

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Doctorado en Ciencias
Ciencias de la Vida
con orientación en Microbiología**

**Aislamiento de actinobacterias y hongos de sedimentos
profundos del golfo de México y evaluación de su
capacidad para biotransformar petróleo crudo pesado y
extra-pesado**

Tesis
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Doctora en Ciencias

Presenta:

Lucia Romero Hernández

Ensenada, Baja California, México
2021

Tesis defendida por

Lucia Romero Hernández

y aprobada por el siguiente comité

Dra. Merixell Riquelme Pérez
Codirectora de tesis

Dr. Rafael Vázquez Duhalt
Codirector de tesis

Miembros del comité

Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra

Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro

Dr. Edgardo Sepúlveda Sánchez

Dra. Alejandra Prieto Davó



Dra. Patricia Juárez Camacho
Coordinadora del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dr. Pedro Negrete Regagnon
Director de Estudios de Posgrado

Lucia Romero Hernández © 2021

Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y director de la tesis.

Resumen de la tesis que presenta **Lucía Romero Hernández** como requisito parcial para la obtención del grado de Doctora en Ciencias de la vida con orientación en Microbiología.

Aislamiento de actinobacterias y hongos de sedimentos profundos del golfo de México y evaluación de su capacidad para biotransformar petróleo crudo pesado y extra-pesado

Resumen aprobado por:

Dra. Meritxell Riquelme Pérez
Codirectora de tesis

Dr. Rafael Vázquez Duhalt
Codirector de tesis

El petróleo sigue siendo la principal fuente de energía mundial para muchas actividades humanas. Dado que las reservas de petróleo convencional se están agotando rápidamente y las fuentes de energía verde son insuficientes aún para satisfacer las demandas energéticas de la humanidad, las grandes reservas de crudo pesado y extra-pesado se están considerando como una alternativa para obtener energía. Sin embargo, su explotación conlleva el riesgo de derrames accidentales, y siendo sus componentes recalcitrantes a la degradación, pueden persistir en el medio ambiente durante décadas y provocar graves daños ecológicos. La biorremediación es uno de los mejores procesos biotecnológicos para tratar de subsanar los daños al medio ambiente, ya sea por bioaumentación o bioestimulación, en donde se pueden emplear microorganismos nativos de la zona contaminada para degradar el petróleo derramado. En este estudio, se aislaron hongos y actinobacterias de sedimentos marinos de diferentes estaciones de las zonas de Perdido y Coatzacoalcos del golfo de México, con el fin de encontrar cepas capaces de degradar petróleo crudo ligero, pesado o extra-pesado. Las cepas de interés se identificaron por morfología macroscópica, por microscopía de contraste por interferencia diferencial (DIC) y por marcadores moleculares. Se aislaron nueve cepas de actinobacterias: *Nocardiosis* sp., *Promicromonospora umidemergen*, *Micromonospora aurantiaca*, *Streptomyces variabilis*, *S. marokkonensis*, y *S. anulatus*. También se aislaron cinco cepas de hongos: *Alternaria* sp., *Penicillium* sp. 1, *Penicillium* sp. 2, *Stemphylium* sp., y *Cladosporium halotolerans*. Todos los microorganismos aislados se cultivaron en medio mínimo Czapek modificado suplementado con petróleo crudo ligero, pesado y extra-pesado como fuente única de carbono. De las cepas de actinobacterias solamente *S. marokkonensis* y *S. variabilis* mostraron crecimiento, aunque muy limitado, con petróleo ligero, por lo que se continuaron los ensayos únicamente con los hongos. Las cepas fúngicas *Alternaria* sp., *Penicillium* sp. 1, *Penicillium* sp. 2, y *Stemphylium* sp. fueron capaces de degradar petróleo crudo pesado, y solamente *Alternaria* sp. pudo crecer en petróleo crudo extra-pesado. El crecimiento de *Alternaria* sp. con petróleo extra-pesado se confirmó por microscopía DIC, microscopía electrónica de barrido (SEM) para verificar y usando como indicador la concentración de proteína intracelular. Además, se llevó a cabo el fraccionamiento del petróleo por el método SARA modificado de los productos de degradación proveniente de los cultivos de *Alternaria* sp. y de los controles abióticos. Las diferentes fracciones se analizaron por cromatografía de gases y se encontró que *Alternaria* sp. degradó el 25.6% del petróleo total y el 91.3% de la fracción aromática. Estos hallazgos identifican a *Alternaria* sp. como candidato adecuado para la biorremediación de petróleo crudo extra-pesado.

Palabras clave: Actinobacterias, petróleo crudo pesado, micodegradación, hongos marinos de aguas profundas, biorremediación, aislamiento de hongos.

Abstract of the thesis presented by **Lucía Romero Hernández** as a partial requirement to obtain the Doctor of Science degree in Life Sciences with orientation in Microbiology

Isolation of actinobacteria and fungi from deep-sea sediments of the Gulf of Mexico and evaluation of their ability to biotransform heavy and extra-heavy crude oil

Abstract approved by:

Dra. Meritxell Riquelme Pérez
Thesis Co-director

Dr. Rafael Vázquez Duhalt
Thesis co-director

Petroleum remains as the main source of global energy for many human activities. Since conventional oil reserves are quickly depleting and the clean energy sources are still insufficient to supply humanity's energy demands, the large reserves of heavy and extra-heavy crude oil are being considered as an alternative to obtaining fossil energy. However, their extraction represents a risk of accidental spills, and their recalcitrant components may be resistant to degradation, and persist in the environment for decades, causing serious ecological damage. Bioremediation is one of the most viable options to reduce the environmental damage by either bioaugmentation or biostimulation where native microorganisms of the contaminated area can be used to degrade the spilled oil. In this study, fungi and actinobacteria were isolated from marine sediment from different stations in Perdido and Coatzacoalcos areas from the Gulf of Mexico, to assess the ability of the strains to degrade light, heavy or extra-heavy crude oil. The strains were identified by macroscopic morphology, microscopically by Differential interference contrast (DIC) microscopy, and by molecular markers. Nine strains of actinobacteria were isolated and identified: *Nocardiopsis* sp., *Promicromonospora umidemergens*, *Micromonospora aurantiaca*, *Streptomyces variabilis*, *S. marokkonensis*, and *S. anulatus*. Five strains of fungi were also isolated and identified: *Alternaria* sp., *Penicillium* sp., *Penicillium* sp. 2, *Stemphylium* sp., and *Cladosporium halotolerans*. All microorganisms were cultured in modified Czapek minimal medium supplemented with light, heavy and extra-heavy crude oil as the sole carbon source. From the Actinobacteria strains, only *Streptomyces marokkonensis* and *S. variabilis* showed limited growth with light crude oil; therefore, subsequent assays were performed only with fungi. It was found by DIC microscopy and SEM microscopy, that *Alternaria* sp., was able to grow with extra-heavy crude oil, and the intracellular protein was also measured. The extra-heavy crude oil degraded by *Alternaria* sp. was fractionated by the modified SARA method, including abiotic controls. The fractions were analyzed by gas chromatography, and it was found that *Alternaria* sp. degraded 25.6% of the total oil and, interestingly, the 91.3% of the aromatic fraction. These findings identify *Alternaria* sp. as a suitable candidate for bioremediation of extra-heavy crude oil.

Keywords: Actinobacteria, heavy crude oil, mycodegradation, deep-sea fungi, bioremediation, fungal isolation.

Dedicatoria

Para Elisa

Por los pasos que te quedaron
pendientes, te dedico todo los
míos.

Agradecimientos

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), y su programa de Posgrado en Ciencias de la Vida, muy especialmente al Departamento de Microbiología, al personal académico, técnico y administrativo por brindarme siempre su apoyo a lo largo de estos años.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca otorgada 471004 por medio del Fondo Sectorial CONACyT - SENER – Hidrocarburos 2017.

Al Consorcio de Investigación del golfo de México (CIGOM) por facilitar las muestras de sedimento marino para realizar ese proyecto.

A la Dra. Meritxell Riquelme, mi más profundo agradecimiento por tu guía durante estos años, por siempre tener una palabra de aliento, una lección que enseñar, por tu inquebrantable profesionalismo. Ha sido un honor estar en tu equipo de trabajo, tus enseñanzas las atesoraré por siempre.

Al Dr. Rafael Vázquez, toda mi gratitud y admiración por usted, gracias por siempre tener un trato tan amable y cordial, por su paciencia y por compartirme un poco de su conocimiento, este trabajo no hubiera finalizado sin su invaluable apoyo.

A mi comité, a la Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra, al Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro, al Dr. Edgardo Sepúlveda Sánchez y a la Dra. Alejandra Prieto Davó, gracias por su guía y tiempo en las múltiples reuniones que tuvimos, por su paciencia y por todo su apoyo durante estos años. Siempre estaré agradecida con cada uno de ustedes.

A la M. A. Itandehui Betanzo Gutiérrez por su amistad y apoyo durante este proceso, gracias por tu guía y todas tus palabras. A la Dra. Olga Callejas, Guillermo González, al Dr. Diego Delgado y al M. C. Juan Manuel Martínez del Departamento de Microbiología, por su valioso apoyo en el laboratorio. A la M. C Karla Sidon por su asesoría y por la recolección de sedimentos.

A la Dra. Patricia Vélez por compartirme tu conocimiento, por todo tu apoyo y guía desde que llegamos juntas a Ensenada. Gracias por tu confianza, tu amistad y por siempre estar para mí, siempre te estaré agradecida, te admiro mucho.

A mi familia:

A mi mamá, Elia Hernández, gracias por siempre darme libertad para ser quien yo quiera ser, por escucharme y guiarme con todo tu amor, por tu fortaleza y por ser un ejemplo de vida para mí, nunca acabaré de agradecer a la vida por tenerte como mamá.

A mi Papá, Camilo Romero, gracias por siempre darme tanto, por contagiarme tu amor a la ciencia, por ser un humano libre, por tu sentido del humor y por darme tanto amor. No cambiaría absolutamente nada de ti, eres el mejor papá.

A mi hermana Elia Romero, gracias por tu cariño, por siempre preocuparte por mí, por cuidarme y por aceptarme como soy, te quiero mucha hermana.

A mi tía Elia, por tu mundo mágico, por consentirme tanto, estarás en mí siempre. A mi tía Lilia por darme una niñez tan alegre. A mi Abuelo, por todas sus enseñanzas y por su dulzura.

A mis amigos:

A Esperanza Rodríguez, agradezco a la vida poder llamarte amiga, hemos sido cómplices en esta vida ya por tantos años y hemos compartido tanto aun a la distancia, que me faltan palabras para decirte como te quiero y como agradezco que seas mi incondicional. Gracias por siempre estar, por escucharme y por tu fe inquebrantable por mí. Por ser mi hermana, por incluirme en tu familia y hacerme parte de ella, te estará eternamente agradecida.

A Adria, Arianne y Lluvis, ustedes pasaron por el mismo camino y tuve la fortuna de que fueran mis guías en cada paso que tomé en este camino. Gracias por su cariño, por escucharme, por todos sus consejos, por preocuparse siempre por mí. Son una parte fundamental de mi vida, las quiero muchísimo. Lluvis gracias por todo el tiempo compartido en la casita, por la complicidad, por los consejos. Arianne gracias por tu fortaleza, por siempre ser tan franca. Adria gracias por tu calidez, por dar siempre lo mejor de ti y por ser un ejemplo en mi vida.

A Christopher gracias por tu amistad incansable, por estar por más de media vida conmigo, por crecer conmigo. Por las incontables aventuras, por ser mi familia, por todo tu cariño y porque siempre nos seguiremos la pista a través del tiempo y la distancia.

A Memo por creer en mí, porque la distancia nada puede contra nuestra amistad y porque siempre mantendremos la promesa de envejecer juntos.

A Scarlett por traer tanta alegría a mi vida, por tu autenticidad, por todos tus colores. Por nuestra amistad viajera que espero dure tanto como la vida. A José Luis por todos los buenos momentos, por tu calidez y por tu amistad sincera.

A Vicente, gracias por empezar este camino conmigo, sin ti esto no hubiera iniciado. Gracias por tu apoyo, por todas tus enseñanzas y por voltearme el mundo. Yo no sería la misma si no te hubiera conocido, siempre será antes y después de ti.

A Ana Luisa, por ser el oído más paciente, la más loca amistad, por todo tu cariño durante tantos años, por ser mi familia. Por tu fe en mí y tu apoyo, por siempre estar ahí. A mis enanos, gracias por darme tanto amor, son mi familia y los voy a querer siempre.

A la Sra. Rosa Castillo y el Sr. Francisco Rodríguez, me faltan palabras para agradecerles por todo el cariño que me han dado durante estos años, por su calidez, por cuidarme en los tiempos difíciles. Son un ejemplo de vida, los quiero con todo mi corazón, gracias por dejarme ser parte de su familia. Mi eterno agradecimiento por toda su bondad.

A Lolis por tu amistad, por tu alegría y por la paz que siempre das, a Alex por su amistad sincera y ser un humano tan integro, a Fausto y a Leobardo por todos los momentos compartidos en la casita, por las risas y por su amistad, a Florian por su amistad y por ser una persona tan leal a sí mismo, a Edel por las risas y el compañerismo, a Sofía por todo lo compartido y por creer en mí.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatorias.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	x
Lista de tablas.....	xii
Capítulo 1. Introducción	
1.1 El petróleo como fuente de energía	1
1.2 Biorremediación	3
1.3 Transformación biológica del petróleo	5
1.4 Actinobacterias	7
1.5 Bioprospección de actinobacterias y degradación de hidrocarburos de petróleo	9
1.6 Identificación de hongos y metabolismo de hidrocarburos aromáticos policíclicos	10
1.7 Justificación	12
1.8 Hipótesis.....	13
1.9 Objetivos	14
1.9.1 Objetivo general.....	14
1.9.2 Objetivos específicos.....	14
Capítulo 2. Metodología	
2.1. Actinobacterias	15
2.1.1. Recolección de muestras	15
2.1.2. Aislamiento e identificación molecular de actinobacterias	17
2.1.3. Ensayos de compatibilidad de actinobacterias	20
2.1.4. Crecimiento de actinobacterias usando petróleo crudo ligero, pesado y extra-pesado como fuente única de carbono	21
2.2. Hongos	23
2.2.1. Aislamiento e identificación de hongos marinos	23
2.2.2. Ensayos de compatibilidad de hongos	27
2.2.3. Evaluación de crecimiento con petróleo crudo como única fuente de carbono	27

2.2.4. Análisis microscópico	28
2.2.5. Cuantificación del crecimiento de hongos.....	28
2.2.6. Extracción líquido-líquido	29
2.2.7. Análisis SAP	29
Capítulo 3. Resultados	
3.1. Actinobacterias	31
3.1.1. Identificación de actinobacterias aisladas	31
3.1.2. Morfología macroscópica y microscópica.....	32
3.1.3. Árbol filogenético.....	39
3.1.4. Análisis de inhibición.....	40
3.1.5. Crecimiento de cepas usando petróleo como fuente única de carbono.....	42
3.2. Hongos	43
3.2.1. Todos los aislados de hongos recuperados pertenecían al phylum Ascomycota.....	43
3.2.2. Los ensayos de compatibilidad no muestran inhibición de crecimiento entre las cepas de hongos.....	47
3.2.3. Degradación de petróleo crudo extra-pesado por <i>Alternaria</i> sp.....	48
3.2.4. <i>Alternaria</i> sp. degrada principalmente los componentes aromáticos del petróleo crudo extra-pesado.....	53
Capítulo 4. Discusión	55
Capítulo 5. Conclusiones	61
Literatura citada	62

Lista de figuras

Figura		Página
1	Taxonomía actual de las actinobacterias.....	8
2	Árbol filogenético esquemático que ilustra grupos adicionales que se ramifican cerca del origen el clado fúngico.....	11
3	Localización de las veinticuatro estaciones de muestreo.....	15
4	Modelo del Dominio III del 23S de rRNA	18
5	Tiempo de precipitación de una gota de petróleo extra-pesado	22
6	Estructura del gen de la β -tubulina (benA) y localización de los oligonucleótidos Bt2a y Bt2b y de los oligonucleótidos degenerados LR1 y LR2.....	23
7	Primocultivos de sedimentos marinos.	31
8	Electroforesis de amplicones de 23S rRNA.....	31
9	Electroforesis de los amplicones 16S rRNA	32
10	Morfología macroscópica y microscópica de la cepa LRH-P-N2-1.....	33
11	Morfología macroscópica y microscópica de la cepa LRH-C-C11-3.....	34
12	Morfología macroscópica y microscópica de la cepa LRH-P-B7-11	35
13	Morfología macroscópica y microscópica de la cepa LRH-C-D18-13.....	36
14	Morfología macroscópica y microscópica de la cepa LRH-C-D15-21 y LRH-C-C11-19.....	37
15	Morfología macroscópica y microscópica de las cepas LRH-P-N6-10 y LRH-C-C11-12	38
16	Análisis evolutivo por el Método Máxima Similitud	39
17	Ensayo de compatibilidad de actinobacterias	40
18	Ensayo de compatibilidad de hongos y actinobacterias.....	41
19	Cultivos de <i>Streptomyces variabilis</i>	42

20	Tinción con safranina de <i>Streptomyces variabilis</i> (izquierda) y <i>Streptomyces marokkonensis</i> (derecha).....	42
21	Macromorfología y micromorfología de aislados de hongos.....	44
22	Análisis evolutivo por el Método de Máxima Verosimilitud para A) 18S, B) ITS y C-D) β -tubulina.....	45
23	Ensayo de compatibilidad de hongos	47
24	Microscopía de contraste de interferencia diferencial de micelio de hongos cultivados en medio mínimo Czapek con 5% p/v de petróleo pesado (16-20° API).....	49
25	Microscopía de contraste de interferencia diferencial de <i>Alternaria</i> sp. cultivado en medio mínimo Czapek con 5% p/v de petróleo extra-pesado 7-10° API).	50
26	Microscopía electrónica de barrido de <i>Alternaria</i> sp. cultivado en medio mínimo Czapek con 5% p/v de petróleo extra-pesado (7-10° API).	50
27	Contenido de proteína de <i>Penicillium</i> spp. obtenido con diferentes concentraciones de petróleo crudo ligero (0.25%, 0.5% y 0.75%).	51
28	Matraces de <i>Alternaria</i> sp. con medio mínimo Czapek modificado	52
29	Porcentaje de degradación de hidrocarburos después de 30 días de crecimiento de <i>Alternaria</i> sp. con petróleo extra-pesado (7-10° API)	53
30	Cromatogramas de petróleo extra-pesado completo y sus fracciones SAP	54

Lista de tablas

Tabla	Página
1. Geolocalización y datos de las estaciones muestreadas en el golfo de México.	16
2. Composición de los cinco medios utilizados para inocular los sedimentos marinos. Todos los medios de cultivo se prepararon en 1 litro de agua destilada conteniendo 32 gramos de sal de mar artificial para obtener una gravedad específica de 1.002.	17
3. Secuencias de los oligonucleótidos para amplificación del gen 23S rRNA y del gen 16S rRNA.	18
4. Secuencias de ADN de referencia del marcador 16S utilizado en el análisis filogenético.	19
5. Composición del medio mínimo Czapek modificado.	21
6. Secuencias de ADN de referencia de los marcadores ITS rDNA, 18S, y β -tubulina utilizados en los análisis filogenéticos.	24
7. Estaciones de donde se aislaron los hongos.	47
8. Crecimiento de hongos seleccionados en petróleo crudo de diferentes densidades. El cultivo se llevó a cabo en 50 mL de medio mínimo Czapek modificado con 0.5% p/v de petróleo crudo como única fuente de carbono. La presencia de hifas se indica con (+) y la ausencia con (-).	48

Capítulo 1. Introducción

1.1 El petróleo como fuente de energía

Los hidrocarburos (HC) del petróleo son una importante fuente de energía y la materia prima de diversos productos industriales. La creciente demanda de productos derivados del petróleo en la vida cotidiana puede causar su escasez y aumentar costos, ya que todavía no se encuentran alternativas que los puedan suplir (Konur, 2021; Varjani y Upasani, 2016). Los HC del petróleo contienen proporciones variables de carbono e hidrógeno y en menor cantidad nitrógeno, azufre y oxígeno (Chandra et al., 2013; Varjani y Srivastava, 2015a). La composición del petróleo crudo puede variar según la ubicación y la edad de un campo petrolero, así como la profundidad del pozo petrolero (Varjani et al., 2014).

Aunque no existe una definición estricta para el petróleo crudo, de acuerdo al *American Petroleum Institute*, el petróleo se puede clasificar como ligero, medio, pesado o extra-pesado comparando la gravedad específica del crudo con la gravedad específica del agua (Magoon, 1988). La naturaleza compleja del petróleo crudo no convencional hace que el estudio de su composición molecular sea difícil y costoso. Como en el caso de los crudos convencionales, el fraccionamiento ha sido ampliamente utilizado para caracterizarlos. Esta metodología separa el petróleo crudo en cuatro fracciones principales (saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos, SARA) según su polaridad y solubilidad (Gudiña y Teixeira, 2017).

Los compuestos aromáticos son moléculas anilladas de HC y se dividen principalmente en HC aromáticos monocíclicos (MAH), (benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos o BTEX) (Costa et al., 2012; Farhadian et al., 2008), y HC aromáticos policíclicos (HAP) (Chandra et al., 2013). Los HAP contienen más de un anillo de benceno. Algunos están formados por dos o tres anillos cíclicos que forman cadenas hexagonales con dobles enlaces como el naftaleno (dos anillos), o el fenantreno y el antraceno (tres anillos) conocidos como HAP ligeros o de peso molecular bajo (Wilkes et al., 2016). Los HAP compuestos por cuatro anillos o más, como el pireno y los crisenos (cuatro anillos), o el fluoranteno y el benzo[a]pireno (cinco anillos) se conocen como HAP de alto peso molecular o pesados (Costa et al., 2012; Farhadian et al., 2008).

El asfalteno es el componente más complejo del petróleo (Gough y Rowland, 1990). La estructura de los asfaltenos tiene una gran importancia económica ya que su arquitectura molecular ha sido motivo de debate por mucho tiempo (Mullins et al., 2007). Algunos estudios indican que las moléculas de

asfalteno están conformadas por agregados de hidrocarburos aromáticos policíclicos llamados islas, mientras que las estructuras con múltiples agregados de HAP se denominan archipiélagos y éstos contribuyen a la complejidad de estas moléculas (Sabbah et al., 2011). Estudios recientes han descrito una tercera arquitectura molecular adicional en el asfalteno, conocida como *aryl-linked core*, aunque sigue debatiéndose si pertenece a las islas o archipiélagos (Schuler et al., 2020) y las dificultades asociadas a la formación de estos agregados radican en la dificultad para separarlos (Alshareef et al., 2011).

Los asfaltenos están relacionados a una gran problemática en la industria petrolera. Las fracciones de asfaltenos no deseadas dificultan la producción, el transporte y el refinado de petróleo (Ancheyta et al., 2010; Mullins et al., 2007). La presencia de altas concentraciones de asfaltenos y de metales pesados aumentan los costos de refinación, disminuyendo el beneficio económico en comparación con los crudos ligeros y medios convencionales (León y Kumar, 2005; Rana et al., 2007), por lo que es necesario desarrollar nuevas tecnologías para mejorar la calidad de los crudos pesados y extra-pesados.

Hoy en día, los combustibles fósiles siguen siendo la fuente de energía más importante del mundo, ya que representan entre el 80 y el 90% de la producción mundial de energía. El petróleo crudo y el gas contribuyen alrededor del 60% (Graus et al., 2011; Strubinger et al., 2015). Se estima que, en los próximos 20 años, a pesar de los esfuerzos para desarrollar recursos de energía renovable como los biocombustibles, la energía solar y la energía eólica, el 80% de las necesidades energéticas del mundo provendrán del petróleo, del gas natural y del carbón (Mirchi et al., 2012; Shibulal et al., 2014). Como resultado, la demanda de petróleo crudo para producir combustibles refinados y productos petroquímicos está aumentando. En contraste, las reservas convencionales de crudo ligero están disminuyendo anualmente un 4.5% (Höök et al., 2009).

Históricamente, la demanda de crudos pesados y extra-pesados ha sido muy baja debido a su alta viscosidad, alta densidad y a su compleja composición, en comparación con los crudos ligeros convencionales (Harner et al., 2011). Sin embargo, el agotamiento progresivo de los crudos ligeros de alta calidad ha llevado a un aumento en la producción de crudos no convencionales y se espera que esta tendencia continúe en las próximas décadas. Su incorporación a los mercados de energía representa un desafío importante que requiere el desarrollo de tecnologías sostenibles para poder tener acceso a estas fuentes de energía emergentes (León y Kumar, 2005; Shibulal et al., 2014; Strubinger et al., 2015).

En el mundo existen grandes depósitos de petróleo crudo pesado y extra-pesado. En los Estados Unidos de América se estima que las reservas de petróleo crudo pesado son siete veces más grandes que

las reservas de petróleo crudo convencional (Meyer y Schenk, 1988). Las reservas de petróleo crudo pesado y extra-pesado más grandes del mundo se encuentran en la franja petrolífera de Orinoco en Venezuela, las arenas bituminosas de Athabasca de Alberta en Canadá y en las arenas bituminosas de Olenik en Siberia, Rusia (Uribe-Alvarez et al., 2011). En México, las reservas de crudos se estiman en 9,711 millones de barriles (MMb), de los cuales, de acuerdo a la clasificación de Pemex, 62% equivalen a crudo pesado, 29% a crudo ligero y 9% a crudo súper ligero (PEMEX, 2015). Las reservas 3P de crudo, que incluyen las reservas probables (2P) y las posibles (1P), alcanzan 25,825 MMb, correspondiendo 56% a crudo pesado, 33% a crudo ligero y 11% a crudo súper ligero (PEMEX, 2015). México se sitúa en el lugar 19 a nivel mundial, por sus reservas probadas de petróleo crudo, calculadas en MMb a enero del 2016 (Hidrocarburos, 2017).

1.2 Biorremediación

En los océanos donde existen explotaciones petroleras, se ha transportado y vertido una gran cantidad de petróleo, resultando en una contaminación de diversos ambientes marinos, las fugas y derrames accidentales ocurren regularmente durante la exploración, producción, refinación, transporte y almacenamiento de crudo y sus productos derivados (Kvenvolden y Cooper, 2003). La remediación de los sitios contaminados por HC y la mejora en los procesos de recuperación del petróleo son dos de los principales problemas de la industria petrolera (Sajna et al., 2015; Varjani y Srivastava, 2015b) y ambos procesos están influenciados por el tipo de HC de petróleo. Los HC contaminantes derivados del petróleo pueden ser compuestos recalcitrantes y se clasifican como contaminantes prioritarios (Costa et al., 2012). Esta contaminación afecta al medio ambiente y representa un riesgo para la salud de todas las formas de vida (Sajna et al., 2015).

Los diferentes componentes contaminantes del petróleo en el ambiente pueden ser degradados por la población natural de microorganismos que habitan estos lugares. Este proceso tan importante es el responsable de eliminar estos contaminantes en la naturaleza. En el medio marino, la biorremediación se considera la tecnología más limpia, efectiva y atractiva para disminuir los niveles de contaminación (Kumar et al., 2011), y una de las soluciones más rápidas para degradar hidrocarburos de petróleo (Kumar et al., 2011; Naeem y Qazi, 2020). La tecnología de biorremediación se basa en el uso de las diversas capacidades metabólicas de los microorganismos para la degradación y eliminación de muchos contaminantes ambientales (Das y Chandran, 2011; Medina-Bellver et al., 2005). Existen diferentes

estrategias de biorremediación que se aplican generalmente en entornos terrestres afectados por un derrame de petróleo como son: i) La bioaumentación, que es la adición de bacterias degradadoras de petróleo para complementar o enriquecer la biota microbiana existente, y ii) la bioestimulación, en donde se aplican fertilizantes (nutrientes), para estimular el crecimiento de los microorganismos degradadores de petróleo nativos (Das y Chandran, 2011).

Los géneros bacterianos *Gordonia*, *Brevibacterium*, *Aeromicrobium*, *Dietzia*, *Burkholderia*, y *Mycobacterium* aislados de suelos contaminados con petróleo ligero BAL 150 (38% HC saturados, 38% aromáticos, 11% resinas y 13% asfaltenos) demostraron ser microorganismos potencialmente capaces de llevar a cabo la degradación de HC, al igual que los géneros de hongos filamentosos *Amorphoteca*, *Neosartorya*, *Talaromyces*, y *Graphium*, y de levaduras *Candida*, *Yarrowia*, y *Pichia*, por mencionar algunos (Chaillan et al., 2004).

Se han reconocido una serie de factores limitantes que afectan la biodegradación de HC del petróleo, siendo la composición del petróleo el factor más importante y decisivo cuando se valora la viabilidad de la biorremediación (Brusseau, 1998). La temperatura es otro de los factores importantes ya que afecta la química del contaminante, y la fisiología y diversidad de los microorganismos. A menor temperatura, se reduce la actividad metabólica y la velocidad de biodegradación (Atlas, 1975). También, la disponibilidad de nutrientes, específicamente de nitrógeno y fósforo, puede actuar como un factor limitante en la degradación de carbono, aunque también el exceso de éstos y del potasio pueden afectar negativamente la biorremediación (Atlas, 1975).

