



**Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del
Instituto Politécnico Nacional**

Unidad Mérida

Departamento Recursos del Mar

**“Estimación de la degradación de hidrocarburos alifáticos por
comunidades bacterianas a través de la cuantificación del gen
alkB en experimentos de mesocosmos”**

Tesis que presenta:

I.Q. Oswaldo de Jesús Gonzalez Yam

Para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias

En la especialidad de:

Biología Marina

Directora de tesis:

Dra. Ma. Leopoldina Aguirre Macedo

Mérida, Yucatán

Febrero de 2024

RESUMEN

En este trabajo se estimó la capacidad de las comunidades bacterianas planctónicas de la Península de Yucatán, para degradar hidrocarburos alifáticos, en experimentos de mesocosmos simulando derrames de petróleo ligero con diferentes concentraciones (10, 40 y 80 mg L⁻¹) durante tres temporadas (secas, lluvias, nortes), a través de la cuantificación del número de copias del gen *alkB*. Los resultados indicaron que en todas las temporadas y tratamientos se detectó la presencia del gen *alkB*; la abundancia de este gen fue similar durante las temporadas de secas y lluvias, mientras que en la temporada de nortes en el tratamiento de 80 mg L⁻¹ se registró el número de copias más alto (8.60 X 10⁶ Copias/μL). Para investigar específicamente la concentración de hidrocarburos alifáticos que pudieran estar relacionados con la abundancia del gen *alkB*, se realizaron correlaciones entre las concentraciones de hidrocarburos alifáticos y la abundancia del gen *alkB* y se seleccionaron las correlaciones negativas significativas de cada uno de los tratamientos. La temporada de secas presentó el mayor número de correlaciones negativas, mientras que en nortes únicamente se detectó al pristano y en lluvias no hubo ninguna correlación. Mediante análisis bioinformáticos de secuencias del gen *16S ARNr* se identificó la presencia de varios géneros bacterianos que han sido previamente relacionados con la degradación de hidrocarburos alifáticos. Para investigar la relación de las abundancias de los géneros con las concentraciones de hidrocarburos, se realizaron correlaciones entre las concentraciones de hidrocarburos previamente seleccionados con las abundancias relativas de la comunidad bacteriana. En temporada de secas (10 mg L⁻¹), algunos géneros que correlacionaron con hidrocarburos fueron *Maricaulis*, *Oleibacter* y *SM1A02*. Además, se observó una correlación significativa entre *Alcanivorax* y el hidrocarburo C11 en el tratamiento de 40 mg L⁻¹, mientras que *Hyphomonas* mostró una correlación significativa con C10 en el tratamiento de 80 mg L⁻¹. En la temporada de nortes, se encontraron correlaciones significativas entre los géneros *Marinomonas* y *Ketobacter*, pertenecientes a la clase *Gamaproteobacteria* con el hidrocarburo pristano, lo que podría sugerir la

participación en procesos de biorremediación. Este estudio contribuye con la comprensión de las comunidades microbianas potencialmente relacionadas con la degradación de hidrocarburos alifáticos en la región Sureste del Golfo de México, que será de gran utilidad para posibles eventos futuros de derrames de petróleo.

ABSTRACT

This study assessed the capacity of planktonic bacterial communities in the Yucatán Peninsula to degrade aliphatic hydrocarbons through mesocosm experiments simulating light crude oil spills at different concentrations (10, 40, and 80 mg L⁻¹) during three seasons (dry, rainy, and cold fronts) by quantifying the number of copies of the *alkB* gene. Results showed the presence of the *alkB* gene in all seasons and treatments. The gene's abundance was similar during dry and rainy seasons, while the highest copy number (8.60 X 10⁶ Copies/μL) was recorded in the cold fronts season at the 80 mg L⁻¹ treatment. Significant negative correlations between aliphatic hydrocarbon concentrations and *alkB* gene abundance were selected from each treatment. The dry season exhibited the highest negative correlations, while only pristane was detected in the cold fronts season, and no correlations were found during the rainy season. Bioinformatic analysis of 16S *rRNA* gene sequences identified several bacterial genera previously associated with aliphatic hydrocarbon degradation. Correlations were then made between selected hydrocarbon concentrations and relative abundances of bacterial communities. In the dry season (10 mg L⁻¹), some correlating genera included *Maricaulis*, *Oleibacter*, and *SM1A02*. Additionally, a significant correlation was observed between *Alcanivorax* and C11 hydrocarbon at 40 mg L⁻¹, while *Hyphomonas* showed a significant correlation with C10 at 80 mg L⁻¹. In the cold fronts season, significant correlations were found between the genera *Marinomonas* and *Ketobacter*, belonging to the *Gammaproteobacteria* class, with pristane, suggesting its involvement in bioremediation processes. This study contributes to understanding microbial communities potentially involved in aliphatic hydrocarbon degradation in the Southeastern Gulf of Mexico region, which could be highly beneficial for future oil spill events.

AGRADECIMIENTOS

A Ixchel Ruiz Hernández, la persona que es mi inspiración diaria, a quien debo mi perseverancia y logro de esta meta. Gracias por sostenerme en los altibajos, por ser la luz que nunca dejó de creer y confiar en mí. A Jesé, quien es la chispa de alegría en este recorrido. Los amo profundamente.

Quiero expresar mi gratitud al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por la beca otorgada (800020). Al Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional unidad Mérida. Este proyecto fue financiado por el Fondo Sectorial CONACyT - SENER - Hidrocarburos, proyecto 201441.

Un agradecimiento especial a la Dra. Ma. Leopoldina Aguirre Macedo por su dirección ejemplar y apoyo incondicional en este camino. Reconozco el valioso aporte de los doctores José Q. García Maldonado y Rossana del Pilar Rodríguez Canul, quienes integraron el comité sinodal y enriquecieron significativamente este trabajo con sus valiosas contribuciones.

No puedo dejar de mencionar mi profundo agradecimiento a la Dra. Sonia Scheherazad Valencia Agami, quien con su sabiduría y amistad se convirtió en un pilar fundamental en la redacción de este documento.

Mis agradecimientos se extienden al laboratorio de Patología Acuática por brindarme sus instalaciones para el desarrollo de este proyecto. En especial, agradezco a Abril Gamboa y Rosa Canul del staff del laboratorio por su invaluable ayuda en el procesamiento de muestras.

Gracias a todos aquellos que me respaldaron durante este proceso, tanto en el ámbito académico como moral. A Karen Arjona, Linda Marmolejo, Amanda Pérez, Alonso de la Garza, Nayely Badillo, Miriam Carrillo, Itza García y Román Espinal, les debo mi reconocimiento y gratitud sincera.

Y, por último, pero no menos importante, a mi familia, cuyo apoyo ha sido el pilar fundamental en cada uno de mis sueños.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.2. Hidrocarburos.....	4
2.3. Degradación de n-Alcanos.....	6
2.3.1. Gen <i>alkB</i>	8
2.4. Microorganismos marinos	9
2.5. Biorremediación	10
2.6. Biorremediación utilizando bacterias.....	11
2.7. Bioensayos en Mesocosmos.....	12
3. JUSTIFICACIÓN.....	15
4. HIPOTESIS.....	16
5. OBJETIVOS.....	17
5.1. Objetivo General	17
5.2. Objetivos Particulares	17
6. MATERIALES Y MÉTODOS	18
6.1. Descripción del experimento y explicación de las condiciones meteorológicas.....	18
6.2. Recolecta de muestras de los sistemas de mesocosmos.....	21
6.3. Cuantificación del gen funcional <i>alkB</i>	22
6.4. Análisis estadísticos y bioinformática de la comunidad bacteriana	23
6.5. Cuantificación de hidrocarburos alifáticos	25
6.6. Análisis de datos	26
7. RESULTADOS	27
7.1. Concentración de hidrocarburos en las muestras de referencia y experimentos de mesocosmos.....	27
7.2. Abundancia del gen <i>alkB</i> durante el experimento de mesocosmos en las distintas temporadas	28
7.2.1. Temporada de Secas	28
7.2.2. Temporada de Lluvias.....	29
7.2.3. Temporada de nortes	30

7.3.	Correlaciones y regresiones lineales de la concentración de los hidrocarburos alifáticos con la abundancia del gen <i>alkB</i>	31
7.4.	Abundancias relativas de la comunidad bacteriana durante el experimento mesocosmos temporadas	34
7.5.	Correlaciones entre las concentraciones de compuestos alifáticos de diferente número de carbonos y las abundancias relativas de los grupos bacterianos.....	40
7.5.1.	Temporada de secas.....	40
7.5.2.	Temporada de Nortes	47
8.	DISCUSIÓN.....	49
8.1.	Cambios en las abundancias del gen <i>alkB</i> en función de las concentraciones de hidrocarburos	49
8.2.	Comunidad bacteriana relacionada con la degradación de hidrocarburos alifáticos en las tres temporadas (Secas, Lluvias, Nortes).....	50
8.3.	Temporada de secas.....	50
8.4.	Temporada de Nortes.....	54
9.	CONCLUSIÓN.....	56
10.	PERSPECTIVAS.....	58
11.	BIBLIOGRAFÍA.....	59
12.	ANEXOS.....	75

INDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Esquema de los diversos procesos que puede sufrir el petróleo una vez introducido en el medio ambiente (J. Chen & Denison, 2011).....</i>	<i>5</i>
<i>Figura 2. Esquema de las enzimas involucradas en la oxidación de n-alcanos pertenecientes a la familia AlkB (Moreno & Rojo, 2017)</i>	<i>8</i>
<i>Figura 3. Representación gráfica del diseño experimental para evaluar el efecto del petróleo durante las temporadas de secas, lluvias y nortes (tomado de Valencia Agami, 2022).....</i>	<i>19</i>
<i>Figura 4. Descripción grafica del equipamiento de la unidad de mesocosmos. a) propela para mantener homogénea el oxígeno y la temperatura dentro del sistema, b) muestreador de agua, c) caja de sensores, d) baño maría, para prevenir cambios bruscos en la temperatura (Valencia-Agami et al., 2019).....</i>	<i>20</i>
<i>Figura 5. Abundancia del gen alkB durante la temporada de secas.....</i>	<i>29</i>
<i>Figura 6. Abundancia del gen alkB durante la temporada de lluvias</i>	<i>30</i>
<i>Figura 7. Abundancia del gen alkB durante la temporada de nortes</i>	<i>31</i>
<i>Figura 8. Abundancia relativa de la comunidad bacteriana a nivel de género en el tratamiento de 10 mg L⁻¹ de la temporada de secas</i>	<i>35</i>
<i>Figura 9. Abundancia relativa de la comunidad bacteriana a nivel de género en el tratamiento de 40 mg L⁻¹ de la temporada de secas</i>	<i>37</i>
<i>Figura 10. Abundancia relativa de la comunidad bacteriana a nivel de género en el tratamiento de 80 mg L⁻¹ de la temporada de secas</i>	<i>38</i>
<i>Figura 11. Abundancia relativa de la comunidad bacteriana a nivel de género en el tratamiento de 40 mg L⁻¹ de la temporada de nortes.....</i>	<i>40</i>
<i>Figura 12. Correlaciones de compuestos alifáticos con la abundancia relativa de la comunidad bacteriana a nivel de género en el tratamiento de 10 mg L⁻¹ durante la temporada de secas. Los asteriscos indican correlaciones significativas</i>	<i>41</i>
<i>Figura 13. Correlaciones de compuestos alifáticos con la abundancia relativa de la comunidad bacteriana a nivel de clase en el tratamiento de 10 mg L⁻¹ durante la temporada de secas. Los asteriscos indican correlaciones significativas</i>	<i>42</i>

<i>Figura 14. Correlaciones de compuestos alifáticos con la abundancia relativa de la comunidad bacteriana a nivel de género en el tratamiento de 40 mg L⁻¹ durante la temporada de secas. Los asteriscos indican correlaciones significativas</i>	<i>43</i>
<i>Figura 15. Correlaciones de compuestos alifáticos con la abundancia relativa de la comunidad bacteriana a nivel de clase en el tratamiento de 40 mg L⁻¹ durante la temporada de secas. Los asteriscos indican correlaciones significativas</i>	<i>44</i>
<i>Figura 16. Correlaciones de compuestos alifáticos con la abundancia relativa de la comunidad bacteriana a nivel de género en el tratamiento de 80 mg L⁻¹ durante la temporada de secas. Los asteriscos indican correlaciones significativas</i>	<i>45</i>
<i>Figura 17. Correlaciones de compuestos alifáticos con la abundancia relativa de la comunidad bacteriana a nivel de clase en el tratamiento de 80 mg L⁻¹ durante la temporada de secas. Los asteriscos indican correlaciones significativas</i>	<i>46</i>
<i>Figura 18. Correlaciones de compuestos alifáticos con la abundancia relativa de la comunidad bacteriana a nivel de género en el tratamiento de 40 mg L⁻¹ durante la temporada de nortes. Los asteriscos indican correlaciones significativas.....</i>	<i>47</i>
<i>Figura 19. Correlaciones de compuestos alifáticos con la abundancia relativa de la comunidad bacteriana a nivel de clase en el tratamiento de 40 mg L⁻¹ durante la temporada de nortes. Los asteriscos indican correlaciones significativas.....</i>	<i>48</i>
<i>Figura 20. Concentración de hidrocarburos alifáticos en temporada de secas, por tratamiento</i>	<i>76</i>
<i>Figura 21. Concentración de hidrocarburos alifáticos en temporada de lluvias, por tratamiento</i>	<i>76</i>
<i>Figura 22. Concentración de hidrocarburos alifáticos en temporada de Nortes, por tratamiento</i>	<i>77</i>
<i>Figura 23. Abundancia relativa de la comunidad bacteriana a nivel de clase en el tratamiento de 10 mg L⁻¹ de la temporada de secas</i>	<i>77</i>
<i>Figura 24. Abundancia relativa de la comunidad bacteriana a nivel de clase en el tratamiento de 40 mg L⁻¹ de la temporada de secas</i>	<i>78</i>
<i>Figura 25. Abundancia relativa de la comunidad bacteriana a nivel de clase en el tratamiento de 80 mg L⁻¹ de la temporada de secas</i>	<i>78</i>

Figura 26. Abundancia relativa de la comunidad bacteriana a nivel de clase en el tratamiento de 40 mg L-1 de la temporada de nortes..... 79

INDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Enzimas que participan en la hidroxilación terminal inicial de n-alcanos (Moreno & Rojo, 2017).</i>	7
<i>Tabla 2. Condiciones para PCR en tiempo real del gen alkB</i>	22
<i>Tabla 3. Concentraciones del total de hidrocarburos de petróleo en muestras de referencia en las tres temporadas (secas, lluvias y nortes)</i>	27
<i>Tabla 4. Regresiones entre las cadenas de carbono de hidrocarburos alifáticos y la abundancia del gen alkB en las temporadas climáticas</i>	33

1. INTRODUCCIÓN

La presencia de hidrocarburos en los mares de México constituye un tema de estudio de gran relevancia debido a que la mayoría de los compuestos derivados del petróleo son altamente contaminantes, lo que impacta negativamente en los ecosistemas marinos. Estos hidrocarburos pueden ser clasificados principalmente en cuatro categorías: Alifáticos, Aromáticos, Resinas y Asfáltenos (Wauquier, 2004).

Factores como la extracción de petróleo, el transporte marítimo y los vertidos en las playas contribuyen significativamente a la presencia de estos hidrocarburos. El golfo de México experimenta una intensa actividad de extracción de petróleo, lo que ha resultado en derrames ocasionales de crudo. En respuesta a estas situaciones, se emplean métodos diversos para controlar dichos derrames, entre ellos los métodos químicos, físicos y biológicos (Ivshina et al., 2015; Zabala, 2019). Los métodos biológicos aprovechan la capacidad de ciertos microorganismos como microalgas, hongos y bacterias para degradar o transformar los contaminantes (Solanas, 2009).

Las bacterias son organismos procariotas unicelulares que se encuentran en prácticamente todos los rincones de la Tierra. Sin embargo, solo alrededor del 1 % de ellas pueden ser cultivadas en el laboratorio (Rappé & Giovannoni, 2003). Uno de los primeros estudios en México que abordó la presencia de bacterias en el golfo de México capaces de degradar hidrocarburos se realizó en respuesta al derrame del pozo Ixtoc-I. En este estudio se empleó un índice de impacto que calcula la proporción de bacterias hidrocarbonoclastas/heterótrofas (Hi/He) (Lizárraga-Partida, 1983) utilizando bacterias cultivables.

Dado que la mayoría de las bacterias no pueden ser cultivadas, se hace necesario recurrir a técnicas que prescindan de su aislamiento o cultivo. En cambio, se requiere la extracción de su material genómico. La metagenómica es un campo que ha experimentado notables avances en las últimas dos décadas. Usualmente la metagenómica a utilizado dos enfoques para investigar muestras del entorno: la secuenciación de amplicones y la secuenciación shotgun. El primer método implica la selección de genes taxonómicamente informativos, como el 16s que codifica la

subunidad menor del ARN ribosomal, para identificar la diversidad de microorganismos en la muestra. El segundo método consiste en fragmentar y secuenciar todo el ADN extraído, lo que permite explorar el potencial metabólico de la comunidad microbiana (Wooley et al., 2010).

Se han identificado genes que funcionan como indicadores en la degradación de distintos tipos de hidrocarburos, utilizando técnicas como el PCR punto final y qPCR. Por ejemplo, el gen *alkB* indica la degradación de hidrocarburos alifáticos (Viggor et al., 2015), mientras que para los hidrocarburos aromáticos existen varios genes como los *NDO* y *pah*, que degradan naftaleno y fenantreno respectivamente. Recientemente, el gen *pahE* se ha empleado como indicador de la degradación de hidrocarburos aromáticos (Liang et al., 2019). Gracias a la metagenómica, es posible identificar que genes están involucrados en el metabolismo de degradación de hidrocarburos, independientemente de si las bacterias son cultivables o no. Por ello, en este estudio se investigó la respuesta natural de la comunidad bacteriana de la Plataforma de Yucatán frente a la eventualidad de un derrame de petróleo utilizando el mencionado método.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Actividad petrolera en el Golfo de México

La actividad económica de extracción de petróleo es de gran importancia en México, y la región del Golfo de México (GoM) es famosa por albergar una vasta reserva de este recurso, con alrededor de 22,000 fuentes naturales de hidrocarburos. Entre ellas, unas 1000 emiten continuamente aceite, siendo visibles desde el espacio. Estas áreas activas se denominan celdas de emanación (Joye et al., 2016). Simultáneamente, esta región cuenta con ecosistemas marinos tropicales de gran valor que se rigen por tres estaciones climáticas: la temporada seca, de marzo a mayo, con poca precipitación; la temporada de lluvias, de junio a octubre, relacionada con alta precipitación y probabilidad de huracanes y la temporada de nortes, con frentes fríos y vientos fuertes provenientes del hemisferio norte (Díaz-Ruiz et al., 2018).

Desde los años 70s, se han realizado exploraciones petroleras en el sur del Golfo de México (Soto et al., 2014; Herzka et al., 2021). En 1979, ocurrió uno de los mayores desastres de la historia en nuestro país: el derrame del pozo Ixtoc-I cerca de Campeche, en la Plataforma de Yucatán: durante 9 meses, se liberaron más de 3.4 millones de barriles de petróleo al ecosistema (García-Cruz & Aguirre-Macedo, 2014; Soto et al., 2014), además de otros de menor magnitud como el pozo Kab 121 (Gold-Bouchot et al., 2014). A lo largo del tiempo se han realizado investigaciones para evaluar los efectos ambientales de los derrames (Lizárraga-Partida, 1983; García-Cruz & Aguirre-Macedo, 2014; Soto et al., 2014). En abril de 2010, la plataforma de perforación Deepwater Horizon explotó y se hundió, derramando alrededor de 4.9 millones de barriles de petróleo crudo y estimando 1.7×10^{11} g de hidrocarburos volátiles en el golfo de México (Camilli & et al, 2010; Atlas & Hazen, 2011; Camilli et al., 2012) frente a las costas de Louisiana. Tras este vertimiento se intensificaron los estudios en biorremediación (García-Cruz et al., 2019; Uribe-Flores et al., 2019; Valencia-Agami et al., 2019). Así mismo, se ha

observado que el sur del Golfo de México, en especial la Plataforma de Yucatán, es vulnerable a los impactos del petróleo debido a su proximidad a zonas petroleras (Aguirre-Macedo et al., 2021; Herzka et al., 2021).

2.2. Hidrocarburos

Los hidrocarburos representan una combinación compleja de compuestos químicos formados principalmente por átomos de carbono e hidrógeno. Estos derivan de la materia prima del petróleo en su estado crudo y se dividen en cuatro categorías principales: alifáticos, aromáticos, resinas y asfáltenos (Al-Hawash et al., 2018). La fracción más predominante en el petróleo crudo es la de los compuestos saturados, que carecen de dobles enlaces y pueden ser clasificados como alcanos (parafinas) o cicloalcanos según su estructura. Es importante destacar que el término "compuestos alifáticos" abarca a aquellos compuestos que son saturados, insaturados, lineales, ramificados o cíclicos (Abbasian et al., 2015; Varjani, 2017), estos hidrocarburos pueden afectar la estructura de las membranas celulares afectando su función y puede causar la disipación del potencial de la membrana (Sikkema et al., 1995).

En contraste, los compuestos aromáticos están caracterizados por uno o más anillos aromáticos, y en algunos casos pueden presentar grupos alquilo unidos. Estos compuestos tienden a ser altamente perjudiciales desde un punto de vista tóxico (Gupta et al., 2015), también son causantes de estrés oxidativo lo cual ocasiona daños en el ADN y tiene efectos mutagénicos y teratogénicos (Wang et al., 2017). Por otro lado, las resinas y asfáltenos se distinguen de los compuestos alifáticos y aromáticos, ya que incluyen compuestos con polaridad y estructuras complejas que dificultan su biodegradación. Dichas estructuras están compuestas por múltiples anillos aromáticos y cadenas alquilo, conteniendo diversos átomos de nitrógeno, azufre y oxígeno (Harayama et al., 2004). Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) se ubican entre los compuestos con potencial para causar contaminación.

En el océano, los compuestos de hidrocarburos derivados del petróleo están expuestos a procesos de dispersión, disolución, emulsificación, evaporación y biodegradación (Figura 1) (Dellagnezze et al., 2019). Durante las últimas décadas, se han llevado a cabo múltiples investigaciones enfocadas en la biodegradación microbiana de hidrocarburos, con el propósito de abordar los serios problemas de contaminación. Estos estudios han demostrado que las principales entidades responsables de la degradación son los microorganismos bacterianos y fúngicos, destacando las bacterias como los agentes más activos en el proceso de descomposición frente a derrames en entornos marinos. Esto ocurre en condiciones tanto aeróbicas como anaeróbicas (Das & Chandran, 2011).