Todos los aspectos antes mencionados influyen en el éxito de la biorremediación. No se deben seleccionar solamente cepas capaces de degradar HC, sino que además se ha de considerar su capacidad para proliferar y tener actividad en los medios donde se inocule. Factores tales como la dinámica de poblaciones microbianas, distribución espacial y temporal de las comunidades microbianas, y capacidad del inóculo para sobrevivir y proliferar, son decisivos (Thompson et al., 2005). Los lugares de los que se aíslan estos microorganismos deben ser, preferentemente, las mismas zonas donde han ocurrido derrames de petróleo y en diversos estudios se ha evaluado su capacidad para degradar HC mediante su inoculación en medios de cultivo con petróleo crudo o fracciones de éste (Harwati et al., 2007).

En el golfo de México se ha encontrado una gran diversidad microbiana en zonas afectadas por derrames de petróleo, incluyendo las costas de Florida y el delta del río Mississippi, en Estados Unidos, y Campeche y Veracruz, en México. En estos sitios se han detectado bacterias degradadoras de petróleo

crudo, como Gammaprotobacteria (*Alcanivorax*, *Marinobacter*), y Alphaproteobacteria (*Rhodobacteraceae*) (Kostka et al., 2011), así como algunos géneros de bacterias hidrocarbonoclastas tales como *Hydrocarboniphaga*, *Pseudomonas* y *Pseudoxanthomonas* (Mortazavi et al., 2013). En Indonesia se evaluó la capacidad degradadora de las bacterias aisladas del puerto de Semarang. Los microorganismos se inocularon en medio de cultivo líquido con petróleo crudo ligero árabe y por cromatografía de gases y espectrometría de masas, se encontraron géneros que no habían sido reportados como hidrocarbonoclastas, tales como *Kocuria*, *Psychrobacter*, *Erythrobacter*, *Maribius*, *Loktanella*, *Roseivivax*, *Salipiger*, *Roseovarius*, *Alterierythrobacter*, *Thioclava*, *Catellibacterium*, y *Jannaschia* (Harwati et al., 2007).

1.3 Transformación biológica del petróleo

El petróleo puede ser transformado por métodos químicos y térmicos, sin embargo, estos métodos pueden contaminar el ambiente, por lo que hay un interés creciente en la aplicación de tratamientos biológicos para reducir la viscosidad y densidad de los aceites crudos no convencionales, como una alternativa más económica y respetuosa con el medio ambiente, o bien, como una tecnología complementaria (Harner et al., 2011; León y Kumar, 2005; Rana et al., 2007).

Se ha prestado especial atención a la mejora biológica de los crudos pesados y extra-pesados, cuyo objetivo es mejorar su valor y facilitar su producción, transporte y procesado. Las reacciones que podrían mejorar las propiedades del petróleo crudo pesado incluyen la escisión de grandes cadenas alifáticas, anillos aromáticos heterocíclicos, resinas y moléculas de asfaltenos para así obtener compuestos más pequeños. Con esto se podría obtener petróleo crudo con menor peso molecular promedio, y al mismo tiempo, modificar sus interacciones con otras moléculas, lo que resultaría en el reordenamiento de los agregados para liberar las moléculas más pequeñas. Al reducir la viscosidad del petróleo se mejoran sus propiedades de flujo, lo que aumenta su movilidad a través de los depósitos y tuberías (Premuzic y Lin, 1999; Premuzic et al., 1999; Tavassoli et al., 2012). Las tecnologías que involucran el uso de microorganismos o sus metabolitos para movilizar petróleo pesado atrapado en reservorios rocosos, pueden contribuir significativamente a su recuperación (Zhang et al., 2020).

Existen reportes de cepas bacterianas capaces de usar asfaltenos como única fuente de carbono y energía. La mayoría de estas bacterias fueron aisladas de muestras de crudo pesado y extra-pesado, e

incluyen bacterias Gram-negativas (*Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Flavimonas*, *Flavobacterium*) y Gram-positivas (*Corynebacterium*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Staphylococcus*). Los consorcios bacterianos son más efectivos en la bioconversión de asfaltenos que los monocultivos puros, porque la transformación efectiva de los diferentes constituyentes de la fracción asfáltica requiere la acción sinérgica de diferentes microorganismos con una amplia especificidad de sustrato (Pendry, 1989; Pineda-Flores et al., 2004; Tavassoli et al., 2012). Además de las bacterias, también se han reportado levaduras y hongos filamentosos con capacidad de mejorar los aceites crudos pesados y extra-pesados, como es el caso de *Neosartorya fischeri* (reclasificada como *Aspergillus fischeri*), aislada de un lago de asfalto natural del estado de Sucre en Venezuela. Este hongo fue capaz de crecer utilizando asfaltenos como única fuente de carbono y energía, degradando hasta el 13% de ellos (Uribe-Alvarez et al., 2011).

Un co-cultivo de los hongos *Pestalotiopsis* sp. NG007 y *Polyporus* sp. S133 exhibió una alta degradación de la fracción asfáltica del petróleo crudo ligero (Yanto y Tachibana, 2014). El 81% de las resinas y el 79% de los asfaltenos se degradaron después de 30 días de incubación a 25°C. Se determinó que hubo un efecto sinérgico en el co-cultivo que mejoró la producción de enzimas degradantes (catecol dioxigenasas, lacasas, peroxidasas de manganeso, y peroxidasas de lignina) en comparación con los cultivos puros. En los ensayos de biodegradación realizados con las enzimas extraídas de los cultivos de hongos, la mezcla de las enzimas producidas por ambos hongos fue más efectiva para degradar la fracción asfáltica en comparación con las enzimas producidas por cada hongo individualmente (Yanto y Tachibana, 2014). El hongo extremófilico *Pestalotiopsis palmarum* BM-04, también aislado de un lago de asfalto en Venezuela, sintetizó una exoenzima oxidativa que cataliza la biotransformación del asfaltenos y la fracción rica de petroporfirinas de petróleo extra-pesado biotratado (Naranjo-Briceño et al., 2019).

La bioconversión de crudos pesados a crudos livianos en los reservorios de petróleo puede contribuir también a recuperar mayores cantidades de petróleo crudo pesado atrapado, evitando los problemas relacionados con su extracción y transporte. La bioconversión es una alternativa más eficiente, económica y ecológica que los procesos químicos o térmicos tradicionales empleados para facilitar la recuperación de estos crudos no convencionales (Gudiña y Teixeira, 2017).

1.4 Actinobacterias

Las actinobacterias tienen células filamentosas denominadas hifas, al igual que los hongos filamentosos. Son bacterias Gram-positivas con un alto contenido de guanina y citosina en sus genomas, cuyo gen 23S rRNA contiene un inserto de 100 pb en la parte media, que está ausente en el resto de las bacterias (Roller et al., 1992). Crecen por extensión de la punta de las hifas y ramificación. Anteriormente se consideraban formas transitorias entre los hongos y las bacterias, pues ambos producen micelio y muchos de ellos se reproducen por esporulación (Barka et al., 2016).

Estudios ecológicos en diversos medios ambientes han mostrado que la mayor biodiversidad de actinobacterias se encuentra en los océanos. El medio marino es un ambiente que no ha sido explorado tan extensamente como el medio terrestre y por lo tanto podría contener una gran cantidad de actinobacterias desconocidas, capaces de sintetizar metabolitos y enzimas no clasificadas. Las actinobacterias marinas tuvieron que adaptarse a condiciones de presión extremadamente altas a temperaturas por debajo de 0-8° C en el lecho marino profundo, condiciones ambas por las cuales se supone que la biodiversidad es muy diferente a la que se encuentra en los medios terrestres (Bull et al., 2005; Magarvey et al., 2004). Las actinobacterias tienen funciones importantes; son agentes del ciclo global del carbono y nitrógeno, son usadas en biorremediación, pueden ser utilizadas como probióticos en humanos y animales, y producen enzimas y metabolitos de importancia clínica (Law et al., 2020).

Rhodococcus marinonascens fue la primera especie marina de actinobacterias que se caracterizó, y su descubrimiento reveló la existencia de actinobacterias capaces de sobrevivir en los océanos (Jensen et al., 2005). Los miembros de los géneros *Dietzia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Salinispora*, *Marinophilus*, *Salinibacterium*, *Aeromicrobium*, *Williamsia*, y *Verrucosipora* han sido designados como actinobacterias marinas autóctonas y actualmente se está realizando un esfuerzo a nivel mundial en la búsqueda de aquellas que aún no hayan sido clasificadas (Stach et al., 2004).

La taxonomía del phylum *Actinobacteria* (Figura 1) fue recientemente actualizada tomando en cuenta la reclasificación de los microorganismos por el gen 16S rRNA y contiene ahora seis clases: *Actinobacteria*, *Acidimicrobiia*, *Coriobacteriia*, *Nitriliruptoria*, *Rubrobacteria*, y *Thermoleophilia* (Barka et al., 2016). Los diferentes géneros que conforman este phylum son muy diversos en cuanto a morfología, fisiología y capacidad metabólica. De forma general los subórdenes se elevaron a órdenes y las subclases a clases (Gao y Gupta, 2012).

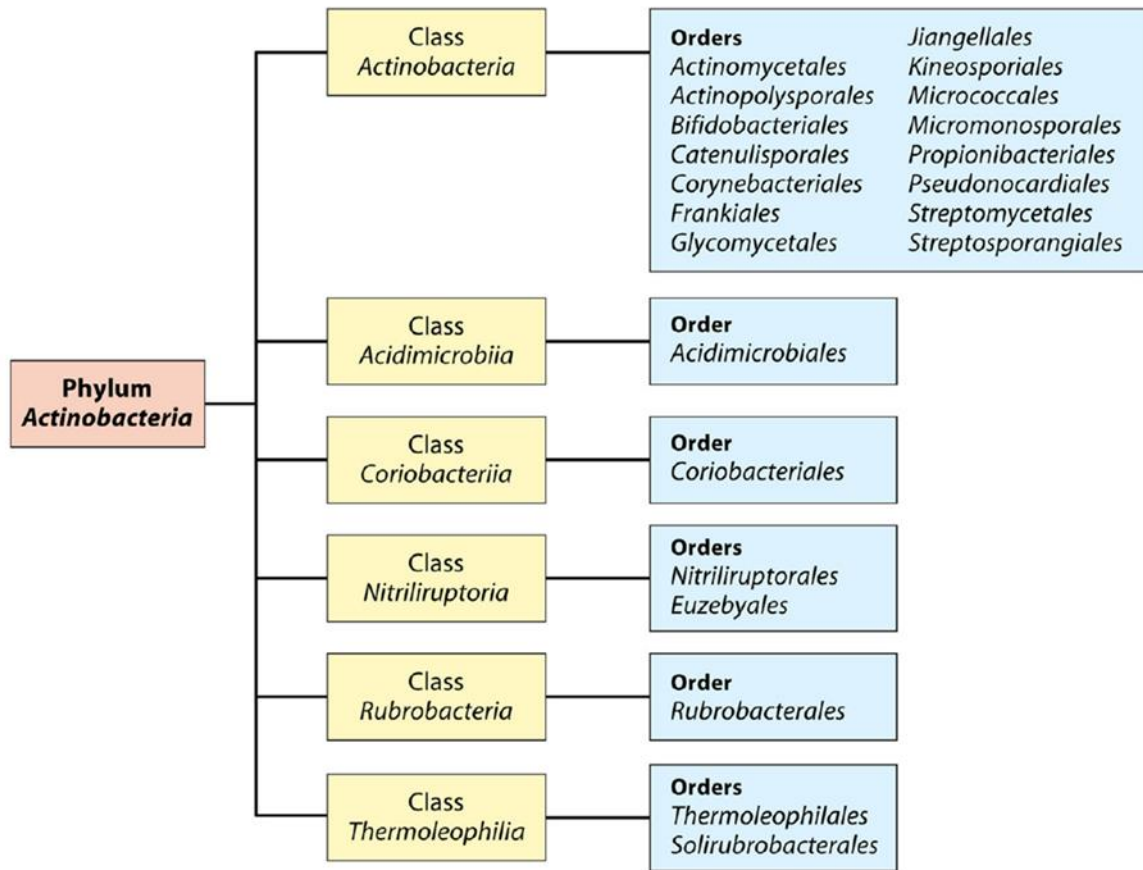


Figura 1. Taxonomía actual de las actinobacterias. Phylum Actinobacteria de acuerdo al Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Gao y Gupta, 2012).

Las principales características utilizadas para delinear la taxonomía de las actinobacterias a nivel de género y especie son la morfología microscópica y la quimiotaxonomía. La quimiotaxonomía se basa principalmente en la composición de la pared celular, el estudio de la secuencia de su ADN y la distribución de azúcares en las células, aunque la composición de fosfolípidos y el tipo de menaquinona también son considerados para la descripción de la arquitectura de la pared celular de las actinobacterias (Labeda, 1987). En cuanto a la clasificación por morfología microscópica, ésta se basa en la morfología del micelio (formación de micelio vegetativo, micelio aéreo, formación de cocos, hifas fragmentadas), morfología de las cadenas de esporas (esporas unicelulares, cadenas de esporas, formación de esporangios y presencia de flagelos, longitud de las cadenas de esporas, etc.) y pigmentos melanoides producidos por polimerización oxidativa de compuestos fenólicos e indólicos (Barka et al., 2016).

A nivel macroscópico las colonias pueden ser de aspecto pulverulento o de consistencia dura y adherida firmemente a la superficie del agar, y pueden producir esporangios, conidios e hifas parecidas a las de los hongos (Ranjani et al., 2016).

1.5 Bioprospección de actinobacterias y degradación de hidrocarburos de petróleo

Las actinobacterias son los organismos procariontes con el mayor valor económico y biotecnológico. Tienen un excelente desempeño en biorremediación y en la síntesis de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana. Por estas razones ha habido un esfuerzo significativo que ha culminado en el aislamiento exitoso de nuevos géneros y especies de estas bacterias provenientes de fuentes terrestres y marinas (Lam, 2006; Salanas, 2009). La rápida colonización de las hifas bacterianas y la secreción de enzimas hacen que las actinobacterias sean un buen candidato para el proceso de biorremediación. Además, son capaces de metabolizar polímeros recalcitrantes (HC, xenobióticos y pesticidas tóxicos), plásticos y caucho (Shivlata y Satyanarayana, 2015).

Recientemente, la tasa de descubrimiento de nuevos compuestos de actinobacterias terrestres ha disminuido, mientras que el reaislamiento de compuestos que ya habían sido antes descritos ha aumentado (Lam, 2006). Por lo tanto, es crucial buscar nuevos grupos de actinobacterias de hábitats inexplorados, para así al mismo tiempo descubrir fuentes de nuevos metabolitos secundarios bioactivos. Este esfuerzo también debe ser dirigido al aislamiento de microorganismos que puedan ser usados en la biorremediación, y determinar su capacidad degradadora de petróleo y posteriormente evaluar si son capaces de eliminar los contaminantes del medio (Lam, 2006; Salanas, 2009).

Existen reportes de actinobacterias alcalitolerantes y alcalifílicas capaces de mineralizar HC y otros contaminantes. Se ha encontrado que algunas especies de *Dietzia* pueden degradar contaminantes orgánicos y también producen biosurfactantes o bioemulsionantes durante la degradación de alcanos (Shivlata y Satyanarayana, 2015). En diversos estudios, se han realizado ensayos donde la degradación de hidrocarburos es mayor al formar consorcios con actinobacterias en vez de cultivos axénicos. Tal es el caso del consorcio formado por *Rhodococcus* sp. P18, *Gordonia* sp. H19, y *Rhodococcus* sp. F27 que en combinación con *Pseudomonas monteillii* P26 y *Pseudomonas* sp. N3, pudo degradar el 100% de naftaleno del medio de cultivo, lo cual no fue posible lograr con cultivos axénicos (Isaac et al., 2015). Sin embargo,

hay también múltiples estudios donde se encontró que los cultivos axénicos de cepas de actinobacterias aisladas de ambientes contaminados con petróleo, tienen un gran potencial de degradación. *Actinomyces viscosus* y *A. israelii* pudieron degradar el 98% de 10 g/L de petróleo crudo medio en 12 días y el 97% de 30, 50 y 75 g/L en 16 y 18 días, respectivamente (Olajuyigbe y Ehiosun, 2016). *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 es una actinobacteria que es conocida por su capacidad de degradar una amplia variedad de HAP de alto peso molecular y ha sido posible encontrar, gracias a la secuenciación de su genoma, 194 genes asociados a la degradación de compuestos aromáticos, lo cual sugiere que posee diferencias significativas en su organización y estructura genética en comparación con otros microorganismos como *Pseudomonas* y *Burkholderia* (Kim et al., 2008).

1.6 Identificación de hongos y metabolismo de hidrocarburos aromáticos policíclicos

Históricamente, la identificación de hongos ha supuesto diversos retos. Los numerosos intentos para identificar un carácter genético, molecular o celular que defina el reino Fungi han tenido poco éxito. Algunos de los parámetros propuestos para definir el reino Fungi son la síntesis de lisina por la vía α -aminoadipato (Vogel, 1964), la presencia de ergosterol en la membrana celular (Paterson, 2005) y la composición química de los carbohidratos de la pared celular (Bartnicki-Garcia, 1968). Sin embargo, la búsqueda de un criterio unificador para agrupar a los hongos ha fallado (Richards et al., 2017) porque estas características se encuentran en otros clados del árbol de la vida. El debate continúa por la gran cantidad de ramas altamente diversificadas que son difíciles de agrupar con los hongos (Figura 2) (Richards et al., 2017).

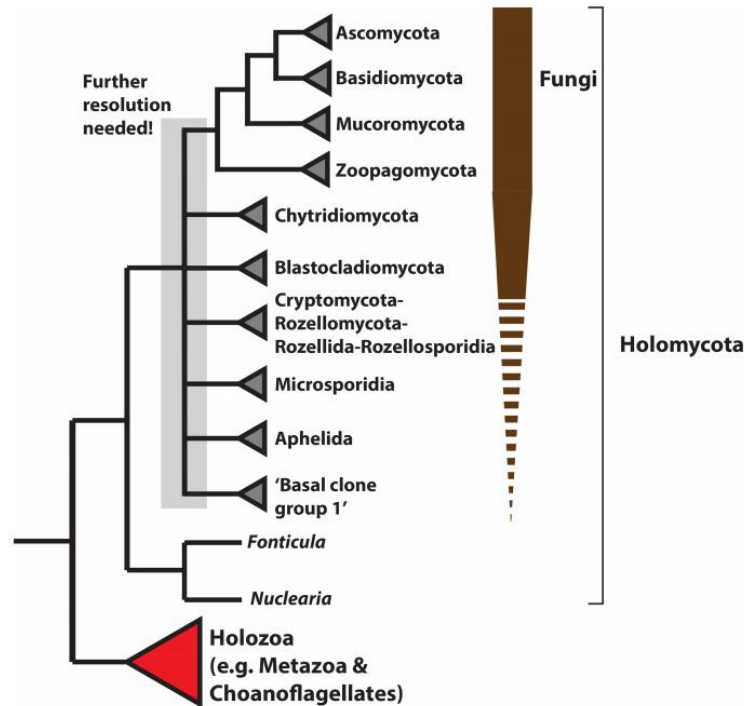


Figura 2. Árbol filogenético esquemático que ilustra grupos adicionales que se ramifican cerca del origen del clado fúngico y la incertidumbre filogenética entre las ramas profundas de los hongos y grupos asociados. El grupo 1 de clon basal está compuesto de secuencias ambientales, que en algunos análisis se ubican cerca de los hongos (Nagahama et al., 2011). Árbol filogenético esquemático que ilustra grupos adicionales que se ramifican cerca del origen del clado fúngico y la incertidumbre filogenética entre las ramas profundas de los hongos y grupos asociados. El grupo 1 de clon basal está compuesto de secuencias ambientales, que en algunos análisis se ubican cerca de los hongos (Nagahama et al., 2011).

Algunos hongos filamentosos han demostrado ser eficientes para eliminar los HAP (Peng et al., 2008). Los mecanismos bioquímicos de muchos hongos Basidiomycota se han estudiado ampliamente debido a su secreción altamente eficiente de enzimas extracelulares solubles capaces de degradar la lignina (Kues, 2015). En los Basidiomycota, la inespecificidad de estas enzimas juega un papel fundamental en la conversión de HAP. Sin embargo, estos hongos utilizan mecanismos enzimáticos adicionales para degradar los HAP. Muchos estudios han demostrado que el sistema enzimático intracelular (citocromos P450, CYPs) está innegablemente involucrado en la conversión de HAP (Aranda, 2016; Črešnar y Petrič, 2011; Ichinose, 2014).

Algunos hongos Ascomycota como *Fusarium* sp. y *Aspergillus* sp. pueden segregar enzimas modificadoras de lignina o ligninolíticas, como por ejemplo manganeso peroxidasa o lignino peroxidasa (Saparrat et al., 2000). Sin embargo, en ambientes contaminados, estas enzimas probablemente no participan en esta conversión porque solo se expresan en presencia de sustratos lignocelulósicos; además,

la mayoría de los Ascomycota (clase Sordariomycetes) no han sido estudiados para evaluar su producción de enzimas ligninolíticas (Aranda, 2016).

Las vías intracelulares de desintoxicación durante la biotransformación de HAP implican la entrada de los compuestos en la célula fúngica y la formación de derivados hidroxilados, dihidroxilados, dihidrodioles y quinonas (fase I), mediada por el sistema de hemoproteínas citocromo P450 y las hidrolasas epoxídicas (EH). Los metabolitos oxidados se conjugan posteriormente con sulfato, metilo, glucosa, xilosa o grupos ácido glucurónico (fase II), un proceso mediado por las transferasas.

Durante la fase III, estos metabolitos se secretan o almacenan en orgánulos, como se observó en el hongo *Fusarium solani* (Fayeulle et al., 2014; Verdin et al., 2006). Una vez que se liberan al medio ambiente, algunos metabolitos pueden degradarse aún más por otros microorganismos, como lo sugieren diferentes autores (Meulenbergh et al., 1997; Schmidt et al., 2010). Sin embargo, el destino de los oxi-HAP, metoxi-HAP o los sulfatos-HAP, una vez que se liberan al medio ambiente, no han sido definidos aún. Parece claro que los hongos autóctonos, principalmente del phylum Ascomycota, pueden jugar un papel importante en la biorremediación de ambientes naturales, pues sin duda, poseen un gran potencial para este fin y la clave parece ser la maquinaria enzimática intracelular codificada en su genoma (Aranda, 2016).

Algunas de estas enzimas promueven la acumulación de metabolitos potencialmente tóxicos en orgánulos específicos, mediante la bioabsorción o la bioacumulación en las hifas. Existen muchas preguntas que siguen sin tener respuesta; hay algunas especies de hongos para las que no se han dilucidado las vías metabólicas intracelulares mediante las cuales degradan HC; tampoco hay un consenso sobre el por qué algunos hongos que habitan en el suelo son capaces de eliminar los xenobióticos (Aranda, 2016).

1.7 Justificación

Los sedimentos marinos profundos del golfo de México son un reservorio de microorganismos con una gran capacidad metabólica y las cepas cultivables pueden ser utilizadas para llevar a cabo procesos de biorremediación de ambientes marinos. El derrame a gran escala ocurrido en el 2010 en la plataforma petrolífera Deepwater Horizon en el golfo de México, ocasionó un grave impacto ambiental,

y marcó un precedente de la importancia de contar con recursos para mitigar el daño ambiental ocasionado por los derrames de petróleo. La bioprospección es una de las opciones más viables para lograr este fin, pues se pueden encontrar cepas nativas del medio ambiente contaminado que sean capaces de degradar el petróleo crudo derramado.

Las reservas de petróleo crudo pesado y extra-pesado representan el 70% del total de las reservas mundiales. Esto, aunado al rápido decremento de las reservas de petróleo ligero, tiene como resultado que el petróleo no convencional se convertirá en una importante fuente de energía en las próximas décadas. En el caso de un accidente accidental de petróleo crudo pesado o extra-pesado, será de vital importancia contar con cepas de microorganismos capaces de biorremediar las fracciones más recalcitrantes y mitigar el daño que de otra forma puede persistir por décadas.

En estudios anteriores pertenecientes a Consorcio de Investigación del golfo de México (CIGOM) se han identificado consorcios de cepas de bacterias que poseen la capacidad de degradar petróleo crudo ligero, y con el análisis de expresión de RNA-seq del hongo *Penicillium* sp. cultivado con hexadecano o 1-hexadeceno se demostró la regulación positiva de los genes involucrados en el transporte transmembrana, el metabolismo de los carbohidratos de seis carbonos y las vías del óxido nítrico (Velez et al., 2020). Sin embargo, no se había realizado ningún estudio de la viabilidad de cultivos axénicos fúngicos y bacterianos para degradar petróleo crudo pesado y extra-pesado. Es por esta razón que este estudio se enfocó en aislar cepas de sedimentos marinos para evaluar la degradación de petróleo crudo no convencional y el crecimiento de los microorganismos usando petróleo crudo como fuente única de carbono.

Encontrar cepas de microorganismos nativos del golfo de México, es un hallazgo que marca un importante precedente para desarrollar estrategias para realizar biorremediación de petróleo pesado y extra-pesado como una alternativa para revertir el daño ecológico ocasionado por derrames de petróleo.

1.8 Hipótesis

Los sedimentos marinos del golfo de México albergan cepas de hongos y/o actinobacterias cultivables con capacidad de degradar petróleo pesado o extra-pesado.

1.9 Objetivos

1.9.1 Objetivo general

Aislar e identificar actinobacterias y hongos de sedimentos marinos del golfo de México y evaluar su capacidad degradadora de petróleo crudo pesado y extra-pesado.

1.9.2 Objetivos específicos

1. Caracterizar taxones de actinobacterias y hongos aislados de sedimentos marinos e identificarlos molecularmente.
2. Estudiar la actividad degradadora de petróleo pesado 16-20° API de las actinobacterias y hongos aislados.
3. Estudiar la degradación de petróleo extra-pesado 7-10° API por las actinobacterias y hongos aislados.

Capítulo 2. Metodología

2.1. Actinobacterias

2.1.1. Recolección de muestras

Las muestras de sedimento marino se recolectaron en la Campaña Oceanográfica de Metagenómica 2, como parte del subproyecto del Consorcio de Investigación del golfo de México (CIGOM) bajo la Línea 4, Cruceros Oceanográficos de Metagenómica (Figura 3). La campaña se realizó de mayo a junio 2017 y se obtuvieron 22 muestras de sedimentos marinos profundos de diferentes estaciones y profundidades (Tabla 1). Las muestras se recolectaron mediante un nucleador de caja Reineck a bordo del buque de investigación Justo Sierra (UNAM), las submuestras se tomaron de los primeros 20 cm de sedimento recolectado en el nucleador, usando jeringas estériles pre cortadas de 50 mL. Las jeringas se sellaron con película plástica y se almacenaron a 4°C para ser transportadas al laboratorio para ser procesadas.

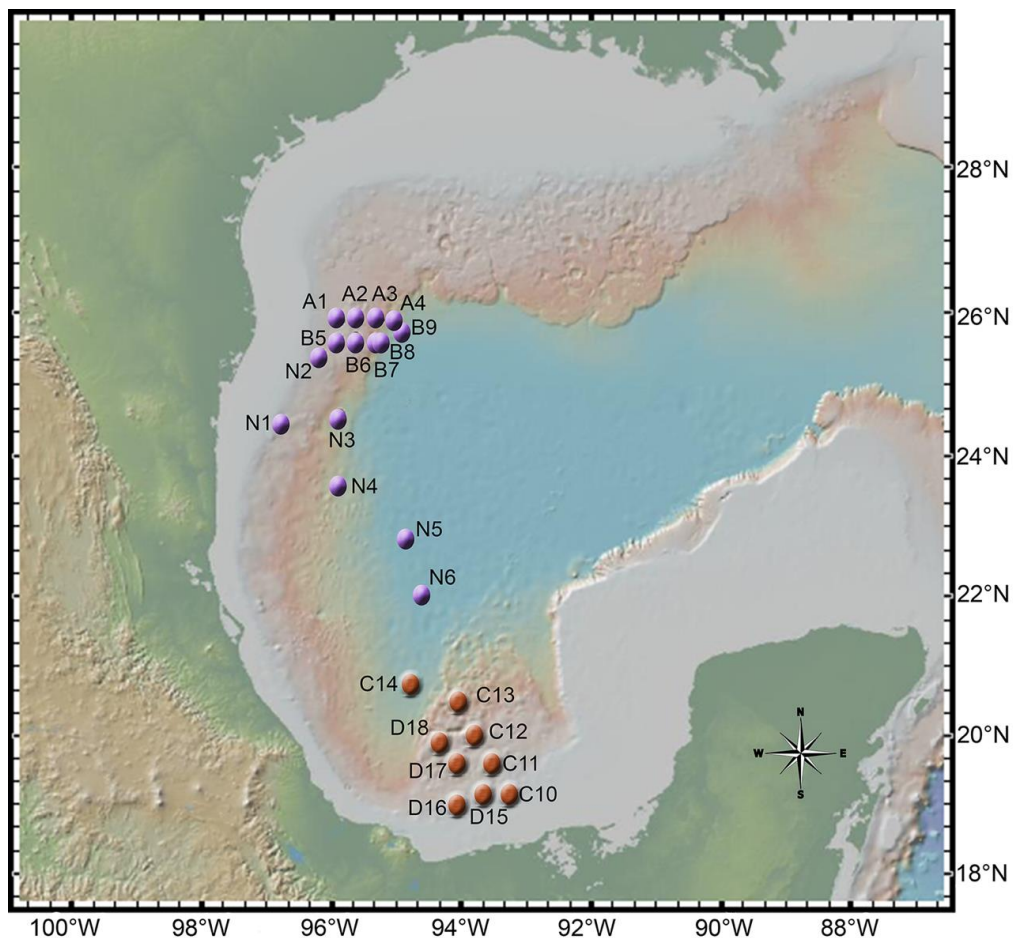


Figura 3. Localización de las veinticuatro estaciones de muestreo. Quince estaciones se localizan en la región de Perdido (estaciones moradas) y nueve en la Cuenca de Coatzacoalcos (estaciones naranjas).

Tabla 1. Geolocalización y datos de las estaciones muestreadas en el golfo de México.

Estación	Longitud [Grados]	Longitud [Min]	Latitud [Grados]	Latitud [Min]	Profundidad (metros)	Temperatura (°C)	Salinidad (psu)	O ₂ disuelto (mL/L)
A1	95	50.130	25.00	53.700	877.00	5.8	27.5	3.4
A2	95	33.829	25.00	53.913	1792.00	4.2	27.7	4.7
A3	95	14.370	25.00	53.320	1926.82	4.2	27.7	4.7
A4	94	42.601	25.00	53.570	3166.00	4.3	27.7	4.6
B5	96	15.359	25.00	39.639	529.00	8.4	27.2	2.5
B6	95	52.510	25.00	39.620	1006.00	5.3	27.5	3.6
B7	95	35.629	25.00	40.523	1374.00	4.4	27.7	4.5
B8	95	15.870	25.00	39.800	2103.00	4.2	27.7	4.7
B9	94	54.913	25.00	40.095	2962.00	4.3	27.7	4.6
C10	93	18.368	19.00	10.430	728.00	6.7	27.4	2.9
C11	93	30.398	19.00	37.380	857.00	5.7	27.5	3.4
C12	93	46.309	20.00	1.116	1452.00	4.3	27.7	4.5
C13	94	18.500	20.00	36.060	2368.00	4.2	27.7	4.7
C14	94	45.130	20.00	43.980	3200.36	4.3	27.7	4.6
D15	93	36.240	19.00	10.008	600.00	7.2	27.3	2.8
D16	94	0.079	19.00	2.697	696.00	6.5	27.4	3.0
D17	94	5.469	19.00	36.543	1026.00	5.2	27.5	3.7
D18	94	20.510	19.00	55.910	1281.00	4.4	27.7	4.4
N1	96	45.901	24.00	25.702	849.00	6.3	27.4	3.1
N2	96	7.980	25.00	26.270	972.00	5.1	27.6	3.8
N3	95	51.070	24.00	36.380	2474.00	4.3	27.7	4.7
N4	95	52.130	23.00	36.460	2839.00	4.3	27.7	4.7
N5	94	45.010	22.00	45.050	3405.00	4.3	27.7	4.6
N6	94	45.560	24.00	45.200	3465.00	4.3	27.7	4.6

2.1.2. Aislamiento e identificación molecular de actinobacterias

Se tomó 1 mL de sedimento húmedo de cada muestra y se realizaron dos diluciones seriadas en 4 mL de agua destilada estéril. Se inocularon 50 μ L de cada dilución en cajas de Petri en 5 medios de cultivo diferentes (Tabla 2). El inóculo se distribuyó con perlas de vidrio, por lo que en total se inocularon 124 cajas Petri de las 24 estaciones muestreadas. A todos los medios, una vez estériles, se les adicionó Nistatina (100 UI/mL) para reducir la contaminación por hongos. Una vez inoculados los medios se incubaron de 2 a 12 semanas a 23°C.

Tabla 2. Composición de los cinco medios utilizados para inocular los sedimentos marinos. Todos los medios de cultivo se prepararon en 1 litro de agua destilada conteniendo 32 gramos de sal de mar artificial para obtener una gravedad específica de 1.002.

Tipo de medio	Composición
Medio 1 (M1)	10 g de almidón, 4 g de extracto de levadura, 2 g de peptona, y 18 g de agar
Medio 2 (M2)	6 mL de glicerol al 100%, 1 g de arginina, 1 g de K_2HPO_4 , 0.5 g de $MgSO_4$ y 18 g agar
Medio 3 (M3)	6 g de glucosa, 2 g de quitina, 18 g de agar
Medio 4 (M4)	2 g de quitina, 18 g de agar
Medio 5 (M5)	18 g de agar

Las colonias de actinobacterias fueron seleccionadas del primocultivo por morfología macroscópica y microscópica (células filamentosas y Gram-positivas) y se aislaron por estría cruzada hasta que se logró obtener un cultivo axénico en el medio en el cual crecieron inicialmente.

Para realizar la tinción de Gram se utilizó el equipo colorante Gram Hyce. Primero, se preparó el frotis con un asa de inoculación estéril y se tomó una muestra de la colonia para suspenderla en una gota de agua previamente aplicada al portaobjetos, para de esta forma formar una película fina de la muestra. El frotis se dejó secar y fijó con calor pasando el portaobjetos sobre un mechero tres veces. Para realizar la tinción se cubrió el frotis fijado con calor con una solución de violeta de genciana y se dejó reposar por 30 segundos. Posteriormente se enjuagó suavemente con agua destilada durante 5 segundos y se eliminó exceso de agua. Se cubrió el frotis con solución de yodo Gram durante 1 minuto y se enjuagó nuevamente. Después se inclinó ligeramente el portaobjetos y se dejó caer lentamente el alcohol acetona y se volvió a

enjuagar con agua destilada por 5 segundos. Se añadió safranina por 30 segundos y finalmente se enjuagó con agua destilada y se dejó secar. Se observó al microscopio con el objetivo 100x con una gota de aceite de inmersión.

Se tomó una muestra de la colonia de bacterias directamente de la caja Petri y se extrajo el DNA genómico mediante el PowerSoil© DNA Isolation Kit. Posteriormente para identificar a las actinobacterias, se utilizaron los oligos 23insFinsFIV y 23 insRinsR3I (Tabla 3) para amplificar el dominio III del gen 23S rRNA el cual contiene el inserto común de aproximadamente 102 pb (Figura 4), específico de actinobacterias Gram-positivas con alto contenido de G+C (Roller et al., 1992).

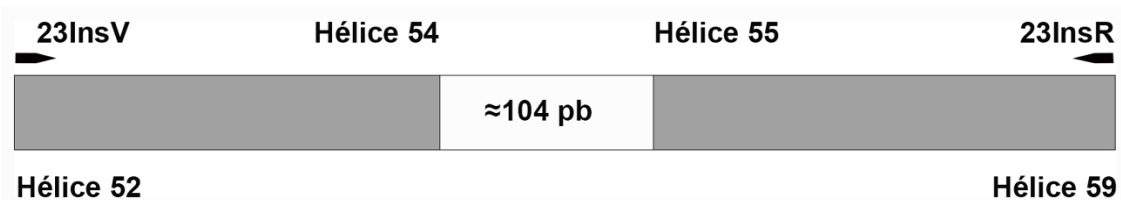


Figura 4. Modelo del Dominio III del 23S de rRNA. La inserción de aproximadamente 104 pb se encuentra localizada entre las hélices 54 y 55 y los sitios de unión de los oligonucleótidos están en la hélice 52 para 23InsV y en la hélice 59 para 23InsR.

Los oligonucleótidos degenerados 8F y 1492R (Tabla 3) se utilizaron para amplificar el gen 16S rRNA (Frank et al., 2008).

Tabla 3. Secuencias de los oligonucleótidos para amplificación del gen 23S rRNA y del gen 16S rRNA.

Oligonucleótido	Secuencia
23 insF	5'-ACAAGTGCCTAGAGCTCGAATGG-3'
23 insR	5'-GTGATCGGTTTAGCTGCTGGTA-3'
8F	5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'
1492R	5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'

Los productos resultantes de la PCR se observaron por electroforesis en gel de agarosa al 2% usando 6 µL de muestra y 2 µL de amortiguador de carga. Se colocaron en un pozo 6 µL de marcador de peso molecular Promega 100 bp DNA. El gel se corrió a 90 volts durante 45 min y se visualizó a través de un fotodocumentador para verificar la presencia del inserto de 100 pb en el gen 23S rRNA, resultando en una banda de aproximadamente 350 pb.

Los productos de la amplificación del 16S rRNA se observaron por electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio, se extrajeron del gel, se purificaron con el QIAquick Gel Extraction Kit y se enviaron al servicio de secuenciación Eton Bioscience Inc.

De las secuencias que se obtuvieron (forward y reverse) se eliminó el inicio y fin haciendo un comparativo con el cromatograma para asegurar la calidad de la secuencia. Posteriormente se tomó una de ellas y se convirtió al reverso complementario para realizar un alineamiento entre las dos secuencias. Se obtuvo una secuencia consenso del alineamiento, todo lo anterior utilizando el programa BioEdit Sequence Alignment Editor.

Las secuencias finales, de cada una de las cepas se sometieron a un análisis comparativo con secuencias (Tabla 4) del GenBank (National Center for Biotechnology Information, NCBI), utilizando el programa Blast. La historia evolutiva de las bacterias se infirió utilizando el método Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987) usando las secuencias de Genbank con porcentajes de identidad no menores al 98% usando el programa Mega 7. El árbol consenso fue construido a partir de 1000 réplicas (Felsenstein, 1985).

Tabla 4. Secuencias de ADN de referencia del marcador 16S utilizado en el análisis filogenético.

OTU	Secuencia ID	Secuencias Coincidencia NCBI	Cobertura	% ID	Acceso NCBI
<i>Promicromonospora umidemergens</i>	LRH-P-N2-1	<i>Promicromonospora umidemergens</i> 14614	99	99.86	JN180228.1
		<i>Promicromonospora kermanensis</i> UTMC 533	99	99.43	NR_156057.1
		<i>Promicromonospora sukumoe</i>	99	99.57	HBUM83622
		<i>Promicromonospora alba</i> 1C-HV12	99	99.57	NR_148779.1
		<i>Promicromonospora xylanilytica</i>	99	98.29	YIM 61515
<i>Streptomyces</i> sp.	LRH-P-B7-11 LRH-C-D18-13	<i>Streptomyces anulatus</i> S07-1	99	99.86	KC814714.1
		<i>Streptomyces marokkonensis</i> 3445	99	99.86	JN180198.1
		<i>Streptomyces griseorubens</i> MA-21	99	99.72	KY783422.1
		<i>Streptomyces labedae</i> NHF7	99	99.72	KU500360.1
		<i>Streptomyces variabilis</i> HBUM173496	99	99.72	EU841661.1
		<i>Streptomyces verrucosiporus</i> CPB1-1	99	99.51	NR_151951.1
		<i>Streptomyces rapamycinicus</i> ATCC 29253	99	99.51	NR_044199.1
		<i>Streptomyces himastatinicus</i> ATCC 53653	99	99.51	NR_044201.1

		<i>Streptomyces ovatisporus</i> S4702	99	99.15	NR_152658.1
		<i>Streptomyces oceani</i> SCSIO 02100	99	99.15	NR_132613.1
		<i>Streptomyces klenkii</i> S2704	99	99.15	NR_134821.1
<i>Nocardiopsis</i> sp.	LRH-P-N6-10 LRH-C-C11-12	<i>Nocardiopsis dassonvillei</i> BA6-3	99	99.79	KF146896.1
		<i>Streptomyces flavidofuscus</i> HBUM174057	99	99.65	EU841706.1
		<i>Nocardiopsis oceani</i> 10A08A	99	99.58	KF146896.1
		<i>Nocardiopsis nanhaiensis</i> 10A08B	99	99.58	NR_137416.2
		<i>Nocardiopsis litoralis</i> 073097	99	99.51	NR_116374.1
		<i>Nocardiopsis coralliicola</i> SCSIO10427	99	99.51	NR_109436.1
<i>Micromonospora aurantiaca</i>	LRH-C-C11-3 y LRH-C-D15-22	<i>Micromonospora aurantiaca</i> NHF69	99	99.79	KU500365.1
		<i>Micromonospora echinofusca</i>	99	99.86	X92625.1
		<i>Micromonospora peucetia</i>	99	99.64	X92603.1
		<i>Micromonospora fulviviridis</i>	99	99.86	X92620.1
		<i>Micromonospora inyonensis</i>	98	99.43	X92629.1
<i>Streptomyces</i> sp.	LRH-C-C11-19 y LRH-C-D15-21	<i>Streptomyces variabilis</i> strain HBUM173496	100	96.51	EU841661.1
		<i>Streptomyces labedae</i> strain NHF7	100	96.16	KU500360.1
		<i>Streptomyces griseorubens</i> strain MA-21	100	96.09	KY783422.1
		<i>Streptomyces marokkonensis</i> 3445	100	96.09	JN180198.1
		<i>Streptomyces anulatus</i> S07-1	99	96.03	KC814714.1

2.1.3. Ensayos de compatibilidad de actinobacterias

Se inocularon dos cepas diferentes de actinobacterias una sola caja Petri de medio de cultivo M1 para determinar si existía alguna inhibición por alguna de las cepas mediante la observación de su crecimiento. En etapas tempranas del proyecto se consideró formar consorcios de actinobacterias para evaluar su capacidad para degradar petróleo crudo y con este ensayo se podría determinar si alguna de las actinobacterias debería excluirse del consorcio en caso de ser incompatible. Aunque estos ensayos se realizaron, no se evaluó la capacidad de los consorcios para degradar petróleo crudo.

2.1.4. Crecimiento de actinobacterias usando petróleo crudo ligero, pesado y extra-pesado como fuente única de carbono

Las esporas de las actinobacterias fueron utilizadas para evaluar si eran capaces de germinar mineralizando el petróleo crudo de diferentes densidades. Las actinobacterias fueron inoculadas en medio M1 e incubadas a 37°C por 15 días para recuperar esporas de cada cepa. Una vez que crecieron, se tomaron 10 mL de agua destilada estéril y se vertió en la placa de Petri. Se procuró la recuperación de esporas mediante el raspado de las colonias con una punta de pipeta de 1000 µL. Se tomó el sobrenadante y se vertió en una jeringa de 20 mL con un tapón de algodón estéril en el fondo de ésta para poder filtrar las esporas. Por presión del émbolo se recuperó el líquido conteniendo las esporas y se colocó en un tubo para centrifuga Falcon de 50 mL. Se centrifugó a 5,000 rpm por 5 minutos, se decantó el sobrenadante, y se realizaron 2 lavados sucesivos posteriormente.

Se realizó un conteo de esporas por medio de una cámara Neubauer y se inocularon aproximadamente 20×10^6 esporas en 50 mL de medio mínimo Czapek modificado (Tabla 5) sin la fuente de carbono original.

Tabla 5. Composición del medio mínimo Czapek modificado.

Nutriente	Cantidad
NaNO ₃	4 g/L
K ₂ HPO ₄	2 g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1 g/L
KCl	1 g/L
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.02 g/l
Elementos traza	500 µl
Agua de mar artificial	750 mL
Agua destilada (50 mL por sal)	250 mL

Para preparar el medio mínimo Czapek se utilizaron 750 mL de agua destilada con 32 g de sal marina artificial. Cada nutriente (Tabla 5) fue pesado y disuelto por separado en 50 ml de agua destilada (a excepción de los elementos traza) y el pH de cada componente se ajustó a 7, con excepción del FeSO₄, cuyo pH debe ser de 6.2. Una vez disueltas las sales y ajustado el pH, tanto los componentes como la fracción de agua de mar se esterilizaron por separado. Finalmente, cuando los componentes alcanzaron los 25°C se mezclaron uno a uno con el agua de mar artificial, lentamente y con agitación constante, siguiendo el siguiente orden de mezcla: 4, 1, 3, 5, 2, y 6. Los elementos traza se prepararon por separado

con los siguientes elementos: 1) 26 g/L H_3BO_3 , 2) 0.50 g/L $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 3) 0.50 g/L $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 4) $\text{MoNa}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 5) 0.70 g/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Abalos et al., 2004). Como fuente de carbono se añadió a cada cultivo 0.5% v/v de petróleo ligero (40° API, proveniente del pozo Xux, Tabasco) y 0.5% p/v de petróleo pesado ($16\text{-}20^\circ$ API, del campo Bacal en Tabasco) y petróleo extra-pesado ($7\text{-}10^\circ$ API, del pozo Ayatsil-Telek en Campeche) respectivamente. Para obtener una referencia de la densidad del petróleo extra-pesado para poder manipularlo durante los experimentos, se realizó una prueba simple del tiempo de goteo del petróleo extra-pesado (Figura 5).

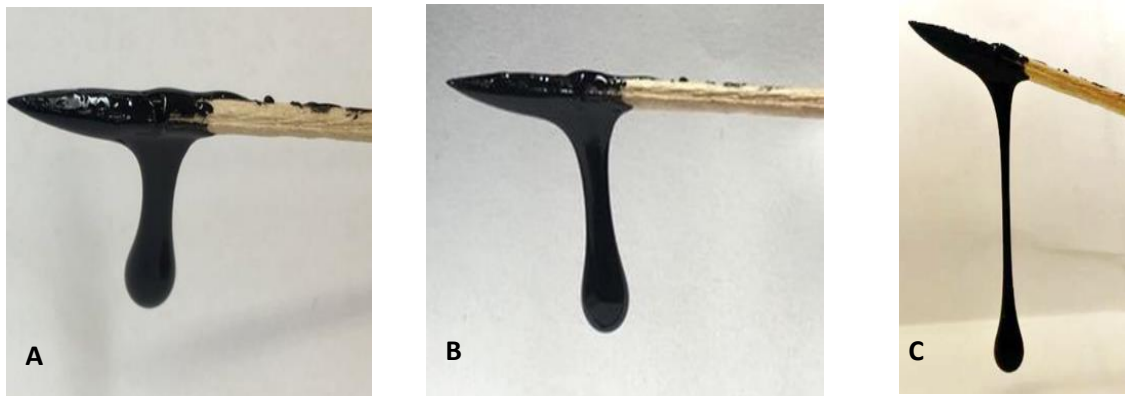


Figura 5. Tiempo de precipitación de una gota de petróleo extra-pesado. A) Día 3 después de tomar la muestra de petróleo extra-pesado. B) Día 5. C) Día 8; la gota finalmente se precipitó.

Como controles se utilizaron medios de cultivo abióticos y medios de cultivo con 1.5 g de sacarosa, para realizar un comparativo de crecimiento con una fuente de carbono fácilmente degradable para los microorganismos. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Para verificar el crecimiento de las cepas con los diferentes petróleos, se observó el crecimiento de micelio macroscópicamente y microscópicamente con un microscopio de luz con un objetivo 100x. Las muestras se tiñeron con safranina, se colocaron en un portaobjetos y se diseminaron con una gota de agua para su observación.

2.2. Hongos

2.2.1. Aislamiento e identificación de hongos marinos

Los hongos utilizados en este estudio se obtuvieron de la colección de hongos del laboratorio Riquelme. En particular los hongos usados en este estudio corresponden a hongos aislados de sedimentos de la Campaña Oceanográfica de Metagenómica 2, Línea 4, Cruceros Oceanográficos de Metagenómica: Investigaciones de los procesos bacterianos y de degradación de HC en las regiones de Perdido y la Cuenca de Coatzacoalcos del golfo de México.

La identificación molecular se realizó mediante análisis filogenéticos utilizando 1) región ITS del núcleo ribosomal DNA ITS1-5.8 rDNA, con los oligonucleótidos ITS1F (5-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3) (Gardes y Bruns, 1993) e ITS4 (5-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3) (White et al., 1990); 2) el gen 18S rRNA usando el par de oligonucleótidos NS1 (5-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3) y NS4 (5-CTTCCGTC AATTCCTTAAG-3) (Gargas y Taylor, 1992); 3) el gen de β -tubulina (benA) con los oligonucleótidos Bt2A (5-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3) y Bt2b (5-ACCCTCAGTG TAGTGACCCTTGGC-3) (Glass y Donaldson, 1995) y 4) con los oligonucleótidos degenerados LR1 (5-RRCRACAARTTCGTGCCCG-3) y LR2 (5-AGTGA ACTGGTCACCYACAC-3), diseñados para amplificar la región gen de la β -tubulina que se localiza río abajo de la región amplificada con los oligonucleótidos Bt2A y Bt2b, para los casos en que estos oligonucleótidos no funcionaron (Figura 6). Los productos de PCR fueron purificados usando el QIAquick Gel Extraction Kit y fueron secuenciados por Eton Bioscience, Inc., San Diego, California.

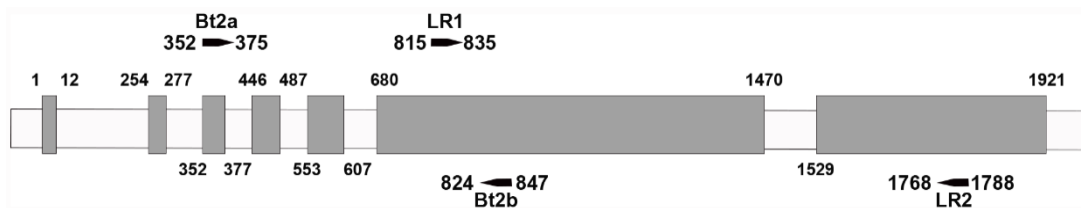


Figura 6. Estructura del gen de la β -tubulina (benA) y localización de los oligonucleótidos Bt2a y Bt2b y de los oligonucleótidos degenerados LR1 y LR2. Las áreas grises representan los codones y las áreas blancas los intrones. Los números de arriba y abajo corresponden a la posición en el ADN. Las flechas representan la posición de los oligonucleótidos. Figura modificada (Glass and Donaldson, 1995).

Las secuencias consenso fueron generadas usando Consed v29.0 (Ewing y Green, 1998; Ewing et al., 1998; Gordon et al., 2001) y se compararon con las bases de datos de GenBank mediante una

búsqueda BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) usando el algoritmo MegaBLAST para obtener secuencias referencia para el análisis filogenético. Solo las secuencias con un porcentaje de cobertura mínimo de 98% fueron consideradas para los análisis ponderando los resultados asociados a material tipo (Tabla 6). Para los análisis no se consideraron muestras no cultivadas o ambientales. Las secuencias fueron alineadas usando el software UGENE v36.1 (Okonechnikov et al., 2012) y MUSCLE (Edgar, 2004).

El árbol filogenético fue inferido usando MEGA X (Kumar et al., 2018; Stecher et al., 2020) con el algoritmo de Maximum Likelihood (ML), con un bootstrap de 1000 réplicas, y los modelos de sustitución de nucleótidos K2+I (ITS y 18S) y K2+G y HKY+G (para β -tubulina benA y LR1-LR2, respectivamente) (Kimura, 1980). Inicialmente, los árboles se obtuvieron por una búsqueda heurística aplicando los algoritmos Neighbor-Joining y BioNJ a una matriz de distancias pareadas estimadas usando el aproximamiento Maximum Composite Likelihood (MCL) y después se seleccionó la topología con el valor superior de log likelihood. Las secuencias están disponibles en GenBank bajo los números de acceso MW412481-MW412485 para el 18S, MW412490-MW412494 para el ITS y MZ392424-MZ392428 para las secuencias de β -tubulina (Tabla 6).

Tabla 6. Secuencias de ADN de referencia de los marcadores ITS rDNA, 18S, y β -tubulina utilizados en los análisis filogenéticos.

OTU	Secuencia ID (18S)	Acceso NCBI	Secuencias Coincidencia NCBI	Cobertura	% ID	Acceso NCBI
<i>Cladosporium</i> sp.	1Z	MW412481	<i>Cladosporium velox</i>	100	99.8	NG_062725.1
			<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	100	100	JN939024.1
			<i>Cladosporium</i> sp.	100	100	MT093347.1
			<i>Cladosporium cladosporoides</i>	100	100	KT582530.1
			<i>Cladosporium halotolerans</i>	100	100	MT000326.1
<i>Stemphylium</i> sp.	3Z	MW412484	<i>Pleospora herbarum/Stemphylium vesicarium</i>	100	99.78	GU238232.1
			<i>Pleospora herbarum/Stemphylium vesicarium</i>	100	99.78	DQ767648.1
			<i>Pleospora herbarum/Stemphylium vesicarium</i>	100	99.78	KY659567.1
			<i>Stemphylium vesicarium</i>	100	99.78	MH050984.1
			<i>Stemphylium botryosum</i>	100	99.78	NG_061146.1

<i>Alternaria</i> sp.	4Z	MW4124 85	<i>Alternaria</i> sp.	99	99.64	MT649579.1
			<i>Alternaria tenuissima</i>	99	99.64	MN075309.1
			<i>Alternaria alternata</i>	99	99.64	MT535855.1
			<i>Alternaria citri</i>	99	99.64	MF989222.1
			<i>Alternaria tomatophila</i>	99	99.64	MK577728.1
<i>Penicillium</i> sp. 1	5Z	MW4124 82	<i>Penicillium</i> sp.	100	100	MT649587.1
			<i>Penicillium chrysogenum</i>	100	100	MN826497.1
			<i>Penicillium spinulosum</i>	100	100	MF072609.1
			<i>Penicillium commune</i>	100	100	MF072605.1
			<i>Penicillium solitum</i>	100	100	JN642222.1
<i>Penicillium</i> sp. 2	6Z	MW4124 83	<i>Penicillium</i> sp.	100	100	MN906962.1
			<i>Penicillium namyslowskii</i>	100	100	KM096326.1
			<i>Penicillium corylophilum</i>	100	100	JN938959.1
			<i>Penicillium phialosporum</i>	100	99.9	AF245266.1
			<i>Penicillium limosum</i>	100	99.71	NG 062729.1
OTU	ID (Beta tubulina)	Acceso NCBI	Secuencias Coincidencia NCBI	Cobertura	% ID	Acceso NCBI
<i>Cladosporium</i> sp.	1B	MZ39242 4	<i>Cladosporium halotolerans</i>	100	99.73	EF101421.1
			<i>Cladosporium halotolerans</i>	100	99.47	EF101423.1
			<i>Cladosporium psychrotolerans</i>	100	89.32	EF101443.1
			<i>Cladosporium langeronii</i>	100	88.48	EF101434.1
			<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	100	87.31	KY952176.1
<i>Stemphylium</i> sp.	3B	MZ39242 5	<i>Stemphylium vesicarium</i>	100	98.41	MT671909.1
			<i>Stemphylium vesicarium</i>	100	97.77	JQ671944.1
			<i>Stemphylium callistephi</i>	100	96.18	JQ671943.1
			<i>Stemphylium</i> sp.	99	95.15	JN105110.1
			<i>Stemphylium solani</i>	99	94.87	JN105109.1
<i>Penicillium</i> sp.	5B	MZ39242 6	<i>Penicillium rubens</i>	100	100	MT393580.1
			<i>Penicillium chrysogenum</i>	100	100	MK675757.1
			<i>Penicillium rubens</i>	100	100	KU896998.1
			<i>Penicillium chrysogenum</i>	100	100	KF225098.1

			<i>Penicillium rolfsii</i>	100	100	LT559055.1
<i>Penicillium</i> sp.	6B	MZ39242 7	<i>Penicillium corylophilum</i>	100	100	MK451126.1
			<i>Penicillium obscurosum</i>	100	99.08	JX141068.1
			<i>Penicillium corylophilum</i>	100	99.08	KF225092.1
			<i>Penicillium humuli</i>	98	99.07	KP016756.1
			<i>Penicillium pagulum</i>	100	98.17	JX141132.1
OTU	ID (ITS)	Acceso NCBI	Secuencias Coincidencia NCBI	Cobertura	% ID	Acceso NCBI
<i>Cladosporium</i> sp.	1T	MW4124 94	<i>Cladosporium halotolerans</i>	100	99.45	MH864391.1
			<i>Cladosporium parahalotolerans</i>	100	99.45	MF473158.1
			<i>Cladosporium</i> sp.	99	99.45	KF293975.1
			<i>Cladosporium cladosporioides</i>	100	98.72	EF577236.1
			<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	97	99.81	AB572902.1
<i>Stemphylium</i> sp.	3T	MW4124 90	<i>Stemphylium vesicarium</i>	100	100	MK713547.1
			<i>Stemphylium eturmiunum</i>	100	100	MK432743.1
			<i>Stemphylium</i> sp.	100	100	MG065794.1
			<i>Stemphylium lucomagnoense</i>	100	99.62	MK691703.1
			<i>Stemphylium solani</i>	100	99.62	LC592374.1
<i>Alternaria</i> sp.	4T	MW4124 91	<i>Alternaria</i> sp.	100	100	MF776039.1
			<i>Alternaria arborescens</i>	100	100	KY484887.1
			<i>Alternaria alternata</i>	100	100	KJ744342.1
			<i>Alternaria tenuissima</i>	100	100	MN495830.1
			<i>Alternaria citri</i>	100	100	EF104220.1
<i>Penicillium</i> sp.	5T	MW4124 92	<i>Penicillium griseoroseum</i>	100	100	MT635309.1
			<i>Penicillium goetzii</i>	100	100	MT558933.1
			<i>Penicillium rubens</i>	100	100	MT558923.1
			<i>Penicillium camemberti</i>	100	100	MT529868.1
			<i>Penicillium vinaceum</i>	100	100	MT482619.1
<i>Penicillium</i> sp.	6T	MW4124 93	<i>Penicillium corylophilum</i>	100	100	MK450687.1
			<i>Penicillium albidum</i>	100	100	MH855058.1
			<i>Penicillium obscurosum</i>	100	100	KP016815.1
			<i>Penicillium chloroleucon</i>	100	100	KP016813.1
			<i>Penicillium fagi</i>	100	99.81	MH865721.1

OTU	ID (Beta tubulina)	Acceso NCBI	Secuencias Coincidencia NCBI	Cobertura	% ID	Acceso NCBI
<i>Alternaria</i> sp.	4LR	MZ392428	<i>Alternaria alternata</i>	99	99.27	XM_01853319.1
			<i>Alternaria alternata</i>	99	99.27	HQ413316.1
			<i>Alternaria alternata</i>	99	99.48	CP061884.1
			<i>Alternaria lini</i>	99	98.64	Y17082.1
			<i>Alternaria brassicae</i>	99	97.48	Y17074.1
			<i>Alternaria infectoria</i>	99	98.85	Y17083.1
			<i>Alternaria linicola</i>	99	96.96	Y17085.1
			<i>Alternaria solani</i>	99	97.48	MK388240.1
<i>Alternaria solani</i>	99	97.48	HQ413317.1			

2.2.2. Ensayos de compatibilidad de hongos

Al igual que con las actinobacterias, también se realizaron ensayos de compatibilidad con los hongos. Se inocularon dos hongos diferentes en cajas Petri con medio de cultivo PDA para determinar si existía alguna inhibición entre las cepas y excluirlas de los consorcios de hongos. Los ensayos para determinar si los consorcios degradaban petróleo crudo no se realizaron.