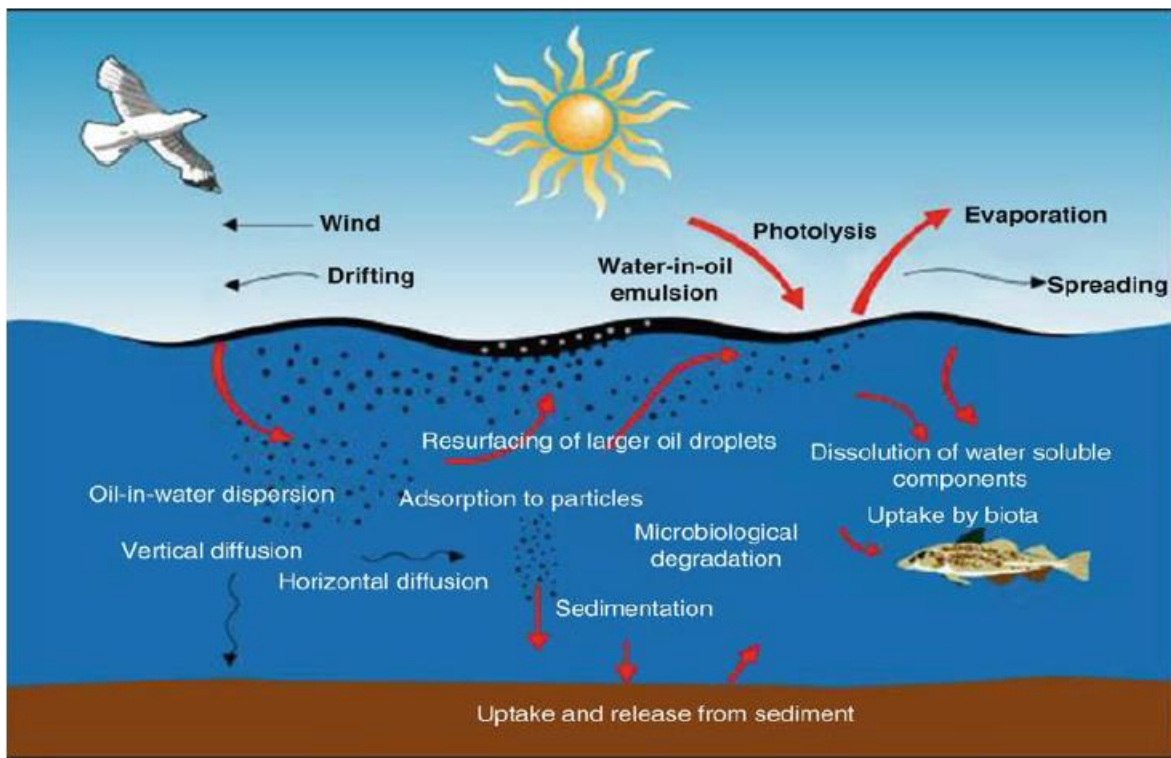


Figura 1. Esquema de los diversos procesos que puede sufrir el petróleo una vez introducido en el medio ambiente (J. Chen & Denison, 2011).

2.3. Degradación de n-Alcanos

La degradación de alcanos comienza con la oxidación del grupo metilo terminal mediante una enzima conocida como alcano-hidroxilasa (también llamada alcano-monooxigenasa). Esto da como resultado la formación de un alcohol primario, el cual es posteriormente transformado en el aldehído correspondiente gracias a la acción de una enzima denominada alcohol deshidrogenasa. Luego, un proceso similar involucra a una enzima llamada aldehído deshidrogenasa, que convierte el grupo aldehído en un ácido graso. Estos ácidos grasos son conjugados con CoA y sometidos a un proceso de degradación conocido como β -oxidación, que da como resultado la producción de acetil-CoA. Aunque la oxidación subterminal solo ha sido documentada en ciertos microorganismos, la oxidación de alcoholes y ácidos grasos es un proceso mucho más común y amplio (Moreno & Rojo, 2017).

En las bacterias, es posible llevar a cabo la hidroxilación terminal inicial de n-alcanos mediante el uso de enzimas provenientes de diversas categorías (Tabla 1) (Van Beilen et al., 2003; Van Beilen & Funhoff, 2007). Los microorganismos que degradan n-alcanos de cadena corta (C2-C4) cuentan con enzimas que están vinculadas a las metano monooxigenasas, en contraste, los que descomponen n-alcanos de longitud media (C5-C11) o extensa (>C12) suelen tener monooxigenasas de hierro no hemo ubicadas en las membranas, estas se relacionan con la ampliamente estudiada alcano hidroxilasa *AlkB* presente en *Pseudomonas putida* *GPO1*. A pesar de esto, algunas cepas contienen enzimas hidroxilantes de alcanos pertenecientes a la familia de los citocromos solubles P-450, que tienen actividad contra los n-alcanos C5-C11. Finalmente, diversas cepas capaces de asimilar n-alcanos que superan los 18 átomos de carbono presentan alcano hidroxilasas que parecen no guardar relación con las mencionadas anteriormente (Moreno & Rojo, 2017).

Tabla 1. Enzimas que participan en la hidroxilación terminal inicial de *n*-alcanos (Moreno & Rojo, 2017).

Clase de Enzimas	Características	Longitud del sustrato	Anfitrión
<i>PRM, propano monooxigenasa</i>	Monooxigenasa de hierro no-heme similar a sMMO	C3	Bacteria
<i>sBMO, butano monooxigenasa</i>	Monooxigenasa de hierro no-heme similar a sMMO	C2 –C9	Bacteria
<i>pBMO, butano monooxigenasa</i>	Monooxigenasa que contiene cobre similar a pMMO	C2 –C9	Bacteria
<i>CYP153</i>	Citocromo soluble P450 (clase I)	C5 –C12	Bacteria
<i>CYP116B5</i>	Citocromo P450 autosuficiente (clase VII)	C14 – C16	Bacteria
<i>CYP52</i>	Membrana unida al citocromo P450	C10 – C16	Levadura
<i>AlkB-relacionado</i>	Monooxigenasa de hierro no-heme	C3 – C13 O C10 – C20	Bacteria
<i>AlmA</i>	Monooxigenasa de unión flavina	C20 – C36	Bacteria
<i>LadA</i>	Monooxigenasa termofílica dependiente de flavina	C10 – C30	Bacteria
<i>Dioxygenasa</i>	Cobre Dioxygenasa dependiente de flavina	C10 – C30	Bacteria
<i>PT7_2466 monooxigenasa</i>	Monooxigenasa tipo Rieske	C5 – C24	Bacteria

La vía de degradación de alcanos más ampliamente caracterizada es aquella codificada en el plásmido OCT de *P. putida* *GPo1* (previamente conocida como *Pseudomonas oleovorans* *GPo1*). La primera enzima en esta vía es la

monooxigenasa de hierro no hemo de membrana integral llamada *AlkB*, que hidroxila los n-alcenos en la posición terminal. Este proceso requiere la participación de dos proteínas solubles de transferencia de electrones conocidas como rubredoxina (*AlkG*) y rubredoxina reductasa (*AlkT*) (Figura 2) (Moreno & Rojo, 2017).

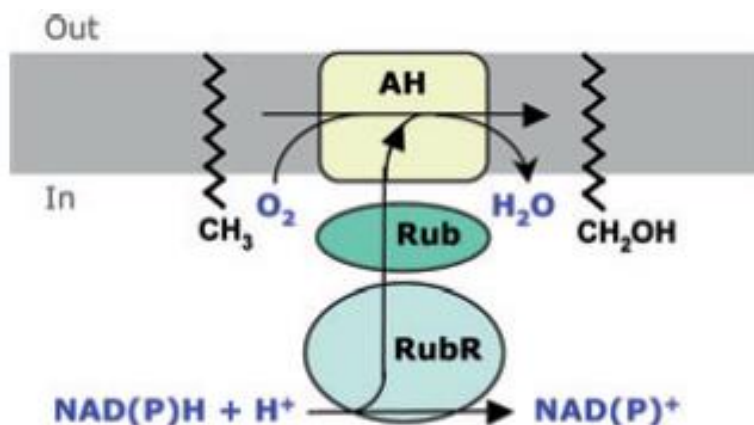


Figura 2. Esquema de las enzimas involucradas en la oxidación de n-alcenos pertenecientes a la familia *AlkB* (Moreno & Rojo, 2017)

2.3.1. Gen *alkB*

En la caracterización de comunidades bacterianas especializadas en la degradación de alcanos, el gen *alkB* se reconoce como un biomarcador funcional clave. Este gen codifica la enzima 1-monooxigenasa, esencial en las vías metabólicas que participan en la degradación de alcanos de diferentes longitudes, incluyendo corta, media y larga (< C10, C10-C16, C20-C40, respectivamente) (Wang & Shao, 2012). La distribución amplia de estos genes ha facilitado su utilización para analizar la composición de las comunidades bacterianas degradadoras de alcanos y para estimar la abundancia de bacterias con capacidades degradadoras de hidrocarburos en diversos entornos (Smith et al., 2013). Los clusters de genes *alkB* contienen la información necesaria para la conversión de alcanos en ácidos grasos

correspondientes, permitiendo a los microorganismos utilizar los alcanos como única fuente de carbono y energía (Wang et al., 2022). Aunque las secuencias de *alkB* pueden ser altamente diversas, comparten regiones conservadas que facilitan el diseño de cebadores aplicables para la amplificación de genes filogenéticamente distantes (Kloos et al., 2006; Viggor et al., 2015), lo que permite la detección de estos genes incluso en entornos contaminados.

2.4. Microorganismos marinos

Se sabe que en el ambiente marino hay una alta presencia de hidrocarburos debido a la contaminación por petróleo, no obstante, se tiene evidencia que hay una recuperación natural (Scoma et al., 2017). Varios estudios han demostrado que algunos microorganismos marinos tienen la capacidad de metabolizar el petróleo de ambientes contaminados. (Head et al., 2006).

La estructura de las comunidades microbianas en los sitios contaminados se debe al estrés generado por los hidrocarburos (Teske, 2019). De esta manera se ha generado un grupo de bacterias especializadas en consumir algunos hidrocarburos, este grupo se conoce como bacterias hidrocarbonoclastas obligadas, cerca del 90% de la población microbiana presente durante un derrame de petróleo son bacterias degradadoras de hidrocarburos, algunos de los principales géneros de bacterias son *Alcanivorax*, *Oleispira*, *Cycloclasticus*, *Thalassolituus* (Yakimov et al., 2007). Las bacterias hidrocarbonoclastas obligadas se encuentran ampliamente distribuidas; no obstante, algunas especies han sido identificadas en aguas frías, como el caso de *Oleispira antarctica*. Además, se ha observado que el tipo de contaminación por hidrocarburos puede influir en la selección de géneros particulares para su degradación. Por ejemplo, los hidrocarburos alifáticos tienden a ser degradados por *Alcanivorax*, mientras que los compuestos aromáticos son degradados por *Cycloclasticus* (Dellagnezze et al., 2019).

También se han reportado otros géneros de bacterias relacionados con la degradación de hidrocarburos, en los que podemos destacar *Pseudomonas*,

Bacillus, *Alcaligenes*, *Rhodococcus* (Chen et al., 2017; Dey et al., 2016). Algunos otros que se han detectado en agua de mar enriquecidos con benzo(a)pireno como *Microbacterium* y *Porphyrobacter*. Cepas de los géneros *Vibrio*, *Marinobacter*, *Cycloasticus*, *Pseudomonas*, *Marinomonas* y *Halomonas* fueron aisladas de sedimentos creciendo en presencia de fenantreno y criseno (McGenity et al., 2012). En otro caso de degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos se detectó *Idiomarina sp. R2A 23.10* que es capaz de de degradar fenantreno; *Marinobacter flavimaris R2A 36.j*, capaz de degradar Pireno y *Modicisalibacter tunisiensis MOD 31.j*, capaz de degradar fenol (Gomes & et al, 2018). En ambientes marino se han detectado también *Diestzia maris*, *Micrococcus sp.* y *Bacillus sp.* que están relacionados con la degradación de hidrocarburos (Kleinsteuber et al., 2006; Nakano et al., 2011; Dellagnezze et al., 2014).

2.5. Biorremediación

La biorremediación, describe un proceso natural que emplea agentes biológicos (microorganismos o sus derivados) con el propósito de impulsar la mineralización de contaminantes y la restauración de sitios afectados por la contaminación. Este enfoque conlleva costos inferiores y otras ventajas en comparación con los procesos fisicoquímicos. Conforme a la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA), la definición de biorremediación implica un "tratamiento que emplea organismos naturalmente presentes para degradar sustancias peligrosas en formas menos tóxicas o no tóxicas" (Dellagnezze et al., 2019). En la literatura se han documentado diversas técnicas de biorremediación que emplean agentes biológicos (bacterias, hongos, plantas) o enzimas. Aunque estas técnicas pueden aplicarse para tratar una amplia gama de contaminantes, los hidrocarburos son los contaminantes más frecuentemente abordados, debido a su amplia presencia en aguas y suelos contaminados (Firmino et al., 2015).

Las técnicas de biorremediación pueden ser gestionadas en el lugar afectado (in situ), abordando la materia contaminante directamente en la superficie, o fuera del

lugar (ex situ), donde la matriz contaminada es tratada en otro sitio (Azubuike et al., 2016). Diversos factores como los costos asociados, las condiciones del lugar y el tipo y concentración de los contaminantes influyen en la decisión de si la biorremediación se llevará a cabo in situ o ex situ. Existen varias modalidades de tratamientos de biorremediación, como la aplicación de especies fúngicas específicas (micorremediación), el empleo de plantas (fitorremediación, rizofiltración) y microorganismos en general, junto con sus subproductos y nutrientes (bioaumentación, bioestimulación, biopilas, atenuación natural y biosurfactantes), entre otras técnicas (Kensa, 2011; Banerjee et al., 2016). En todo caso para llegar a la bioremediación se requiere de múltiples ensayos tanto en laboratorio como a nivel piloto.

2.6. Biorremediación utilizando bacterias

Debido a la preocupación de los gobiernos y la comunidad científica, se han realizado múltiples estudios en diferentes partes del mundo a causa de los desastres que involucran los derrames de petróleo, esto para tratar de evaluar la capacidad de degradación de hidrocarburos utilizando microorganismos y de esta manera tratar de remediar el ambiente de manera natural. Por ejemplo, Liu et al., (2017) realizaron experimentos en el Golfo de México usando muestras de agua superficial y profunda cercanos a la plataforma Deepwater Horizon. Donde observaron que la temperatura fue clave en la selección bacteriana: a 4°C favoreció a *Cycloclasticus*, *Pseudoalteromonas*, *Sulfitobacter* y *Reineke*, mientras que a 24°C impulsó a *Oleibacter*, *Thalassobius*, *Phaeobacter* y *Roseobacter*. Por otro lado, Cerqueda-García et al., 2020 investigaron la sucesión microbiana usando cinco tipos de petróleo (extra ligero, ligero, medio, pesado y extra pesado) y cinco comunidades microbianas en el noroeste del Golfo de México, cuatro en la columna de agua y una en el sedimento, donde se lograron percatar que la comunidad en el sedimento era capaz de degradar los cinco tipos de petróleo. En un trabajo realizado por Raggi et al., 2020 se lograron identificar marcadores metabólicos de bacterias

autóctonas que interviene en varios ciclos biogeoquímicos y que tienen la capacidad de degradar diversos hidrocarburos ya sea en agua (*Vibrio sp*, *Alteromonas* y *Alcaniborax*) o sedimento (*Nitrospira* y *Sva008*). En un estudio reciente realizado en la bahía de Jiaozhou, China, S. Liu et al., (2022) lograron aislar cuatro cepas de bacterias que degradan petróleo en el agua de mar entre ellas *Pseudomonas aeruginosa* ZS1 el cual tuvo una buena capacidad para degradar alcanos de cadena corta. Los estudios recopilados subrayan la sorprendente capacidad de las bacterias para degradar hidrocarburos en diversos entornos marinos. Las investigaciones revelan que la temperatura ejerce un papel crucial en la selección de comunidades bacterianas, mientras que algunas muestran especialización en la degradación de diferentes tipos de petróleo. Además, la identificación de marcadores metabólicos específicos resalta la participación de bacterias autóctonas en ciclos biogeoquímicos y su destreza en la degradación de hidrocarburos tanto en agua como en sedimentos marinos. Estos hallazgos demuestran la diversidad y potencial de las bacterias para abordar la degradación de contaminantes petroleros, lo que podría ser esencial para estrategias de biorremediación y respuestas a derrames de petróleo.

2.7. Bioensayos en Mesocosmos

La investigación de los efectos que varias actividades humanas pueden generar en el entorno natural y la salud se configura como una de las primordiales motivaciones que impulsan a los investigadores a iniciar sus estudios. No obstante, en determinadas instancias, se vuelve desafiante evaluar los resultados únicamente a través de trabajos de campo. En el entorno natural, se evidencia una amplia diversidad de variables, lo cual dificulta establecer relaciones de causa y efecto de manera concluyente, razón por la cual se recurre a enfoques experimentales en el laboratorio.

Los ensayos en mesocosmos abordan una variedad de cuestiones vinculadas a los procesos acuáticos (como la producción primaria, el pastoreo, la depredación y la

transferencia de energía entre niveles tróficos) y el comportamiento de los seres vivos (como el crecimiento, la migración, la respuesta a los contaminantes, etc.) en contextos seminaturales (Wolff, 2002). La realización de experimentos en mesocosmos (con dimensiones que varían entre 1 m³ y 100 m³) ha enriquecido la comprensión de las interacciones entre procesos fisicoquímicos, biológicos e incluso toxicológicos vinculados a la contaminación por petróleo. Por otra parte, esta modalidad de experimentación también ha facilitado la exploración del potencial de biodegradación de hidrocarburos por parte de las bacterias. La ventaja principal de este tipo de experimentos radica en la capacidad de construir estructuras que posibiliten simular las condiciones ambientales de los ecosistemas e incluso, en ocasiones específicas, controlar determinados parámetros fisicoquímicos (Odum, 1984; Zhang & Bennett, 2005; Cappello & Yakimov, 2010).

A finales de los años 70, Lee y su equipo llevaron a cabo un experimento en un entorno controlado para investigar el destino de una serie de hidrocarburos aromáticos policíclicos con diferentes pesos moleculares en un sistema de contenedores de 60,000 litros de agua de mar. En estos contenedores, que tenían 2 metros de diámetro y 15 metros de profundidad, se introdujo petróleo crudo con variadas concentraciones de hidrocarburos aromáticos, que oscilaban entre 1 y 20 µg/L. Se observaron cambios en la concentración de estos hidrocarburos en el agua, principalmente debido a procesos como la evaporación, la degradación biológica y la oxidación fotoquímica, entre otros (Lee et al., 1978).

Asimismo, se llevó a cabo un estudio que investigó el destino ambiental de algunos Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) y los efectos de los dispersantes químicos utilizando mesocosmos experimentales de 500 litros que imitaban ecosistemas naturales. Se analizaron 38 compuestos HAPs utilizando cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS). Además, se añadieron dispersantes químicos, lo que aceleró la disolución y biodegradación de los HAPs de alto peso molecular (Yamada et al., 2003).

En un estudio posterior se evaluó la eficacia de tratamientos de bioaugmentación/bioestimulación para recuperar agua de mar contaminada con

petróleo crudo. Se realizaron tres series de experimentos en una "Instalación Mesocosmos" de 10,000 litros. Se contaminó artificialmente agua de mar natural con petróleo crudo (1000 ppm), y el experimento se llevó a cabo durante 20 días, durante los cuales se midieron varios parámetros, como la abundancia bacteriana, bacterias heterótrofas cultivables y actividad metabólica microbiana NMP (Hassanshahian et al., 2014).

Así mismo, se han empleado consorcios bacterianos provenientes de yacimientos de petróleo para evaluar su capacidad de degradación en mesocosmos con agua de mar contaminada artificialmente con petróleo crudo. Dellagnezze et al., (2016) tomaron muestras en diferentes momentos y las sometieron a varios análisis, incluyendo GC-FID y análisis microbiológicos, como la abundancia bacteriana total y heterótrofa, la demanda biológica de oxígeno (DBO) y la diversidad taxonómica mediante secuenciación masiva de genes 16S rRNA. Aquí se observó que la degradación de n-alcanos fue similar en ambos tratamientos, pero la degradación de compuestos aromáticos fue más eficiente en el tratamiento de Bioaugmentación. Estos experimentos se llevaron a cabo en tanques de 3.75 metros cúbicos de capacidad.

Para las aguas del Golfo de México, en 2019, se realizó un estudio que evaluó los cambios en la estructura de la comunidad de bacterioplancton causados por un derrame de petróleo simulado a escala de mesocosmos. Se realizaron análisis de secuenciación del gen 16S rRNA, se midió la actividad de degradación de hidrocarburos y se determinó el número de copias del gen *alkB*. Se observaron cambios significativos después de 4 días, con un aumento en la actividad de degradación de hidrocarburos, y al final del experimento, la diversidad bacteriana regresó a valores similares a los iniciales, aunque la composición era diferente (Valencia-Agami et al., 2019).

3. JUSTIFICACIÓN

El Golfo de México ha sido un lugar constante de extracción de petróleo por parte de México y Estados Unidos durante más de un siglo. A pesar de esto, el petróleo sigue siendo una mercancía crucial para el crecimiento económico y las relaciones comerciales. Aunque recientemente se ha aprobado la exploración y la apertura de nuevas plataformas petroleras, existe una falta de evidencia científica para respaldar las decisiones gubernamentales en caso de derrames de petróleo en México. En este contexto, la biorremediación se presenta como una alternativa importante, ya que utiliza microorganismos nativos del Golfo de México para abordar la contaminación por hidrocarburos (Colmenares, 2008).

Las bacterias son especialmente abundantes en el Golfo de México y desempeñan un papel crucial en la degradación de hidrocarburos (Herzka et al., 2020). Por lo tanto, es esencial comprender la composición de la comunidad bacteriana en esta región mediante la identificación de genes funcionales que están relacionados con la degradación de hidrocarburos, sustancias tóxicas que pueden causar daños a los organismos marinos y representar un riesgo para los seres humanos que consumen estos organismos.

Mediante ensayos a gran escala, es posible simular derrames de petróleo y determinar qué bacterias tienen la capacidad de degradar hidrocarburos. Además, se puede observar cómo las abundancias de genes funcionales, como el *alkB*, varían en presencia de estos contaminantes, debido a que este gen codifica la enzima 1-monooxigenasas que es importante en la degradación de alcanos. La información recopilada en estos estudios proporciona una base sólida para comprender la respuesta de las bacterias nativas cuando se enfrentan a la presencia de hidrocarburos.

4. HIPOTESIS

En experimentos de mesocosmos simulando un derrame de petróleo ligero con diferentes concentraciones (10, 40 y 80 mg L⁻¹) y en distintas épocas climáticas, se espera que a mayor concentración de petróleo adicionado habrá un mayor número de copias del gen *alkB* que codifica para la enzima alcano 1-monooxigenasa, que es un marcador molecular para la degradación de hidrocarburos alifáticos. Además, se espera encontrar variaciones en las abundancias relativas de los grupos bacterianos con la capacidad de degradar hidrocarburos alifáticos en los tratamientos y temporadas.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

- Estimar la degradación de hidrocarburos alifáticos por comunidades bacterianas a través de la cuantificación del gen *alkB* en experimentos de mesocosmos a diferentes concentraciones de petróleo ligero en distintas temporadas climáticas en la Plataforma de Yucatán.