2.2.3. Evaluación de crecimiento con petróleo crudo como única fuente de carbono

Las cepas de hongos se inocularon en placas de medio con agar, papa y dextrosa (PDA) y se incubaron durante cinco días a 30°C. Los conidios se recolectaron de las placas PDA con 20 mL de agua destilada estéril, se separaron del micelio con ayuda de una punta de pipeta de 1000 µL y se filtraron. Se realizaron dos lavados mediante centrifugación y decantación a 5,000 rpm por 5 minutos.

Los conidios se contaron usando una cámara de Neubauer y se inocularon 20×10^6 conidios en 50 mL de medio mínimo Czapek modificado sin fuente de carbono (4 g NaNO_3 , 2 g K_2HPO_4 , 1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g KCl, 0.02 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 32 g de sal marina y 0.5 ml de solución de oligoelementos) (Abalos et al., 2004). Los matraces se suplementaron con 0.5% de petróleo ligero crudo (40° API del pozo Xux en Tabasco, México), pesado (16-20° API del campo Bacal, en Tabasco) y extra-pesado (7-10° API del pozo Ayatsil - Telek, en Campeche, México), como única fuente de carbono. Los cultivos se incubaron a 30°C a 150 rpm por un mes.

2.2.4. Análisis microscópico

Para evaluar si los conidios fueron capaces de germinar utilizando petróleo crudo como fuente única de carbono, se observó el desarrollo de hifas mediante Microscopía de Contraste de Interferencia Diferencial (DIC) utilizando un microscopio invertido Nikon Eclipse Ti-E con un objetivo de 40x/0.95. La muestra de micelio de cada cultivo se tomó de la interfase del medio de cultivo de petróleo con un asa bacteriológica estéril y la muestra se dispersó en un portaobjetos de microscopio con una gota de agua.

Debido a que *Alternaria* sp. fue la única cepa que presentó un crecimiento visible en medio Czapek modificado enriquecido con 0.5% de petróleo extra-pesado 7-10° API, se realizó Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) con un microscopio Hitachi SU3500, para evaluar la interacción micelio-petróleo. A las tres semanas, cuando se observó el crecimiento de micelio en el cultivo, se decantó y recuperó el petróleo con la biomasa fúngica y fue fijada durante dos horas con 50 mL de una solución de paraformaldehído al 1%, glutaraldehído al 2% y buffer de potasio 0.1 M (K_2HPO_4 1M y KH_2PO_4 1M, pH 6.8). La muestra se decantó nuevamente, se cubrió con tetraóxido de osmio al 2% y se incubó durante una hora. Finalmente, se utilizó alcohol en diferentes concentraciones (25%, 50%, 75% y 100%) para fijar y deshidratar la muestra.

2.2.5. Cuantificación del crecimiento de hongos

Para corroborar el crecimiento micelial de *Alternaria* sp. con petróleo extra-pesado como fuente de carbono, se cuantificó la concentración de proteína intracelular. Los cultivos de hongos se incubaron en las condiciones antes descritas durante un mes a 30°C a 150 rpm. Como el micelio se encontraba adherido al petróleo se agregaron 20 mL de tolueno para recuperar solamente la biomasa, esta mezcla se agitó durante 20 minutos y se centrifugó a 15,000 rpm durante 10 min. La fase superior que contenía el petróleo disuelto se eliminó y la biomasa fúngica se recuperó mediante filtración con una bomba de vacío usando un Papel de Filtro Whatman Grado 1 de 0.25 mm. El micelio fue macerado en un mortero con nitrógeno líquido y se mezcló con 1 mL de buffer de lisis (Tris 1 M pH 7.4, KCl 2M, $MgCl_2$ 1M, Triton X100, y una tableta de Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Roche) y se incubó durante 30 min a 4°C. Después se centrifugó a 12,000 g durante 10 min y se recuperó el sobrenadante para medir el contenido de proteína soluble total. Se utilizó el Protein Assay Kit II de Bio-Rad para cuantificar la proteína y construyó una curva estándar de BSA. Se incluyeron como controles cultivos abióticos (petróleo extra-

pesado y medio mínimo Czapek modificado) y cultivos sin petróleo extra-pesado, todos los experimentos se realizaron por triplicado. Se realizó un ANOVA unidireccional entre tratamientos para comparar el efecto del petróleo a diferentes concentraciones.

Cuando se evaluaron todas las cepas en las primeras etapas de este proyecto, *Penicillium* spp. se cultivaron bajo diferentes concentraciones de petróleo crudo ligero (0.25%, 0.5% y 0.75% v/v) como única fuente de carbono para determinar a qué concentración producían más biomasa. No fue necesario agregar tolueno para separar el micelio del petróleo porque no hubo una unión fuerte entre ellos y el micelio se recuperó fácilmente mediante filtración. Se utilizaron como controles cultivos abióticos (petróleo crudo ligero y medio mínimo de Czapek modificado) y cultivos sin petróleo crudo ligero, todos los experimentos se realizaron por triplicado. Se realizó una prueba t de Student para muestras independientes para comparar los mg/L de proteína en todos los cultivos. Las comparaciones *a posteriori* se realizaron utilizando la diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey.

2.2.6. Extracción líquido-líquido

Se prepararon cultivos con 50 mL de medio mínimo Czapek modificado suplementado con 0.5% p/v de petróleo extra-pesado (7-10° API) como fuente única de carbono, inoculados con 20×10^6 conidios de *Alternaria* sp. y se incubaron a 30°C con una agitación de 150 rpm durante un mes. Se incluyeron cultivos abióticos y todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Al término de la incubación, el petróleo se extrajo para realizar el análisis de cromatografía de gases. El medio se acidificó con HCl y se extrajo con 10 mL de diclorometano y se lavaron con el solvente tres veces. El extracto orgánico se recuperó mediante un embudo de separación, se deshidrató en una columna de Na₂SO₄ anhidro y se secó en un evaporador rotativo a 0.79 atm.

2.2.7. Análisis SAP

Para analizar el porcentaje de degradación de las diferentes fracciones de petróleo extra-pesado por *Alternaria* sp., el crudo se fraccionó por el método estándar ASTM D2007 modificado y mediante cromatografía de gases se analizaron las fracciones SARA (saturados, aromáticos, resina y asfaltenos). La

modificación consistió en obtener los componentes resinas y asfaltenos juntos, en una sola fracción. Como resultado, se obtuvieron las fracciones de saturados, aromáticos y polares (resinas y asfaltenos) (SAP). Todas las fracciones se analizaron mediante cromatografía de gases. Los disolventes utilizados para separar las fracciones fueron: 40 mL de n-hexano para los saturados, 40 mL de tolueno para los aromáticos y una mezcla de 20 mL de metanol y 20 mL de diclorometano (50:50) para las resinas y asfaltenos. La separación se realizó mediante columna de sílice y se obtuvieron tres fracciones según la polaridad de los disolventes. Las fracciones se evaporaron en un rotavapor y fueron analizadas en un Cromatógrafo de Gases Agilent 7820A con una columna Zebron Inferno de 20 m x 0.18 mm x 0.18 μm (Phenomenex, EE. UU.), y de acuerdo con el método EPA-8015 (US EPA). Los hidrocarburos de petróleo totales (TPH) se cuantificaron de acuerdo a la respuesta del detector de ionización de llama (FID). El programa de GC comenzó a 50°C (2 min), seguido de una rampa de temperatura de 10°C/min a 375°C (5 min). El inyector spitless se configuró a 360°C y el detector a 400°C. Se utilizó helio como gas portador a un flujo constante de 0.9 mL/min.

Capítulo 3. Resultados

3.1. Actinobacterias

3.1.1. Identificación de actinobacterias aisladas

De los primocultivos (Figura 7), se identificaron y aislaron 22 cepas Gram positivas que presentaron una morfología macroscópica y microscópica parecida a la de las actinobacterias.



Figura 7. Primocultivos de sedimentos marinos. En los cultivos iniciales se observó el crecimiento de una gran cantidad de colonias de diversas morfologías y de estas se seleccionaron las que parecían tener características morfológicas de actinobacterias.

Se extrajo DNA de cada una de las cepas, se amplificó el dominio III del gen 23S rRNA, y se encontró que nueve cepas de actinobacterias tenían el inserto común de aproximadamente 102 pb, característico de las actinobacterias (Figura 8).

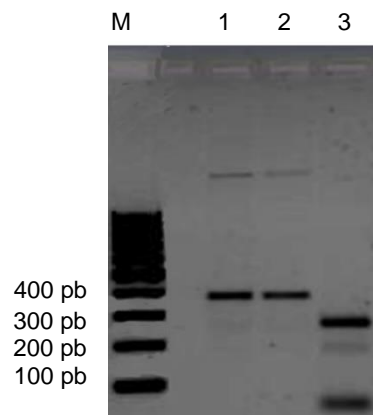


Figura 8. Electroforesis de amplicones de 23S rRNA. En el carril 1 se encuentra la cepa LRH-P-N2-1 y en el carril 2 la cepa LRH-C-C11-3; ambos amplicones contienen el inserto de aproximadamente 100 pb, lo que corresponden a la banda de más de 300 pb. En el carril 3 se encuentra *E. coli* y se observa el amplicón de 200 pb. M: marcador molecular de 100 pb.

Se amplificó por PCR el gen 16S rRNA y posteriormente se purificaron los amplicones del gel de agarosa mediante el QIAquick Gel Extraction Kit (Figura 9). El producto de amplificación se remitió al servicio de secuenciación Eton Bioscience Inc. Cuando se obtuvieron los resultados, las secuencias se revisaron y editaron en el programa BioEdit Sequence Alignment Editor 200 y se compararon con las bases de datos de BLAST de NCBI. De forma general todas las secuencias rebasaron los 1,400 pares de bases después de ser editadas y al compararlas con la base de datos de Blast de NCBI, en todos los casos se obtuvo un valor de E de cero y porcentajes de identidad mayores al 80%.

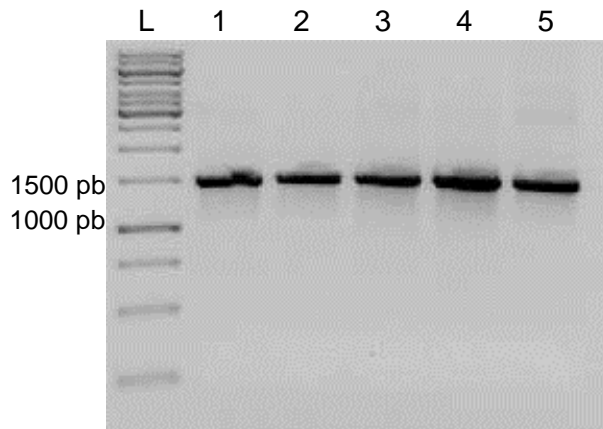


Figura 9. Electroforesis de los amplicones 16S rRNA. En los carriles se muestran los amplicones purificados de las cepas: 1) LRH-P-N2-1, 2) LRH-C-C11-3, 3) LRH-P-N6-10, 4) LRH-C-C11-12, y 5) LRH-C-D18-13; todos son de 1,500 pb. L: marcador molecular de 200 pb.

Se asignó una clave a cada una de las cepas, de acuerdo a la colección a la que pertenecen, a la zona de donde provienen los sedimentos de donde fueron aisladas (Perdido o Coatzacoalcos), la estación a la que pertenecen y, por último, el número de referencia. Las características observadas en la morfología macroscópica y microscópica de las cepas son consistentes y corresponde a los géneros asignados por Blast de NCBI con base en las secuencias del gen 16S rRNA.

3.1.2. Morfología macroscópica y microscópica

La morfología macroscópica de las cepas se muestra en el panel A de las Figuras 8-13, donde se observa el crecimiento de las cepas en caja Petri; los paneles B y C corresponden a las imágenes obtenidas con estereoscopio y el panel D muestra la imagen obtenida con el microscopio invertido Nikon Eclipse Ti-E, por DIC (Figuras 10-15).

Cepa LRH-P-N2-1

Se observaron colonias pequeñas de consistencia cremosa de color amarillo intenso (Figura 10 A-C), con bordes lobulados. Las colonias forman pequeñas estructuras en forma de panal y complejas estructuras ramificadas. En la microscopía se observan hifas ramificadas (Figura 10 D).

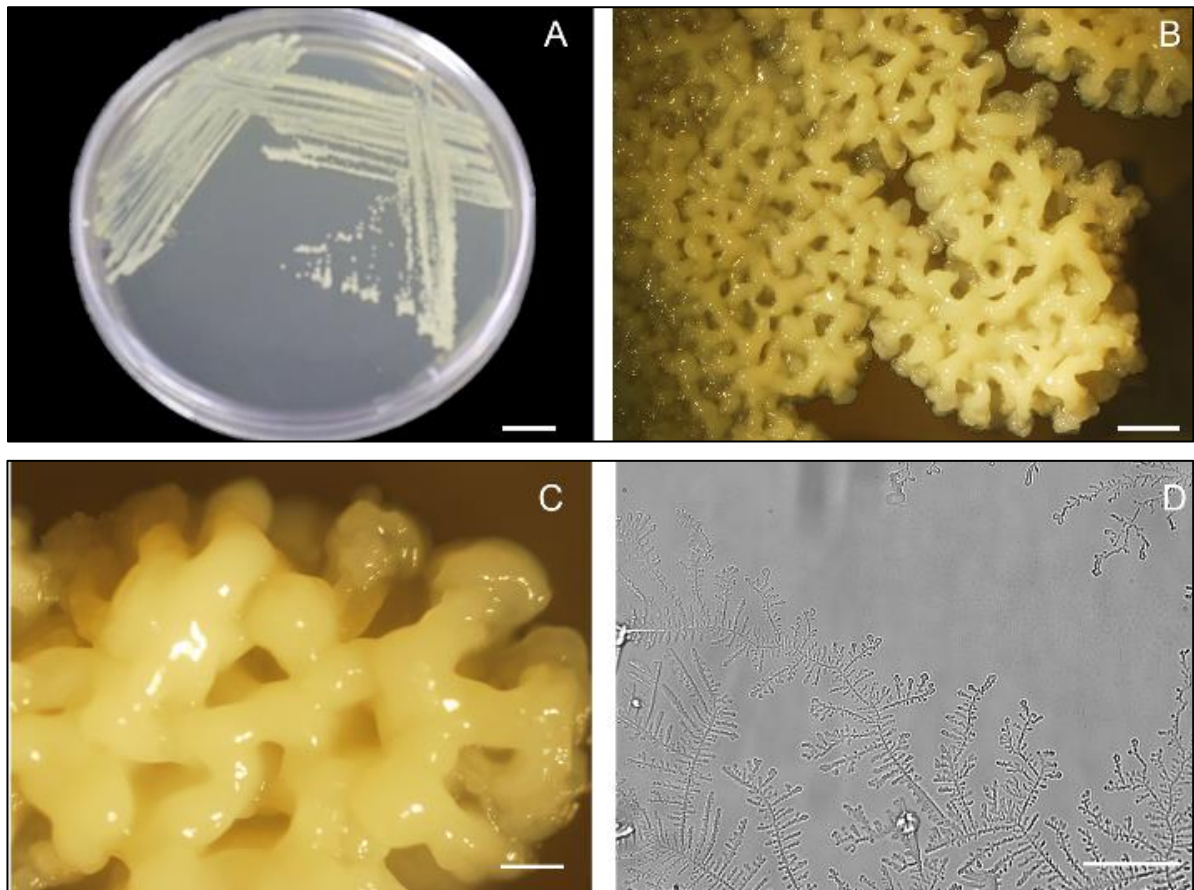


Figura 10. Morfología macroscópica y microscópica de la cepa LRH-P-N2-1. (A) Colonias pequeñas y puntiformes; escala = 1 cm. (B) Estructuras en forma de panal; escala = 1.10 μm . (C) Colonias bacterianas aglomeradas; escala = 316 μm . (D) Hifas esporulando en extremos ramificados; escala = 20 μm .

Cepas LRH-C-C11-3 y LRH-C-D15-22

Estas dos cepas, aisladas de diferentes estaciones, tienen una consistencia cremosa (Figura 11 A-C), forman colonias pequeñas y circulares de bordes definidos, de color naranja brillante. Al esporular forman anillos cafés concéntricos. En la microscopía se observan hifas ramificadas y racimos de esporas en forma de abanico (Figura 11 D). Ambas cepas presentaron una morfología idéntica y por los resultados obtenidos en Blast, se concluyó que corresponden al mismo género y especie.

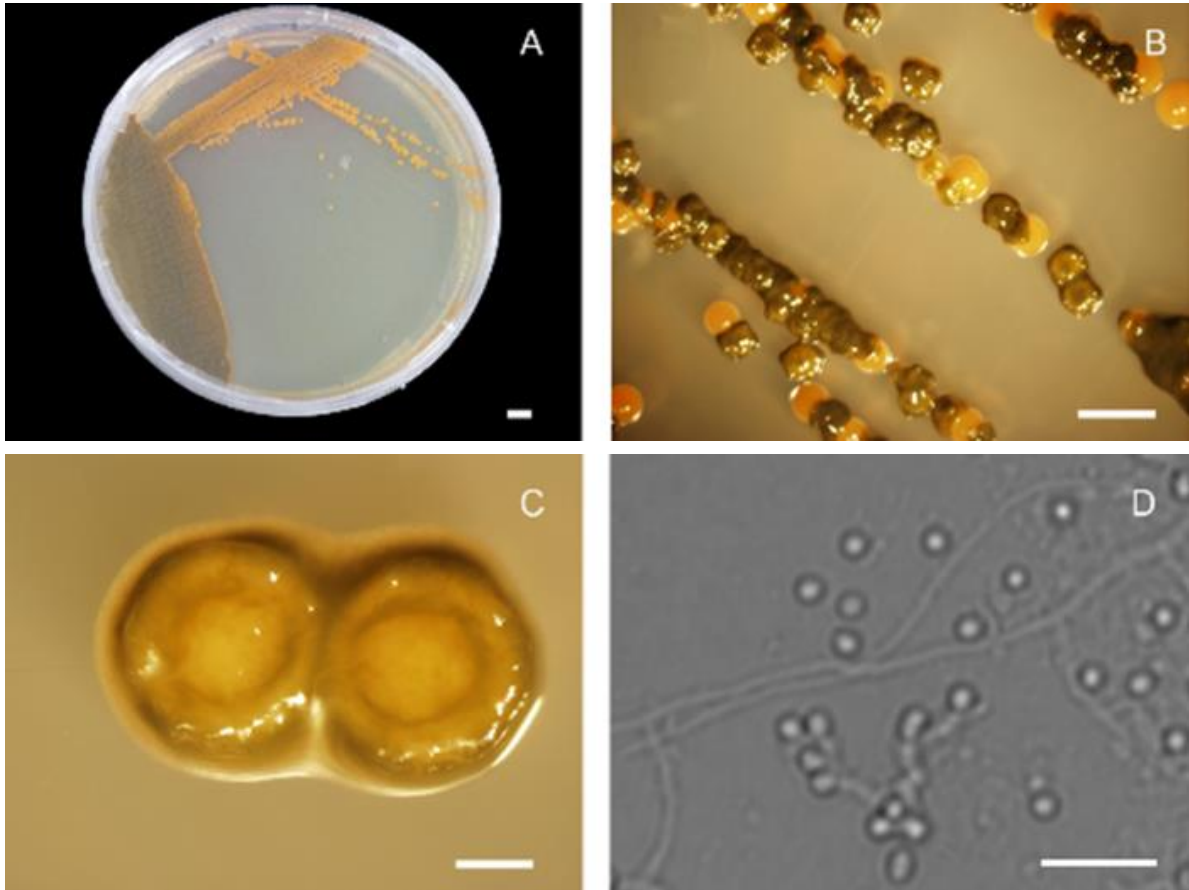


Figura 11. Morfología macroscópica y microscópica de la cepa LRH-C-C11-3. (A) Colonias con cambio de coloración de naranja a café; escala = 1 cm. (B) Colonias redondeadas y con diferentes grados de esporulación; escala = 1.25 mm. (C) Anillos concéntricos de color café formados por esporas; escala = 312 μ m. (D) Hifas con esporas en forma de racimos; escala = 5 μ m.

Cepa LRH-P-B7-11

Las colonias forman grandes agregados de consistencia dura, de color blanco que al esporular se observan pulverulentas (Figura 12 A-C), con bordes lobulados. En la microscopía se observan hifas y cadenas de esporas (Figura 12 D).

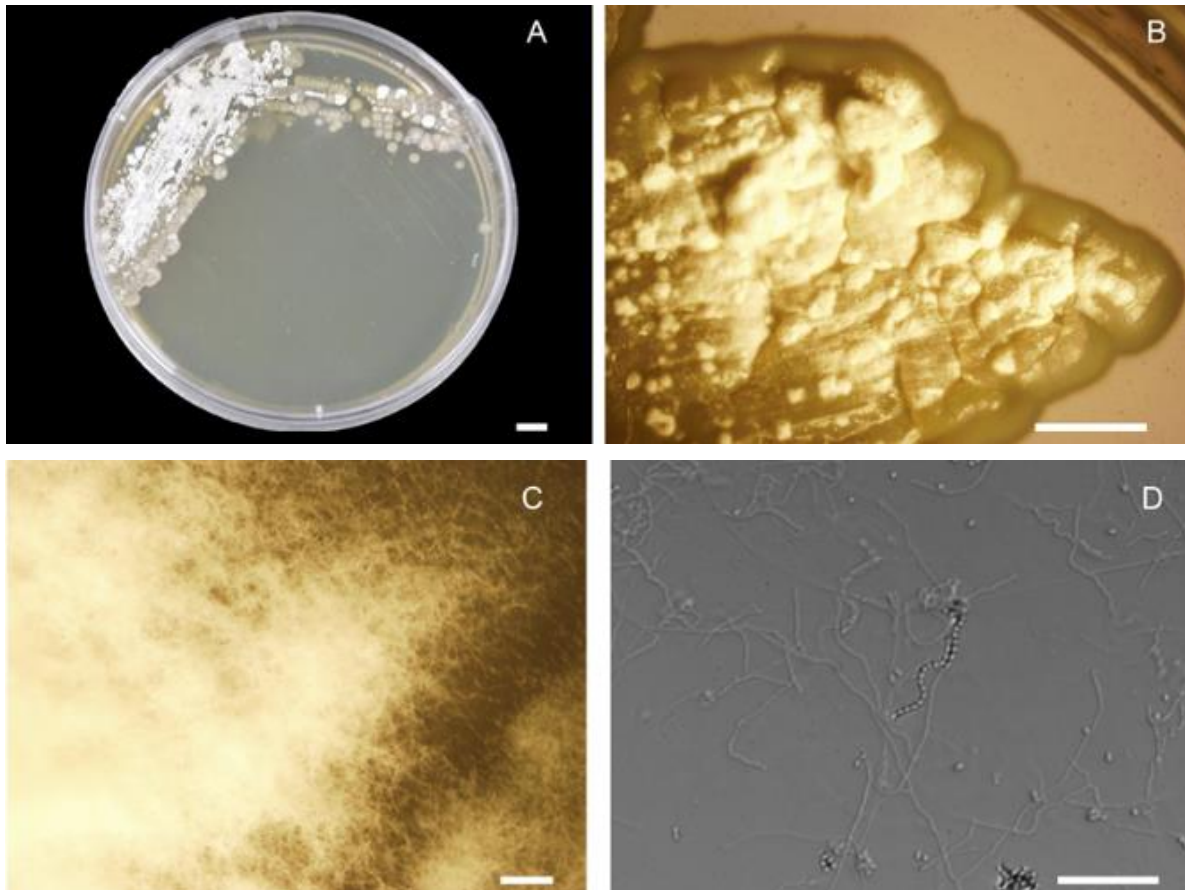


Figura 12. Morfología macroscópica y microscópica de la cepa LRH-P-B7-11. (A) Crecimiento en grandes agregados; escala =1 cm. (B) Cambio de coloración en el borde de la colonia al formar micelio aéreo; escala =1 cm. (C) Micelio aéreo formado por filamentos blancos opacos; escala=7.8 μm . (D) Hifas largas y poco ramificadas e hifa formando cadenas de esporas; escala=20 μm .

Cepa LRH-C-D18-13

La cepa tiene una consistencia dura y forma colonias pequeñas y puntiformes de color marfil que cambia a blanco cuando esporula. (Figura 13 A-C). En la microscopía se observaron únicamente hifas (Figura 13 D).

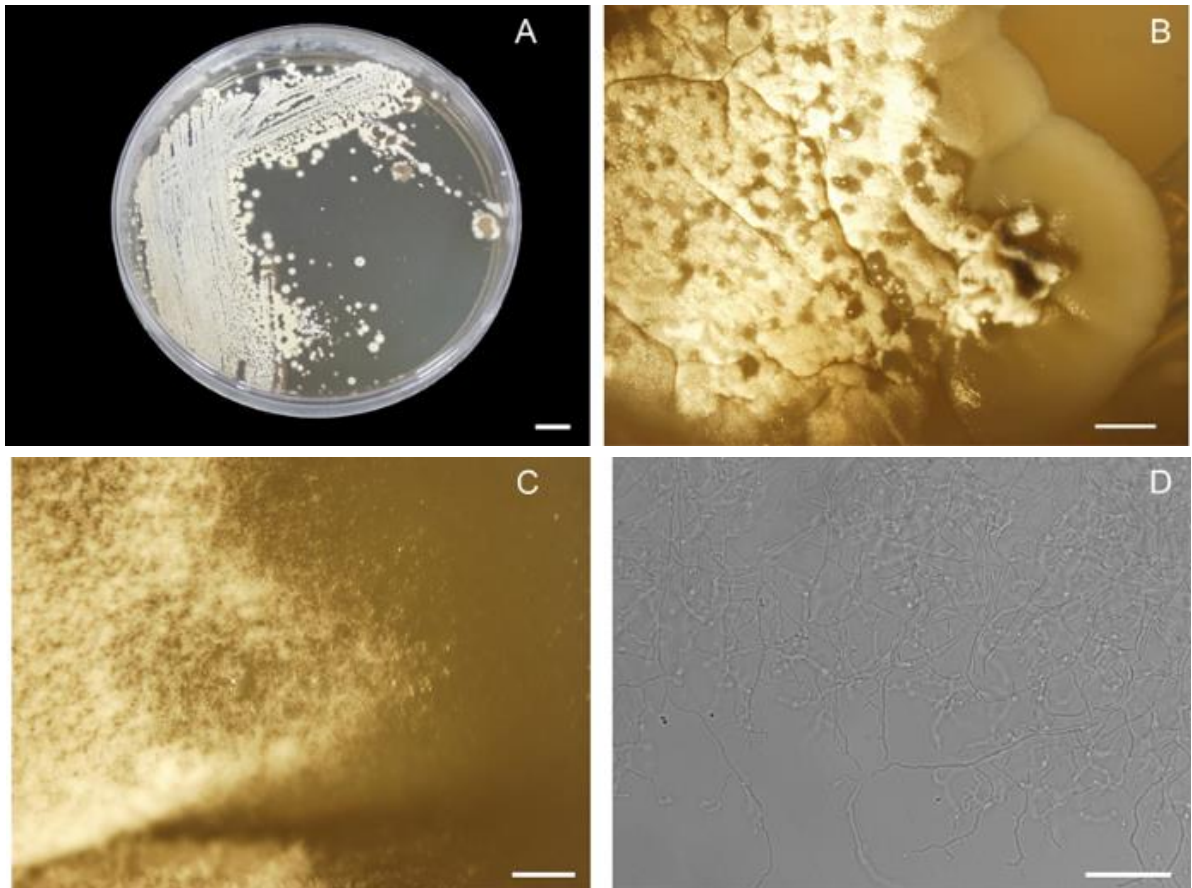


Figura 13. Morfología macroscópica y microscópica de la cepa LRH-C-D18-13. (A) La colonia tiene un aspecto pulverulento al esporular; escala= 1 cm. (B) Cambio de coloración en el borde de la colonia; escala= 1.01 mm. (C) El micelio aéreo se forma del centro de la colonia a la periferia; escala= 202 μ m. (D) Agregados de hifas sin formación de esporas; escala = 20 μ m.