5.2. Objetivos Particulares

- Cuantificar las abundancias del gen *alkB* en las distintas temporadas y concentraciones de crudo.
- Correlacionar las abundancias del gen *alkB* con las concentraciones de hidrocarburos alifáticos en las distintas temporadas y concentraciones de crudo.
- Identificar la composición de la comunidad bacteriana capaz de degradar hidrocarburos alifáticos en agua marina de la Plataforma de Yucatán en tres temporadas climáticas de la región expuestas a diferentes concentraciones de petróleo crudo.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Descripción del experimento y explicación de las condiciones meteorológicas

Se realizaron 3 experimentos de mesocosmos, en donde al agua de mar que se utilizó para los ensayos correspondía a cada una de tres temporadas climáticas del año (secas, lluvias, norte). En cada uno se llevaron a cabo simulaciones de derrames de petróleo a diferentes concentraciones (10, 40 y 80 mg/L o ppm) (Figura 3). Las fechas de muestreo (colecta de agua de mar) se seleccionaron basados en la información obtenida de los reportes climatológicos de la CONAGUA (<https://smn.conagua.gob.mx/es/>). La temporada de secas la colecta de agua se realizó el 28 de febrero del 2018, ya que durante el mes de febrero y marzo de ese año se registraron bajas precipitaciones y altas temperaturas. El 15 de agosto se llevó a cabo el muestreo de la temporada de lluvias, debido a que se observó un pico de precipitaciones. El muestreo para la temporada de nortes se llevó a cabo el 22 de octubre, esto coincidía con el término de la temporada de huracanes en el océano atlántico. En cada temporada se empleó un camión cisterna donde se recolectó y transportó 31, 000 L de agua de mar del muelle fiscal de progreso (Yucatán, México, en la latitud 21_20" N; 89_40" W). En cada temporada se tomaron muestras de agua en contenedores de 20 L, con el fin de conocer las concentraciones de hidrocarburos en el sitio al momento de la toma del agua para el experimento (muestras de referencia).

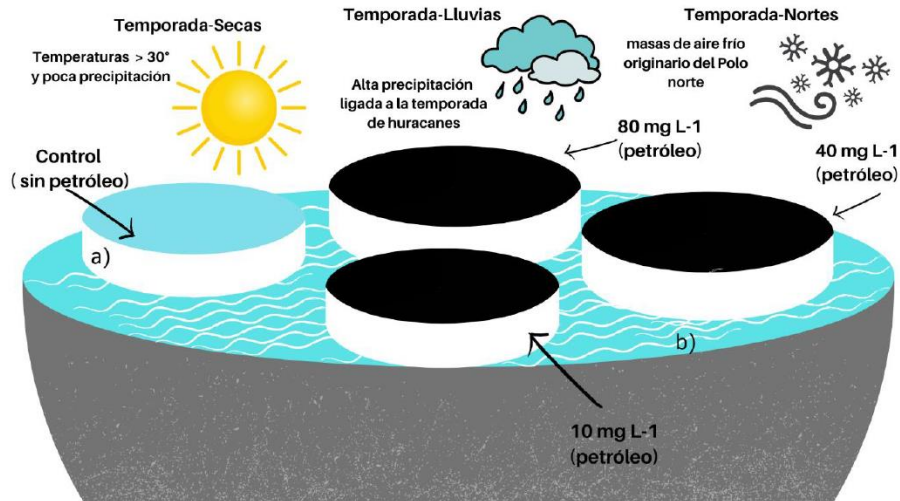


Figura 3. Representación gráfica del diseño experimental para evaluar el efecto del petróleo durante las temporadas de secas, lluvias y nortes (tomado de Valencia Agami, 2022).

Los contenedores donde se realizaron los experimentos tienen una capacidad total de 2800 L con 1.75 m de altura y 1.55 m de diámetro, estos están equipados con una propela electrónica con la finalidad de homogenizar la temperatura, oxígeno y salinidad (Figura 4).

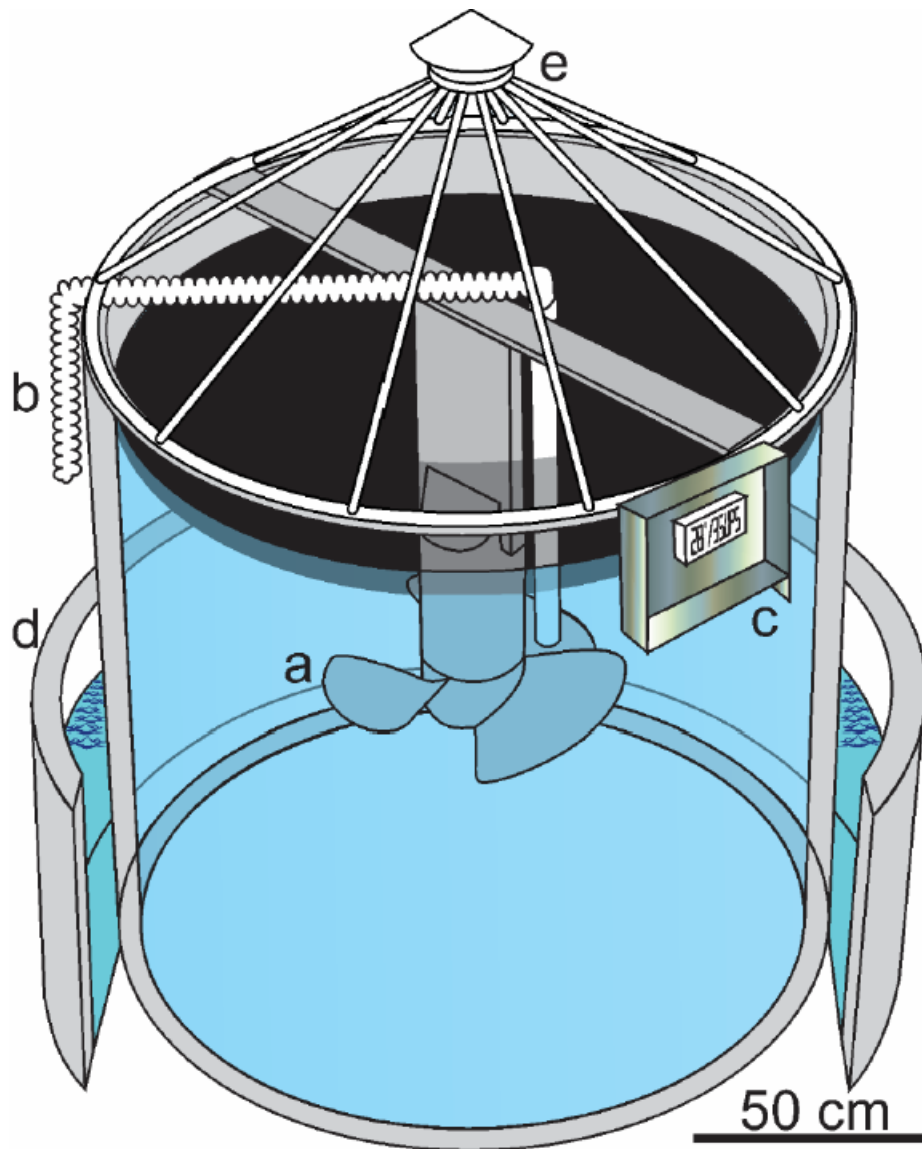


Figura 4. Descripción gráfica del equipamiento de la unidad de mesocosmos. a) propela para mantener homogénea el oxígeno y la temperatura dentro del sistema, b) muestreador de agua, c) caja de sensores, d) baño maría, para prevenir cambios bruscos en la temperatura (Valencia-Agami et al., 2019).

Las condiciones experimentales y el llenado de las unidades de mesocosmos se llevaron a cabo de la siguiente manera: Todos los ensayos se realizaron durante un período de 15 días, al aire libre, bajo ciclos de luz solar natural, con una agitación constante a una velocidad de 0.125 m/s, y sin la adición de ningún tipo de nutrientes. Para simular los derrames de petróleo a diferentes concentraciones (10 mg/L, 40 mg/L, 80 mg/L), se empleó petróleo crudo ligero (con un rango de 31-39° API)

obtenido del Pozo Ixtoc-I, situado a 94 km de Ciudad del Carmen, Campeche, México, en el Golfo de México, se tomaron estas concentraciones ya que se ha reportado que a concentraciones de 1 mg L^{-1} hay estimulación en el crecimiento y concentraciones por arriba de los 100 mg L^{-1} pueden inhibir el crecimiento de la comunidad bacterioplanctónica (Harrison et al., 1986). Para observar los cambios en la comunidad bacteriana sin la influencia de los hidrocarburos, se utilizó dos unidades de mesocosmos que contenían exclusivamente agua marina. Dado que se duplicó cada experimento, en total se emplearon ocho cisternas con una capacidad total de 2800 litros, con dimensiones de 1.75 metros de altura y 1.55 metros de diámetro. Estas cisternas estaban equipadas con una hélice eléctrica para mantener la temperatura, el oxígeno y la salinidad homogéneos. Cada cisterna fue llenada con un volumen total de 2500 litros de agua marina previamente filtrada a través de una malla de nylon de $200 \mu\text{m}$ para eliminar los detritos y el mesoplancton. Después de llenar las cisternas, se les otorgó un período de aclimatación de 24 horas antes de iniciar los experimentos, lo que permitió que la comunidad microbiana se adaptara a las condiciones del sistema.

6.2. Recolección de muestras de los sistemas de mesocosmos

Para cada una de las temporadas climáticas del GoM (temporadas de secas, lluvias y nortes), se llevó a cabo un primer muestreo inmediatamente después de añadir petróleo a los mesocosmos y este fue denominado el tiempo cero (t_0). Los muestreos posteriores se realizaron en los días uno (t_1), dos (t_2), siete (t_7) y al finalizar el experimento dependiendo del número de días (t_n). Durante la temporada de secas, la duración total del experimento fue de 13 días, mientras que en las temporadas de lluvias y nortes, cada experimento se extendió por un período de 15 días. Las muestras se extrajeron directamente de las unidades de mesocosmos a una profundidad de 1 metro utilizando un sifón de plástico. Para monitorear los cambios en la comunidad microbiana, se tomaron 5 L de agua de los mesocosmos los cuales fueron filtrados y sometidos a secuenciación del gen 16S ARNr utilizando

la plataforma Illumina de acuerdo con la metodología descrita en Cappello et al., 2007.

6.3. Cuantificación del gen funcional *alkB*

La determinación de la concentración del gen *alkB*, relacionado con la primera etapa de la descomposición de alcanos mediante hidrolasas, se llevó a cabo utilizando el sistema Rotor-Gene Q (Qiagen, Hilden, Alemania). Se emplearon los iniciadores Forward: 5'-AAC TAC MTC GAR CAY TAC GG-3' y Reverse: 5'-TGA MGA TGT GGT YRC TGT TCC-3' (donde "M" = AC, "R" = AG y "Y"=CT), los cuales habían sido previamente reportados por Powell et al., (2006), con algunas modificaciones al protocolo según lo descrito por Uribe-Flores et al., (2019), a excepción de la concentración de ADN de las muestras, la cual se mantuvo en 1 ng/μL (Tabla 2). Para la creación de la curva estándar, se realizaron diluciones (1/10, 1/100, 1/1000 y 1/10000) de una muestra de la comunidad microbiana marina conocida por contener el gen objetivo. Al cuantificar la curva, se obtuvo un coeficiente de determinación (r^2) de 0.98 y una eficiencia de amplificación del 98.3%.

Tabla 2. Condiciones para PCR en tiempo real del gen *alkB*

<i>Etapa</i>	<i>Temperatura</i>	<i>Tiempo</i>
<i>Desnaturalización</i>	95 °C	10 min
<i>35 ciclos</i>	84 °C	20 s
	50 °C	30 s
	72 °C	45 s
	77 °C	15 s
<i>Melt</i>	Rampa de 45 a 95 °C	

6.4. Análisis estadísticos y bioinformática de la comunidad bacteriana

Para determinar los cambios en la comunidad microbiana, se empleó la secuenciación del gen 16S ARNr en la plataforma Illumina. Este análisis fue realizado en el laboratorio de patología acuática en CINVESTAV Unidad Mérida de acuerdo con la metodología de Valencia-Agami et al., 2019, bajo el siguiente procedimiento:

La extracción de ADN se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del "kit de PowerWater Sterivex DNA Isolation" de Mo Bio Laboratories, Inc. Utilizando una bomba peristáltica, se filtraron 5 litros de agua de mar de los mesocosmos a través de una unidad de filtración Sterivex de 0.22 μm de Millipore Corp., Bedford, MA, E.U.A. La calidad de la extracción de ADN se evaluó mediante electroforesis utilizando un gel de agarosa al 1%.

Para amplificar la región hipervariable V3-V4 del gen 16S ARNr, se utilizaron los siguientes primers: 341F (5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG-3') y 805R (5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC3') siguiendo las condiciones recomendadas por (Klindworth et al., 2013). La amplificación se realizó en un Termociclador Veriti™ de 96 pozos (Applied Biosystems, USA) utilizando 2 μL de ADN genómico, 0.5 μL de cebador directo (1 $\mu\text{mol/L}$), 2 μL de cebador inverso (1 $\mu\text{mol/L}$), 7 μL de agua de calidad PCR (Promega), y 10 μL de mezcla de PCR 2X Phusion Flash High-Fidelity (Thermo Scientific). El proceso incluyó una desnaturalización inicial a 95 °C durante 3 minutos, seguida de 25 ciclos de 95 °C durante 30 segundos, 55 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 30 segundos, con una extensión final a 72 °C durante 5 minutos.

Para la preparación de las librerías, se siguieron las recomendaciones del protocolo proporcionado en el kit "Nextera XT Kit". La purificación de los amplicones se realizó

utilizando las perlas AMPure XP y, posteriormente, se indexaron las muestras. Las muestras de PCR indexadas se purificaron y cuantificaron utilizando el equipo "Qubit® 3.0 Fluorometer" con el kit dsDNA HS de Life Technologies, Carlsbad, CA, E.U.A. Cada amplicón se diluyó en tris a 10 mM (pH 8.5) y luego se generó una mezcla de concentraciones equimolares a 4nM.

La secuenciación de las bibliotecas se llevó a cabo en CINVESTAV Unidad Mérida utilizando la plataforma Miseq-Illumina (Illumina, San Diego, CA, E.U.A.) y el kit "Miseq reagent V3 (2 _300)". Las lecturas crudas generadas en este estudio se depositaron en NCBI en el bioproyecto con el número de acceso PRJNA560042.

Se llevaron a cabo varias etapas de procesamiento de datos en el análisis de las lecturas pareadas (2x300) utilizando el pipeline QIIME2 (2018.8) (Caporaso et al., 2010). La corrección de errores y la identificación de secuencias variantes del amplicón (ASVs, por sus siglas en inglés) se realizaron mediante el complemento DADA2. Las lecturas se recortaron a un tamaño de 100 pares de bases. Se eliminaron las quimeras utilizando el método de "consenso" (Callahan et al., 2016, 2017). Posteriormente, los ASVs representativos se asignaron taxonómicamente utilizando el complemento VSEARCH (Rognes et al., 2016) y la base de datos SILVA (v.138). Se construyó una filogenia utilizando el algoritmo FastTree ((Price et al., 2010) basado en los ASVs como referencia.

El número de lecturas osciló entre un mínimo de 8,000 y un máximo de 190,000 lecturas en las muestras. La tabla de abundancia resultante se exportó al entorno de software "R" para realizar análisis estadísticos, y se generaron visualizaciones utilizando las librerías phyloseq (McMurdie & Holmes, 2013), vegan (Oksanen Jari & et al, 2022) y ggplot2 (Wilkinson, 2011). Dada la variabilidad en el número de lecturas antes de realizar los análisis estadísticos, se normalizaron los datos utilizando la función "phyloseq_transform_css" en la biblioteca metagMisc.

6.5. Cuantificación de hidrocarburos alifáticos

Los datos de hidrocarburos alifáticos se procesaron en laboratorio de patología acuática en CINVESTAV Unidad Mérida los cuales ya han sido reportados por Valencia Agami, 2022 utilizando siguiente metodología:

Se recolectó agua del mesocosmos diariamente en botellas ámbar de 4 L, preservándola a 4°C. La extracción de hidrocarburos se efectuó mediante embudos de separación de teflón con una capacidad de 2 litros, utilizando 175 mL de diclorometano. Después de agitarla por 10 minutos, se dejó en reposo hasta la separación de fases, recuperando el diclorometano en una botella ámbar etiquetada y congelándola a una temperatura entre 0°C y -4°C para su análisis. Las muestras se concentraron a 10 mL mediante rotavapor y se redujeron a 0.5 mL con nitrógeno. La fracción de hidrocarburos alifáticos se obtuvo mediante cromatografía en columna. Se empleó una columna cromatográfica de dimensiones 200 x 10.5 mm con una llave de teflón. Inicialmente, se insertó un tapón de lana de vidrio en la columna, realizando un lavado secuencial con metanol, hexano y cloruro de metileno. Posteriormente, se procedió a secar la lana de vidrio y la columna en un horno a una temperatura de 90 °C. La columna fue empacada con 3 g de sílice gel, coronada con una capa de 0.5 cm de sulfato de sodio anhidro. Se utilizó hexano (20 mL) como eluyente. La preparación de la muestra consistió en combinar una mezcla de 3 mL de hexano con 200 µL de la muestra a analizar para montar la cabeza de la columna. Para eluir los hidrocarburos alifáticos se emplearon 12 mL de hexano. Posteriormente, se concentraron estos hidrocarburos mediante un flujo suave de nitrógeno en un tubo de centrifuga, precalibrado para una inyección inicial de 0.5 – 1.0 mL.

Se cuantificaron los hidrocarburos alifáticos mediante cromatografía de gases en un equipo Agilent 7890A con detector de ionización de flama (FID), una columna capilar DB-5 y helio como gas portador. Cada muestra se inyectó en modo splitless con 1 µL, y el análisis duró 16 minutos con rampa de temperatura hasta alcanzar los 300°C. El cromatógrafo se calibró utilizando soluciones estándar de n-alcános,

pristano, fitano y 5- α -Androsteno como estándar interno, con una curva de calibración de cinco puntos o más para demostrar el rango lineal del análisis. El factor de respuesta relativo se calculó con respecto al estándar interno (modificado de J. Wang et al., 1994). Se midieron las concentraciones de hidrocarburos alifáticos de cadena corta, media y larga, donde se tomaron en cuenta los compuestos de C10 a C40 incluyendo el fitano y pristano como indicadores de biorremediación.

6.6. Análisis de datos

Se llevaron a cabo análisis de correlación entre los compuestos alifáticos de diferente número de carbonos (C_n) y el gen *alkB*. Estas correlaciones se examinaron en cada tratamiento para cada temporada climática, se tomaron en cuenta solo correlaciones negativas significativas (mayores a 0.6). De igual manera se realizaron análisis de regresión de los compuestos alifáticos que presentaron correlaciones significativas con el gen *alkB*, con el objetivo de determinar en qué medida la variabilidad de estos alifáticos puede ser atribuida al gen *alkB*. Adicionalmente se elaboraron mapas de calor “heatmaps” para lo cual se tomaron los compuestos con cadenas de carbonos de alifáticos que tuvieron buena correlación con la abundancia del gen *alkB* y que a su vez se correlacionaron con la abundancia de la comunidad bacteriana que se lograron asignar en cada una de las temporadas. Solo se tomaron en cuenta las correlaciones entre las concentraciones de compuestos alifáticos y las abundancias de la comunidad (clase y género) que tuvieron valores mayores a 0.6 y valores de P menores a 0.05. Estos análisis fueron realizados en el lenguaje R, utilizando las librerías tidyverse (Wickham et al., 2019), ggplot2 (Wilkinson, 2011) y Microeco (Liu et al., 2021).

7. RESULTADOS

7.1. Concentración de hidrocarburos en las muestras de referencia y experimentos de mesocosmos.

De acuerdo con los datos obtenidos por Valencia Agami, 2022 en las muestras de referencia de cada temporada, se observó que en temporada de secas se registra la mayor concentración del total de hidrocarburos de petróleo (TPH), mientras que en nortes hay la menor concentración de TPH (Tabla 3).

Tabla 3. Concentraciones del total de hidrocarburos de petróleo en muestras de referencia en las tres temporadas (secas, lluvias y nortes)

Temporada	TPH (Total de hidrocarburos de petróleo) $\mu\text{g L}^{-1}$
Secas	42.31
Lluvias	20.01
Nortes	4.51

Según los hallazgos de Valencia Agami, (2022), se notó que, durante las tres temporadas, las concentraciones más altas de alifáticos se encontraron en los tratamientos con 40 y 80 mg L^{-1} entre los compuestos alifáticos C13 y C30, excepto en la temporada de nortes, donde el tratamiento con 10 mg L^{-1} registró concentraciones elevadas de fitano. Por otro lado, los controles mostraron las concentraciones más bajas en todas las temporadas, aunque en la temporada de nortes se observó una mayor concentración de C37 en los controles en comparación con los tratamientos (ver Anexo 2).

7.2. Abundancia del gen *alkB* durante el experimento de mesocosmos en las distintas temporadas

7.2.1. Temporada de Secas

Durante la temporada de secas la abundancia del gen *alkB* del tratamiento control oscilo entre las 2.19×10^6 y 3.31×10^6 Copias / μ L. El día 2 se destacó por tener la mayor cantidad de copias, mientras que el día 13 marcó el punto más bajo.

Con relación a los tratamientos con petróleo en la concentración de 10 mg L^{-1} se observó que la cantidad del gen en el día 0 fue 3.32×10^6 Copias / μ L lo cual represento la cifra máxima entre todos los tratamientos incluyendo el grupo control a lo largo de todo el experimento de secas. En contraste, el valor más bajo se registró el día 13, con tan solo 6.95×10^5 Copias / μ L.

Se observo que en los tratamientos con concentraciones de 40 y 80 mg L^{-1} , la mayor cantidad de copias del gen se detectó en el segundo día, con valores de 2.39×10^6 y 2.17×10^6 Copias / μ L, respectivamente. Por otro lado, la menor cantidad de copias se registró en el día 13, con cifras de 7.59×10^4 y 8.97×10^4 Copias / μ L en los mismos tratamientos. Es importante destacar que el tratamiento de 40 mg L^{-1} en el día 13 exhibió la menor abundancia de copias de gen en todo el experimento de secas (Figura 5).

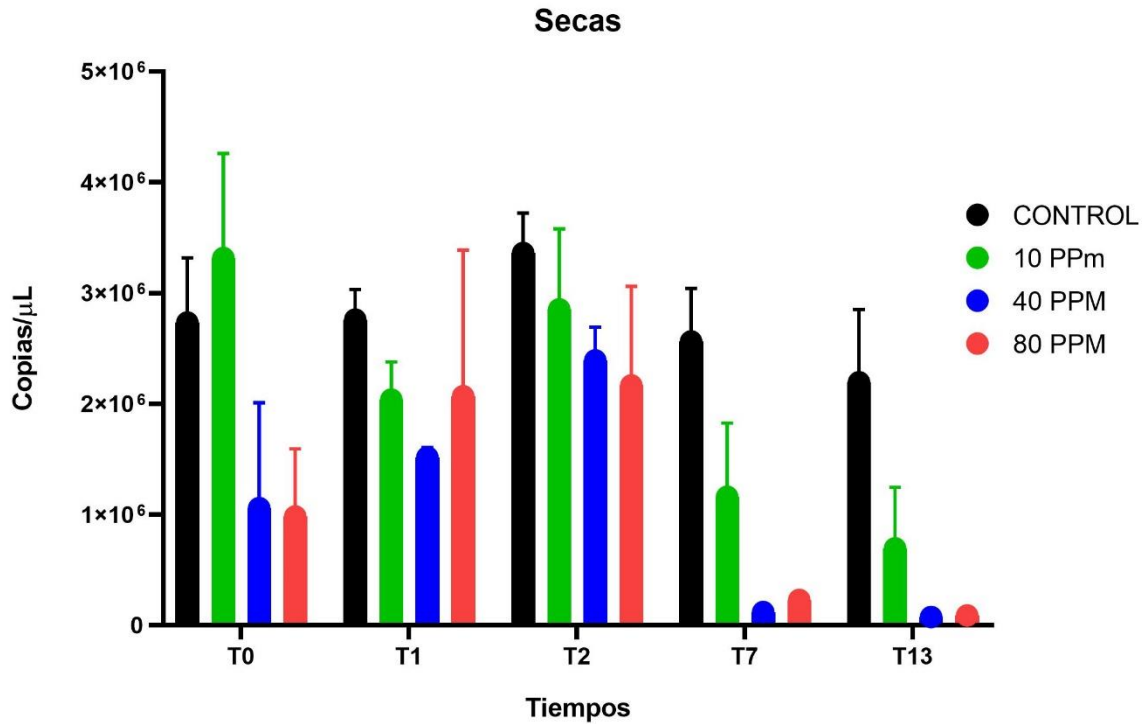


Figura 5. Abundancia del gen *alkB* durante la temporada de secas

7.2.2. Temporada de Lluvias

En la temporada de lluvias el control tuvo su abundancia más baja del gen *alkB* en el día 0 (4.39×10^5 Copias / μ L) y la abundancia más alta en el día 2 (3.62×10^6 Copias / μ L). La abundancia del control en el día 2 fue la más alta en todo el experimento de lluvias.

En los tratamientos 10 y 80 mg L⁻¹ las abundancias más bajas fueron en el día 15 con 1.07×10^5 y 6.28×10^4 Copias / μ L respectivamente, las abundancias más altas fueron registradas en día 2 con 2.55×10^6 y 2.87×10^6 Copias / μ L respectivamente.

El tratamiento de 40 mg L⁻¹ obtuvo su abundancia más baja en día 0 con 7.39×10^3 Copias / μ L y la más alta en el día 2 con 2.78×10^6 Copias / μ L. La abundancia del

tratamiento 40 mg L⁻¹ en el día 0 fue la más baja de todo el experimento de lluvias (Figura 6).

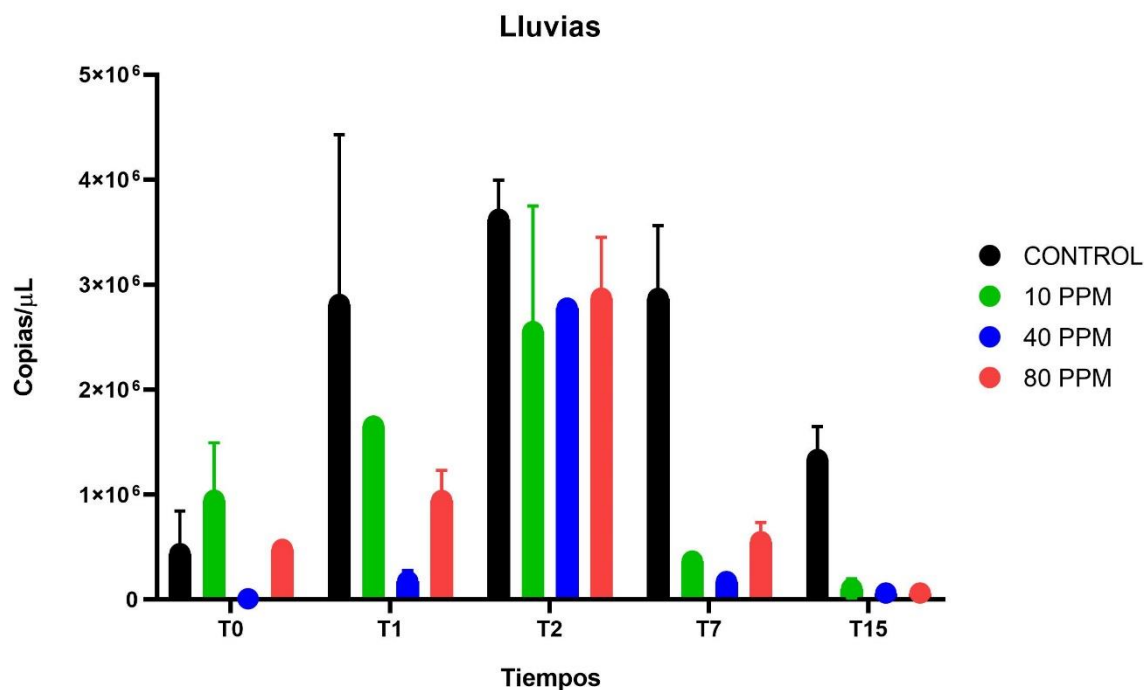


Figura 6. Abundancia del gen *alkB* durante la temporada de lluvias

7.2.3. Temporada de nortes

En temporada de nortes, el control obtuvo su abundancia más alta del gen *alkB* en el día dos (5.16×10^6 Copias /μL) y la abundancia más baja fue en el día 15 (5.61×10^4). En el tratamiento de 10 mg L⁻¹ se observó la abundancia más alta en el día 0 con 5.21×10^6 Copias /μL y la abundancia más baja fue en el día 15 con 2.15×10^5 Copias /μL. Los tratamientos 40 y 80 mg L⁻¹ obtuvieron sus abundancias más altas del gen el día 2 (2.95×10^6 y 8.60×10^6 Copias /μL); mientras que los valores más bajos fueron en el día 15 con 4.18×10^4 y 1.38×10^5 Copias /μL respectivamente. La abundancia más alta del experimento de nortes fue la del

tratamiento 80 mg L⁻¹ en el día 2 y la más baja fue el tratamiento 40 mg L⁻¹ en el día 15 (Figura 7).

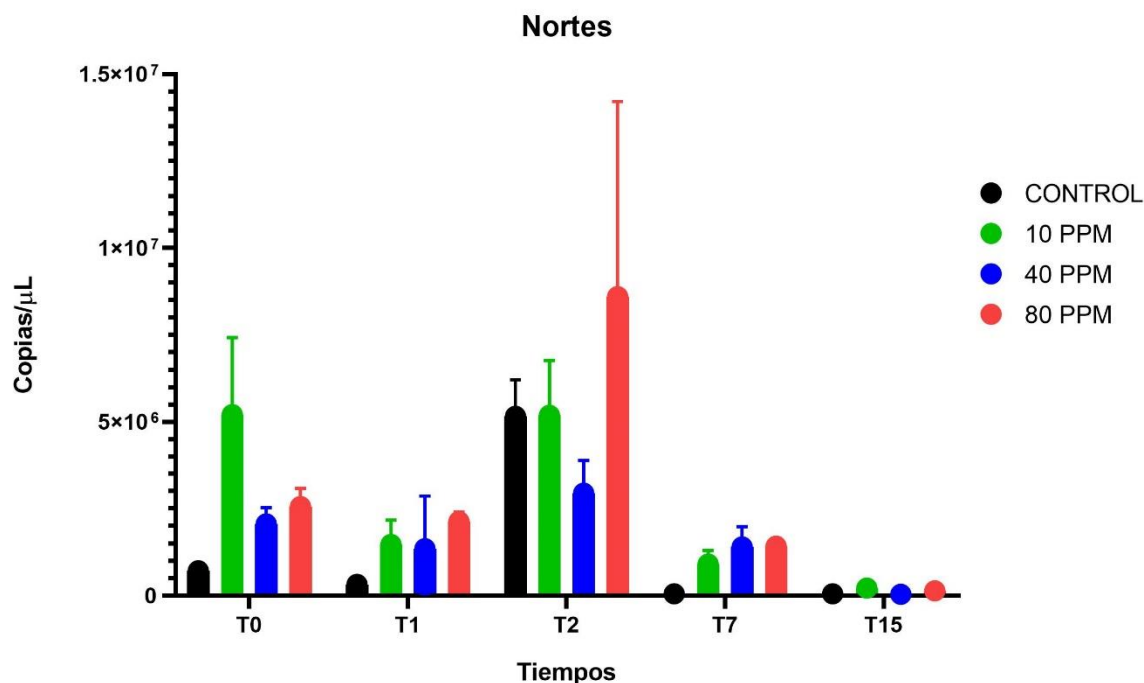


Figura 7. Abundancia del gen *alkB* durante la temporada de nortes

7.3. Correlaciones y regresiones lineales de la concentración de los hidrocarburos alifáticos con la abundancia del gen *alkB*

7.3.1. Temporada de secas

No se encontraron correlaciones significativas entre el control y el gen *alkB*, donde el valor superara 0.6 (Anexo 1). En el tratamiento de 10 mg L⁻¹, se identificaron 18 tipos de compuestos con correlaciones negativas. El fitano exhibió la correlación negativa más alta (-0.82). En contraste, la cadena de 30 carbonos presentó la correlación negativa más baja (-0.60). En el tratamiento de 40 mg L⁻¹, se detectó

una correlación negativa significativa con el gen *alkB*, esta fue con el compuesto alifático de 11 carbonos, el cual tuvo un valor de -0.65. De igual manera en el tratamiento de 80 mg L⁻¹, se identificó una sola correlación negativa significativa con el compuesto alifático de 10 carbonos (-0.62) (Anexo 1).

Por otro lado, en el análisis de regresiones el tratamiento de 10 mg L⁻¹, se observó que el valor más alto de *r* ajustada fue de 0.71, correspondiente a la cadena de 22 carbonos. En contraste, la cadena de 29 carbonos mostró un valor de *r* ajustada de 0.20. En el tratamiento de 40 mg L⁻¹, la cadena de 11 carbonos tuvo un valor de 0.12 de *r* ajustada. En el tratamiento de 80 mg L⁻¹, la cadena de 10 carbonos registró una *r* ajustada de 0.31 (Tabla 4).

7.3.2. Temporada de lluvias

En esta temporada, no se obtuvieron correlaciones negativas significativas con el gen *alkB* en ninguno de los tratamientos incluyendo el control.

7.3.3. Temporada de nortes

En esta temporada el grupo control y los tratamientos de 10 y 80 mg L⁻¹ no tuvieron correlaciones negativas significativas con la abundancia del gen *alkB* (Anexo 1).

En el tratamiento de 40 mg L⁻¹, se obtuvo una correlación negativa significativa con el pristano con un valor de -0.71. También se realizó la regresión entre el pristano y la abundancia del gen *alkB* y se obtuvo 0.44 de *r*-ajustada (Tabla 7).

Tabla 4. Regresiones entre las cadenas de carbono de hidrocarburos alifáticos y la abundancia del gen *alkB* en las temporadas climáticas

Secas					
10 mg L⁻¹		40 mg L⁻¹		80 mg L⁻¹	
Alifático	r-ajustada	Alifático	r-ajustada	Alifático	r-ajustada
C10	0.4116	C11	0.1261	C10	0.3184
C13	0.4645				
C18	0.6032				
FITANO	0.5093				
C19	0.6977				
C20	0.71				
C21	0.5912				
C22	0.7134				
C23	0.6818				
C24	0.7114				
C25	0.6616				
C26	0.5854				
C27	0.6888				
C28	0.6613				
C29	0.2077				
C30	0.3654				
C32	0.6644				
C33	0.6355				
Nortes					
		PRISTANO	0.449		

7.4. Abundancias relativas de la comunidad bacteriana durante el experimento mesocosmos temporadas

Se generaron gráficas de abundancia relativa a nivel de clase y género para los tratamientos que presentaron correlaciones negativas significativas entre algún compuesto alifático con el gen *alkB* en las diferentes temporadas.

7.4.1. Temporada de secas

En la temporada de secas se obtuvieron buenas correlaciones entre los compuestos alifáticos y el gen *alkB*, para los tres tratamientos: 10 mg L⁻¹, 40 mg L⁻¹ y 80 mg L⁻¹.

Se asignaron 14 clases de bacterias en el tratamiento de 10 mg L⁻¹ de la temporada de secas. Durante todos los días, la clase *Bacteroidia* fue la más abundante (entre 35% y 43%). Además, *Alphaproteobacteria* (entre 29 y 31%), *Gammaproteobacteria* (entre 14 y 22%) y *Verrucomicrobiae* (entre 3 y 5%), estuvieron presentes todos los días. Las clases *Cyanobacteriia* y *OM190* solo no estuvieron presentes en el "Día 7" con abundancias relativas menores al 3%. Por otro lado, *Phycisphaerae*, *Planctomycetes* y *Rhodothermia* solo estuvieron presentes en el "Día 7 y 13" con abundancias menores al 2%. La clase *Chlamydiae* tuvo la abundancia más baja de este tratamiento (0.51 %) (Anexo 3, Figura 23).

En el tratamiento de 10 mg L⁻¹ se identificaron 60 géneros de bacterias, no obstante, la abundancia de géneros no asignados fue significativamente alto en todos los días del tratamiento. En el "Día 0" se observó que el género *Ns5 marine group* (9.65%) fue el más abundante. El "Día 1" destacó por la abundancia de *Winogradskyella* (8.51%) y la presencia de *KI89A clade* (0.71%), que solo estuvo presente en este día. En el "Día 2," *Formosa* se convirtió en el género más abundante con un 7.53%, y la abundancia de *Winogradskyella* se mantuvo alta (5.27%). También, se observaron los géneros *SAR116 clade* (0.81%), *Labrenzia* (0.99%) y *Babeliales* (0.95%) exclusivamente en este día. El "Día 7" fue notable por la alta abundancia

tuvo la mayor abundancia los primeros tres días (0, 1 y 2) entre 39% y 45%, y en los últimos dos días (7 y 13) *Alphaproteobacteria* presentó las abundancias más altas (41% y 44%). La clase menos abundante fue Bdellovibrionia con 0.37% en el "Día 7" (Anexo 3, Figura 24).

En el tratamiento de 40 mg L⁻¹, se observaron 71 géneros asignados, y al igual que en el tratamiento de 10 mg L⁻¹, se notó un alto porcentaje de géneros no asignados en todos los tiempos. En el "Día 0," *Formosa* fue el género más abundante (5.59%), mientras que *Pseudomonas* fue el menos abundante (0.52%). Además, se identificaron géneros como *Clade Ia*, *Seonamhaeicola*, *Litoricola*, *Coxiella*, *Devosia*, *Dinoroseobacter*, *Luteolibacter*, *Candidatus Actinomarina*, *Thiomicrothrix*, *Gloeocapsa PCC-7428* y *AEGEAN-169 marine group*, que estuvieron presentes únicamente en este día en particular. El "Día 1" se destacó por la abundancia de *Winogradskyella* (5.59%) y la presencia de *UBA10353 marine group* (0.09%) y *NS7 marine group* (1.14%), que solo se observaron en este día. En el "Día 2," *Formosa* continuó siendo el género más abundante (8.68%), y se registró la presencia de *Labrenzia* (0.68%), *Clade II* (1.01%) y *Tenacibaculum* (0.87%) exclusivamente en este día. El "Día 7" se caracterizó por la alta abundancia de *Winogradskyella* (11.925) y la presencia de *Bdellovibrio* (0.33%). En el "Día 13," *Winogradskyella* siguió siendo el género más abundante (9.01%), y se observaron géneros como *Gastranaerophilales* (0.55%), *Roseovarius*, *DEV007*, *Xenococcus PCC-7305*, *MD3-55*, *Phaeodactylibacter*, *Pelagicoccus*, *Marinobacter* y *Rubribacterium*, que estuvieron presentes únicamente en este día, con abundancias relativas entre 0.56% y 0.85%. En este tratamiento, los géneros que estuvieron presentes en todos los días fueron *Winogradskyella*, *Roseibacillus*, *OM43 clade* y *Pseudohongiella* (Figura 9).

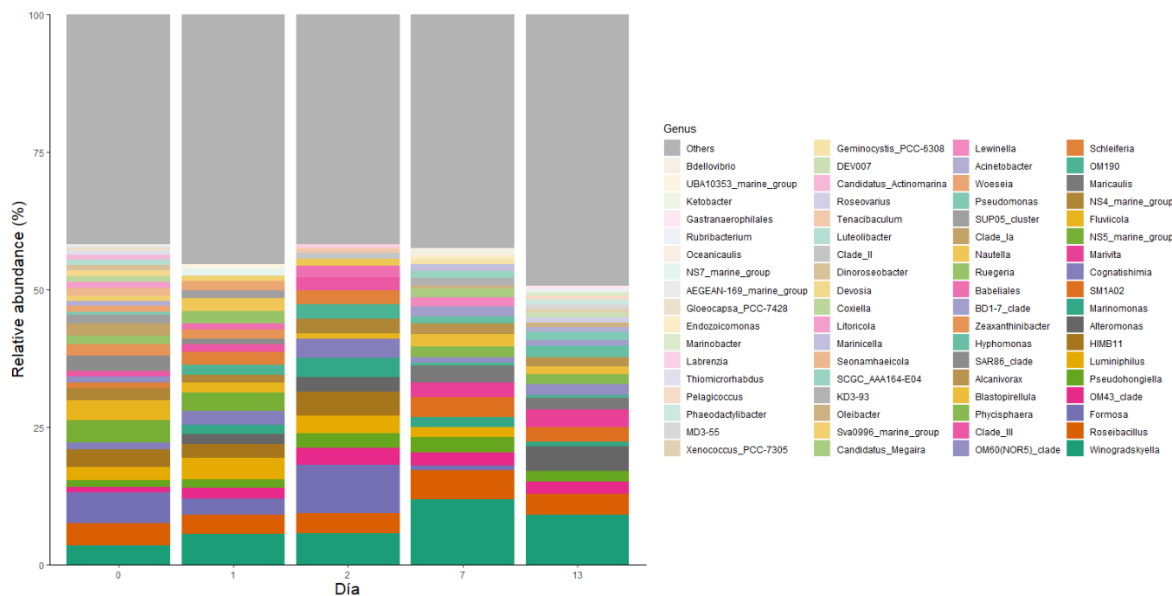
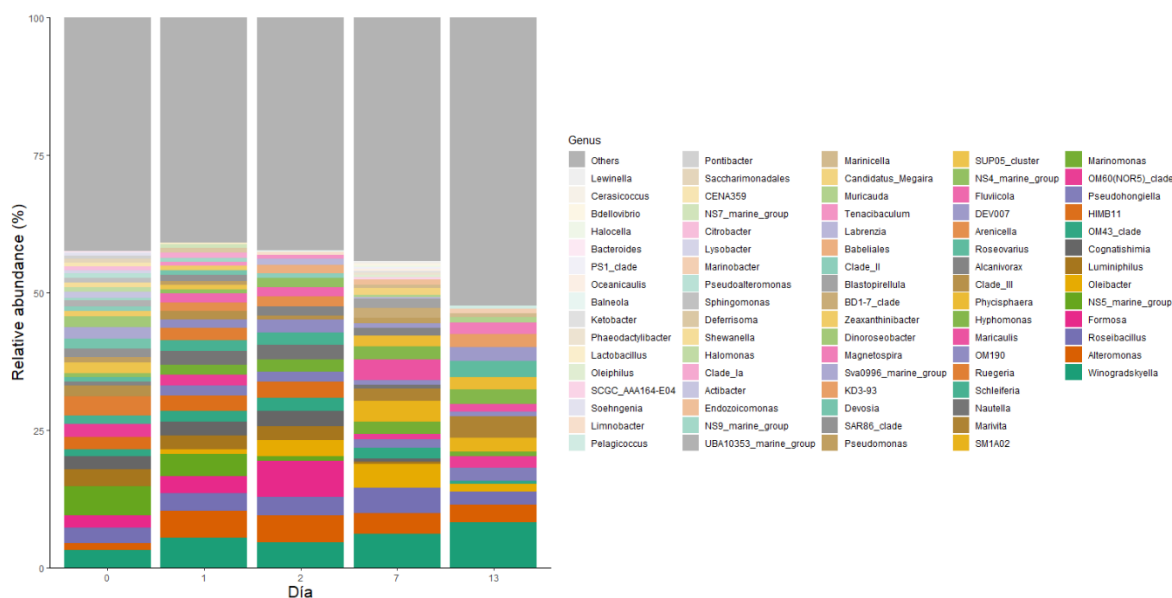


Figura 9. Abundancia relativa de la comunidad bacteriana a nivel de género en el tratamiento de 40 mg L⁻¹ de la temporada de secas

En el tratamiento de 80 mg L⁻¹ se asignaron 19 clases de bacterias. El mismo patrón se observó en este tratamiento en el que predominaron las clases *Bacteroidia*, *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* y *Verrucomicrobiae*, donde *Alphaproteobacteria* fue la más abundante en todos los días (entre 31% y 58%). Las clases *Babeliales*, *Actinobacteria*, *Defferisomatia*, *Saccharimonadia*, *Bacilli*, *Rhodothermia*, *Chlamydiae*, *Halanaerobiia* y *Bdellovibrionia* solo estuvieron presentes en un día y con abundancias menores a 1.6% (Anexo 3, Figura 25).

En el tratamiento de 80 mg L⁻¹, se asignaron 80 géneros, y al igual que en los tratamientos anteriores, se observó un alto porcentaje de géneros no asignados. En el "Día 0," *Formosa* fue el género más abundante (5.37%), mientras que *Bacteroides* fue el menos abundante (0.32%). Se identificaron géneros como *Sva0996 marine group*, *Dinoroseobacter*, *UBA10353 marine group*, *Actibacter*, *Halomonas*, *Shewanella*, *Sphingomonas*, *Pseudoalteromonas*, *Citrobacter*, *Lysobacter*, *CENA359*, *Pontibacter*, *Saccharimonadales*, *Soehngenia* y *Bacteroides*, que estuvieron presentes únicamente en este día, con porcentajes de abundancia relativa entre 0.44% y 2.21%. En el "Día 1," *Winogradskyella* destacó como el

género más abundante (5.39%), mientras que *Finegoldia* fue el menos abundante (0.22%). Además, se registraron géneros como *Clade Ia*, *Deferrisoma*, *NS7 marine group* y *Lactobacillus*, que estuvieron presentes únicamente en este día, con valores de abundancia relativa entre 0.36% y 1.04%. El "Día 2" se caracterizó por la abundancia de *Formosa* (6.52%) y la presencia de *Balneola* (0.34%), *Babeliales* (1.57%) y *Limnobacter* (0.50%) exclusivamente en este día. El "Día 7" fue notable por la alta abundancia de *Winogradskyella* (6.14%) y la presencia de los géneros *BD1-7 clade*, *Blastopirellula*, *Candidatus Megaira*, *Endozoicomonas*, *SCGC AAA164-E04*, *Oleiphilus*, *Phaeodactylibacter*, *Ketobacter*, *Oceanicaulis*, *PS1 clade*, *Halocella* y *Bdellovibrio*, con abundancias entre 0.27% y 1.77%. Finalmente, en el "Día 13," *Winogradskyella* (8.16%) fue el género más abundante, y se observaron géneros como *KD3-93*, *Magnetospira*, *Marinobacter* y *Pelagicoccus*, que estuvieron presentes únicamente en este día, con abundancias entre 0.62% y 2.34%. Los géneros que estuvieron presentes en todos los días del tratamiento de 80 mg L⁻¹ fueron *Winogradskyella*, *Roseibacillus*, *Alteromonas*, *OM43 clade* (Figura 10).