Cepa LRH-C-D15-21 y LRH-C-C11-19

Se observaron colonias grandes de color café, consistencia dura, pulverulenta y al esporular las colonias cambian a color gris. También se observaron filamentos mucilaginosos (Figura 14 A-C). En la microscopía se observan hifas ramificadas con esporas en la punta (Figura 14 D). Ambas cepas presentaron una morfología idéntica y por los resultados obtenidos en Blast, se concluyó que corresponden al mismo género y especie.

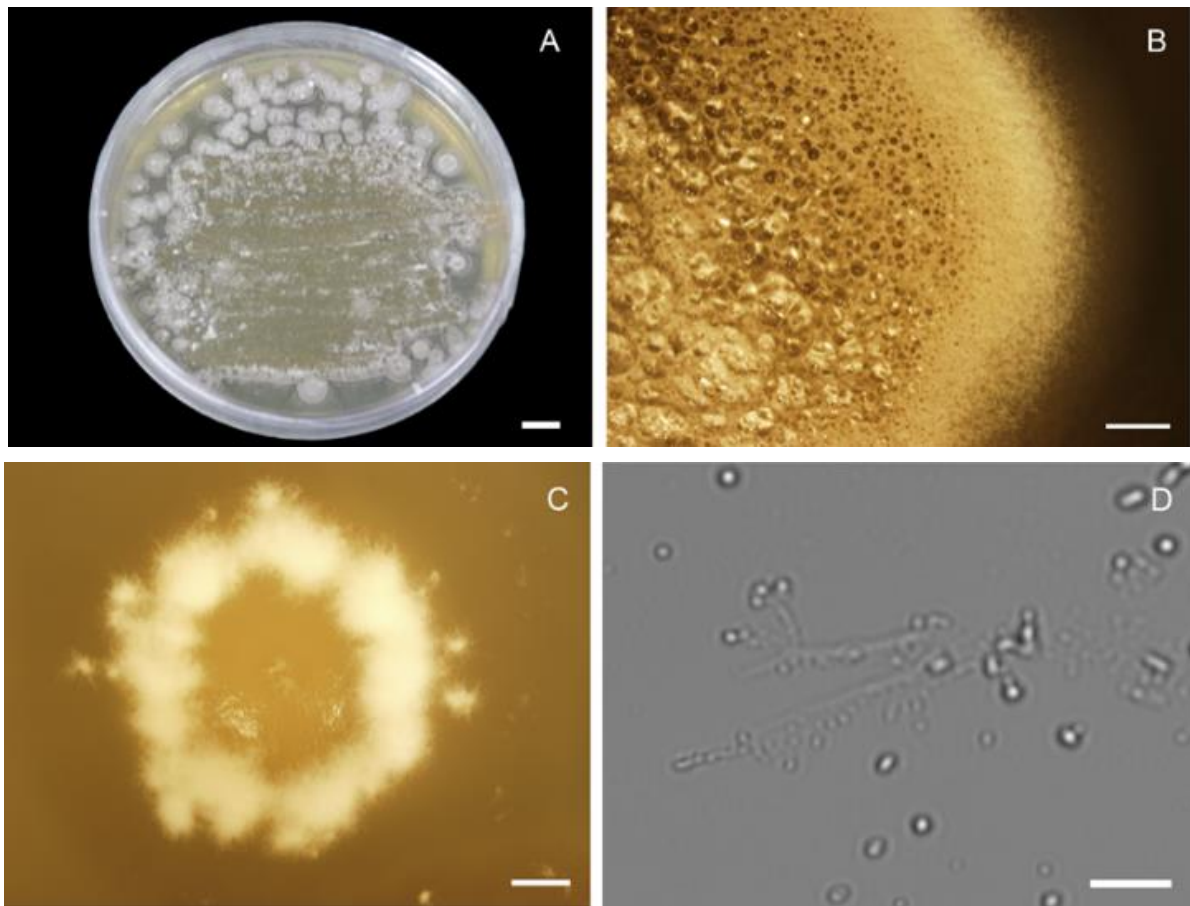


Figura 14. Morfología macroscópica y microscópica de la cepa LRH-C-D15-21 y LRH-C-C11-19. (A) La colonia crece de forma masiva en la placa de Petri con cambio de color a blanco y gris; escala = 1 cm. (B) Margen de la colonia con formación de micelio aéreo; escala = 1.25 mm. (C) Gruesos filamentos con formación de micelio aéreo al centro de la imagen; escala = 139 μ m. (D) Agregado de gruesas hifas y esporas ovaladas en la periferia; escala = 10 μ m.

Cepas LRH-P-N6-10 y LRH-C-C11-12

Ambas cepas poseen una morfología similar (Figura 15 A-C), comparten resultados muy similares en Blast, por lo cual, aunque se aislaron de diferentes estaciones y zonas, se consideraron como idénticas. Se observaron colonias grandes y circulares de bordes espiculados, de consistencia dura y pulverulenta. Las colonias son de color blanco y grisáceo al esporular. En la microscopía se observan hifas cortas y cadenas de esporas (Figura 15 D).

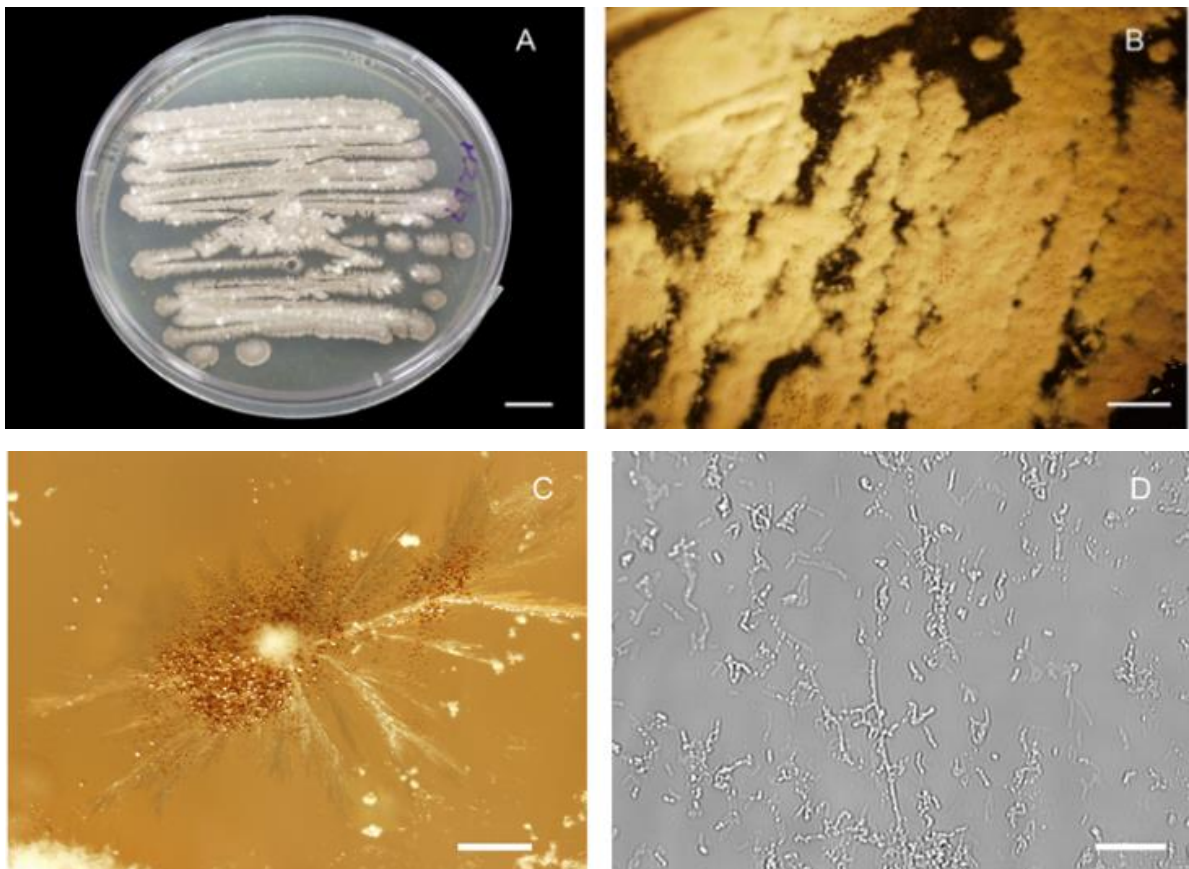


Figura 15. Morfología macroscópica y microscópica de las cepas LRH-P-N6-10 y LRH-C-C11-12. (A) Colonias con cambios de coloración de blanca a grises; escala= 1 cm. (B) El micelio aéreo se observa voluminoso y grisáceo; escala = 60.3 μm . (C) Micelio vegetativo inmerso en el medio con pequeña formación de micelio aéreo al centro; escala = 1.25 μm . (D) Hifas fragmentadas en forma de espiral; escala = 10 μm .

3.1.3. Árbol filogenético

El árbol filogenético (Figura 16) muestra la asociación filogenética con las especies y géneros inferidos anteriormente por porcentajes de identidad altos en la base de datos de Genbank. Los géneros *Nocardiopsis*, *Micromonospora*, y *Promicromonospora* pertenecen al orden de los Actinomycetales y *Streptomyces* al orden de los Streptomycetales. La reconstrucción filogenética se realizó con el método estadístico Maximum Likelihood con 1000 réplicas de bootstrap. Se identificó a la cepa LRH-P-N2-1 como *Promicromonospora umidemergen*, a la cepa LRH-P-B7-11 como *S. marokkonensis*, a LRH-P-N6-10 y LRH-C-C11-12 como *Nocardiopsis* sp., a LRH-C-C11-3 y LRH-C-D15-22 como *Micromonospora aurantiaca*, a los aislados LRH-C-C11-19 y LRH-C-D15-21 como *Streptomyces variabilis*, y a LRH-C-D18-13 como *S. anulatus*.

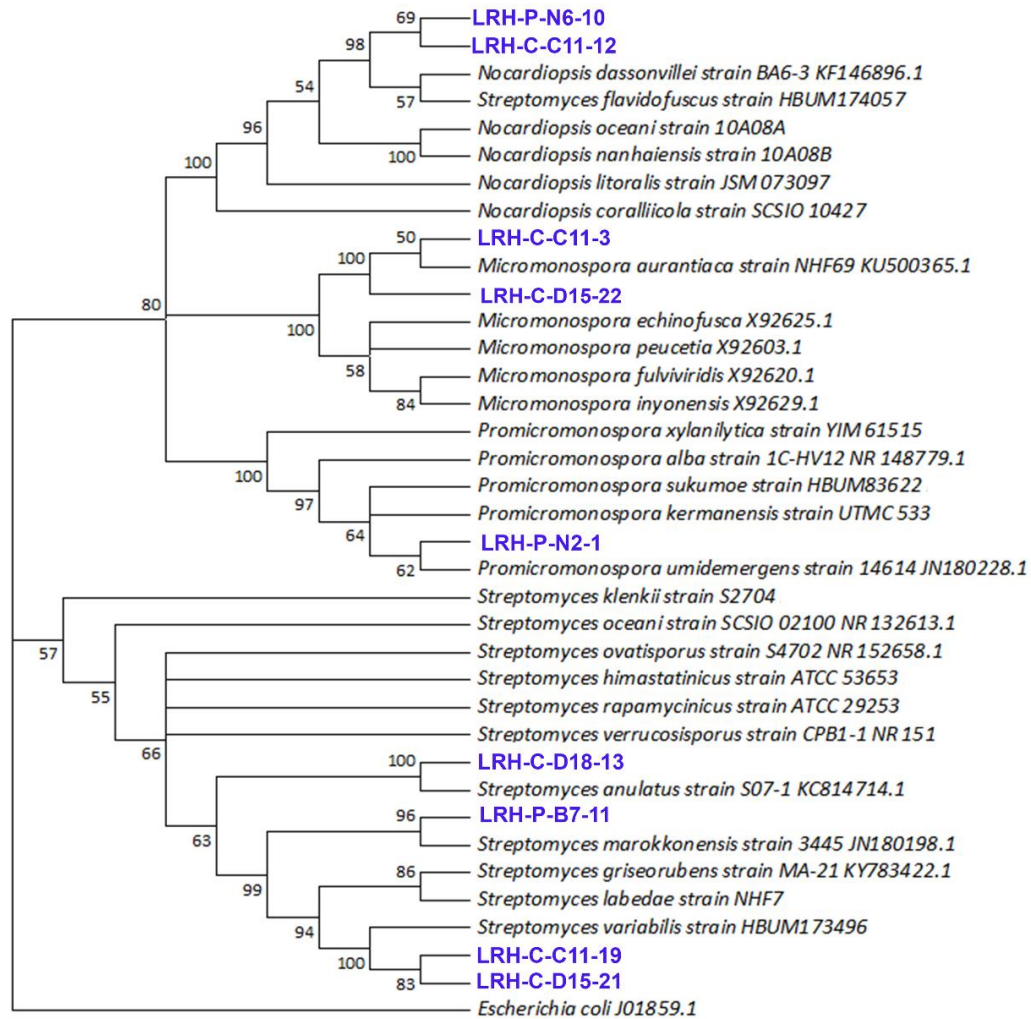


Figura 16. Análisis evolutivo por el Método Máxima Similitud. Los valores de Bootstrap se indican sobre las ramas. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de sustitución de nucleótidos de K2. El árbol inicial para la búsqueda heurística se obtuvo con los logaritmos Neighbor-Joining y BioNJ. Se empleó el método heurístico Nearest-Neighbor-Interchange (NNI).

3.1.4. Análisis de inhibición

No se observó inhibición de crecimiento entre las cepas de actinobacterias (Figura 17) y en general, tampoco esas cepas fueron capaces de inhibir el crecimiento de los hongos (Figura 18). Solamente el hongo *Penicillium* sp. 2 presentó inhibición de crecimiento por la actinobacteria *S. variabilis* (Figura 18, fila A, cepas 8 y 9).

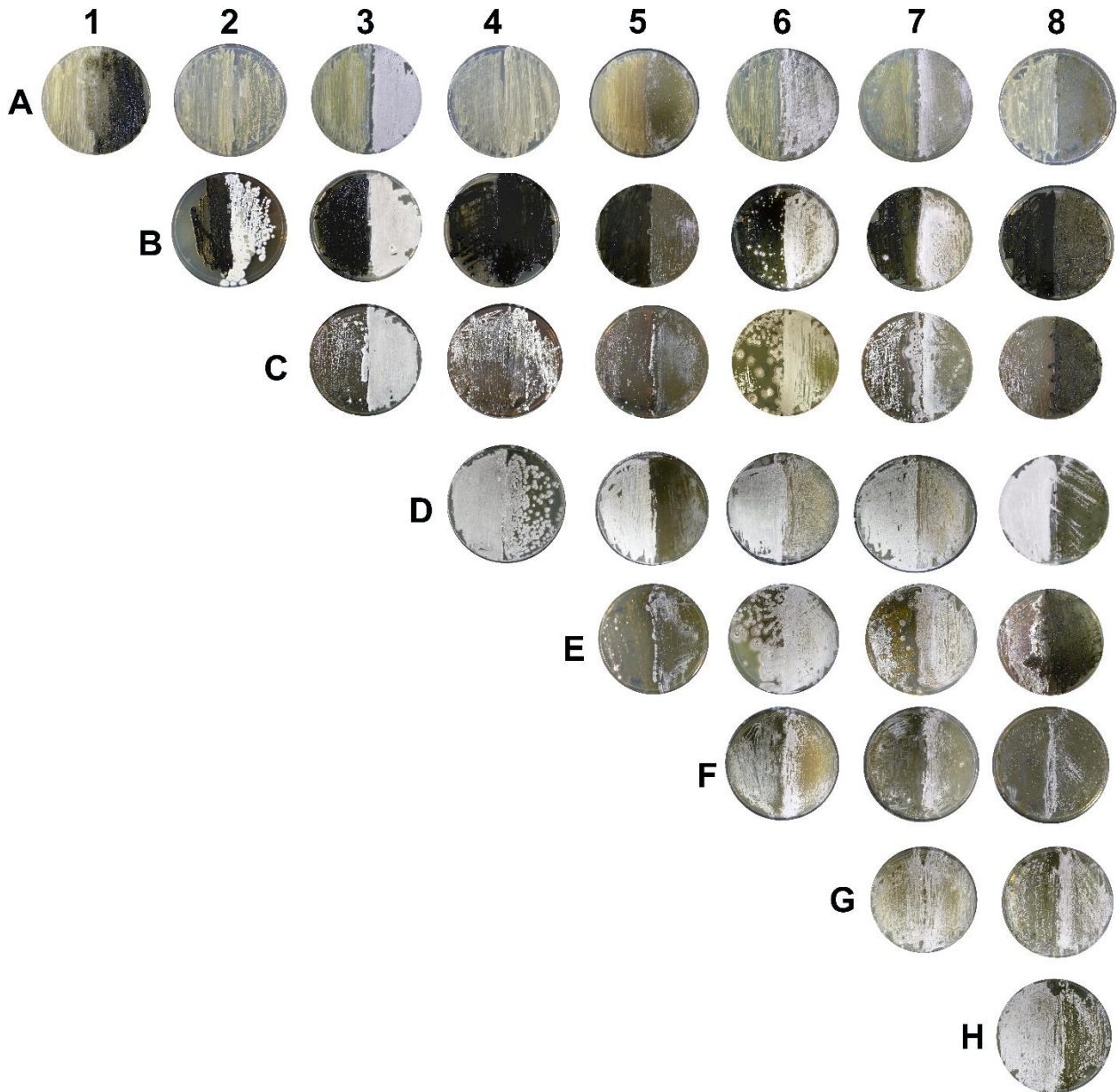


Figura 17. Ensayo de compatibilidad de actinobacterias. Placas de medio M1. Las combinaciones de actinobacterias corresponden a las siguientes filas A) *P. umidemergens*, B) *M. aurantiaca*, C) *Nocardioopsis* sp., D) *S. marokkonensis*, E) *Nocardioopsis* sp., F) *S. anulatus*, G) *S. variabilis*, H) *S. variabilis*. Las columnas corresponden a 1) *M. aurantiaca*, 2) *Nocardioopsis* sp., 3) *S. marokkonensis*, 4) *Nocardioopsis* sp., 5) *S. anulatus*, 6) *S. variabilis*, 7) *S. variabilis*, y 8) *M. aurantiaca*.

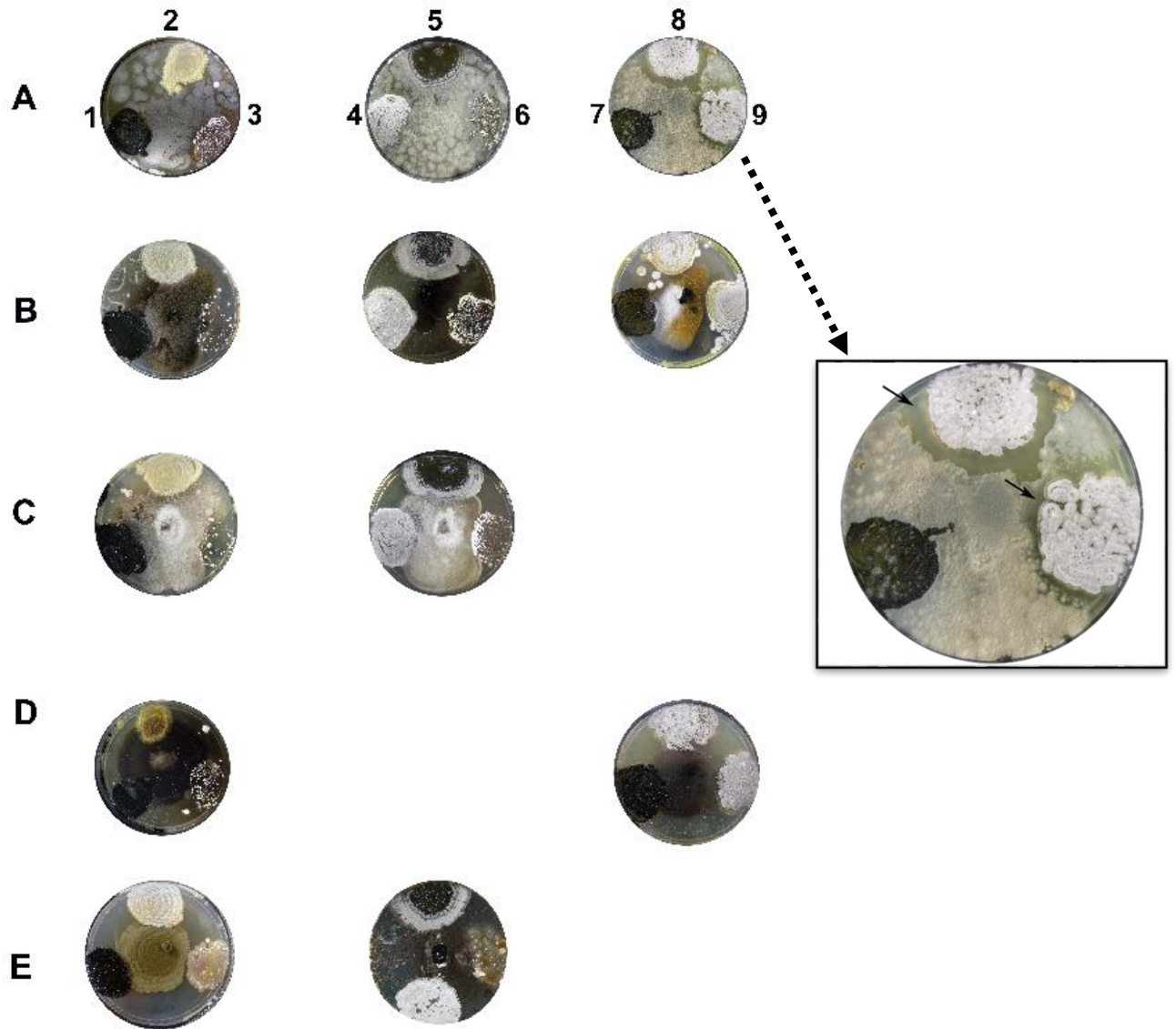


Figura 18. Ensayo de compatibilidad entre hongos y actinobacterias. Se inoculó al centro de la caja Petri la cepa de hongo y alrededor tres cepas de actinobacterias, correspondiendo cada fila a la cepa: A) *Penicillium* sp. 2, B) *Penicillium* sp. 1, C) *Alternaria* sp., D) *Stemphylium* sp., y E) *Cladosporium halotolerans*. Las actinobacterias que corresponden a cada columna son 1) *M. aurantiaca*, 2) *P. umidemergens*, 3) *Nocardiopsis* sp., 4) *Nocardiopsis* sp., 5) *S. marokkonensis*, 6) *S. anulatus*, 7) *M. aurantiaca*, 8) *S. variabilis*, y 9) *S. variabilis*. Con una flecha punteada se señala la imagen ampliada la caja Petri donde se observan los halos de inhibición (flechas) de *Penicillium* sp. 2 con las cepas de *S. variabilis*.

3.1.5. Crecimiento de cepas usando petróleo como fuente única de carbono

Al comparar los cultivos de actinobacterias inoculadas en medio mínimo Czapek con petróleo como única fuente de carbono, los controles abióticos, y los controles con 1.5 g de sacarosa, no se apreció ningún crecimiento a nivel macroscópico en los cultivos suplementados con petróleo (Figura 19). En la evaluación microscópica solamente se observaron muy pocas hifas en los cultivos de *Streptomyces variabilis* y *Streptomyces marokkonensis* con petróleo ligero (Figura 20), por lo que se decidió continuar los ensayos solamente con las cepas de hongos.

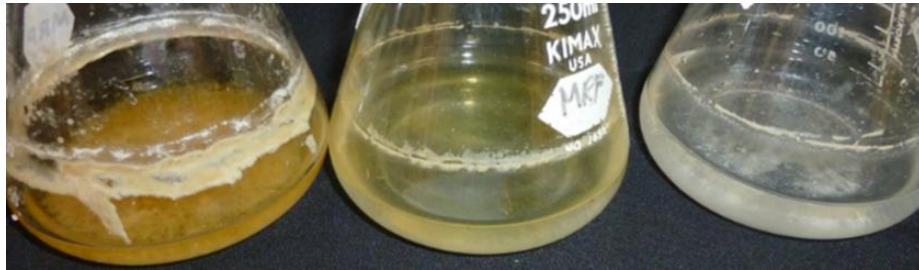


Figura 19. Cultivos de *Streptomyces variabilis*. De izquierda a derecha se observa el medio de cultivo suplementado con sacarosa, con una gran cantidad de biomasa, el cultivo con petróleo ligero al 0.5% v/v con muy poco crecimiento, y el control sin fuente de carbono sin biomasa observable.

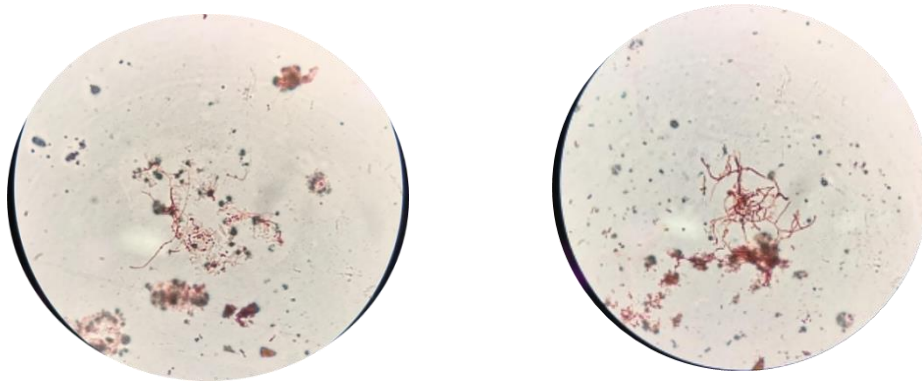


Figura 20. Tinción con safranina de *Streptomyces variabilis* (izquierda) y *Streptomyces marokkonensis* (derecha). Se observaron campos con muy pocas hifas.

3.2. Hongos

3.2.1. Todos los aislados de hongos recuperados pertenecían al phylum Ascomycota

Se obtuvieron 27 aislados de hongos de los sedimentos de las 24 estaciones del golfo de México. Estos se agruparon en cinco morfotipos basados en características morfológicas macroscópicas y microscópicas (Figura 21). Posteriormente se realizó un análisis filogenético de las especies con los genes 18S ARNr, β -tubulina y región ITS. Se identificó con certeza a *Cladosporium halotolerans* a nivel de especie (similitud de $\geq 99\%$ en las secuencias de beta-tubulina y un valor de soporte de bootstrap soporte del 97%), y cuatro aislados a nivel de género (Tabla 6 y Figura 22). Todos los aislados pertenecían al filo Ascomycota dentro de las familias Aspergillaceae, Cladosporiaceae y Pleosporaceae. El taxón *Alternaria* sp. se aisló de la región de Perdido (estación N2, clave 4). En la imagen de la figura 21 en el panel C se puede observar la colonia color oliva y los conidios alargados y septados vertical y transversalmente en forma de raqueta. Los conidios pigmentados de color marrón se observan en la punta de la hifa y en aglomerados en forma de cadena. En el panel A se observa la colonia de color verde formada por *Cladosporium halotolerans* (estación C11, clave 1), con conidios ovoides de superficie lisa que se formaron como cadenas en la punta de la hifa. *Penicillium* sp. 1 (estación D16, con la clave 5) formó una colonia color verde oscuro de aspecto seco y pulverulento y por microscopía se observaron conidios emergiendo de las fiálides. *Penicillium* sp. 2 (estación C11, clave 6) formó colonias verdosas al centro y blancas en la zona de crecimiento, en la microscopía se aprecian también las fiálides y conidios redondos en la punta de las hifas. *Stemphylium* sp. (estación C12, clave 3) formó una colonia de aspecto granuloso verde con blanco, y con conidios ovalados de color marrón y septados vertical y transversalmente. Todos los hongos se aislaron de la región de Coatzacoalcos a excepción de *Alternaria* sp. (Tabla 7).