7.4.2. Temporadas de Nortes

Al analizar las correlaciones entre las cadenas de carbono de hidrocarburos alifáticos y el gen *alkB*, se tomó en cuenta la única correlación negativa significativa que fue el tratamiento de 40 mg L⁻¹. En este tratamiento, se logró asignar más de 200 géneros de bacterias, aunque, para simplificar el análisis, se seleccionaron los primeros 85 géneros para la representación gráfica de las abundancias relativas, considerando que los géneros restantes tenían porcentajes menores al 0.06 %, los cuales se sumaron al porcentaje de los géneros no asignados.

Se lograron asignar 60 clases de bacterias en el tratamiento de 40 mg L⁻¹. La clase más abundante durante los “Días 0 al 2” fue *Bacteroidia* con abundancias entre 23.8% y 31.8%, en los “Días 7 y 13” la clase *Alphaproteobacteria* tuvo las abundancias más altas entre 27.6% y 28.5%. varios géneros de bacterias estuvieron presentes durante todos los días entre ellos se encuentran *Gammaproteobacteria*, *Verrucomicrobiae*, *Phycisphaerae*, *Acidimicrobiia*, *Actinobacteria*, *Planctomycetes*, *Rhodothermia*, *Cyanobacteriia*, *OM190*, *Bdellovibrionia*, *Desulfuromonadia*, *Chlamydiae*, *Gracilibacteria* entre otras, muchas de esas clases también se encontraron en los tres tratamientos de la temporada de secas (Anexo 3, Figura 26).

En este tratamiento durante los “Días 0, 1 y 2” el género *NS5 marine group* fue el más abundante, aunque se observó una disminución en el porcentaje de abundancia del “Día 0” al “Día 2” (entre 3.51% y 5,34%) (Figura 9); durante el “Día 1 al 2” se observó el aumento en la abundancia del género *Alcanivorax* (entre 1.68% y 2.52%); además, durante el “Día 2” se detectaron varios géneros de bacterias que son degradadoras de hidrocarburos alifáticos y aromáticos con abundancia altas, tales como *Alteromonas*, *Marinobacter* y *Fluviicola*. Durante los “Días 7 y 15” el género más abundante fue *SM1A02* (3.76% y 6.73% respectivamente) (Figura 11).

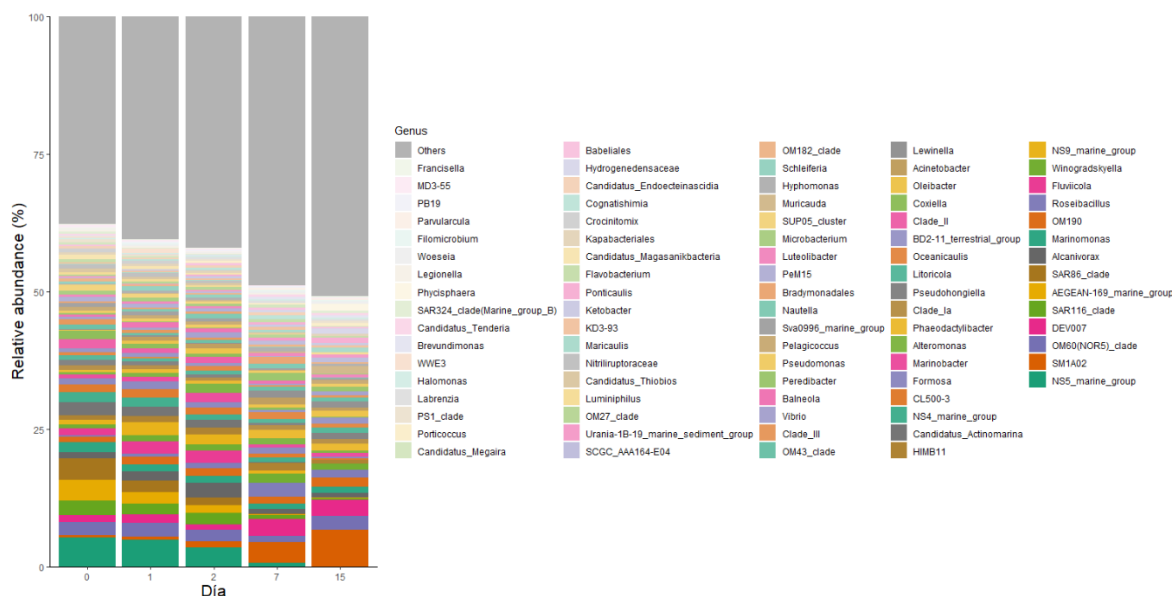


Figura 11. Abundancia relativa de la comunidad bacteriana a nivel de género en el tratamiento de 40 mg L⁻¹ de la temporada de nortes

7.5. Correlaciones entre las concentraciones de compuestos alifáticos de diferente número de carbonos y las abundancias relativas de los grupos bacterianos

7.5.1. Temporada de secas

En el tratamiento de 10 mg L⁻¹ un total de 26 géneros de bacterias tuvieron correlaciones significativas con las cadenas de carbonos de los hidrocarburos alifáticos (Anexo1, Figura 8). Se observó que los géneros *Oleibacter*, *Maricaulis* y *SM1A02*, son los que se correlacionaron de manera positiva con la mayoría de los carbonos, mientras que los géneros *Schleiferia*, *Cognatishimia* y *HIMB11* se correlacionaron negativamente con varios de los compuestos. El C32 fue el que se correlaciono con más géneros de bacterias, la mayoría fueron correlaciones positivas, mientras que el C10 fue el que con menos géneros se correlaciono significativamente (Figura 16).

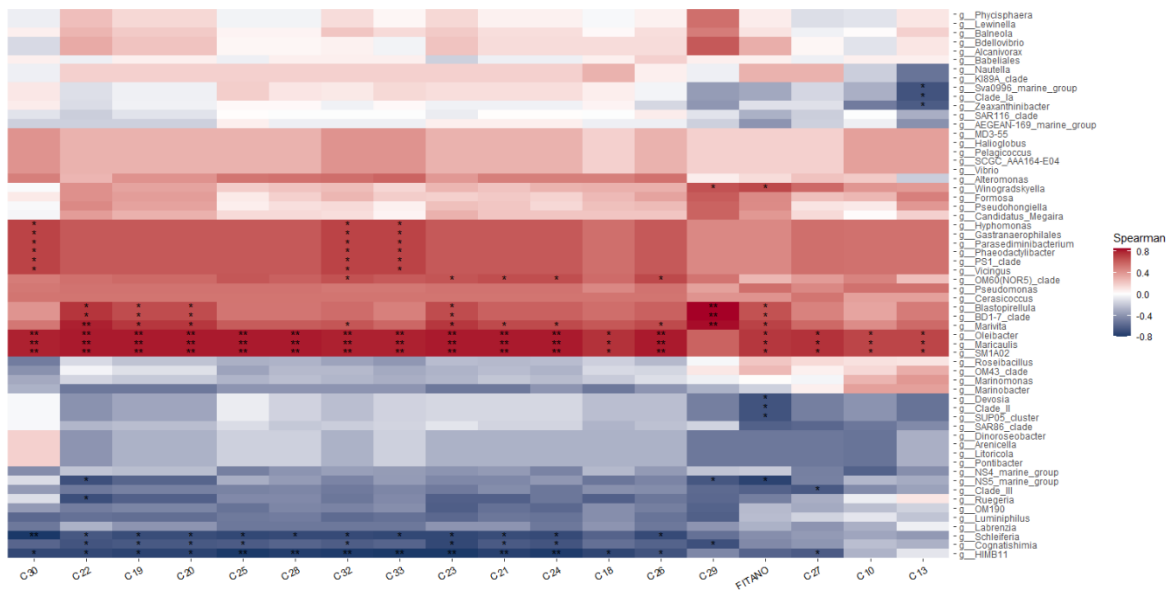


Figura 12. Correlaciones de compuestos alifáticos con la abundancia relativa de la comunidad bacteriana a nivel de género en el tratamiento de 10 mg L⁻¹ durante la temporada de secas. Los asteriscos indican correlaciones significativas

Se observó que 5 clases de bacterias presentaron correlaciones significativas con los compuestos alifáticos. Entre ellas, *Vampirivibrionia*, *Planctomycetes* y *Phycisphaerae* mostraron correlaciones positivas. Es importante destacar que *Phycisphaerae* registró un total de 15 correlaciones significativas con los compuestos alifáticos, siendo este el mayor número de correlaciones observadas en este tratamiento. Por otro lado, se observaron correlaciones negativas en las clases *Cyanobacteria* y *Acidimicrobiia*. Específicamente, la clase *Cyanobacteria* mostró un total de 5 correlaciones significativas (Figura 17).

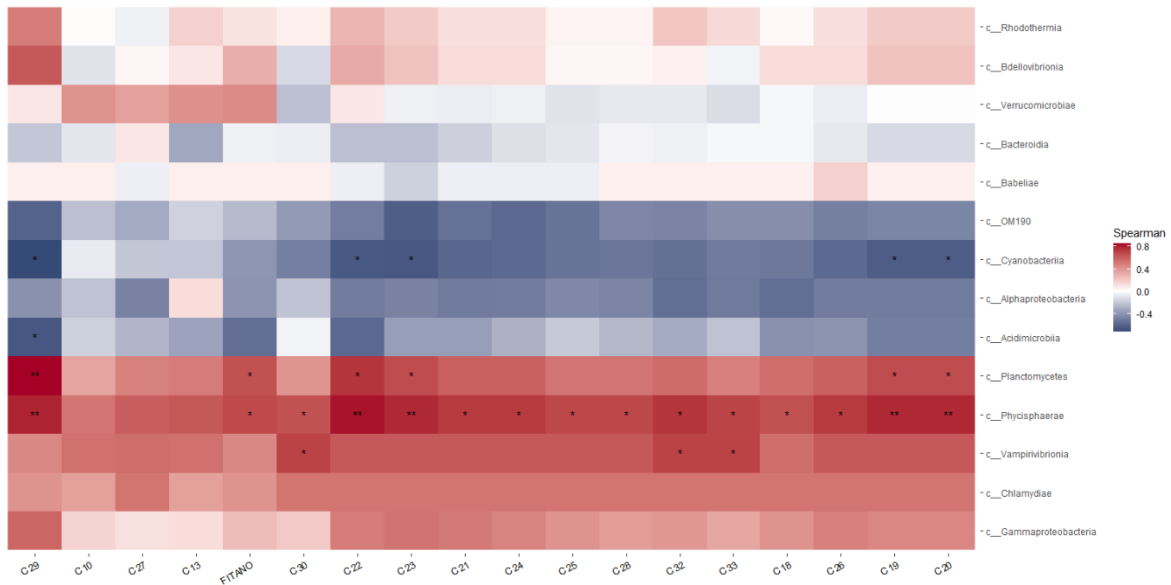


Figura 13. Correlaciones de compuestos alifáticos con la abundancia relativa de la comunidad bacteriana a nivel de clase en el tratamiento de 10 mg L⁻¹ durante la temporada de secas. Los asteriscos indican correlaciones significativas

En el tratamiento de 40 mg L⁻¹, solo se encontró correlación entre el compuesto alifático de 11 carbonos y la composición de la comunidad bacteriana a nivel de género (Anexo 1, Figura 10). Se identificaron 9 géneros con correlaciones significativas. Entre ellos, los géneros *Maricaulis*, *Blastopirellula*, *Phycisphaera*, *SM1A02*, *Alcanivorax* y *Marivita* mostraron correlaciones positivas, mientras que los géneros *Schleiferia*, *Luminiphilus* y *NS5 marine group* presentaron correlaciones negativas (Figura 18).

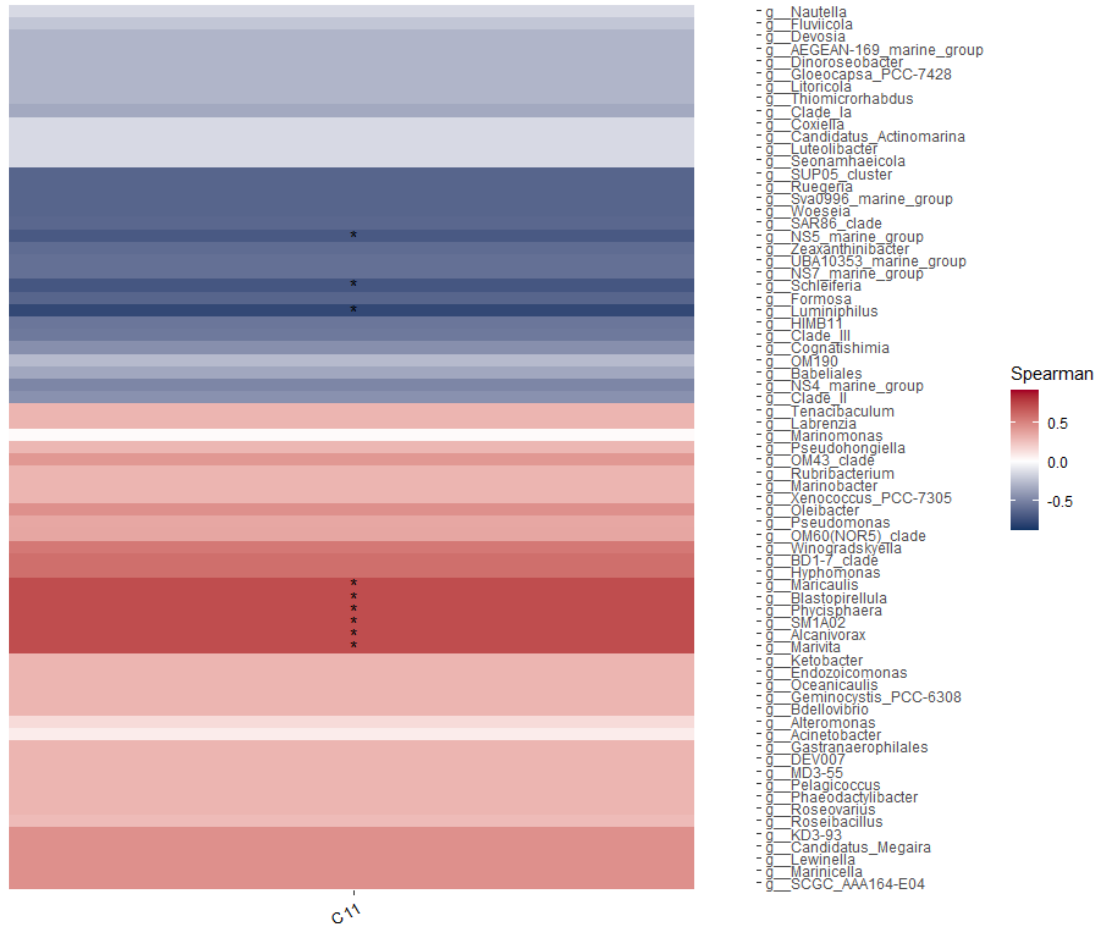


Figura 14. Correlaciones de compuestos alifáticos con la abundancia relativa de la comunidad bacteriana a nivel de género en el tratamiento de 40 mg L⁻¹ durante la temporada de secas. Los asteriscos indican correlaciones significativas

En el mismo tratamiento, se identificaron 3 correlaciones significativas a nivel de clase. Se encontró una asociación positiva entre las clases *Planctomycetes* y *Phycisphaerae*, mientras que la clase *Cyanobacteria* mostró correlaciones negativas (Figura 19).

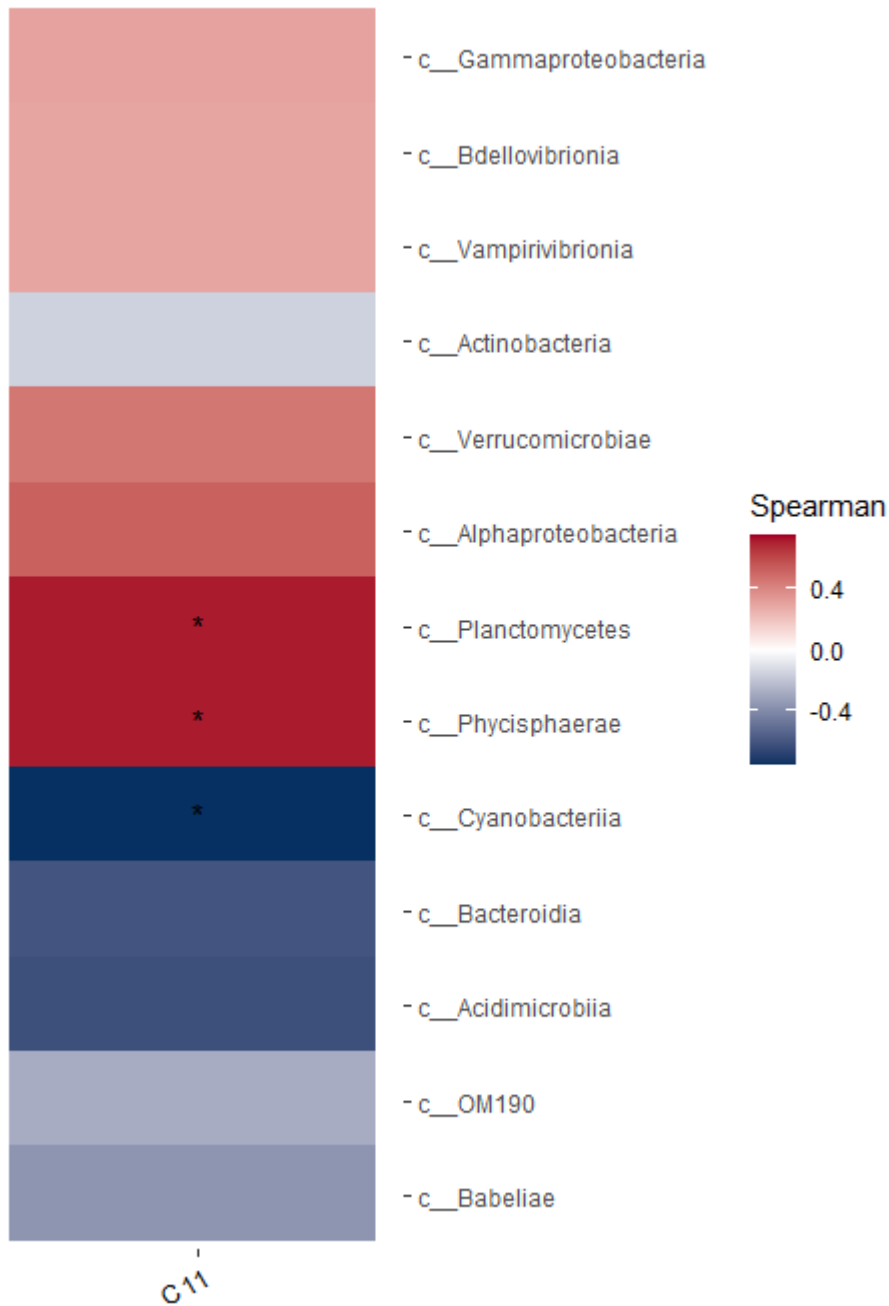


Figura 15. Correlaciones de compuestos alifáticos con la abundancia relativa de la comunidad bacteriana a nivel de clase en el tratamiento de 40 mg L⁻¹ durante la temporada de secas. Los asteriscos indican correlaciones significativas

En el tratamiento de 80 mg L⁻¹, se encontró una correlación entre el compuesto alifático de 10 carbonos y la composición de la comunidad bacteriana a nivel de género (Anexo 1, Figura 12). Se identificaron 10 correlaciones significativas. Entre ellas, los géneros *HIMB11*, *Formosa*, *Cognatishimia*, *NS4 marine group* y *Babeliales* mostraron correlaciones negativas. Por otro lado, los géneros *Winsgradskiella*, *Phycisphaera*, *Hypnomonas*, *Marivita* y *SM1A02* presentaron correlaciones positivas (Figura 20).

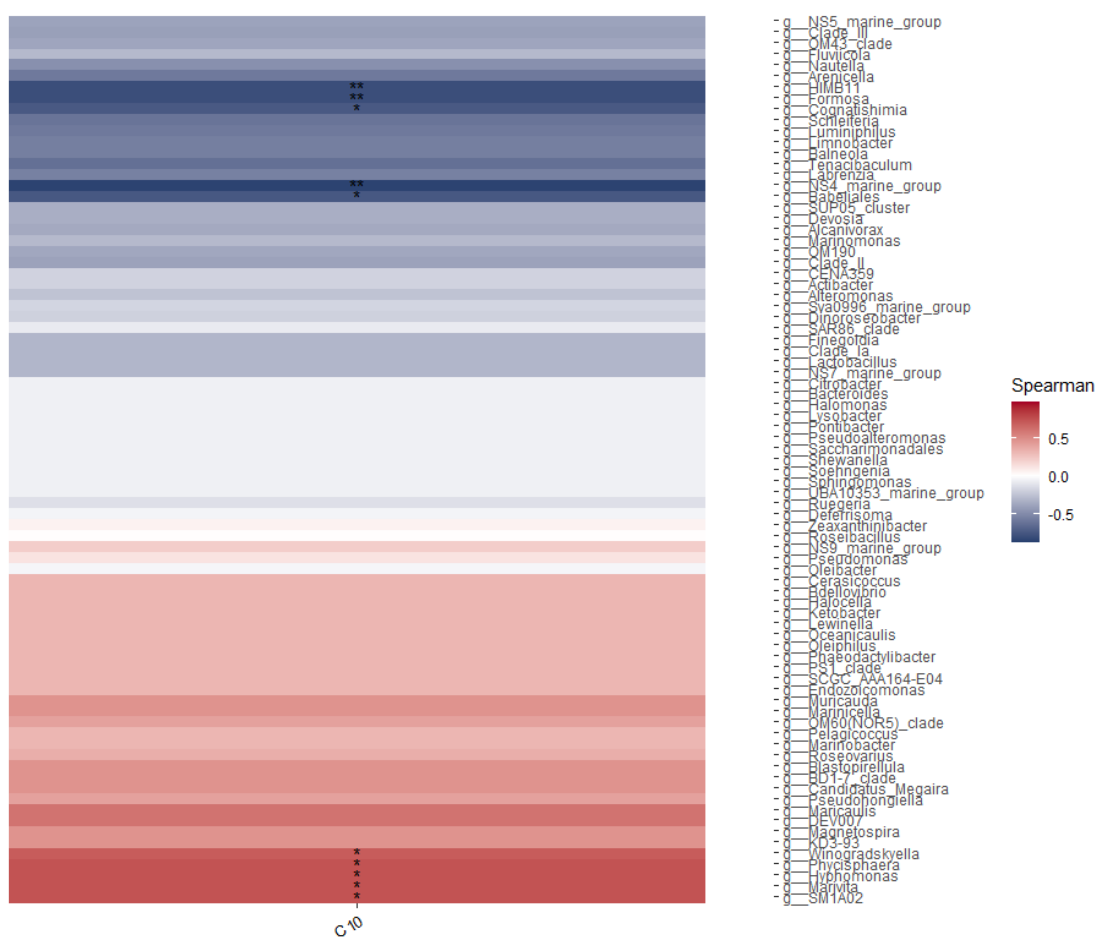


Figura 16. Correlaciones de compuestos alifáticos con la abundancia relativa de la comunidad bacteriana a nivel de género en el tratamiento de 80 mg L⁻¹ durante la temporada de secas. Los asteriscos indican correlaciones significativas

Asimismo, en el tratamiento de 80 mg L⁻¹ Se identificaron 3 clases de bacterias con correlaciones significativas. La clase *Babeliae* mostro correlaciones negativas, mientras que las clases *Phycisphaerae* y *Verrucomicrobiae* exhibieron correlaciones positivas (Figura 21).