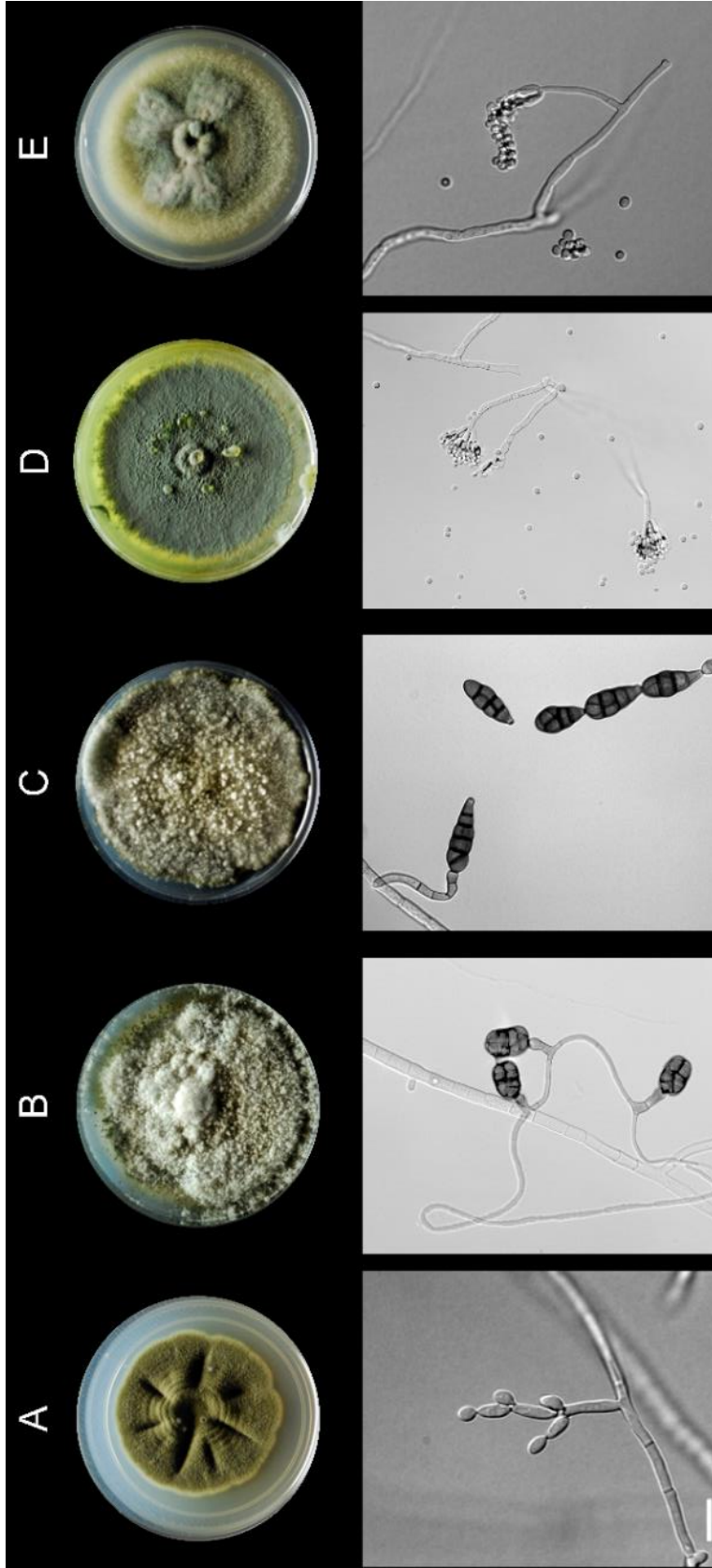


Figura 21. Macromorfología y micromorfología de aislados de hongos recuperados de muestras de sedimentos de aguas profundas y evaluados por su capacidad para degradar el petróleo. Fila superior: morfología de colonias de cepas cultivadas en Placas de Petri con medio PDA. Fila inferior: conidióforos y conidios de las cepas fúngicas obtenidas mediante microscopía DIC. Barra de escala=10 μm . A) *Cladosporium halotolerans*, B) *Stemphylium* sp., C) *Alternaria* sp., D) *Penicillium* sp. 1, y E) *Penicillium* sp. 2.

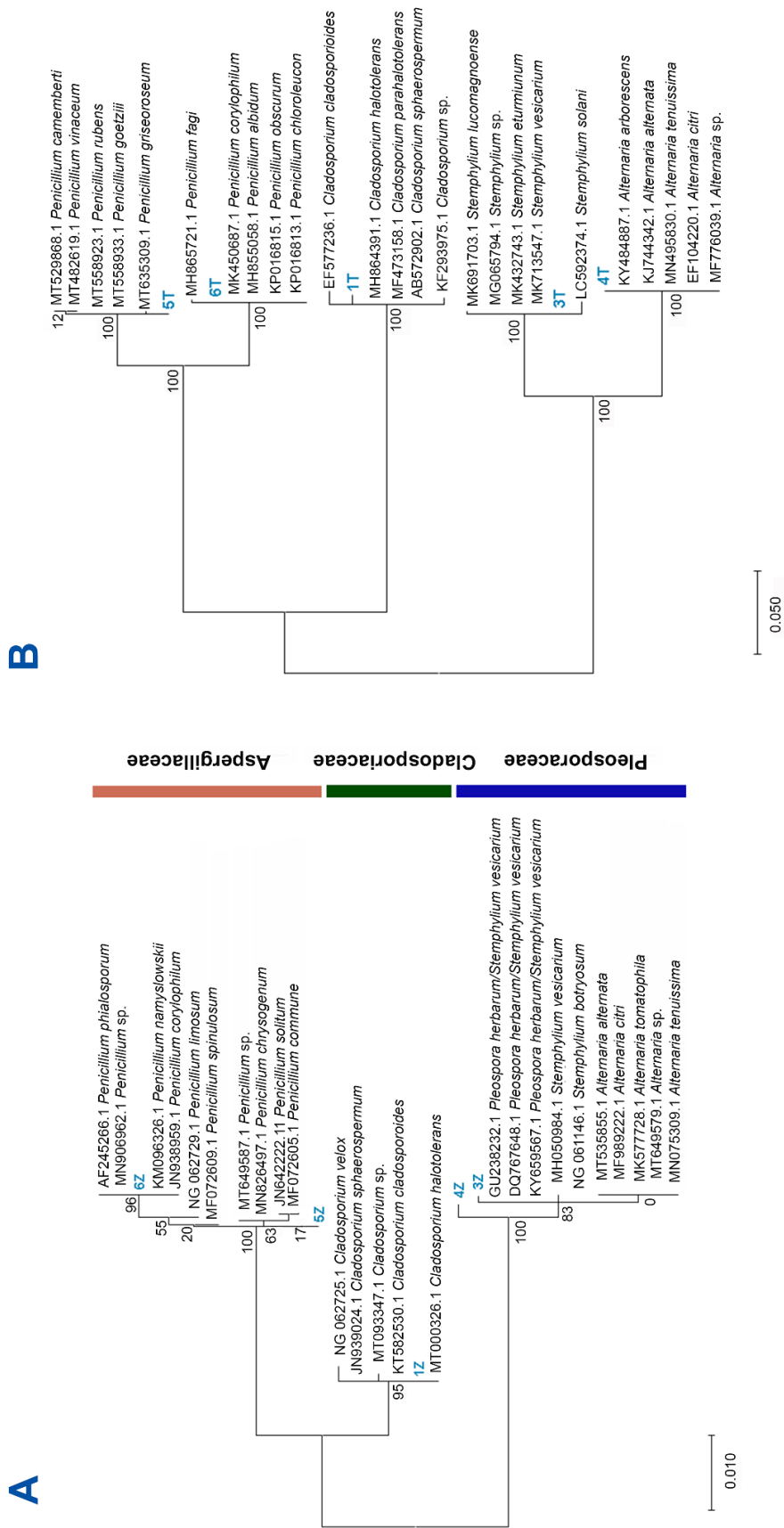
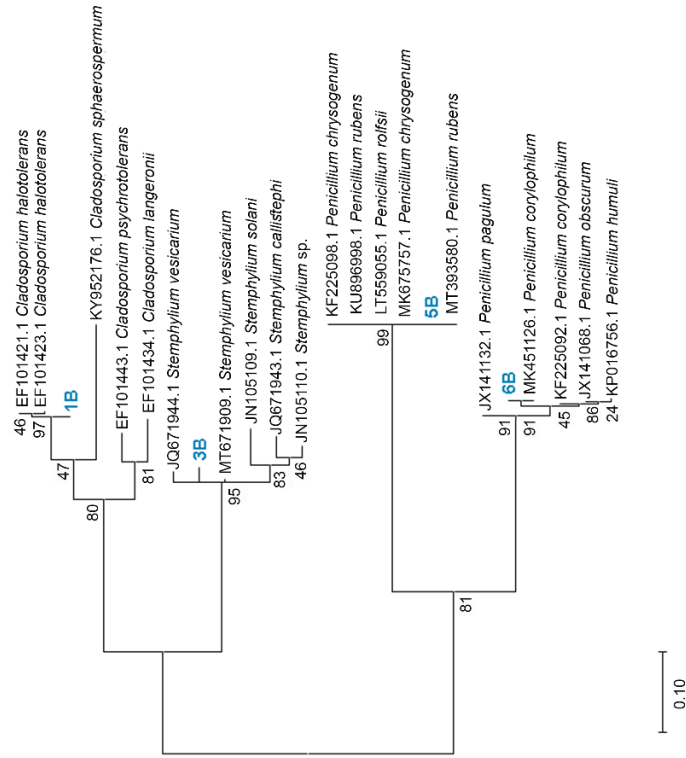


Figura 22. Análisis evolutivo por el Método de Máxima Verosimilitud para A) 18S, B) ITS y C-D) β -tubulina. Los valores de Bootstrap se indican sobre las ramas. La posición filogenética de las secuencias fúngicas derivadas de aislados de aguas profundas se indica con el color azul. La historia evolutiva se infirió utilizando modelos de sustitución K2 + I (A y B), K2 + G (C) y HKY + G (D). Se muestra el árbol con la mayor probabilidad heurística se obtuvo automáticamente aplicando los algoritmos Neighbour-Joining y BioNJ a una matriz de distancias por pares estimadas utilizando el enfoque de Máxima Probabilidad Compuesta (MCL) y luego seleccionando la topología con un valor de probabilidad de registro mayor. El árbol está dibujado a escala, con las longitudes de las ramas medidas en el número de sustituciones por sitio.

C



D

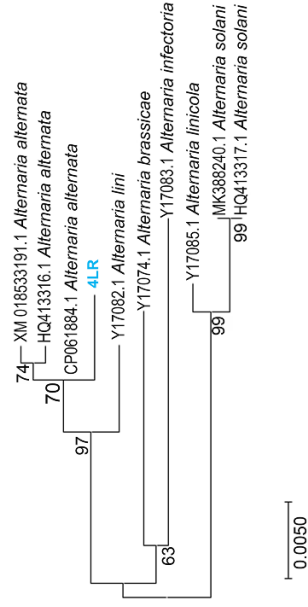


Tabla 7. Estaciones de donde se aislaron los hongos.

Aislado	Estación/Zona
<i>Cladosporium halotolerans</i>	C11, Coatzacoalcos
<i>Stemphylium</i> sp.	C12, Coatzacoalcos
<i>Alternaria</i> sp.	N2, Perdido
<i>Penicillium</i> sp. 1	D16, Coatzacoalcos
<i>Penicillium</i> sp. 2	C11, Coatzacoalcos

3.2.2. Los ensayos de compatibilidad no muestran inhibición de crecimiento entre las cepas de hongos

Los ensayos de compatibilidad mostraron que las cepas crecieron sin mostrar un efecto evidente de inhibición en todas sus combinaciones, por lo que sería factible utilizar todas las cepas en consorcios (Figura 23).

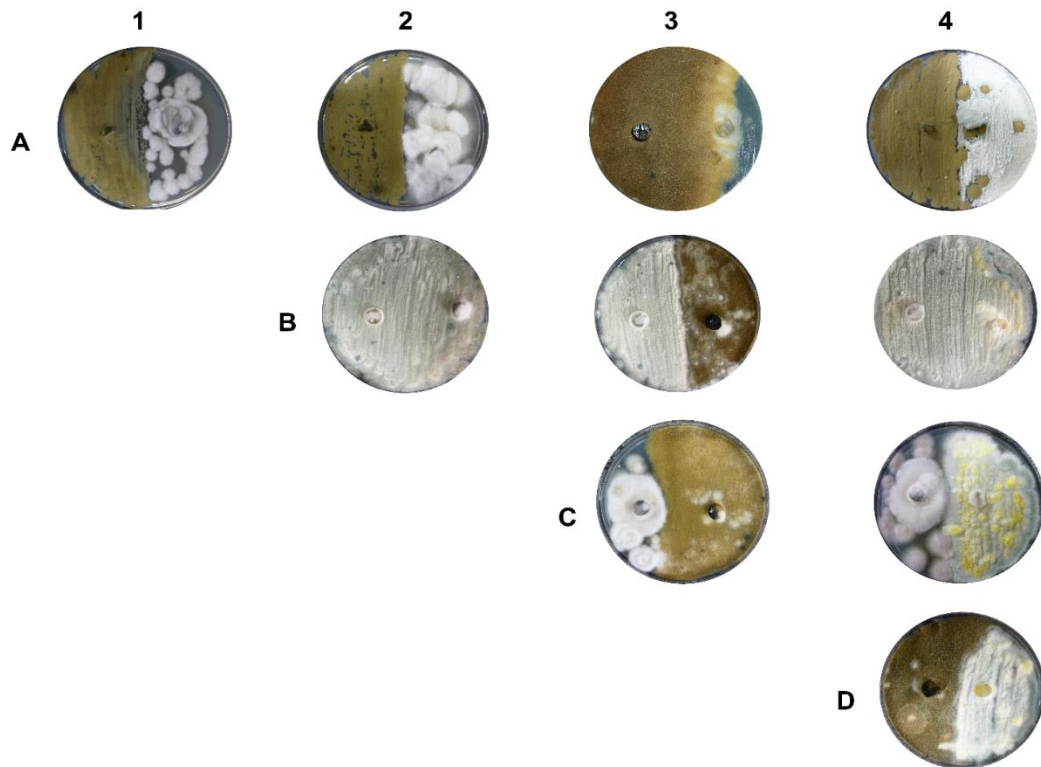


Figura 23. Ensayo de compatibilidad de hongos. Cada fila corresponde a la cepa A) *Cladosporium halotolerans*, B) *Stemphylium* sp., C) *Alternaria* sp., D) *Penicillium* sp. 1. Las columnas corresponden a 1) *Stemphylium* sp., 2) *Alternaria* sp., 3) *Penicillium* sp. 1, y 4) *Penicillium* sp. 2.

3.2.3. Degradación de petróleo crudo extra-pesado por *Alternaria* sp.

Mediante microscopía DIC, se observaron hifas de *Alternaria* sp., *Penicillium* sp. 1, y *Penicillium* sp. 2 fuertemente adheridas al petróleo pesado (Figura 24 A-C). En contraste, se observó que las hifas de *Stemphylium* sp. no se encontraban adheridas al petróleo (Figura 24D). Independientemente de cuán adheridas estuvieran las hifas al crudo, el objetivo principal de este experimento fue confirmar la presencia de micelio, y esto se logró con éxito, como se muestra en las imágenes obtenidas. Con petróleo ligero solo se observaron las hifas con el microscopio y se confirmó ausencia o presencia de hifas (Tabla 8).

Tabla 8. Crecimiento de hongos seleccionados en petróleo crudo de diferentes densidades. El cultivo se llevó a cabo en 50 mL de medio mínimo Czapek modificado con 0.5% p/v de petróleo crudo como única fuente de carbono. La presencia de hifas se indica con (+) y la ausencia con (-).

Cepa	Densidad del petróleo crudo		
	Ligero 40° API	Pesado 16-20° API	Extra-pesado 7-10° API
<i>Alternaria</i> sp.	+	+	+
<i>Cladosporium halotolerans</i>	+	-	-
<i>Penicillium</i> sp. 1	+	+	-
<i>Penicillium</i> sp. 2	+	+	-
<i>Stemphylium</i> sp.	+	+	-

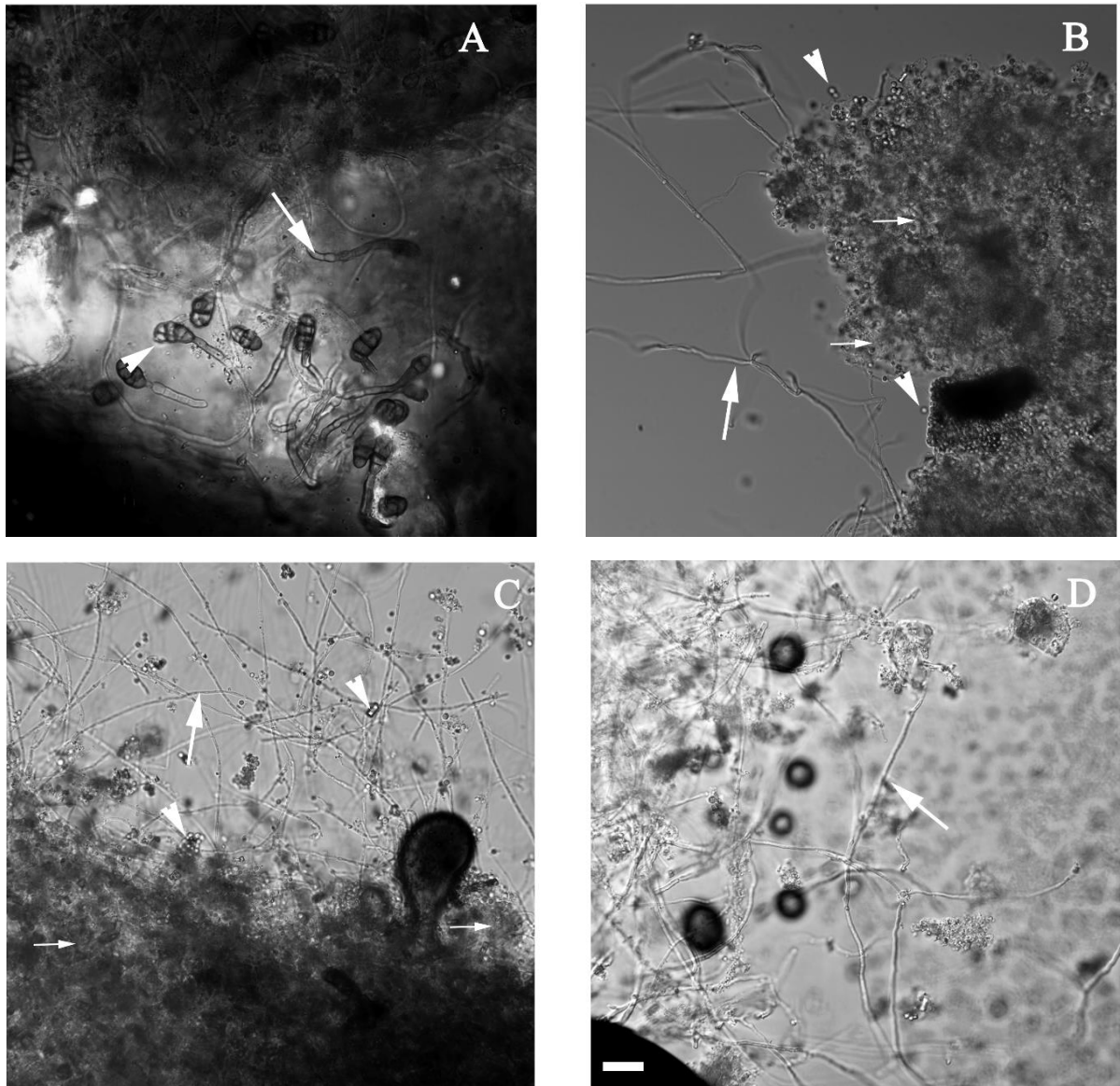


Figura 24. Microscopía de contraste de interferencia diferencial de micelio de hongos cultivados en medio mínimo Czapek con 5% p/v de petróleo pesado (16-20° API). A) Los conidios de *Alternaria* sp. (puntas de flecha) y el micelio (flechas) se adhirieron al petróleo después de 6 días de incubación. B) Hifas de *Penicillium* sp. 1 (flechas) y crecimiento de conidios (puntas de flecha) después de 24 días de incubación; Se pueden observar sales del medio mínimo de Czapek (flechas pequeñas). C) Micelio de *Penicillium* sp. 2 (flechas) y conidios (puntas de flecha) embebidos en sal (flechas pequeñas) y petróleo después de 24 días de incubación. D) Hifas de *Stemphylium* sp. (flechas) sin unión al petróleo después de 27 días de incubación. Barra de escala = 25 µm.

Las hifas y conidios de *Alternaria* sp. también se encontraban fuertemente adheridas al petróleo extra-pesado. Por microscopía DIC se observaron conidios recién formados en las puntas de las hifas (Figura 25). Por SEM, también se observó una densa masa de micelio y conidios creciendo alrededor de la superficie del petróleo (Figura 26).

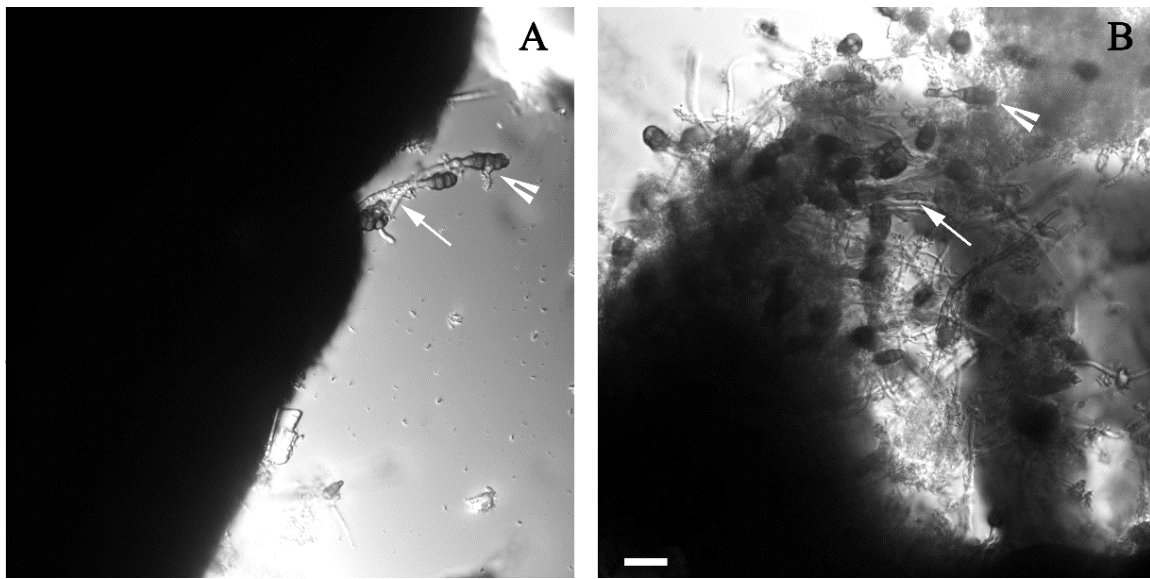


Figura 25. Microscopía de contraste de interferencia diferencial de *Alternaria* sp. cultivado en medio mínimo Czapek con 5% p/v de petróleo extra-pesado 7-10° API. A) Hifas (flecha) y conidios tabicados (punta de flecha) emergiendo de una densa masa de petróleo. B) Micelio (flecha) y conidios (punta de flecha) con sales medias mínimas de Czapek y petróleo. Barra de escala = 25 μ m.

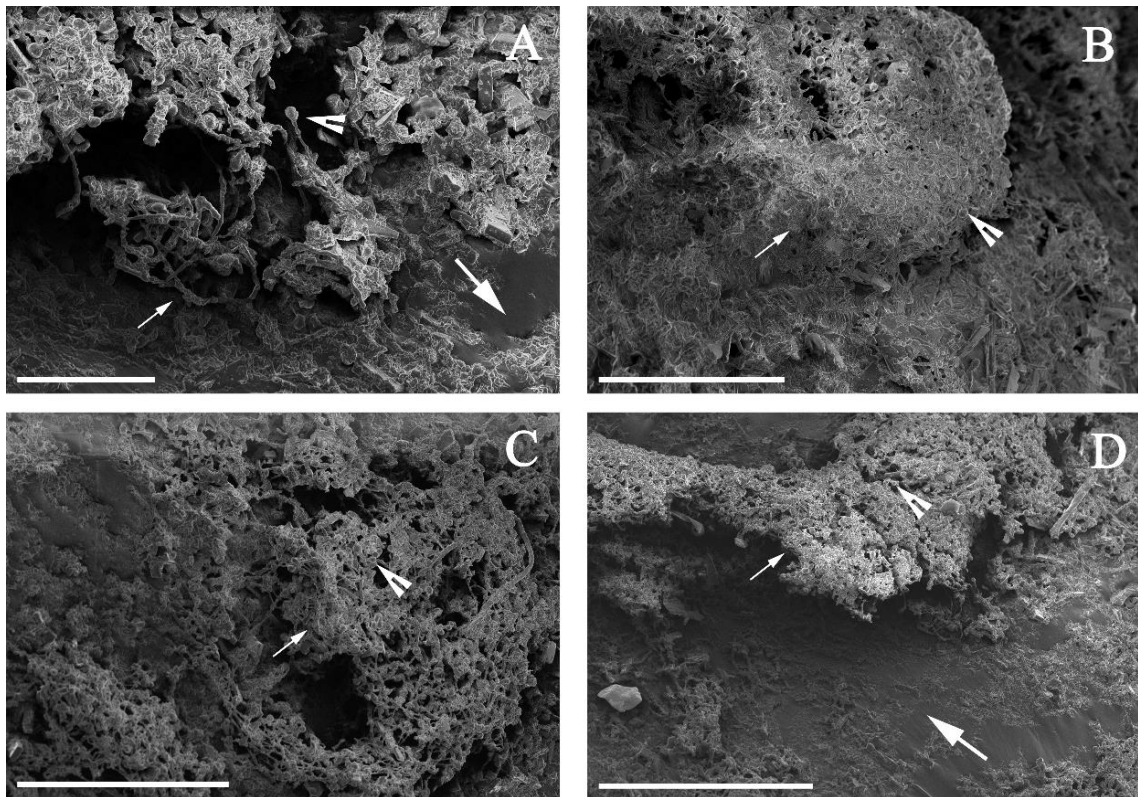
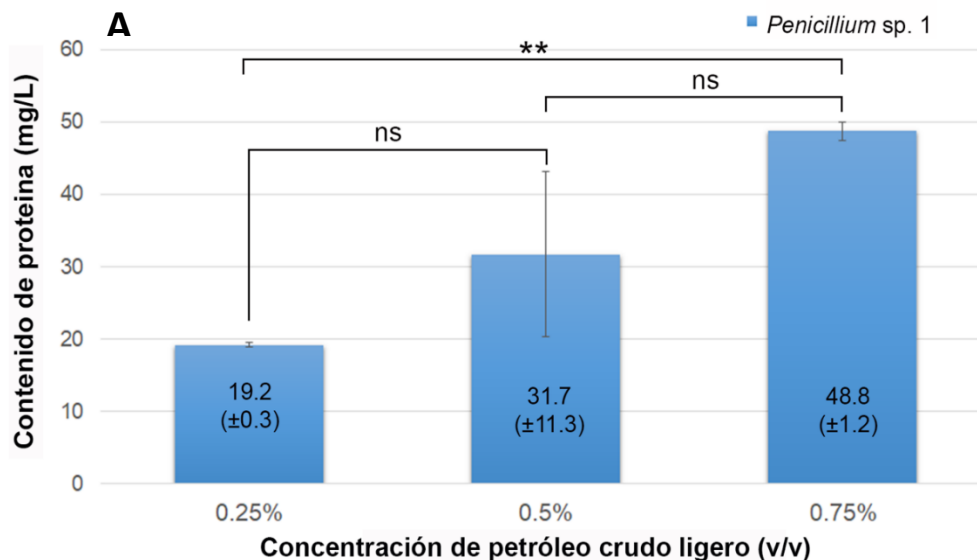


Figura 26. Microscopía electrónica de barrido de *Alternaria* sp. cultivado en medio mínimo Czapek con 5% p/v de petróleo extra-pesado (7-10 ° API). A) Hifas (flechas pequeñas), conidios (puntas de flecha) y superficie lisa de petróleo (flechas). Barra de escala = 100 μ m, B) Micelio (flechas pequeñas), conidios (puntas de flecha). Barra de escala = 200 μ m, C) Hifas (flechas pequeñas), conidios (puntas de flecha). Barra de escala = 300 μ m, y D) Micelio (flechas pequeñas), conidios (puntas de flecha) y petróleo (flechas). Barra de escala = 500 μ m. En todas las imágenes, el micelio está en estrecho contacto con la superficie del petróleo.

Para *Penicillium* spp., la cantidad promedio máxima de proteína (40.5 ± 1.2 mg/L para *Penicillium* 1 y 46.0 ± 13.7 mg/L para *Penicillium* 2) se obtuvo para los cultivos con 0.75% v/v de petróleo crudo ligero (Figura 27). La concentración de proteínas en *Penicillium* sp. 1 fue significativamente mayor ($p=0.012$) a una concentración de 0.75% (v/v) que al 0.25% (v/v) del crudo ligero. Mientras que para *Penicillium* sp. 2, no se pudieron observar diferencias significativas con las diferentes concentraciones de crudo ligero ($p=5.14$) (Figura 27). Para cuantificar la concentración de proteínas en los cultivos de *Alternaria* sp. en medio mínimo Czapek suplementado con 0.5% v/v de petróleo extra-pesado, fue necesario agregar tolueno para separar el micelio del petróleo porque había una fuerte unión entre ellos y el micelio no se podía recuperar fácilmente mediante filtración. Se obtuvo un aumento promedio de proteína total de 7.04 ± 0.20 mg/L para los cultivos de *Alternaria* sp. después de un mes de incubación en medio mínimo Czapek suplementado con petróleo extra-pesado al 0.5% p/v. Ese valor fue ligeramente superior al obtenido para los cultivos control sin petróleo extra-pesado, aunque no fue significativo (5.9 ± 0.32 mg/L); ($p=0.066$). Macroscópicamente se apreció una diferencia en el crecimiento de micelio entre los cultivos con petróleo extra-pesado y los controles sin fuente de carbono (Figura 28).



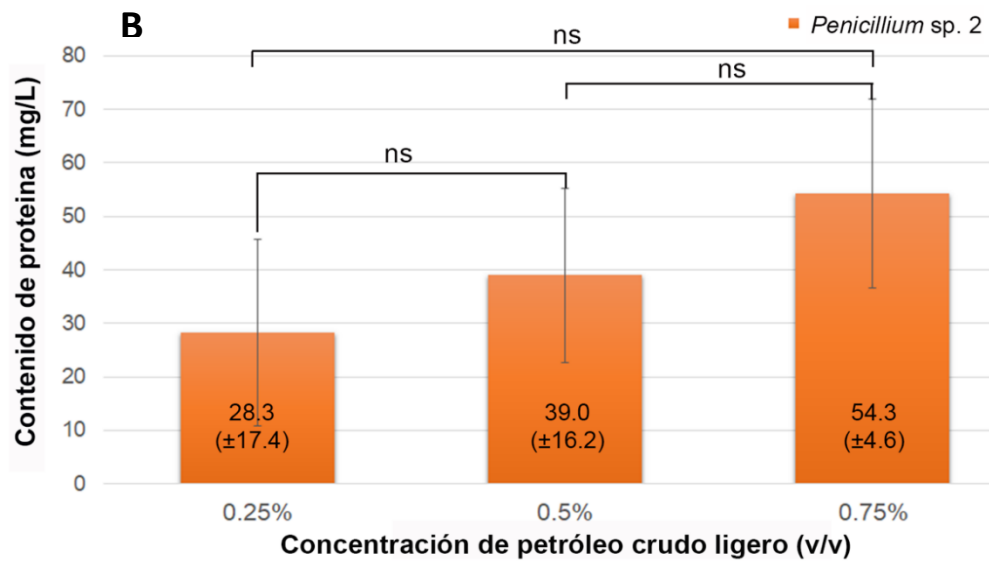


Figura 27. Contenido de proteína de *Penicillium* spp. obtenido con diferentes concentraciones de petróleo crudo ligero (0.25%, 0.5% y 0.75%). A) Se encontraron diferencias significativas (**) en el contenido de proteína con *Penicillium* sp. 1 entre la concentración de 0.25% y 0.75% de petróleo crudo ligero. B) No se encontraron diferencias significativas (ns) entre las diferentes concentraciones con *Penicillium* sp. 2.

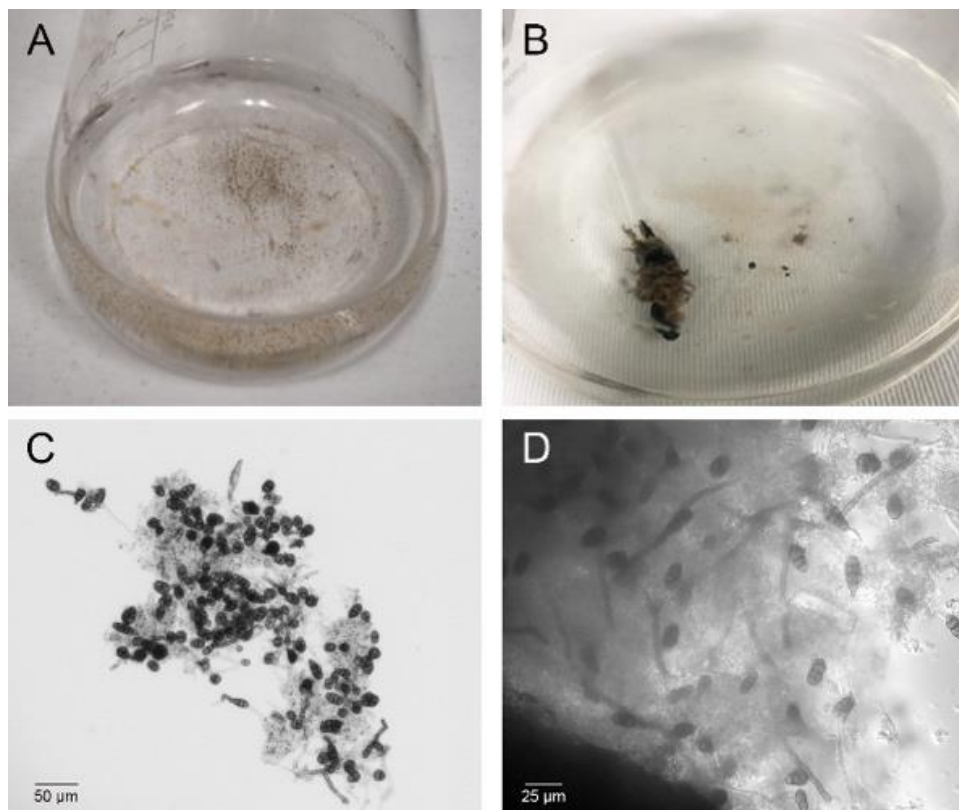


Figura 28. Matrazes de *Alternaria* sp. con medio mínimo Czapek modificado incubados por un mes a 30°C y microscopía DIC A) Control sin fuente de carbono, no se observa un crecimiento notable. B) *Alternaria* sp. con petróleo extra-pesado como fuente única de petróleo, se observa micelio alrededor del petróleo C) Microscopía de control sin fuente carbono; se observan conidios y sales del medio Czapek. D) Microscopía de *Alternaria* sp. con petróleo extra-pesado, se aprecian los conidios germinados y una gran cantidad de hifas.

3.2.4. *Alternaria* sp. degrada principalmente los componentes aromáticos del petróleo crudo extra-pesado

La degradación del crudo extra-pesado por *Alternaria* sp., después de 30 días de crecimiento, se determinó mediante cromatografía de gases tanto en el petróleo extra-pesado completo como en sus fracciones (Figura 29). Los principales componentes del petróleo extra-pesado completo, es decir sin ser biodegradado, correspondieron a la fracción aromática con un 43.5% (± 10.8), seguida de los saturados con un 35.5% (± 1.5) y finalmente de resinas-asfaltenos con un 21% (± 1.9).

De acuerdo a los cromatogramas, *Alternaria* sp. degradó el 25.6% (± 7.6) del crudo total (Figura 30). Cabe destacar que *Alternaria* sp. presentó una mayor metabolización de la fracción aromática, con 91.3% (± 15.7) de degradación de estos compuestos. También degradó la fracción de saturados en un 24.7% (± 1.0). Las fracciones de resinas-asfaltenos mostraron un incremento del 108% (± 5.8), debido principalmente a la producción de moléculas polares. Es decir, la composición del crudo después de la biodegradación fue del 26.7% (± 1.4) de la fracción saturada, 3.7% (± 0.9) de la fracción aromática y 43.8% (± 3.2) de la fracción de resinas-asfaltenos (Figura 29).

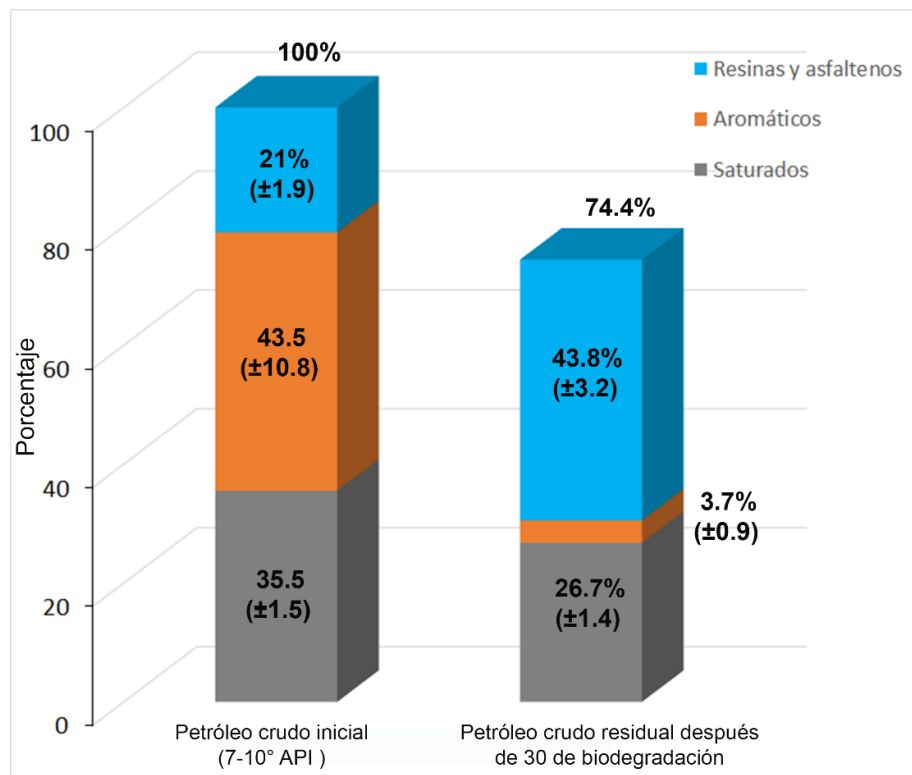


Figura 29. Porcentaje de degradación de hidrocarburos después de 30 días de crecimiento de *Alternaria* sp. con petróleo extra-pesado (7-10° API) como única fuente de carbono, composiciones de petróleo inicial y residual. El número en la parte superior de las columnas representa el petróleo residual después de la biodegradación y el porcentaje del petróleo crudo inicial. Los números de cada columna son el porcentaje de cada fracción, en la columna derecha el porcentaje corresponde al petróleo remanente. El petróleo se fraccionó mediante el procedimiento SARA modificado para obtener las fracciones de los saturados, aromáticos y polares. Los hidrocarburos de petróleo totales se determinaron mediante Cromatografía de Gases equipada con detector FID.

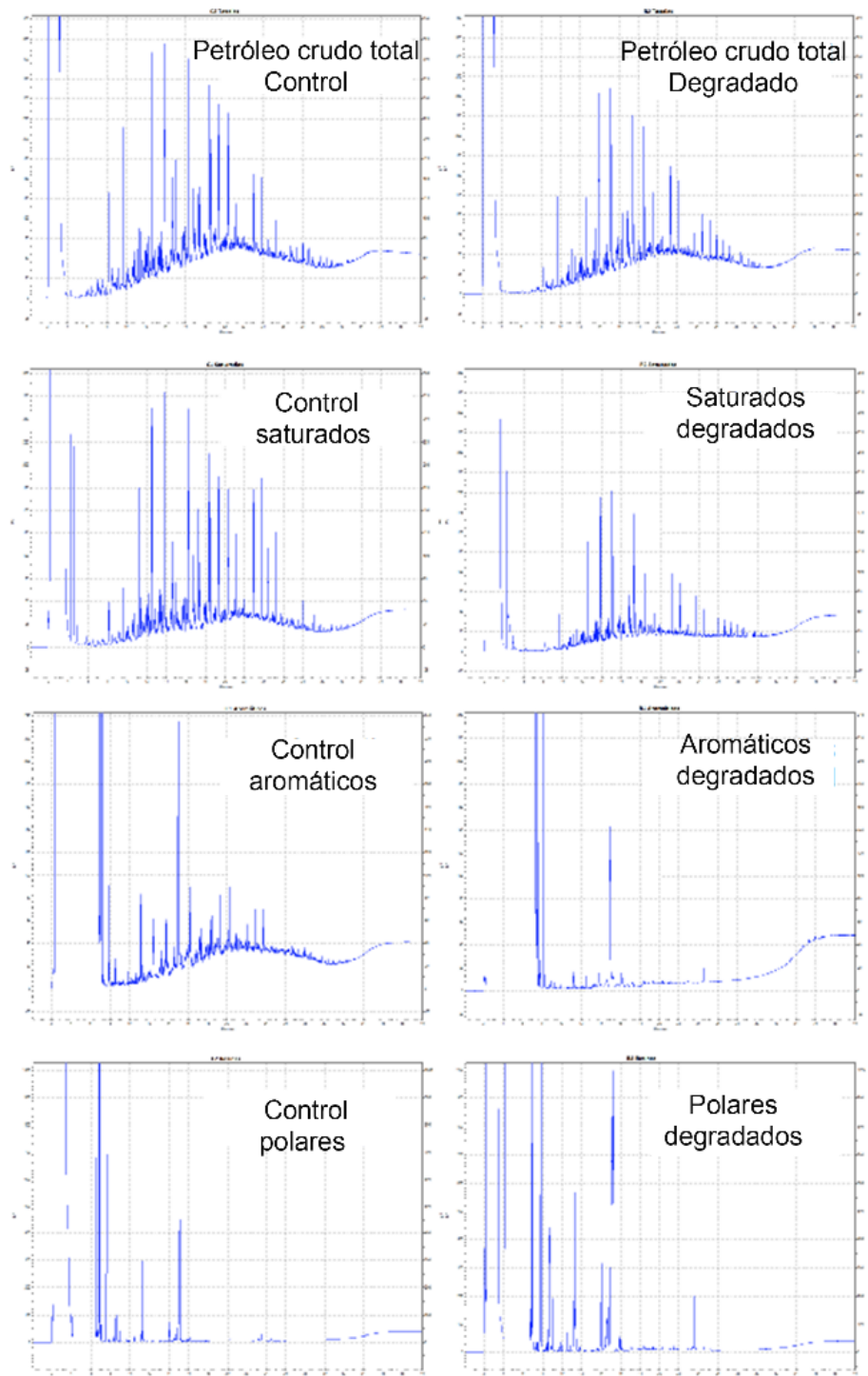


Figura 30. Cromatogramas de petróleo extra-pesado completo y sus fracciones SAP. La columna de la izquierda corresponde a los controles abióticos y la columna de la derecha a las muestras degradadas. A) Cromatogramas de petróleo extra-pesado entero y fracciones SAP de controles abióticos B) Cromatogramas de petróleo extra-pesado y fracciones SAP degradado por *Alternaria* sp.

Capítulo 4. Discusión

El golfo de México ha sido una fuente importante de petróleo marino. Con el descubrimiento de nuevos campos petroleros a partir de 1938, la zona comercial mexicana ha sido ampliamente explorada en busca de campos petroleros en aguas poco profundas. Hoy en día, debido al agotamiento de reservas de petróleo ligero de aguas poco profundas, la extracción de petróleo en aguas profundas es la tendencia predominante. Sin embargo, cuanto mayor es la profundidad, mayor es el riesgo de un derrame accidental de petróleo (Murawski et al., 2020). Por ello, diversos estudios se han centrado en identificar microorganismos hidrocarbonoclastas del golfo de México como potenciales agentes de biorremediación. Después del derrame de petróleo de Deepwater Horizon de 2010, se identificaron microorganismos potencialmente interesantes para la biorremediación.

En estudios recientes del Consorcio de Investigación del golfo de México (CIGoM) se han descrito bacterias hidrocarbonoclastas identificados en la ZEE mexicana del golfo de México (Moreno-Ulloa et al., 2019). También se ha reportado el perfil químico de los metabolomas de aislados bacterianos de sedimentos de aguas profundas del golfo de México, las cepas crecieron en una mezcla de hidrocarburos simples y complejos y se encontraron metabolitos no reportados de la superclase de lípidos y moléculas similares a lípidos (Moreno-Ulloa et al., 2019). Otro estudio que describe la comunidad bacteriana de línea base en sedimentos de diferentes estaciones del suroeste del golfo de México, encontró que las zonas someras con una mayor concentración de hidrocarburos aromáticos albergaban más bacterias degradadoras de hidrocarburos que las zonas profundas (Godoy-Lozano et al., 2018). Estos datos ayudarán a evaluar los cambios en la comunidad bacteriana si ocurriera un derrame de petróleo accidental.

Las actinobacterias poseen muchas características que les confieren ciertas ventajas para sobrevivir en condiciones extremas, como ambientes secos, baja cantidad de nutrientes, y también pueden producir biosurfactantes que ayudan a incrementar la biodisponibilidad de los contaminantes y facilitar el proceso de biodegradación (Alvarez et al., 2011). Estas ventajas hacen que sea posible encontrar actinobacterias tanto en medios prístinos no contaminados como en contaminados con hidrocarburos, como se demostró en un estudio realizado en el golfo de México, donde las actinobacterias representaron el 2.5% del total las bacterias identificadas (Godoy-Lozano et al., 2018). Por tanto, es importante realizar bioprospección de actinobacterias que tengan las enzimas necesarias para biodegradar petróleo crudo. En este estudio se encontró que solo las actinobacterias *Streptomyces marokkonensis* y *S. variabilis* fueron capaces de crecer, aunque de forma muy limitada, con petróleo crudo

ligero, por lo que no se continuaron los ensayos con estas cepas. Sin embargo, existe la posibilidad de que la biodegradación aumente si se forman consorcios con las diferentes cepas de actinobacterias, tal como lo sugieren estudios anteriores, donde las actinobacterias en los consorcios bacterianos mostraron la mayor contribución en términos de degradación de hidrocarburos de petróleo (Auffret et al., 2015). En este trabajo no se encontró inhibición entre las cepas de actinobacterias aisladas, sin embargo, por motivos de tiempo no se pudo continuar con los experimentos para evaluar si los consorcios de actinobacterias podían degradar petróleo. El objetivo se enfocó a *Alternaria* sp. por la relevancia de los resultados obtenidos con esta cepa.

En cuanto a los hongos, sus capacidades metabólicas y la rápida propagación del micelio hacen que sean candidatos atractivos para ser aplicados para biorremediación (Vidali, 2001). En particular, los hongos de origen marino han sido reconocidos como agentes de biorremediación prometedores debido a sus adaptaciones metabólicas a las fuentes de petróleo de origen natural (Kumar et al., 2011; Kvenvolden y Cooper, 2003). Sin embargo, su capacidad para degradar petróleo pesado y extra-pesado ha sido muy escasamente estudiada.

En este estudio, se demostró la capacidad de *Alternaria* sp., *Penicillium* spp. y *Stemphylium* sp., aislados de sedimentos de aguas profundas de la ZEE mexicana del golfo de México, para crecer utilizando petróleo pesado, y más importante aún, se demostró la capacidad de *Alternaria* sp. para crecer utilizando petróleo extra-pesado como única fuente de carbono. Desafortunadamente, dada la naturaleza del petróleo extra-pesado y la fuerte unión del micelio de *Alternaria* sp. al petróleo extra-pesado en la varilla de vidrio, la cuantificación de la biomasa no se logró con éxito. Sin embargo, a nivel visible, se pudo observar el micelio de *Alternaria* sp. sólo en los cultivos suplementados con petróleo extra-pesado (Figura 30). Se concluyó que el tolueno agregado para la cuantificación de proteínas para obtener una medición indirecta de la biomasa fúngica probablemente interfirió con la recuperación completa del micelio, y el contenido de proteína obtenido no fue una estimación precisa de la cantidad real de proteína.

Aunque los taxones de hongos identificados en este estudio han sido reportados previamente como degradadores de petróleo crudo livianos y medianos, no existen reportes previos de degradación de petróleo pesado o petróleo extra-pesado por ninguno de ellos. *Penicillium* spp. aislados de diversos ambientes contaminados han sido ampliamente reportados como capaces de eliminar una amplia gama de contaminantes, incluidos metales pesados e hidrocarburos de petróleo (Elshafie et al., 2007; Singh, 2006). *Penicillium* spp. puede degradar eficientemente hidrocarburos aromáticos policíclicos como el fluoreno (Garon y Sage, 2004), pireno (Saraswathy y Hallberg, 2005), y fenantreno (Melendez-Estrada et

al., 2006). *Stemphylium vesicarium* ha sido aislado de suelos contaminados con petróleo en Irán (Mohammadian et al., 2017) y de un sitio marino mediterráneo después de un derrame de petróleo, donde también se recuperó *C. halotolerans* (Bovio et al., 2017).

Alternaria spp. han sido aisladas de zonas terrestres contaminadas y hay evidencia de su capacidad para degradar PAH (Balaji et al., 2014); también se han aislado de bolas de alquitrán y de jardines no contaminados y fueron capaces de degradar petróleo crudo (Elshafie et al., 2007) y octano y decano respectivamente (Loretta et al., 2017). *A. alternata* tiene la capacidad de sintetizar enzimas relacionadas con la degradación de hidrocarburos, como la peroxidasa de manganeso y la peroxidasa de lignina (Ali et al., 2012; Vazquez-Duhalt et al., 1994). Existe un análisis comparativo del perfil de secretoma de algunos hongos oxidantes de manganeso II que incluyen a *Alternaria alternata* (Zeiner et al., 2016), así como un informe de la producción de lignina peroxidasa (Sharma et al., 2016), y esto sienta un precedente para la capacidad de degradación potencial de *Alternaria* sp.

Los crudos pesados contienen una alta proporción de hidrocarburos de alto peso molecular y niveles elevados de heterocompuestos, incluidos azufre, nitrógeno, oxígeno y metales pesados (Speight, 1991). La composición típica de SARA de los petróleos pesados es 4-23% de saturados, 14-32% de aromáticos, 27-46% de resinas y 15-43% de asfaltenos (Hinkle et al., 2008). La alta concentración de resinas y asfaltenos, junto con la alta concentración de HAP de alto peso molecular en petróleo extra-pesado, plantea un desafío para los procesos de biodegradación y biorremediación por ser moléculas mucho más complejas. En este estudio no se analizó la naturaleza química de los productos de la degradación de hidrocarburos. La composición del petróleo crudo incluye varios miles de hidrocarburos diferentes que podrían representar una fuente potencial de carbono para *Alternaria* sp. En consecuencia, los productos resultantes de la degradación microbiana por *Alternaria* sp. también son una mezcla compleja de compuestos polares difíciles de resolver con herramientas de química analítica convencionales. Sin embargo, la naturaleza química de los productos de degradación de los hidrocarburos se ha estudiado ampliamente (Van Hamme et al., 2003; Varjani, 2017). Existen varias vías, como la oxidación terminal, la oxidación sub-terminal, la ω -oxidación y la β -oxidación que están involucradas en la degradación de los hidrocarburos alifáticos (Varjani, 2017). La oxidación inicial del alcano da como resultado la formación de un alcohol, que luego puede ser metabolizado por la vía de la β -oxidación de ácidos grasos. Por otro lado, la oxidación inicial de los hidrocarburos aromáticos por hongos está mediada por monooxigenasas que forman un trans-diol. A continuación, el anillo de benceno se escinde de diferentes formas por las enzimas que conducen a la formación de intermedios centrales, que se convierten posteriormente en intermedios del ciclo del ácido tricarbóxico (TCA). Finalmente, los alcanos

cíclicos se convierten en alcoholes cíclicos y se deshidrogenan en cetonas mediante un sistema de oxidasas. Luego, un sistema de monooxigenasas forma lactonatos y una lactona hidrolasa finalmente abre el anillo (Varjani, 2017).

Alternaria sp. transformó el 91.3% de la fracción aromática del petróleo extra-pesado que se añadió como fuente única de carbono, mostrando una gran afinidad por esta fracción. El aumento porcentual de la fracción resina-asfaltenos en los hidrocarburos degradados, sugiere que *Alternaria* sp. transforma la fracción aromática a compuestos más polares que migraron a la fracción resina-asfaltenos. A pesar de este incremento, se ha establecido previamente que los compuestos polares que aparecen en la fracción resina-asfaltenos como resultado de la biodegradación de los saturados y especialmente de la fracción aromática, son más biodegradables que los hidrocarburos originales (Kulik et al., 2006; Meulenberg et al., 1997).

En las primeras etapas de este proyecto, en ensayos preliminares con todas las cepas, se realizó el mismo experimento con *Penicillium* sp. 1 y con *Penicillium* sp. 2 utilizando petróleo crudo ligero para determinar a qué concentración se producía más biomasa. Para ambos hongos, se obtuvo la máxima cantidad de proteína para los cultivos suplementados con 0.75% v/v de petróleo crudo ligero (*Penicillium* sp. 1 con 48.8 ± 1.2 mg/L y *Penicillium* sp. 2 con 54.3 ± 4.6 mg/L). No fue necesario utilizar tolueno en ese caso para separar el micelio del petróleo porque no había adhesión, por lo que el micelio se recuperó fácilmente mediante filtración, no se realizaron más estudios con estos hongos, pero sirvieron como referencia para los resultados obtenidos con *Alternaria* sp.

En cuanto al incremento en el contenido de proteína en los cultivos de *Alternaria* sp., suplementados con 0.5% p/v de petróleo crudo extra-pesado como única fuente de carbono, fue un claro indicio de producción de biomasa, confirmando cuantitativamente el crecimiento de hifas observado a la par por análisis microscópico. Aunque se pudo observar claramente el crecimiento de micelio de *Alternaria* sp. en el cultivo (Figura 28), probablemente el tratamiento con tolueno interfirió con la recuperación completa del micelio y el contenido de proteína obtenido no fue una representación precisa de la cantidad real de proteína.

La estación N2 (región de Perdido), de donde se aisló *Alternaria* sp., no mostró ninguna diferencia notable en salinidad, temperatura o concentración de oxígeno disuelto en comparación con el resto de las estaciones (Tabla 1). El golfo de México tiene un sistema de dos capas; la capa superior (por encima de 800-1000 m) está altamente regulada por la Corriente de Bucle y sus remolinos asociados (LCE) que

ingresan al golfo de México a través del Canal de Yucatán (Hamilton, 2009). Las descargas del río, la variación de temperatura y la entrada de agua dulce no afectan la salinidad o la temperatura más allá de los 100 m superiores de la columna de agua (Portela et al., 2018). En consecuencia, el principal impulsor de las condiciones hidrográficas en el golfo de México de donde se tomaron las muestras de sedimentos fue la presencia local de LCE (Portela et al., 2018). Independientemente de la amplia distribución de los sitios muestreados en el golfo de México, no es posible reconocer una diferencia entre las estaciones Perdido y Coatzacoalcos.

Algunas estimaciones recientes indican que las reservas de petróleo no convencional, que incluyen petróleo pesado, petróleo extra-pesado y betún, podrían superar los 6 mil millones de barriles (Alboudwarej et al., 2006). La extracción ineludible de estos reservorios producirá inevitablemente derrames de petróleo. Los resultados expuestos en esta tesis muestran la importancia de las comunidades fúngicas para degradar este tipo de hidrocarburos. Por lo tanto, es fundamental explorar los microorganismos fúngicos nativos capaces de degradar el petróleo pesado y especialmente el petróleo extra-pesado en caso de que sea necesario implementar planes de acción y reacción para mitigar el impacto ambiental de cualquier derrame accidental de petróleo. Entre las estrategias de biorremediación, la bioaumentación es una tecnología *in situ* que implica la introducción de microorganismos hidrocarbonoclastas autóctonos (obtenidos del sitio contaminado) o exógenos al sitio contaminado para mejorar la degradación microbiana en el sitio (Kingston, 2002). En México, las propuestas de remediación deben ser aprobados por la SEMARNAT (NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012 y NOM-143-SEMARNAT-2003). Existen ejemplos de biorremediación exitosa de los derrames de hidrocarburos marinos (Atlas y Hazen, 2011) ya que los derrames de petróleo en alta mar tienen un gran impacto en los sistemas ecológicos, lo cual repercute importantemente en la economía (Kingston, 2002).