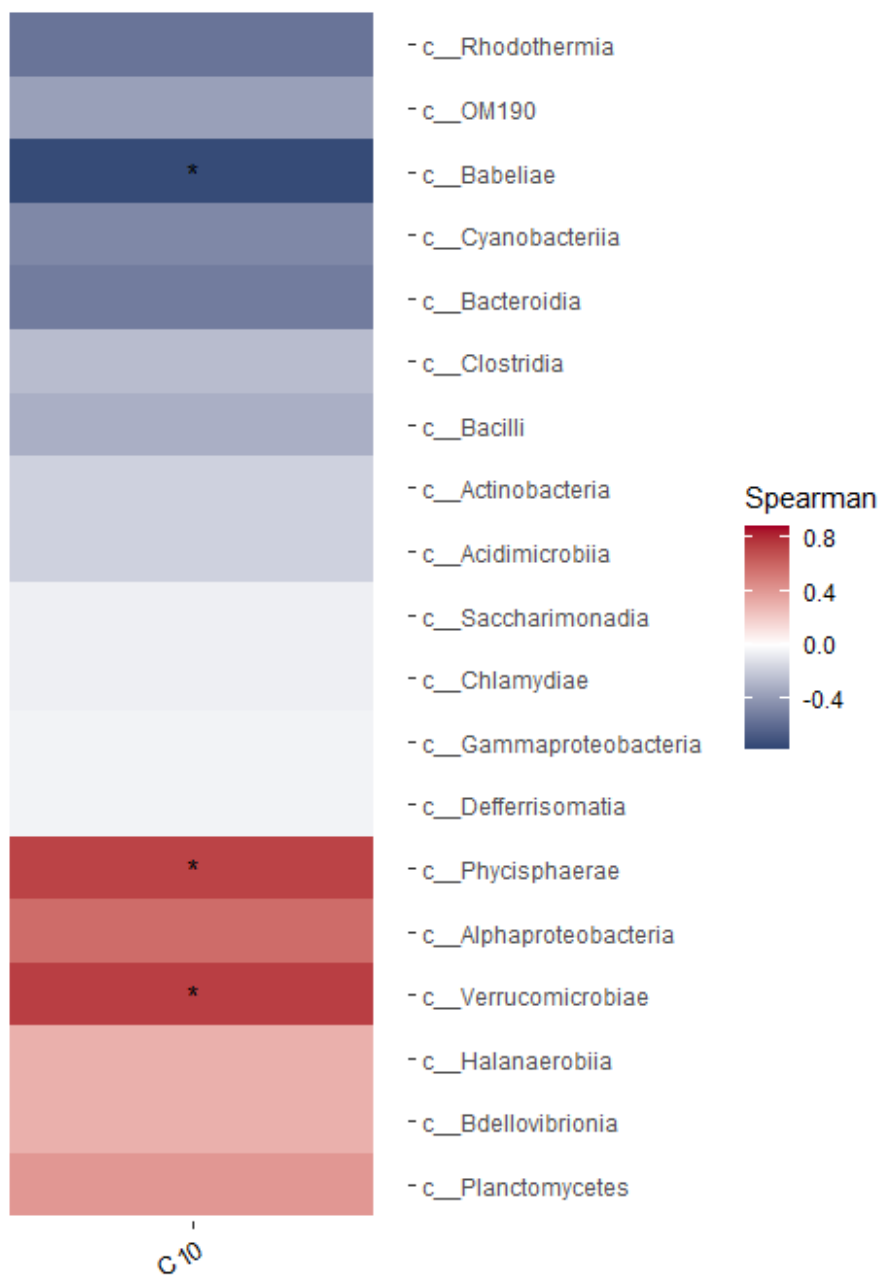


Figura 17. Correlaciones de compuestos alifáticos con la abundancia relativa de la comunidad bacteriana a nivel de clase en el tratamiento de 80 mg L⁻¹ durante la temporada de secas. Los asteriscos indican correlaciones significativas

7.5.2. Temporada de Nortes

En el tratamiento de 40 mg L⁻¹, se encontró una correlación entre el compuesto alifático Pristano y la composición de la comunidad bacteriana a nivel de género (Anexo 1, Figura 14). En este tratamiento 7 géneros tuvieron correlaciones significativas. Los géneros *Marinomonas*, *AEGEAN-169 marine group*, *SAR116 clade*, *Candidatus Thiobios* y *OM60(NOR5)* clade tuvieron correlaciones negativas. Los géneros *OM190* y *Ketobacter* tuvieron correlaciones positivas (Figura 22).

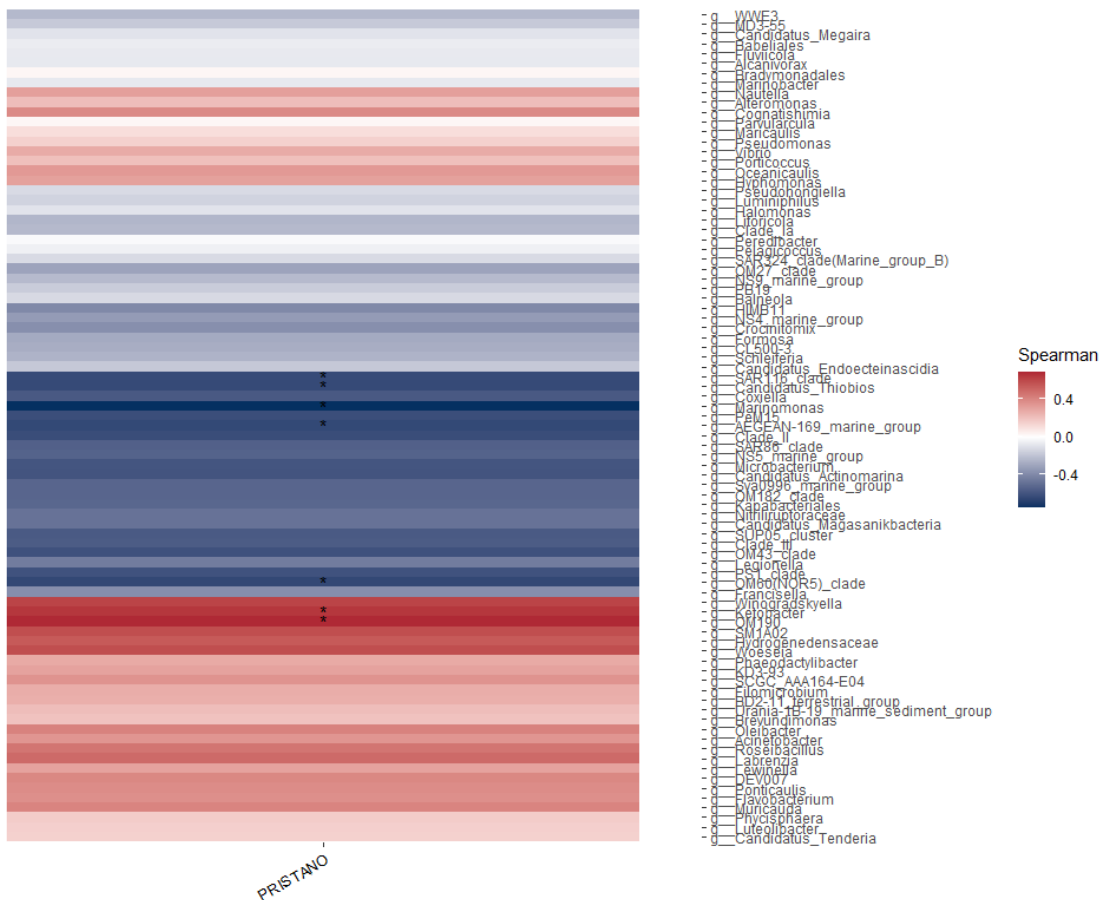


Figura 18. Correlaciones de compuestos alifáticos con la abundancia relativa de la comunidad bacteriana a nivel de género en el tratamiento de 40 mg L⁻¹ durante la temporada de nortes. Los asteriscos indican correlaciones significativas

En este tratamiento se observaron 2 clases de bacterias con correlaciones significativas. Tanto la clase *OM190* y *Subgroup 22* tuvieron correlaciones positivas (Figura 23).

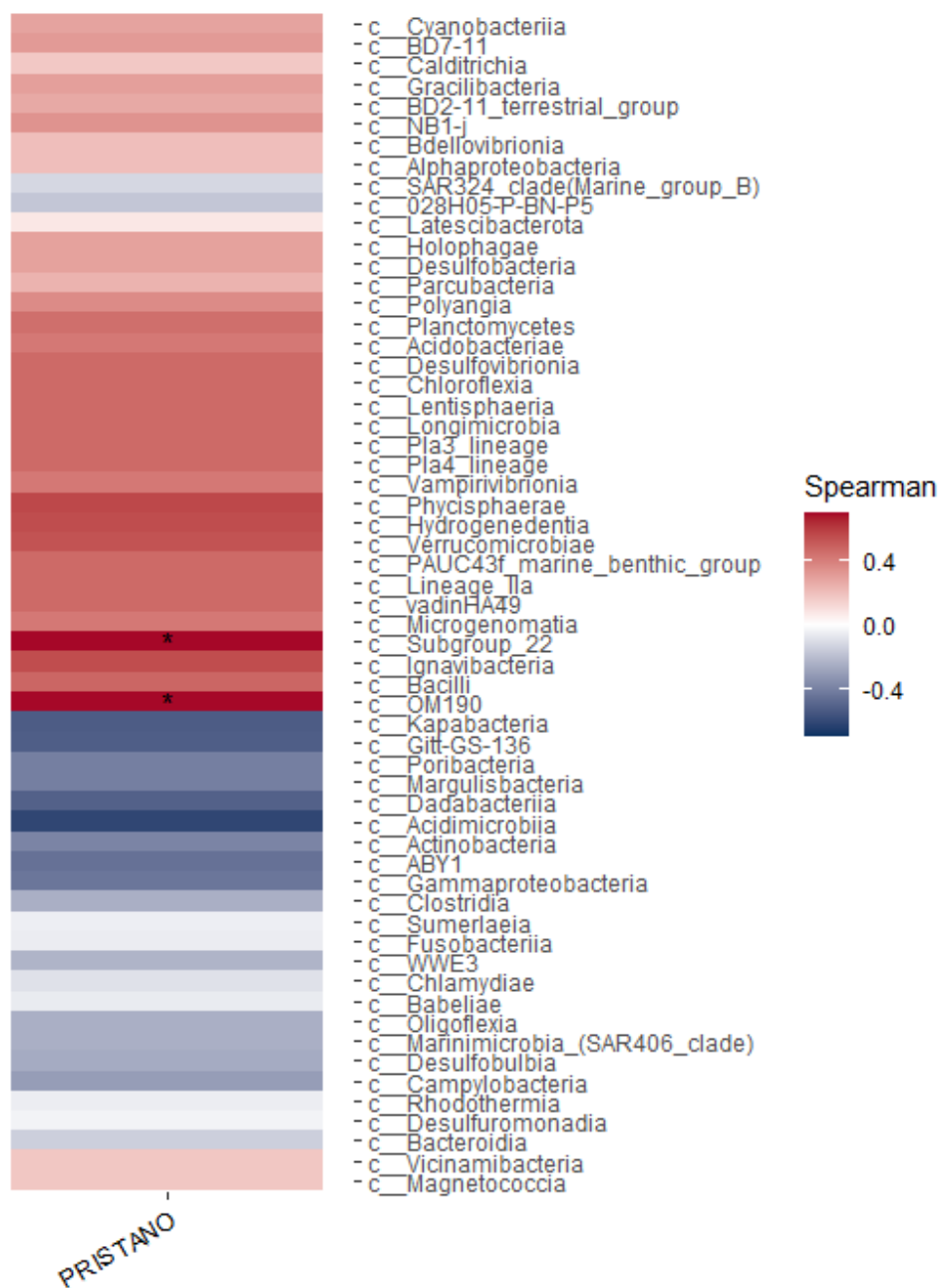


Figura 19. Correlaciones de compuestos alifáticos con la abundancia relativa de la comunidad bacteriana a nivel de clase en el tratamiento de 40 mg L⁻¹ durante la temporada de nortes. Los asteriscos indican correlaciones significativas

8. DISCUSIÓN

Este estudio evidenció que la presencia de petróleo está parcialmente vinculada al aumento en la cantidad del gen funcional *alkB*. Se observó que a medida que la concentración de hidrocarburos aumenta, también lo hace la abundancia de este gen en algunos tratamientos, sobre todo en la temporada de nortes. Sin embargo, durante la degradación de hidrocarburos alifáticos, la variación en la concentración de este gen no mostró una asociación significativa con la composición de la comunidad bacteriana. Aunque la presencia de petróleo juega un rol clave en determinar esta composición, otros factores como la temperatura, los vientos y los nutrientes podrían estar ejerciendo un impacto igualmente relevante.

8.1. Cambios en las abundancias del gen *alkB* en función de las concentraciones de hidrocarburos

Aunque se aplicaron concentraciones específicas de hidrocarburos a los mesocosmos (10, 40 y 80 mg L⁻¹), las muestras de referencia revelaron una mayor presencia de Hidrocarburos Totales del Petróleo (TPH) (42.31 µg L⁻¹) durante la temporada de secas y esto hizo evidente un aumento significativo en la presencia de hidrocarburos alifáticos, mostrando correlaciones negativas consistentes con la abundancia del gen. Los análisis de regresión revelaron variaciones en los datos explicadas entre 20% y 71% por la presencia del *alkB*. En contraste, durante la temporada de lluvias donde la muestra de referencia tuvo menor concentración de TPH (20.01 µg L⁻¹), no se obtuvieron correlaciones negativas con el gen, por lo que esta temporada no se tomó en cuenta a la hora de los análisis. Por otro lado, la temporada de Nortes la cual en los datos obtenidos por Valencia Agami, 2022 se observó una baja concentración de TPH (4.51 µg L⁻¹), mostró menos correlaciones en comparación con la temporada de secas, donde solamente en el tratamiento de 40 se obtuvo una única correlación negativa con el compuesto alifático Pristano con un valor de *r*-ajustada de 44%. En una investigación realizada por Valenzuela

Sánchez et al. (2005), indican que, en el puerto de Progreso, durante la temporada de secas, se registran bajas concentraciones de hidrocarburos totales, aumentando considerablemente durante la temporada de lluvias y disminuyendo durante la temporada de Nortes, a pesar que el comportamiento es diferente a los datos obtenidos en este trabajo, los rangos que mencionan en esta investigación están entre 7.13 y 35.34 $\mu\text{g L}^{-1}$ los cuales coinciden con la información obtenida en las muestras de referencia. Además, Zaldívar Jiménez et al. (2004) mencionan en su estudio en las costas de la península de Yucatán, que las condiciones de las diferentes temporadas en el Golfo de México tienen efectos significativos en la temporada siguiente, lo que podría explicar el comportamiento de las correlaciones observadas en las tres temporadas.

8.2. Comunidad bacteriana relacionada con la degradación de hidrocarburos alifáticos en las tres temporadas (Secas, Lluvias, Nortes).

Al relacionar la composición de la comunidad bacteriana con las concentraciones de hidrocarburos alifáticos, se observó que algunos géneros de bacterias como *Maricaulis*, *Oleibacter* y *Alcanivorax* en secas; *Marinomonas* y *Ketobacter* en nortes, están relacionados en la degradación de hidrocarburos; así como las clases *Cyanobacteriia*, *Planctomycetes*, *Phycisphaerae*, *Gamaproteobacteria* entre otras.

8.3. Temporada de secas

El aumento de la abundancia del gen *alkB* durante esta temporada en todos los tratamientos es sin duda atribuible al crecimiento de bacterias capaces de degradar hidrocarburos alifáticos (Valencia-Agami et al., 2019).

La presencia de *Maricaulis* y *Oleibacter* en el tratamiento con una concentración de 10 mg L^{-1} , y su correlación con los hidrocarburos alifáticos, sugieren que estas bacterias están participando en el proceso de degradación. Otros autores ya han

reconocido su capacidad para la degradación de hidrocarburos alifáticos (Vila et al., 2010; Synnøve Lofthus et al., 2018). Además, estos géneros de bacterias han sido encontrados en zonas contaminadas con petróleo donde las temperaturas varían entre 24° y 30° (J. Liu et al., 2017; Bacosa et al., 2018). El género *SM1A02* por otro lado, mostró correlaciones positivas con varios compuestos carbonados, habiéndose asociado previamente con la degradación de compuestos aromáticos y la nitrificación (Yan et al., 2023). Aunque estas bacterias estuvieron presentes en días específicos del experimento durante la temporada de secas (días 7 y 13), su abundancia coincidió con los cambios en los niveles del gen *alkB* en esos días. Es relevante mencionar que estas bacterias también presentaron correlaciones positivas con el Fitano, un hidrocarburo sensible a la biodegradación (Peters et al., 2005), indicando así su posible papel en la degradación de estos compuestos mediante metabolismos vinculados al gen *alkB*.

El género *Cognatishimia* está relacionado con la degradación de diversas fuentes de carbono, la formación de moléculas como el acetil CoA y también participa en rutas metabólicas capaces de degradar hidrocarburos (T. Wang et al., 2019). *HIMB11* depende de la presencia de fósforo en su ambiente, adaptándose mediante la síntesis de lípidos de glutamina en condiciones de limitación de fósforo (A. F. Smith et al., 2019), lo cual podría relacionarse con la presencia de fósforo en el entorno debido a actividades antropogénicas en la zona costera (Morales et al., 2020). Es importante mencionar que estos géneros de bacterias podrían estar relacionados con la dinámica de los vientos y aporte de PO_4 durante la temporada de secas, ya que en estudios previos se demostró que la presencia de vientos provenientes del sur a más de 80 Km h^{-1} (suradas) (Adame Hernández et al., 2018; Bancon-Montigny et al., 2019) transportan sedimentos hacia la costa de Yucatán, lo cual aumenta la presencia de nutrientes como PO_4 (Paudel et al., 2017; Hernández-Candelario et al., 2019).

De igual manera en el tratamiento de 10 mg L^{-1} se encontraron correlaciones negativas entre la clase *Cyanobacteria* con compuestos alifáticos, lo que sugiere

que podrían influir en la degradación de estos compuestos. En investigaciones anteriores, como el estudio realizado por Gupta et al., 2013 y El-Sheekh & Hamouda, 2014, se evidencia que ciertos microorganismos fotosintéticos, especialmente las *Cyanobacteria*, pueden participar en la oxidación y descomposición de diversos hidrocarburos, tales como el naftaleno, antraceno, fluoranteno, pireno, n-octadecano, criseno y algunos compuestos alifáticos. Entre las clases de bacterias que tuvieron correlaciones positivas se encuentran *Phycisphaerae* y *Planctomycetes* los cuales incluyen algunos de los géneros reportados en la degradación de hidrocarburos en este trabajo; también en estudios previos como los de Botelho et al., 2017 y Eze et al., 2021, mencionan que estas clases de bacterias intervienen en procesos de biorremediación y fitorremediación, por lo que, podrían estar involucradas en la degradación de los compuestos alifáticos como el pristano y el fitano que son hidrocarburos resistente a la biodegradación (Peters et al., 2005).

En el tratamiento con una concentración de 40 mg L⁻¹, se observaron correlaciones tanto positivas como negativas, atribuibles al incremento en la concentración y la competencia por el petróleo (Christensen et al., 2002; Rahman et al., 2002). Los géneros identificados en el tratamiento con 10 mg L⁻¹ (*Marivita*, *Maricaulis*, *SM1A02*, *Blastopirellula*, *Phycisphaera*, *SM1A02*) estuvieron presentes, así como otros géneros, como *Alcanivorax*, conocido por albergar el gen *alkB* y ser un degradador de hidrocarburos alifáticos (Hara et al., 2003; Cappello et al., 2007), estos géneros tuvieron correlaciones positivas con el alifático de 11 carbonos, lo que podría sugerir la degradación de este. A nivel de clase este tratamiento se comportó de manera similar al tratamiento de 10 mg L⁻¹, donde se identificaron 3 clases (*Cyanobacteria*, *Planctomycetes*, *Phycisphaerae*) con correlaciones significativas las cuales podrían degradando el compuesto alifático de 11 carbonos (Gupta et al., 2013, Botelho et al., 2017, Eze et al., 2021;).

En el tratamiento con una concentración de 80 mg L⁻¹, se correlaciono únicamente el compuesto alifático de 10 carbonos con la composición de la comunidad bacteriana a nivel de género y clase, donde se logró observar que géneros como

Winosgradskyella, *Phycisphaerae*, *Marivita* y *SM1A02* también estuvieron presentes en este tratamiento, los cuales se mencionó que están involucrados en la degradación de hidrocarburos (Vila et al., 2010; Yan et al., 2023). El género *Hyphomonas* tuvo una correlación positiva y en estudios previos ha sido reportado como posible degradador de hidrocarburos alifáticos, así como de asfáltenos (Song et al., 2018); este grupo ha sido detectado en áreas afectadas por la contaminación petrolera. Sin embargo, la característica predominante de los lugares donde se ha detectado es su temperatura, que oscila entre los 24° y los 30° C (Bacosa et al., 2018). Generos como *HIMB11* y *Cognastishimia* que al igual que en el tratamiento de 10 mg L⁻¹ podrían estar cumpliendo la función de apoyo en la comunidad bacteriana degradadora de hidrocarburos (Morris et al., 2012). Las correlaciones significativas a nivel de clase en este tratamiento nos hicieron notar que se registran clases similares a los tratamientos anteriores (*Verrucomicrobiae*, *Phycisphaerae*) en los cuales se ha mencionado que contienen géneros con capacidad de degradar hidrocarburos alifáticos (Eze et al., 2021).