Muchos estudios se centran en la degradación de petróleo en la columna de agua y no se ha prestado atención a la degradación de sedimentos marinos. La biodegradación del petróleo en los sedimentos es importante para las fracciones pesadas de petróleo, que tienden a asentarse después del derrame de petróleo. Además, las condiciones ambientales de los sedimentos son diferentes, como las concentraciones de oxígeno y nutrientes. Existen algunos desafíos asociados con la biorremediación del petróleo derramado (Macaulay y Rees, 2014), que incluyen: i) Resistencia a la degradación de las fracciones pesadas, especialmente asfaltenos e hidrocarburos aromáticos policíclicos de alta masa molar. Por tanto, parece crucial contar con cepas microbianas capaces de realizar la biodegradación de petróleos pesados y extra-pesados como *Alternaria* sp. aislada y caracterizada en este trabajo; ii) Eutrofización provocada por bioestimulación. El agua de mar se caracteriza por las bajas concentraciones de nitrógeno

y fósforo, éstos son factores limitantes para la degradación del petróleo. El uso de fertilizantes oleofílicos parece ser un tipo de nutriente eficaz para ser aplicado en ambientes marinos para prevenir la eutrofización; iii) Insostenibilidad de la bioaumentación en campo. Esto se puede reducir utilizando microorganismos bien adaptados, como, por ejemplo, los adaptados a las condiciones de los sedimentos. Además, la encapsulación del microorganismo puede protegerlo en las nuevas condiciones ambientales; iv) Poca biodisponibilidad del petróleo derramado. La biodegradación del petróleo tiene lugar en la interfase agua-petróleo. Por lo tanto, la dispersión o solubilización del petróleo es ampliamente utilizada, mediante la adición de tenso-activos químicos o biológicos para mejorar la biodegradación. Sin embargo, los agentes químicos podrían ser potencialmente tóxicos para el medio ambiente; y v) Ineficiencia de la biodegradación del petróleo en ambientes semi-anóxicos. Como se mencionó anteriormente, en sedimentos profundos, hay una baja concentración de oxígeno. Es por esta razón que es importante tener microorganismos aislados de sedimentos marinos profundos como *Alternaria* sp. aislada y caracterizada en este trabajo (Macaulay y Rees, 2014).

Teniendo en cuenta todo lo anterior, en este trabajo se demostró que, de todos los microorganismos aislados en este trabajo, de entre las cepas de actinobacterias y las cepas de hongos, únicamente *Alternaria* sp., fue capaz de degradar algunos de los componentes más pesados y recalcitrantes del petróleo crudo extra-pesado. Las actinobacterias tienen un gran potencial para degradar petróleo, sin embargo, los cultivos axénicos pudieran resultar ser menos efectivos que los consorcios de estas bacterias y esta podría ser la razón por la que no se tuvieron resultados más significativos con las actinobacterias en cuanto a la degradación de petróleo crudo pesado y extra-pesado. Aunque la cantidad de microorganismos cultivables es muy baja, se logró aislar exitosamente un microorganismo que pudo degradar petróleo crudo extra-pesado, especialmente cuando las muestras provienen de condiciones ambientales extremas. Por tanto, *Alternaria* sp. puede ser candidata para futuros estudios en donde se evalúe su desempeño en diferentes condiciones ambientales, en combinación con las diferentes cepas de bacterias y hongos aislados en este trabajo. También se podrían evaluar las interacciones de *Alternaria* sp. con comunidades microbiológicas de la zona contaminada con el fin de evaluar su uso para la biorremediación en el caso de un derrame de petróleo.

Capítulo 5. Conclusiones

En este estudio se demostró que existen cepas de hongos en el golfo de México con la capacidad de degradar petróleo crudo de diferentes densidades. Esto sugiere que en el golfo de México es posible encontrar cepas fúngicas cultivables con capacidades metabólicas poco conocidas hasta el momento.

El uso de microscopía como un primer acercamiento para la verificación de la germinación de conidios usando petróleo crudo como fuente única de carbono, resultó ser un método eficaz y simple para determinar si las cepas de hongos pueden degradar petróleo crudo.

Los resultados obtenidos con las actinobacterias demostraron que los cultivos axénicos tienen una capacidad limitada para degradar petróleo crudo ligero. Si bien se podrían formar consorcios de actinobacterias con las cepas aisladas porque no existe inhibición entre ellas, aunque la capacidad de degradar petróleo por consorcios de actinobacterias no se evaluó en este trabajo.

Literatura citada

- Abalos, A., Vinas, M., Sabate, J., Manresa, M.A., Solanas, A.M., 2004. Enhanced biodegradation of Casablanca crude oil by a microbial consortium in presence of a rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10. *Biodegradation* 15, 249-260.
- Alboudwarej, H., Felix, J., Taylor, S., Badry, R., Bremner, C., Brough, B., Skeates, C., Baker, A., Palmer, D., Pattison, K., Beshry, M., Krawchuk, P., Brown, G., Calvo, R., Triana, J.A.C., Hathcock, R., Koerner, K., Hughes, T., Kundu, D., West, C., 2006. Highlighting heavy oil. *Oilfield Review* 18, 34-53.
- Ali, M.I., Khalil, N.M., Abd El-Ghany, M.N., 2012. Biodegradation of some polycyclic aromatic hydrocarbons by *Aspergillus terreus*. *African Journal of Microbiology Research* 6, 3783-3790.
- Alshareef, A.H., Scherer, A., Tan, X., Azyat, K., Stryker, J.M., Tykwinski, R.R., Gray, M.R., 2011. Formation of archipelago structures during thermal cracking implicates a chemical mechanism for the formation of petroleum asphaltenes. *Energy & Fuels* 25, 5.
- Alvarez, V.M., Marques, J.M., Korenblum, E., Seldin, L., 2011. Comparative bioremediation of crude oil-amended tropical soil microcosms by natural attenuation, bioaugmentation, or bioenrichment. *Applied and Environmental Soil Science*
- Ancheyta, J., Trejo, F., Rana, M.S., 2010. *Asphaltenes: Chemical transformation during hydroprocessing of heavy oils*. CRC Press.
- Aranda, E., 2016. Promising approaches towards biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons with Ascomycota fungi. *Current Opinion in Biotechnology* 38, 1-8.
- Atlas, R.M., 1975. Effects of temperature and crude oil composition on petroleum biodegradation. *Applied Microbiology* 30, 396-403.
- Atlas, R.M., Hazen, T.C., 2011. *Oil biodegradation and bioremediation: a tale of the two worst spills in US history*. ACS Publications, 6709-6715.
- Auffret, M.D., Yergeau, E., Labbé, D., Fayolle-Guichard, F., Greer, C.W., 2015. Importance of *Rhodococcus* strains in a bacterial consortium degrading a mixture of hydrocarbons, gasoline, and diesel oil additives revealed by metatranscriptomic analysis. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99, 2419-2430.
- Balaji, V., Arulazhagan, P., Ebenezer, P., 2014. Enzymatic bioremediation of polyaromatic hydrocarbons by fungal consortia enriched from petroleum contaminated soil and oil seeds. *Journal of Environmental Biology* 35, 521-529.
- Barka, E.A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H.P., Clement, C., Ouhdouch, Y., van Wezel, G.P., 2016. Taxonomy, physiology, and natural products of actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 80, 1-43.

- Bartnicki-Garcia, S., 1968. Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi. *Annual Review of Microbiology* 22, 87-108.
- Bovio, E., Gnani, G., Prigione, V., Spina, F., Denaro, R., Yakimov, M., Calogero, R., Crisafi, F., Varese, G.C., 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.
- Brusseu, M.L., 1998. The impact of physical, chemical and biological factors on biodegradation, in: Serra, R. (Ed.), *Proceedings of the International Conference on Biotechnology for Soil Remediation: Scientific Bases and Practical Applications*. C.I.P.A. S.R.L, Milan, Italy., pp. 81-98.
- Bull, A.T., Stach, J.E., Ward, A.C., Goodfellow, M., 2005. Marine actinobacteria: perspectives, challenges, future directions. *Antonie Van Leeuwenhoek* 87, 65-79.
- Costa, A.S., Romao, L.P., Araujo, B.R., Lucas, S.C., Maciel, S.T., Wisniewski, A., Jr., Alexandre, M.R., 2012. Environmental strategies to remove volatile aromatic fractions (BTEX) from petroleum industry wastewater using biomass. *Bioresource Technology* 105, 31-39.
- Črešnar, B., Petrič, Š., 2011. Cytochrome P450 enzymes in the fungal kingdom *Proteins and proteomics*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1, 29-35.
- Chaillan, F., Le Fleche, A., Bury, E., Phantavong, Y.H., Grimont, P., Saliot, A., Oudot, J., 2004. Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon-degrading microorganisms. *Research in Microbiology* 155, 587-595.
- Chandra, S., Sharma, R., Singh, K., Sharma, A., 2013. Application of bioremediation technology in the environment contaminated with petroleum hydrocarbon. *Annals of Microbiology*, 63, 14.
- Das, N., Chandran, P., 2011. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *Biotechnology Research International* 1, 1-13.
- Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32, 1792-1797.
- Elshafie, A., AlKindi, A.Y., Al-Busaidi, S., Bakheit, C., Albahry, S., 2007. Biodegradation of crude oil and n-alkanes by fungi isolated from Oman. *Marine Pollution Bulletin* 54, 1692-1696.
- Ewing, B., Green, P., 1998. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. II. Error probabilities. *Genome Research* 8, 186-194.
- Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M.C., Green, P., 1998. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. I. accuracy assessment. *Genome Research* 8, 175-185.
- Farhadian, M., Vachelard, C., Duchez, D., Larroche, C., 2008. *In situ* bioremediation of monoaromatic pollutants in groundwater: a review. *Bioresource Technology* 99, 5296-5308.

- Fayeulle, A., Veignie, E., Slomianny, C., Dewailly, E., Munch, J.C., Rafin, C., 2014. Energy-dependent uptake of benzo[a]pyrene and its cytoskeleton-dependent intracellular transport by the telluric fungus *Fusarium solani*. *Environmental Science and Pollution Research* 21, 3515-3523.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap evolution. *International Journal of Organic Evolution* 39, 783-791.
- Frank, J.A., Reich, C.I., Sharma, S., Weisbaum, J.S., Wilson, B.A., Olsen, G.J., 2008. Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 2461-2470.
- Gao, B., Gupta, R.S., 2012. Phylogenetic framework and molecular signatures for the main clades of the phylum Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 76, 66-112.
- Gardes, M., Bruns, T.D., 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2, 113-118.
- Gargas, A., Taylor, J.W., 1992. Polymerase chain reaction (PCR) primers for amplifying and sequencing nuclear 18S rDNA from lichenized fungi. *Mycologia* 84, 589-592.
- Garon, D., Sage, L., 2004. Effects of fungal bioaugmentation and cyclodextrin amendment on fluorene degradation in soil slurry. *Biodegradation* 15, 1-8.
- Glass, N.L., Donaldson, G.C., 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 1323-1330.
- Godoy-Lozano, E.E., Escobar-Zepeda, A., Raggi, L., Merino, E., Gutierrez-Rios, R.M., Juarez, K., Segovia, L., Licea-Navarro, A.F., Gracia, A., Sanchez-Flores, A., 2018. Bacterial diversity and the geochemical landscape in the southwestern Gulf of Mexico. *Frontiers in Microbiology* 9, 2528.
- Gordon, D., Desmarais, C., Green, P., 2001. Automated finishing with autofinish. *Genome Research* 11, 614-625.
- Gough, M., Rowland, S., 1990. Characterization of unresolved complex mixtures of hydrocarbons in petroleum. *Nature* 344, 648-650.
- Graus, W., Roglieri, M., Jaworski, P., Alberio, L., Worrell, E., 2011. The promise of carbon capture and storage: evaluating the capture-readiness of new EU fossil fuel power plants. *Climate Policy* 11, 789-812.
- Gudiña, J., Teixeira, A., 2017. HC-0C-03: Biological treatments to improve the quality of heavy crude oils. *Biodegradation and Bioconversion of Hydrocarbons*, 337-351.
- Hamilton, P., 2009. Topographic rossby waves in the Gulf of Mexico. *Progress in Oceanography* 82, 1-31.

- Harner, N.K., Richardson, T.L., Thompson, K.A., Best, R.J., Best, A.S., Trevors, J.T., 2011. Microbial processes in the Athabasca oil sands and their potential applications in microbial enhanced oil recovery. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 38, 1761-1775.
- Harwati, T., Kasai, Y., Kodoma, Y., 2007. Characterization of diverse hydrocarbon-degrading bacteria isolated from Indonesian seawater. *Microbes and Environments* 22, 412-415.
- Hidrocarburos 2017. Consultado en: 2019. Estadísticas e indicadores de hidrocarburos. Secretaría de Energía. <https://sie.energia.gob.mx/bdiController.do?action=temas>
- Hinkle, A., Shin, E.-J., Liberatore, M.W., Herring, A.M., Batzle, M., 2008. Correlating the chemical and physical properties of a set of heavy oils from around the world. *Fuel* 87, 3065-3070.
- Höök, M., Hirsch, R., Aleklett, K., 2009. Giant oil field decline rates and their influence on world oil production. *Energy Policy* 37, 20.
- Ichinose, H., 2014. Metabolic diversity and cytochromes P450 of fungi, Fifty Years of Cytochrome P450 Research. Springer, Tokio. 187-205.
- Isaac, P., Martínez, F.L., Bourguignon, N., Sánchez, L.A., Ferrero, M.A., 2015. Improved PAHs removal performance by a defined bacterial consortium of indigenous *Pseudomonas* and actinobacteria from Patagonia, Argentina. *International Biodeterioration & Biodegradation* 101, 23-31.
- Jensen, P.R., Gontang, E., Mafnas, C., Mincer, T.J., Fenical, W., 2005. Culturable marine actinomycete diversity from tropical Pacific Ocean sediments. *Environmental Microbiology* 7, 1039-1048.
- Kim, S.-J., Kweon, O., Jones, R.C., Edmondson, R.D., Cerniglia, C.E., 2008. Genomic analysis of polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *Biodegradation* 19, 859-881.
- Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16, 111-120.
- Kingston, P.F., 2002. Long-term environmental impact of oil spills. *Spill Science & Technology Bulletin* 7, 53-61.
- Konur, O., 2021. Crude oils: A scientometric review of the research, *Petrodiesel Fuels*. CRC Press, 837-858.
- Kostka, J.E., Prakash, O., Overholt, W.A., Green, S.J., Freyer, G., Canion, A., Delgardio, J., Norton, N., Hazen, T.C., Huettel, M., 2011. Hydrocarbon-degrading bacteria and the bacterial community response in gulf of Mexico beach sands impacted by the deepwater horizon oil spill. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 7962-7974.
- Kues, U., 2015. Fungal enzymes for environmental management. *Current Opinion in Biotechnology* 33, 268-278.

- Kulik, N., Goi, A., Trapido, M., Tuhkanen, T., 2006. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by combined chemical pre-oxidation and bioremediation in creosote contaminated soil. *Journal of Environmental Management* 78, 382-391.
- Kumar, A., Bisht, B.S., Joshi, V.D., Dhewa, T., 2011. Review Bioremediation of Polluted Environment: A Management Tool. *International Journal of Environmental Sciences* 1, 14.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K., 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35, 1547-1549.
- Kvenvolden, K., Cooper, C., 2003. Natural seepage of crude oil into the marine environment. *Geo-marine Letters* 23, 140-146.
- Labeda, D.P., 1987. 12. Actinomycete taxonomy: generic characterization. *Developments in Industrial Microbiology* 28, 115-121.
- Lam, K.S., 2006. Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. *Current Opinion in Microbiology* 9, 245-251.
- Law, J.W.-F., Letchumanan, V., Tan, L.T.-H., Ser, H.-L., Goh, B.-H., Lee, L.-H., 2020. The rising of “modern actinobacteria” era. *Progress in Microbes & Molecular Biology* 3, 1.
- León, V., Kumar, M., 2005. Biological upgradation of heavy crude oil. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 10, 471-481.
- Loretta, O.O., Samuel, O., Johnson, G.H., Emmanuel, S., 2017. Comparative studies on the biodegradation of crude oil-polluted soil by *Pseudomonas aeruginosa* and *Alternaria* species isolated from unpolluted soil. *Microbiology Research Journal International*, 1-10.
- Macaulay, B.M., Rees, D., 2014. Bioremediation of oil spills: a review of challenges for research advancement. *Annals of Environmental Science* 8, 9-37.
- Magarvey, N.A., Keller, J.M., Bernan, V., Dworkin, M., Sherman, D.H., 2004. Isolation and characterization of novel marine-derived actinomycete taxa rich in bioactive metabolites. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 7520-7529.
- Magoon, L.B., 1988. The petroleum system—a classification scheme for research, exploration, and resource assessment. *Petroleum Systems of the United States. US Geological Survey Bulletin* 1870, 2-15.
- Medina-Bellver, J.I., Marin, P., Delgado, A., Rodriguez-Sanchez, A., Reyes, E., Ramos, J.L., Marques, S., 2005. Evidence for in situ crude oil biodegradation after the Prestige oil spill. *Environmental Microbiology* 7, 773-779.

- Melendez-Estrada, J., Amezcua-Allieri, M., Alvarez, P., Rodríguez-Vázquez, R., 2006. Phenanthrene removal by *Penicillium frequentans* grown on a solid-state culture: effect of oxygen concentration. *Environmental Technology* 27, 1073-1080.
- Meulenberg, R., Rijnaarts, H.H., Doddema, H.J., Field, J.A., 1997. Partially oxidized polycyclic aromatic hydrocarbons show an increased bioavailability and biodegradability. *FEMS Microbiology Letters* 152, 45-49.
- Meyer, R.F., Schenk, C.J., 1988. An estimate of world resources of heavy crude oil and natural bitumen, *Proceedings of the Third UNITAR/UNDP International Conference of Hydrocarbons and Tar Sands*, Alberta Oil Sands Technology and Research Authority 1, 1-24.
- Mirchi, A., Hadian, S., Madani, K., Rouhani, O.M., Rouhani, A.M., 2012. World energy balance outlook and OPEC production capacity: implications for global oil security. *Energies* 5, 25.
- Mohammadian, E., Arzanlou, M., Babai-Ahari, A., 2017. Diversity of culturable fungi inhabiting petroleum-contaminated soils in Southern Iran. *Antonie Van Leeuwenhoek* 110, 903-923.
- Moreno-Ulloa, A., Diaz, V.S., Tejeda-Mora, J.A., Contreras, M.I.M., Castillo, F.D., Guerrero, A., Sanchez, R.G., Duhalt, R.V., Licea-Navarro, A., 2019. Metabolic and metagenomic profiling of hydrocarbon-degrading microorganisms obtained from the deep biosphere of the Gulf of México. *BioRxiv*, 606806.
- Mortazavi, B., Horel, A., Beazley, M.J., Sobczyk, P.A., 2013. Intrinsic rates of petroleum hydrocarbon biodegradation in Gulf of Mexico intertidal sandy sediments and its enhancement by organic substrates. *Journal of Hazardous Materials* 244, 537-544.
- Mullins, O.C., Sheu, E.Y., Hammami, A., Marshall, A.G., 2007. *Asphaltenes, heavy oils, and petroleomics*. Springer Science & Business Media.
- Murawski, S.A., D.J., H., Gilbert, S., Gracia, A., 2020. Deep-water oil and gas production in the Gulf of Mexico, and related global trends. *Scenarios and Responses to Future Deep Oil Spills* (pp. 16-32). Springer Cham.
- Nagahama, T., Takahashi, E., Nagano, Y., Abdel-Wahab, M.A., Miyazaki, M., 2011. Molecular evidence that deep-branching fungi are major fungal components in deep-sea methane cold-seep sediments. *Environmental Microbiology* 13, 2359-2370.
- Naranjo-Briceño, L., Pernía, B., Perdomo, T., González, M., Inojosa, Y., De Sisto, Á., Urbina, H., León, V., 2019. Potential role of extremophilic hydrocarbonoclastic fungi for extra-heavy crude oil bioconversion and the sustainable development of the petroleum industry. *Fungi in Extreme Environments: Ecological Role and Biotechnological Significance* (pp. 559-586). Springer, Cham.
- Okonechnikov, K., Golosova, O., Fursov, M., 2012. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics* 28, 1166-1167.

- Olajuyigbe, F.M., Ehiosun, K.I., 2016. Assessment of crude oil degradation efficiency of newly isolated actinobacteria reveals untapped bioremediation potentials. *Bioremediation Journal* 20, 133-143.
- Paterson, R.R.M, 2005. Fungus or bacterium and vice versa? *Microbiology* 151, 641.
- PEMEX, 2015. Reservas de hidrocarburos de México al 1 de enero de 2015, p. 21. Consultado en 2018. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/460767/Analisis_de_Reservas_1P_2P_3P_2019._vf-cnh-web.pdf
- Pendrys, J.P., 1989. Biodegradation of asphalt cement-20 by aerobic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 55, 1357-1362.
- Peng, R.H., Xiong, A.S., Xue, Y., Fu, X.Y., Gao, F., Zhao, W., Tian, Y.S., Yao, Q.H., 2008. Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiology Reviews* 32, 927-955.
- Pineda-Flores, G., Boll-Arguello, G., Lira-Galeana, C., Mesta-Howard, A.M., 2004. A microbial consortium isolated from a crude oil sample that uses asphaltenes as a carbon and energy source. *Biodegradation* 15, 145-151.
- Portela, E., Tenreiro, M., Pallàs-Sanz, E., Meunier, T., Ruiz-Angulo, A., Sosa-Gutiérrez, R., Cusí, S., 2018. Hydrography of the central and western Gulf of Mexico. *Journal of Geophysical Research: Oceans* 123, 5134-5149.
- Premuzic, E.T., Lin, M.S., 1999. Induced biochemical conversions of heavy crude oils. *Journal of Petroleum Science and Engineering* 22, 171-180.
- Premuzic, E.T., Bohenekl, M., Zhou, W.M., 1999. Bioconversion reactions in asphaltenes and heavy crude oils. *Energy & Fuels* 13,297-304.
- Rana, M.S., Sámano, V., Ancheyta, J., Diaz, J.A.I., 2007. A review of recent advances on process technologies for upgrading of heavy oils and residua. *Fuel* 86, 1216-1231.
- Ranjani, A., Dhanasekaran, D., Gopinath, P.M., 2016. An Introduction to Actinobacteria. 10.5772/62329.
- Richards, T.A., Leonard, G., Wideman, J.G., 2017. What defines the “kingdom” fungi? . *Microbiol Spectrum* 5, 5-3.
- Roller, C., Ludwig, W., Schleifer, K., 1992. Gram-positive bacteria with a high DNA G+C content are characterized by a common insertion within their 23s rRNA genes. *Microbiology* 138, 1167-1175.
- Sabbah, H., Morrow, A.L., Pomerantz, A.E., Zare, R., 2011. Evidence for Island Structures as the Dominant Architecture of Asphaltenes. *Energy & Fuels* 25, 1597-1604.

- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4, 406-425.
- Sajna, K.V., Sukumaran, R.K., Gottumukkala, L.D., Pandey, A., 2015. Crude oil biodegradation aided by biosurfactants from *Pseudozyma* sp. NII 08165 or its culture broth. *Bioresource Technology* 191, 133-139.
- Salanas, A., 2009. La biodegradación de hidrocarburos y su aplicación en la biorremediación de suelos. *Estudios en la Zona no Saturada del Suelo*, 9.
- Saparrat, M., Martinez, M., Tournier, H., Cabello, M., Arambarri, A., 2000. Production of ligninolytic enzymes by *Fusarium solani* strains isolated from different substrata. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 16, 799-803.
- Saraswathy, A., Hallberg, R., 2005. Mycelial pellet formation by *Penicillium ochrochloron* species due to exposure to pyrene. *Microbiological Research* 160, 375-383.
- Schmidt, S.N., Christensen, J.H., Johnsen, A.R., 2010. Fungal PAH-metabolites resist mineralization by soil microorganisms. *Environmental Science & Technology* 44, 1677-1682.
- Schuler, B., Zhang, Y., Liu, F., Pomerantz, A.E., Andrews, A.B., Gross, L., Pauchard, V., Banerjee, S., Mullins, O.C., 2020. Overview of asphaltene nanostructures and thermodynamic applications. *Energy & Fuels* 34, 15082-15105.
- Sharma, A., Aggarwal, N.K., Yadav, A., 2016. First Report of Lignin Peroxidase Production from *Alternaria alternata* ANF238 Isolated from Rotten Wood Sample. *Bioengineering and Bioscience* 4, 76-87.
- Shibulal, B., Al-Bahry, S.N., Al-Wahaibi, Y.M., Elshafie, A.E., Al-Bemani, A.S., Joshi, S.J., 2014. Microbial enhanced heavy oil recovery by the aid of inhabitant spore-forming bacteria: an insight review. *The Scientific World Journal* 2014, 309.
- Shivlata, L., Satyanarayana, T., 2015. Thermophilic and alkaliphilic Actinobacteria: biology and potential applications. *Frontiers in Microbiology* 6, 1014.
- Singh, H., 2006. *Mycoremediation: fungal bioremediation*. John Wiley & Sons, 24-36.
- Speight, J.G., 1991. *The chemistry and technology of petroleum*, M. Dekker, New York, 15-20.
- Stach, J.E., Maldonado, L.A., Ward, A.C., Bull, A.T., Goodfellow, M., 2004. *Williamsia maris* sp. nov., a novel actinomycete isolated from the Sea of Japan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54, 191-194.
- Stecher, G., Tamura, K., Kumar, S., 2020. Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) for macOS. *Molecular Biology and Evolution* 37, 1237-1239.

- Strubinger, A., Ehrmann, U., León, V., DeSisto, A., González, M., 2015. Changes in Venezuelan Orinoco belt crude after different biotechnological approaches. *Journal of Petroleum Science and Engineering* 127, 421-432.
- Tavassoli, T., Mousavi, S.M., Shojaosadati, S.A., Salehizadeh, H., 2012. Asphaltene biodegradation using microorganisms isolated from oil samples. *Fuel* 93, 142-148.
- Thompson, I.P., van der Gast, C.J., Ciric, L., Singer, A.C., 2005. Bioaugmentation for bioremediation: the challenge of strain selection. *Environmental Microbiology* 7, 909-915.
- Uribe-Alvarez, C., Ayala, M., Perezgasga, L., Naranjo, L., Urbina, H., Vazquez-Duhalt, R., 2011. First evidence of mineralization of petroleum asphaltenes by a strain of *Neosartorya fischeri*. *Microbial Biotechnology* 4, 663-672.
- Van Hamme, J.D., Singh, A., Ward, O.P., 2003. Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67, 503-549.
- Varjani, S., Srivastava, V., 2015a. Green technology and sustainable development of environment. *Renewable Resources Journal* 3, 244-249.
- Varjani, S.J., 2017. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. *Bioresource Technology* 223, 277-286.
- Varjani, S.J., Srivastava, V.K., 2015b. Green technology and sustainable development of environment. *Renewable Resources*. 3, 5.
- Varjani, S.J., Thaker, M.B., Upasani, V.N., 2014. Optimization of growth conditions of native hydrocarbon utilizing bacterial consortium "HUBC" obtained from petroleum pollutant contaminated sites. *Indian Journal of Applied Resources* 4, 2.
- Varjani, S.J., Upasani, V.N., 2016. Biodegradation of petroleum hydrocarbons by oleophilic strain of *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514. *Bioresource technology* 222, 195-201.
- Vazquez-Duhalt, R., Westlake, D.W., Fedorak, P.M., 1994. Lignin peroxidase oxidation of aromatic compounds in systems containing organic solvents. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 459-466.
- 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. *Marine Environmental Research* 153, 104816.
- Verdin, A., Lounes-Hadj Sahraoui, A., Laruelle, F., Grandmougin-Ferjani, A., Durand, R., 2006. Effect of the high polycyclic aromatic hydrocarbon, benzo[a]pyrene, on the lipid content of *Fusarium solani*. *Mycological Research* 110, 479-484.
- Vidali, M., 2001. Bioremediation. an overview. *Pure and Applied Chemistry* 73, 1163-1172.

- Vogel, H.J., 1964. Distribution of lysine pathways among fungi: evolutionary implications. *The American Naturalist* 98, 435-446.
- White, T., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., Innis, M., Gelfand, D., Sninsky, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* 18, 315-322.
- Wilkes, H., Buckel, W., Golding, B.T., Rabus, R., 2016. Metabolism of Hydrocarbons in n-Alkane-Utilizing Anaerobic Bacteria. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 26, 138-151.
- Yanto, D.H., Tachibana, S., 2014. Potential of fungal co-culturing for accelerated biodegradation of petroleum hydrocarbons in soil. *Journal of Hazardous Materials* 278, 454-463.
- Zeiner, C.A., Purvine, S.O., Zink, E.M., Paša-Tolić, L., Chaput, D.L., Haridas, S., Wu, S., LaButti, K., Grigoriev, I.V., Henrissat, B., 2016. Comparative analysis of secretome profiles of manganese (II)-oxidizing ascomycete fungi. *Plos One* 11, e0157844.
- Zhang, J., Gao, H., Xue, Q., 2020. Potential applications of microbial enhanced oil recovery to heavy oil. *Critical Reviews in Biotechnology* 40, 459-474.