Ciertos microorganismos que persisten en un hábitat pueden ser identificados como parte del microbioma core (Kokou et al., 2019). En este caso específico, los géneros *Clade III*, *Schleifeira*, *NS4 marine group* y *NS5 marine group*, se encontraron de manera constante durante todo el experimento de la temporada de secas.

Independientemente del tratamiento aplicado, los géneros mencionados como parte del microbioma core mayormente se encuentran asociados con las clases *Bacteroidia* y *Alphaproteobacteria*, las cuales tienen una conexión positiva entre el aumento de la temperatura del agua y la intensidad de la luz (Spring et al., 2015; Bradshaw et al., 2020; Comba González et al., 2021). Por lo tanto, podemos inferir que la presencia de muchos de estos géneros se relaciona con el aumento de la temperatura del agua y la exposición a una alta intensidad lumínica durante las temporadas secas. Esto nos indica que posiblemente las variables ambientales, como temperatura, oxígeno y los nutrientes podrían estar teniendo efecto en la composición de la comunidad bacteriana.

8.4. Temporada de Nortes

El hecho de que no se presentara más que una correlación negativa entre el gen y los compuestos de hidrocarburos en la temporada de lluvias pudiera deberse a la baja concentración de estos compuestos a la hora de la colecta de agua para el experimento, ya que las muestras de referencia mostraron una concentración menor que la de secas ($4.51 \mu\text{g L}^{-1}$) esto coincide con la información obtenida en el trabajo de Valenzuela Sánchez et al., 2005. La única correlación significativa que se observó fue en el tratamiento de 40 mg L^{-1} con el pristano, el cual es un hidrocarburo alifático que es sensible a la biorremediación y puede servir como indicador de esta función (Peters et al., 2005). El género *Marinomonas* tuvo una correlación positiva fuerte con el pristano, lo que nos podría estar indicando que interviene en la degradación de este compuesto, en estudios previos se ha reportado que *marinomonas* está involucrado en la degradación de hidrocarburos alifáticos de cadenas largas y de algunos aromáticos (Xia et al., 2018). AEGEAN-169 marine group, SAR116 clade, son consideradas géneros cosmopolitas, ya que son muy abundante en aguas marinas superficiales (Getz et al., 2023), esto nos indica que podrían tener una implicación indirecta en la degradación, dando apoyo a bacterias con capacidad de degradar hidrocarburos. El género *Ketobacter* tuvo una correlación significativa con el pristano, este género es reconocido como uno de los géneros capaces de degradar hidrocarburos lineales y alcanos ramificados y están ampliamente distribuidos a nivel mundial (Yakimov et al., 2019). A nivel de clase solo los grupos *OM190* y *Subgroup 22* tuvieron correlaciones significativas, pero también fueron identificados clases como *Gamaproteobacteria* la cual contiene a los géneros antes mencionados y que ya de han involucrado en la degradación de hidrocarburos alifáticos (Cappello & Yakimov, 2010; Yakimov et al., 2019).

Si bien este trabajo evaluó la participación del gen *AlkB* en la degradación de hidrocarburos de con cadenas de diferente número de carbonos, también es cierto que en un estudio previo realizado por Valencia Agami, (2022), se observó que los

nutrientes (NO_3 , PO_4 , SiO_4) están también relacionados con los cambios en la composición de la comunidad bacteriana y por tanto muy probablemente con la actividad de degradación. Por ejemplo, en dicho estudio se observó que la temporada de nortes tuvo valores altos de NO_3 y SiO_4 , mientras que los valores más altos de PO_4 se registraron en temporada de secas. Esto coincide con los datos obtenidos en este trabajo ya que en temporada de secas se registraron el mayor número de correlaciones significativas entre los hidrocarburos alifáticos y la composición de la comunidad bacteriana, reforzando el papel de la disponibilidad de ciertos nutrientes para que se lleve a cabo la degradación. Se sabe que los fosfatos son el nutriente limitante en la degradación de hidrocarburos (Bracho et al., 2004).

9. CONCLUSIÓN

Este estudio ofrece una gran cantidad de información sobre correlaciones entre la presencia de hidrocarburos alifáticos y la expresión del gen *alkB* en diferentes temporadas en la Plataforma de Yucatán, así como la relación potencial de la comunidad bacteriana con la degradación de estos compuestos en cada temporada.

Se observó la presencia del gen *alkB* en todas las temporadas y tratamientos y las abundancias de este gen fueron similares en las tres temporadas, lo que sugiere que en la costa de la Península de Yucatán hay grupos bacterianos con potencial para degradar hidrocarburos alifáticos.

Varios hidrocarburos alifáticos durante las temporadas secas tuvieron correlaciones negativas con la expresión del gen *alkB*. Sin embargo, en la temporada de lluvias no se observaron correlaciones significativas y la temporada de Nortes tuvo una sola correlación negativa significativa, a pesar de estos resultados es importante realizar estudios que involucren más variables como nutrientes, temperatura entre otros, para ser más precisos.

Los análisis de correlación sugieren que la abundancia del gen *alkB* puede estar relacionada con bacterias potencialmente degradadoras de hidrocarburos alifáticos. Géneros como *Maricaulis*, *Oleibacter* y *SM1A02*, así como las clases *Cyanobacteriia*, *Planctomycetes* y *Phycisphaerae* presentaron correlaciones significativas con los hidrocarburos alifáticos en el tratamiento de 10 mg L⁻¹ en temporada de secas, lo cual sugiere que podrían estar interviniendo en la degradación de estos.

Algunos grupos de bacterias se podrían estar beneficiando del aumento de la concentración de petróleo ligero. Por ejemplo, géneros como *Alcanivorax*, *Hyphomonas*, tuvieron correlaciones significativas con la degradación de hidrocarburos alifáticos en concentraciones de 40 y 80 mg L⁻¹, pero a nivel de clase los grupos *Cyanobacteriia*, *Planctomycetes* y *Phycisphaerae* se mantuvieron presentes con correlaciones significativas.

Es importante mencionar que los géneros *Marinomonas* y *Ketobacter* que pertenecen la clase *Gamaproteobacteria* destacaron en temporada de nortes y que tuvieron correlaciones con el alifático pristano el cual es sensible a biorremediación.

La competencia entre diferentes géneros bacterianos por el uso de la misma fuente de carbono parece influir en las correlaciones observada. Por otro lado, algunos géneros bacterianos sugieren adaptaciones a condiciones específicas, como la resistencia al NaCl o la dependencia de la presencia de fósforo en el ambiente.

Algunos géneros, como *Schleifeira*, *NS54 marine group* y *NS5 marine group*, estuvieron presentes en todas las temporadas, por lo que estaría formando parte del microbioma core.

Las condiciones ambientales de una temporada pueden tener efectos significativos en la temporada siguiente, lo que sugiere un impacto continuo en la degradación de hidrocarburos en el entorno costero. Estas ideas destacan la complejidad de las interacciones entre la presencia de hidrocarburos alifáticos, la expresión del gen *alkB* y la comunidad bacteriana en diferentes condiciones estacionales.

10. PERSPECTIVAS

- Se requiere validar la actividad del gen *alkB* mediante la extracción de ARN y la ejecución de qPCR.
- Es fundamental llevar a cabo experimentos centrados en la fracción aromática de los hidrocarburos, dado que esta fracción posee una alta toxicidad para el entorno.
- Se sugiere desarrollar primers específicos destinados a genes indicadores de la degradación a partir de consorcios bacterianos aislados en la región del Golfo de México.
- Es fundamental estudiar el papel de la disponibilidad de nutrientes en los procesos de degradación aunados a la cuantificación del gen *AlkB* y la composición bacteriana

11. BIBLIOGRAFÍA

- Abbasian, F., Lockington, R., Mallavarapu, M., & Naidu, R. (2015). A Comprehensive Review of Aliphatic Hydrocarbon Biodegradation by Bacteria. In *Applied Biochemistry and Biotechnology* (Vol. 176, Issue 3, pp. 670–699). Humana Press Inc. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1603-5>
- Adame Hernández, G. M., Ulloa, M. J., Martínez Pérez, J. R., & Díaz Maya, M. A. (2018). Desarrollo de un inventario de datos de oleaje para ciclones tropicales en el golfo de México y mar caribe mexicano (Vol. 2, Issue 1). <http://weather.unisys.com/hurricane>.
- Aguirre Macedo, M. L., Pérez Brunius, P., & Saldaña-Ruiz, L. E. (2021). Vulnerabilidad ecológica del golfo de México ante derrames de gran escala.
- Al-Hawash, A. B., Dragh, M. A., Li, S., Alhujaily, A., Abbood, H. A., Zhang, X., & Ma, F. (2018). Principles of microbial degradation of petroleum hydrocarbons in the environment. In *Egyptian Journal of Aquatic Research* (Vol. 44, Issue 2, pp. 71–76). National Institute of Oceanography and Fisheries. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2018.06.001>
- Atlas, R. M., & Hazen, T. C. (2011). Oil biodegradation and bioremediation: A tale of the two worst spills in U.S. history. *Environmental Science and Technology*, 45(16), 6709–6715. <https://doi.org/10.1021/es2013227>
- Azubuike, C. C., Chikere, C. B., & Okpokwasili, G. C. (2016). Bioremediation techniques—classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. In *World Journal of Microbiology and Biotechnology* (Vol. 32, Issue 11). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2137-x>
- Bacosa, H. P., Erdner, D. L., Rosenheim, B. E., Shetty, P., Seitz, K. W., Baker, B. J., & Liu, Z. (2018). Hydrocarbon degradation and response of seafloor sediment bacterial community in the northern Gulf of Mexico to light Louisiana

sweet crude oil. *ISME Journal*, 12(10), 2532–2543.

<https://doi.org/10.1038/s41396-018-0190-1>

Bancon-Montigny, C., Gonzalez, C., Delpoux, S., Avenzac, M., Spinelli, S., Mhadhbi, T., Mejri, K., Hlaili, A. S., & Pringault, O. (2019). Seasonal changes of chemical contamination in coastal waters during sediment resuspension. *Chemosphere*, 235, 651–661.

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.06.213>

Banerjee, A., Dutta, S., Mondal, S., & Roy, A. (2016). Bioremediation of hydrocarbon – a review. *International Journal of Advanced Research*, 4(6), 1303–1313. <https://doi.org/10.21474/IJAR01/734>

Bracho, M., & Díaz Luz Marina Soto, L. (2004). Crecimiento de *Pseudomonas stutzeri* en presencia de dibenzotiofeno y en función de nitrógeno y fósforo. *Scientific Journal from the Experimental Faculty of Sciences*, 12(3), 125–131.

Bradshaw, D. J., Dickens, N. J., Trefry, J. H., & McCarthy, P. J. (2020). Defining the sediment prokaryotic communities of the Indian River Lagoon, FL, USA, an Estuary of National Significance. *PLoS ONE*, 15(10 October).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0236305>

Callahan, B. J., McMurdie, P. J., & Holmes, S. P. (2017). Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *ISME Journal*, 11(12), 2639–2643. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.119>

Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581–583.

<https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>

Camilli, R., Di Iorio, D., Bowen, A., Reddy, C. M., Techet, A. H., Yoerger, D. R., Whitcomb, L. L., Seewald, J. S., Sylva, S. P., Fenwick, J., Designed, L. L. W., Performed, S. P. S., & Contributed, J. S. S. (2012). Acoustic measurement of the Deepwater Horizon Macondo well flow rate. *PNAS*, 109(50), 20235–20239. <https://doi.org/10.1073/pnas.1100385108/-/DCSupplemental>

- Camilli, R., & et al. (2010). Tracking Hydrocarbon Plume Transport and Biodegradation at Deepwater Horizon. *Science*, 330, 201–204.
<https://doi.org/10.1126/science.1195223>
- Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., Fierer, N., Pěa, A. G., Goodrich, J. K., Gordon, J. I., Huttley, G. A., Kelley, S. T., Knights, D., Koenig, J. E., Ley, R. E., Lozupone, C. A., McDonald, D., Muegge, B. D., Pirrung, M., ... Knight, R. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. In *Nature Methods* (Vol. 7, Issue 5, pp. 335–336). <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303>
- Cappello, S., Denaro, R., Genovese, M., Giuliano, L., & Yakimov, M. M. (2007). Predominant growth of *Alcanivorax* during experiments on “oil spill bioremediation” in mesocosms. *Microbiological Research*, 162(2), 185–190.
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.05.010>
- Cappello, S., & Yakimov, M. M. (2010). Mesocosms for Oil Spill Simulation. In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* (pp. 3513–3521). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-77587-4_274
- Cerqueda-García, D., García-Maldonado, J. Q., Aguirre-Macedo, L., & García-Cruz, U. (2020). A succession of marine bacterial communities in batch reactor experiments during the degradation of five different petroleum types. *Marine Pollution Bulletin*, 150. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.110775>
- Chen, J., & Denison, M. S. (2011). The Deepwater Horizon Oil Spill: Environmental Fate of the Oil and the Toxicological Effects on Marine Organisms (Vol. 21).
- Chen, Q., Li, J., Liu, M., Sun, H., & Bao, M. (2017). Study on the biodegradation of crude oil by free and immobilized bacterial consortium in marine environment. *PLoS ONE*, 12(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174445>
- Christensen, B. B., Haagenen, J. A. J., Heydorn, A., & Molin, S. (2002). Metabolic commensalism and competition in a two-species microbial consortium. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(5), 2495–2502.
<https://doi.org/10.1128/AEM.68.5.2495-2502.2002>

- Colmenares, F. (2008). Petróleo y crecimiento económico en México 1938-2006. *Economía UNAM*, 5(15), 53–65.
- Comba González, N. B., Niño Corredor, A. N., López Kleine, L., & Montoya Castaño, D. (2021). Temporal Changes of the Epiphytic Bacteria Community From the Marine Macroalga *Ulva lactuca* (Santa Marta, Colombian-Caribbean). *Current Microbiology*, 78(2), 534–543.
<https://doi.org/10.1007/s00284-020-02302-x>
- Das, N., & Chandran, P. (2011). Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview. *Biotechnology Research International*, 2011, 1–13. <https://doi.org/10.4061/2011/941810>
- Dellagnezze, B. M., de Sousa, G. V., Martins, L. L., Domingos, D. F., Limache, E. E. G., de Vasconcellos, S. P., da Cruz, G. F., & de Oliveira, V. M. (2014). Bioremediation potential of microorganisms derived from petroleum reservoirs. *Marine Pollution Bulletin*, 89(1–2), 191–200.
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.10.003>
- Dellagnezze, B. M., Gomes, M. B., & de Oliveira, V. M. (2019). Microbes and petroleum bioremediation. In *Microbial Action on Hydrocarbons* (pp. 97–123). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-1840-5_5
- Dellagnezze, B. M., Vasconcellos, S. P., Angelim, A. L., Melo, V. M. M., Santisi, S., Cappello, S., & Oliveira, V. M. (2016). Bioaugmentation strategy employing a microbial consortium immobilized in chitosan beads for oil degradation in mesocosm scale. *Marine Pollution Bulletin*, 107(1), 107–117.
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.04.011>
- Dey, U., Chatterjee, S., & Mondal, N. K. (2016). Isolation and characterization of arsenic-resistant bacteria and possible application in bioremediation. *Biotechnology Reports*, 10, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2016.02.002>
- Díaz-Ruiz, S., Aguirre-León, A., Mendoza-Sánchez, E., Ana, & Lara-Domínguez, L. (2018). Factores ambientales que influyen en la ictiofauna de la laguna La

Mancha, sitio Ramsar, Golfo de México. In *Rev. Biol. Trop. (Int. J. Trop. Biol. ISSN (Vol. 66, Issue 1))*.

El-Sheekh, M. M., & Hamouda, R. A. (2014). Biodegradation of crude oil by some cyanobacteria under heterotrophic conditions. *Desalination and Water Treatment*, 52(7–9), 1448–1454.

<https://doi.org/10.1080/19443994.2013.794008>

Eze, M. O., Hose, G. C., George, S. C., & Daniel, R. (2021). Diversity and metagenome analysis of a hydrocarbon-degrading bacterial consortium from asphalt lakes located in Wietze, Germany. *AMB Express*, 11(1).

<https://doi.org/10.1186/s13568-021-01250-4>

Filipa Botelho Carvalho Mestrado em Ecologia Ambiente, T., Maria Oliveira da Silva Lage, O., & auxiliar, P. (2017). Dealing with Hydrocarbons: from Planctomycetes to microbial community.

Firmino, P. I. M., Farias, R. S., Barros, A. N., Buarque, P. M. C., Rodríguez, E., Lopes, A. C., & dos Santos, A. B. (2015). Understanding the anaerobic BTEX removal in continuous-flow bioreactors for ex situ bioremediation purposes. *Chemical Engineering Journal*, 281, 272–280.

<https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.06.106>

García-Cruz, N. U., & Aguirre-Macedo, M. L. (2014). Biodegradación de petróleo por bacterias: algunos casos de estudio en el Golfo de México. *Golfo México Contam e impacto Ambient diagnóstico y tendencias*.

García-Cruz, N. U., Valdivia-Rivera, S., Narciso-Ortiz, L., García-Maldonado, J. Q., Uribe-Flores, M. M., Aguirre-Macedo, M. L., & Lizardi-Jiménez, M. A. (2019). Diesel uptake by an indigenous microbial consortium isolated from sediments of the Southern Gulf of Mexico: Emulsion characterisation. *Environmental Pollution*, 250, 849–855. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.04.109>

Getz, E. W., Lanclos, V. C., Kojima, C. Y., Cheng, C., Henson, M. W., Schön, M. E., Ettema, T. J. G., Faircloth, B. C., & Thrash, J. C. (2023). The *AEGEAN-169 clade* of bacterioplankton is synonymous with SAR11 subclade V (HIMB59)

and metabolically distinct. *MSystems*, 8(3).
<https://doi.org/10.1128/msystems.00179-23>

Gold-Bouchot, G., Ceja-Moreno, V., Chan-Cocom, E., & Zapata-Perez, O. (2014). Petroleum hydrocarbons, fluorescent aromatic compounds in fish bile and organochlorine pesticides from areas surrounding the spill of the Kab121 well, in the Southern Gulf of Mexico : A case study. *Journal of Environmental Biology*, 147–156. www.jeb.co.in

Gomes, M. B., & et al. (2018). Exploring the potential of halophilic bacteria from oil terminal environments for biosurfactant production and hydrocarbon degradation under high-salinity conditions. In *Int Biodeteriorat Biodegrad* (Vol. 126, pp. 231–242).

Gupta, S., Pathak, B., & Fulekar, M. H. (2015). Molecular approaches for biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon compounds: a review. In *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* (Vol. 14, Issue 2, pp. 241–269). Kluwer Academic Publishers. <https://doi.org/10.1007/s11157-014-9353-3>

Gupta, V., Ratha, S. K., Sood, A., Chaudhary, V., & Prasanna, R. (2013). New insights into the biodiversity and applications of cyanobacteria (blue-green algae)-Prospects and challenges. In *Algal Research* (Vol. 2, Issue 2, pp. 79–97). <https://doi.org/10.1016/j.algal.2013.01.006>

Hara, A., Syutsubo, K., & Harayama, S. (2003). *Alcanivorax* which prevails in oil-contaminated seawater exhibits broad substrate specificity for alkane degradation. *Environmental Microbiology*, 5(9), 746–753.
<https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2003.00468.x>

Harayama, S., Kasai, Y., & Hara, A. (2004). Microbial communities in oil-contaminated seawater. In *Current Opinion in Biotechnology* (Vol. 15, Issue 3, pp. 205–214). <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2004.04.002>

Harrison, P. J., Cochlan, W. P., Acreman, J. C., Parsons, T. R., Thompsom, P. A., Dovey, H. M., & Xiaolin, C. (1986). The Effects of Crude Oil and Corexit 9527

- on Marine Phytoplankton in an Experimental Enclosure. In *Marine Environmental Research* (Vol. 18).
- Hassanshahian, M., Emtiazi, G., Caruso, G., & Cappello, S. (2014). Bioremediation (bioaugmentation/biostimulation) trials of oil polluted seawater: A mesocosm simulation study. *Marine Environmental Research*, 95, 28–38.
<https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2013.12.010>
- Head, I. M., Jones, D. M., & Röling, W. F. M. (2006). Marine microorganisms make a meal of oil. In *Nature reviews. Microbiology* (Vol. 4, Issue 3, pp. 173–182).
<https://doi.org/10.1038/nrmicro1348>
- Hernández-Candelario, I. del C., Lares, M. L., Camacho-Ibar, V. F., Linacre, L., Gutiérrez-Mejía, E., & Pérez-Brunius, P. (2019). Dissolved cadmium and its relation to phosphate in the deep region of the Gulf of Mexico. *Journal of Marine Systems*, 193, 27–45. <https://doi.org/10.1016/j.jmarsys.2019.01.005>
- Herzka, S. Z., Alfonso Zaragoza Álvarez, R., Peters Recagno Gilberto Hernández Cárdenas Coordinación general Tomo X, E. M., & Pardo López Rosa María Gutiérrez Ríos Editoras José Antonio Loza Román Ana Patricia Arias Torres Cartografía, L. (2020). Atlas de línea base ambiental del Golfo de México. Distribución de bacterias.
- Herzka, S. Z., Zaragoza Álvarez Rigel Alfonso, Peters Edward M., & Hernández Cárdenas Gilberto. (2021). Atlas de línea base ambiental del Golfo de México. Hidrografía, biogeoquímica e imágenes de satélite.
- Ivshina, I. B., Kuyukina, M. S., Krivoruchko, A. V., Elkin, A. A., Makarov, S. O., Cunningham, C. J., Peshkur, T. A., Atlas, R. M., & Philp, J. C. (2015). Oil spill problems and sustainable response strategies through new technologies. In *Environmental Science: Processes and Impacts* (Vol. 17, Issue 7, pp. 1201–1219). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/c5em00070j>
- Joye, S. B., Bracco, A., Özgökmen, T. M., Chanton, J. P., Grosell, M., MacDonald, I. R., Cordes, E. E., Montoya, J. P., & Passow, U. (2016). The Gulf of Mexico ecosystem, six years after the Macondo oil well blowout. In *Deep-Sea*

Research Part II: Topical Studies in Oceanography (Vol. 129, pp. 4–19).
Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2016.04.018>

Kensa, V. M. (2011). BIOREMEDIATION-AN OVERVIEW. *Jr. of Industrial Pollution Control*, 27(2), 161–168.

Kleinsteuber, S., Riis, V., Fetzer, I., Harms, H., & Müller, S. (2006). Population dynamics within a microbial consortium during growth on diesel fuel in saline environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(5), 3531–3542. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.5.3531-3542.2006>

Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., & Glöckner, F. O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*, 41(1). <https://doi.org/10.1093/nar/gks808>

Kloos, K., Munch, J. C., & Schloter, M. (2006). A new method for the detection of alkane-monooxygenase homologous genes (alkB) in soils based on PCR-hybridization. *Journal of Microbiological Methods*, 66(3), 486–496. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.01.014>

Kokou, F., Sasson, G., Friedman, J., Eyal, S., Ovadia, O., Harpaz, S., Cnaani, A., & Mizrahi, I. (2019). Core gut microbial communities are maintained by beneficial interactions and strain variability in fish. *Nature Microbiology*, 4(12), 2456–2465. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0560-0>

Lee, R. F., Gardner, W. S., Anderson, J. W., Blaylock, J. W., & Barwell-Clarke, J. (1978). Fate of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Controlled Ecosystem Enclosures. *Environmental Science and Technology*, 12(7), 832–838.

Liang, C., Huang, Y., & Wang, H. (2019). *pahE*, a functional marker gene for polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(3). <https://doi.org/10.1128/AEM.02399-18>

- Liu, C., Cui, Y., Li, X., & Yao, M. (2021). *microeco* : an R package for data mining in microbial community ecology. *FEMS Microbiology Ecology*, 97(2).
<https://doi.org/10.1093/femsec/fiaa255>
- Liu, J., Bacosa, H. P., & Liu, Z. (2017). Potential environmental factors affecting oil-degrading bacterial populations in deep and surface waters of the Northern Gulf of Mexico. *Frontiers in Microbiology*, 7(JAN).
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02131>
- Liu, S., Sun, R., Cai, M., Kong, Y., Gao, Y., Zhang, T., Xiao, X., Qiao, Y., Xue, J., & Huang, G. (2022). Petroleum spill bioremediation by an indigenous constructed bacterial consortium in marine environments. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 241. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113769>
- Lizárraga-Partida, M. , L. , J. P.-A. F. B. I. (1983). Tasa bacteriana hidrocarbonoclasticas/heterotrofas como índice de impacto ambiental por petróleo crudo en la sonda de Campeche. *Anales Del Instituto de Ciencias Del Mar y Limnología*, 10, 177–185.
- McGenity, T. J., Folwell, B. D., McKew, B. A., & Sanni, G. O. (2012). Marine crude-oil biodegradation: a central role for interspecies interactions. In *Aquatic Biosystems* (Vol. 8, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/2046-9063-8-10>
- McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). *Phyloseq*: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE*, 8(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- Morales, A. P., Antolín, J., Castillo, A., Antonio, C., Delgado, P., Fotografía, C., Guadalupe, A., & Romero, M. (2020). *Investigaciones marinas en el golfo de México y mar Caribe mexicano*.
- Moreno, R., & Rojo, F. (2017). Enzymes for Aerobic Degradation of Alkanes in Bacteria. In *Aerobic Utilization of Hydrocarbons, Oils and Lipids* (pp. 1–25). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-39782-5_6-1

- Morris, J. J., Lenski, R. E., & Zinser, E. R. (2012). The black queen hypothesis: Evolution of dependencies through adaptive gene loss. *MBio*, 3(2).
<https://doi.org/10.1128/mBio.00036-12>
- Nakano, M., Kihara, M., Iehata, S., Tanaka, R., Maeda, H., & Yoshikawa, T. (2011). Wax ester-like compounds as biosurfactants produced by *Dietzia maris* from n-alkane as a sole carbon source. *Journal of Basic Microbiology*, 51(5), 490–498. <https://doi.org/10.1002/jobm.201000420>
- Odum, E. P. (1984). *The Mesocosm*. <http://bioscience.oxfordjournals.org/>
- Oksanen Jari, & et al. (2022). *vegan: Community Ecology Package (R package version 2.6-4)*.
- Paudel, B., Weston, N., O'Connor, J., Sutter, L., & Velinsky, D. (2017). Phosphorus Dynamics in the Water Column and Sediments of Barnegat Bay, New Jersey. *Journal of Coastal Research*, 78, 60–69. <https://doi.org/10.2112/SI78-006.1>
- Peters, K., Walters, C., & Moldovan, J. (2005). *The biomarker guide: Biomarkers and isotopes in the environment and human history*. Cambridge University Press, 492.
- Powell, S. M., Ferguson, S. H., Bowman, J. P., & Snape, I. (2006). Using real-time PCR to assess changes in the hydrocarbon-degrading microbial community in Antarctic soil during bioremediation. *Microbial Ecology*, 52(3), 523–532.
<https://doi.org/10.1007/s00248-006-9131-z>
- Price, M. N., Dehal, P. S., & Arkin, A. P. (2010). FastTree 2 - Approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS ONE*, 5(3).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009490>
- Raggi, L., García-Guevara, F., Godoy-Lozano, E. E., Martínez-Santana, A., Escobar-Zepeda, A., Gutierrez-Rios, R. M., Loza, A., Merino, E., Sanchez-Flores, A., Licea-Navarro, A., Pardo-Lopez, L., Segovia, L., & Juarez, K. (2020). Metagenomic Profiling and Microbial Metabolic Potential of Perdido

- Fold Belt (NW) and Campeche Knolls (SE) in the Gulf of Mexico. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01825>
- Rahman, K. S. M., Thahira-Rahman, J., Lakshmanaperumalsamy, P., & Banat, I. M. (2002). Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium. *Bioresource Technology*, 257–261.
- Rappé, M. S., & Giovannoni, S. J. (2003). The Uncultured Microbial Majority. In *Annual Review of Microbiology* (Vol. 57, pp. 369–394). <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.090759>
- Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., & Mahé, F. (2016). VSEARCH: A versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ*, 2016(10). <https://doi.org/10.7717/peerj.2584>
- Scoma, A., Yakimov, M. M., Daffonchio, D., & Boon, N. (2017). Self-healing capacity of deep-sea ecosystems affected by petroleum hydrocarbons. *EMBO Reports*, 18(6), 868–872. <https://doi.org/10.15252/embr.201744090>
- Sikkema, J., De Bont, J. A. M., & Poolman, B. (1995). Mechanisms of Membrane Toxicity of Hydrocarbons. In *MICROBIOLOGICAL REVIEWS* (Vol. 59, Issue 2).
- Smith, A. F., Rihtman, B., Stirrup, R., Silvano, E., Mausz, M. A., Scanlan, D. J., & Chen, Y. (2019). Elucidation of glutamine lipid biosynthesis in marine bacteria reveals its importance under phosphorus deplete growth in *Rhodobacteraceae*. *ISME Journal*, 13(1), 39–49. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0249-z>
- Smith, C. B., Tolar, B. B., Hollibaugh, J. T., & King, G. M. (2013). Alkane hydroxylase gene (alkB) phylotype composition and diversity in northern Gulf of Mexico bacterioplankton. *Frontiers in Microbiology*, 4(DEC). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00370>

- Solanas, A. M. (2009). La biodegradación de hidrocarburos y su aplicación en la biorremediación de suelos (Silva Roja Orlando & Carrera Ramírez Jesús, Eds.). CIMNE.
- Song, W. F., Wang, J. W., Yan, Y. C., An, L. Y., Zhang, F., Wang, L., Xu, Y., Tian, M. Z., Nie, Y., & Wu, X. L. (2018). Shifts of the indigenous microbial communities from reservoir production water in crude oil- and asphaltene-degrading microcosms. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 132, 18–29. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2018.04.015>
- Soto, L. A., Botello, A. V., Licea-Durán, S., Lizárraga-Partida, M. L., & Yáñez-Arancibia, A. (2014). The environmental legacy of the Ixtoc-I oil spill in Campeche Sound, southwestern Gulf of Mexico. In *Frontiers in Marine Science* (Vol. 1, Issue NOV). Frontiers Media S. A. <https://doi.org/10.3389/fmars.2014.00057>
- Spring, S., Scheuner, C., Göker, M., & Klenk, H. P. (2015). A taxonomic framework for emerging groups of ecologically important marine *gammaproteobacteria* based on the reconstruction of evolutionary relationships using genome-scale data. *Frontiers in Microbiology*, 6(APR). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00281>
- Synnøve Lofthus, Roman Netzer, & Anna S. Lewin. (2018). Biodegradation of n-alkanes on oil-seawater interfaces at different temperatures and microbial communities associated with the degradation. *Biodegradation*, 29, 141–157. <https://doi.org/10.1007/s10532>
- Teske, A. (2019). Hydrocarbon-Degrading Microbial Communities in Natural Oil Seeps. In *Microbial Communities Utilizing Hydrocarbons and Lipids: Members, Metagenomics and Ecophysiology* (pp. 1–31). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-60063-5_3-2
- Uribe-Flores, M. M., Cerqueda-García, D., Hernández-Núñez, E., Cadena, S., García-Cruz, N. U., Trejo-Hernández, M. R., Aguirre-Macedo, M. L., & García-Maldonado, J. Q. (2019). Bacterial succession and co-occurrence patterns of

an enriched marine microbial community during light crude oil degradation in a batch reactor. *Journal of Applied Microbiology*, 127(2), 495–507.

<https://doi.org/10.1111/jam.14307>

Valencia Agami, S. S. (2022). Cambios en la estructura de la comunidad bacteriana en la columna de agua de la Plataforma de Yucatán durante simulaciones de derrames de petróleo. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

Valencia-Agami, S. S., Cerqueda-García, D., Putzeys, S., Uribe-Flores, M. M., García-Cruz, N. U., Pech, D., Herrera-Silveira, J., Aguirre-Macedo, M. L., & García-Maldonado, J. Q. (2019). Changes in the bacterioplankton community structure from southern gulf of Mexico during a simulated crude oil spill at mesocosm Scale. *Microorganisms*, 7(10).

<https://doi.org/10.3390/microorganisms7100441>

Valenzuela Sánchez, I. S., Gold-Bouchot, G., & Ceja Moreno, V. (2005). Golfo de México Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias. Hidrocarburos en agua y sedimentos de la laguna de Chelem, y puerto Progreso, Yucatán (Vol. 2). Universidad Autónoma de Campeche, Centro de Ecología, Pesquerías y Oceanografía del Golfo de México.

Van Beilen, J. B., & Funhoff, E. G. (2007). Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 74, Issue 1, pp. 13–21). <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0748-0>

Van Beilen, J. B., Li, Z., Duetz, W. A., Smits, T. H. M., & Witholt, B. (2003). Diversity of Alkane Hydroxylase Systems in the Environment. In *Oil & Gas Science and Technology-Rev. IFP* (Vol. 58, Issue 4).

Varjani, S. J. (2017). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. In *Bioresource Technology* (Vol. 223, pp. 277–286). Elsevier Ltd.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.037>

Viggor, S., Jõesaar, M., Vedler, E., Kiiker, R., Pärnpuu, L., & Heinaru, A. (2015). Occurrence of diverse alkane hydroxylase *alkB* genes in indigenous oil-

- degrading bacteria of Baltic Sea surface water. *Marine Pollution Bulletin*, 101(2), 507–516. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.10.064>
- Vila, J., Nieto, J. M., Mertens, J., Springael, D., & Grifoll, M. (2010). Microbial community structure of a heavy fuel oil-degrading marine consortium: Linking microbial dynamics with polycyclic aromatic hydrocarbon utilization. *FEMS Microbiology Ecology*, 73(2), 349–362. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00902.x>
- Wang, I. J., Karmaus, W. J. J., & Yang, C. C. (2017). Polycyclic aromatic hydrocarbons exposure, oxidative stress, and asthma in children. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 90(3), 297–303. <https://doi.org/10.1007/s00420-017-1198-y>
- Wang, J., Huang, Z.-H., Gage, D. A., & Watson, J. T. (1994). Analysis of amino acids by gas chromatography-flame ionization detection and gas chromatography-mass spectrometry : Simultaneous derivatization of functional groups by an aqueous-phase chloroformate-mediated reaction. In *Journal of Chromatography A* (Vol. 663).
- Wang, S., Li, G., Liao, Z., Liu, T., & Ma, T. (2022). A novel alkane monooxygenase (alkB) clade revealed by massive genomic survey and its dissemination association with IS elements. *PeerJ*, 10. <https://doi.org/10.7717/peerj.14147>
- Wang, T., Wirth, J. S., & Whitman, W. B. (2019). *Cognatishimia*. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (pp. 1–3). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01677>
- Wang, W., & Shao, Z. (2012). Diversity of flavin-binding monooxygenase genes (almA) in marine bacteria capable of degradation long-chain alkanes. *FEMS Microbiology Ecology*, 80(3), 523–533. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01322.x>
- Wauquier J. P. (2004). El refinado del petróleo Petróleo crudo — Productos petrolíferos Esquemas de fabricación.

- Wickham, H., Averick, M., Bryan, J., Chang, W., McGowan, L., François, R., Grolemund, G., Hayes, A., Henry, L., Hester, J., Kuhn, M., Pedersen, T., Miller, E., Bache, S., Müller, K., Ooms, J., Robinson, D., Seidel, D., Spinu, V., ... Yutani, H. (2019). Welcome to the Tidyverse. *Journal of Open Source Software*, 4(43), 1686. <https://doi.org/10.21105/joss.01686>
- Wilkinson, L. (2011). ggplot2: Elegant graphics for data analysis by WICKHAM, H. *Biometrics*, 67, 678–679.
- Wolff, M. (2002). Concepts and approaches for marine ecosystem research with reference to the tropics. *Revista de Biologia Tropical*, 50(2), 395–414.
- Wooley, J. C., Godzik, A., & Friedberg, I. (2010). A Primer on Metagenomics. *PLoS Comput Biol*, 6(2). <https://doi.org/doi:10.1371/journal.pcbi.1000667>
- Xia, W., Li, J., Han, L., Liu, L., Yang, X., Hao, S., & Zhang, M. (2018). Influence of Dispersant/Oil Ratio on the Bacterial Community Structure and Petroleum Hydrocarbon Biodegradation in Seawater. *Journal of Coastal Research*, 84, 77–81. <https://doi.org/10.2112/SI84-011.1>
- Yakimov, M. M., Golyshin, P. N., Crisafi, F., Denaro, R., & Giuliano, L. (2019). Marine, Aerobic Hydrocarbon-Degrading *Gammaproteobacteria*: The Family *Alcanivoracaceae*. In *Taxonomy, Genomics and Ecophysiology of Hydrocarbon-Degrading Microbes* (pp. 167–179). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-14796-9_24
- Yakimov, M. M., Timmis, K. N., & Golyshin, P. N. (2007). Obligate oil-degrading marine bacteria. In *Current Opinion in Biotechnology* (Vol. 18, Issue 3, pp. 257–266). <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.04.006>
- Yamada, M., Takada, H., Toyoda, K., Yoshida, A., Shibata, A., Nomura, H., Wada, M., Nishimura, M., Okamoto, K., & Ohwada, K. (2003). Study on the fate of petroleum-derived polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and the effect of chemical dispersant using an enclosed ecosystem, mesocosm. *Marine Pollution Bulletin*, 47(1–6), 105–113. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(03\)00102-4](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(03)00102-4)

- Yan, B., Jiang, L., Zhou, H., Okokon Atakpa, E., Bo, K., Li, P., Xie, Q., Li, Y., & Zhang, C. (2023). Performance and microbial community analysis of combined bioreactors in treating high-salinity hydraulic fracturing flowback and produced water. *Bioresource Technology*, 386. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.129469>
- Zabala García Diego Andres. (2019). Evaluación técnica y financiera a nivel laboratorio del uso de residuos de polipropileno y tereftalato de polietileno como absorbentes para derrames de petróleo en ambientes terrestres [Universidad de America]. <http://repository.uamerica.edu.co/bitstream/20.500.11839/7650/1/5132793-2019-2-IP.pdf>
- Zaldívar Jiménez, A., Silveira, J. H., Coronado Molina, C., & Parra, D. A. (2004). Estructura y productividad de los manglares en la reserva de biosfera Ría Celestún, Yucatán, México.
- Zhang, C., & Bennett, G. N. (2005). Biodegradation of xenobiotics by anaerobic bacteria. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 67, Issue 5, pp. 600–618). <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1864-3>

12. ANEXOS

Anexo 1. Correlaciones entre las cadenas de carbono de hidrocarburos alifáticos y la abundancia del gen alkB en temporada de secas

Secas					
10 mg L⁻¹		40 mg L⁻¹		80 mg L⁻¹	
Alifático	Correlación	Alifático	Correlación	Alifático	Correlación
C10	-0.6253054	C11	-0.6486493	C10	-0.62777025
C13	-0.70034205				
C18	-0.61212121				
FITANO	-0.81818182				
C19	-0.72121212				
C20	-0.72121212				
C21	-0.61212121				
C22	-0.74545455				
C23	-0.64848485				
C24	-0.66060606				
C25	-0.61212121				
C26	-0.68484848				
C27	-0.75757576				
C28	-0.64848485				
C29	-0.76969697				
C30	-0.6				
C32	-0.68484848				
C33	-0.63636364				
Nortes					
		PRISTANO	-0.71428363		

Anexo 2. Concentraciones de hidrocarburos alifáticos en las tres temporadas

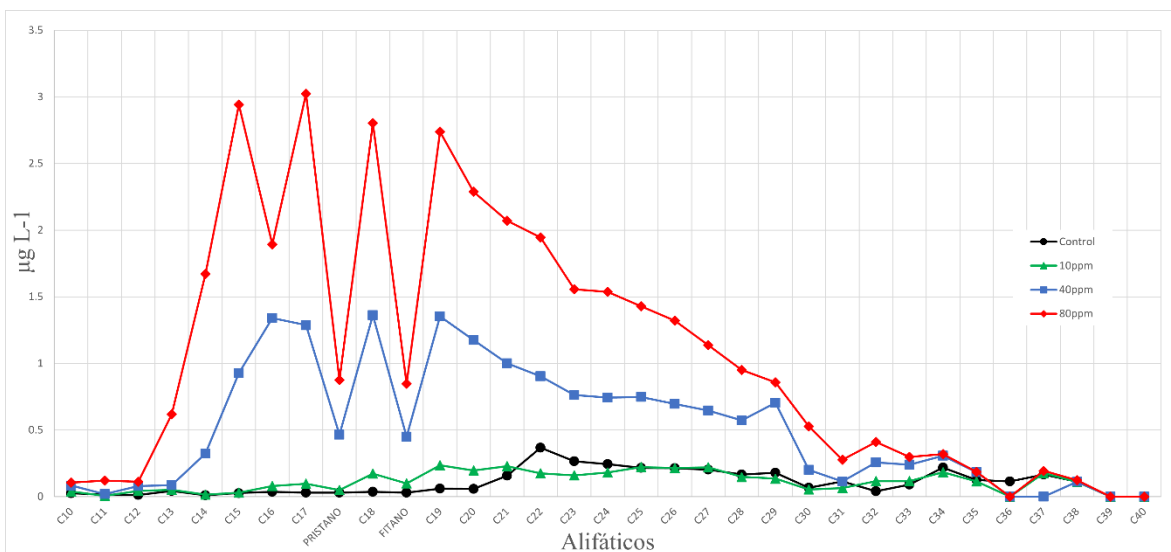


Figura 20. Concentración de hidrocarburos alifáticos en temporada de secas, por tratamiento

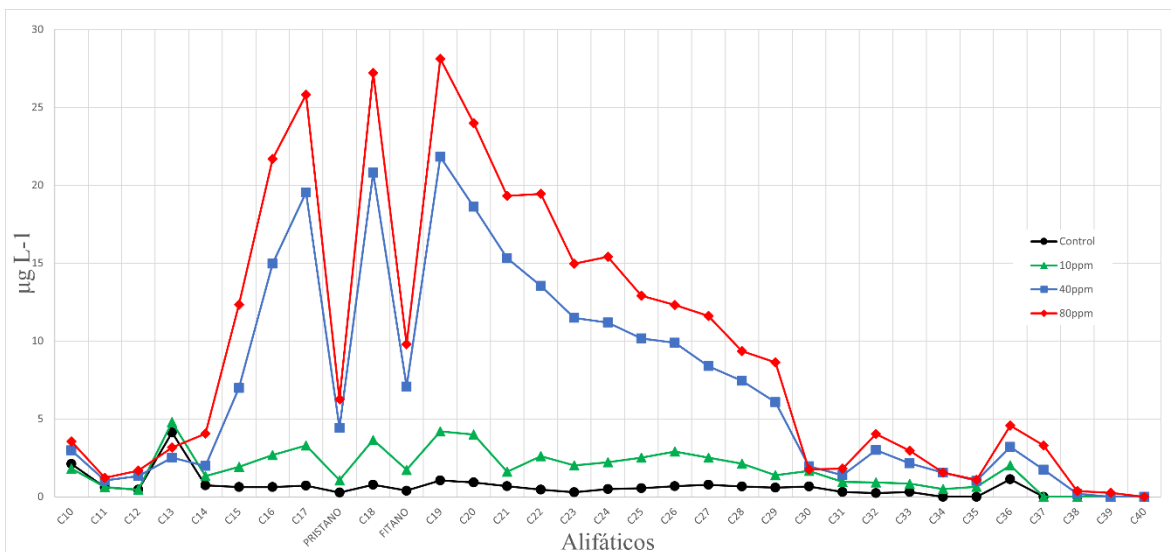


Figura 21. Concentración de hidrocarburos alifáticos en temporada de lluvias, por tratamiento

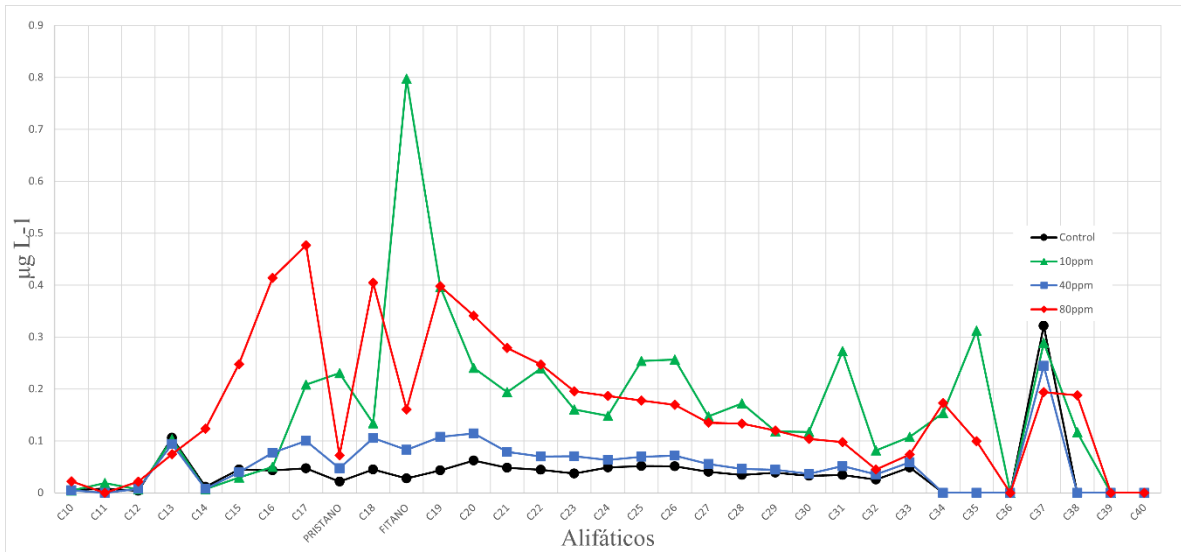


Figura 22. Concentración de hidrocarburos alifáticos en temporada de Nortes, por tratamiento

Anexo 3. Abundancias relativas a nivel de clase en las tres temporadas climáticas

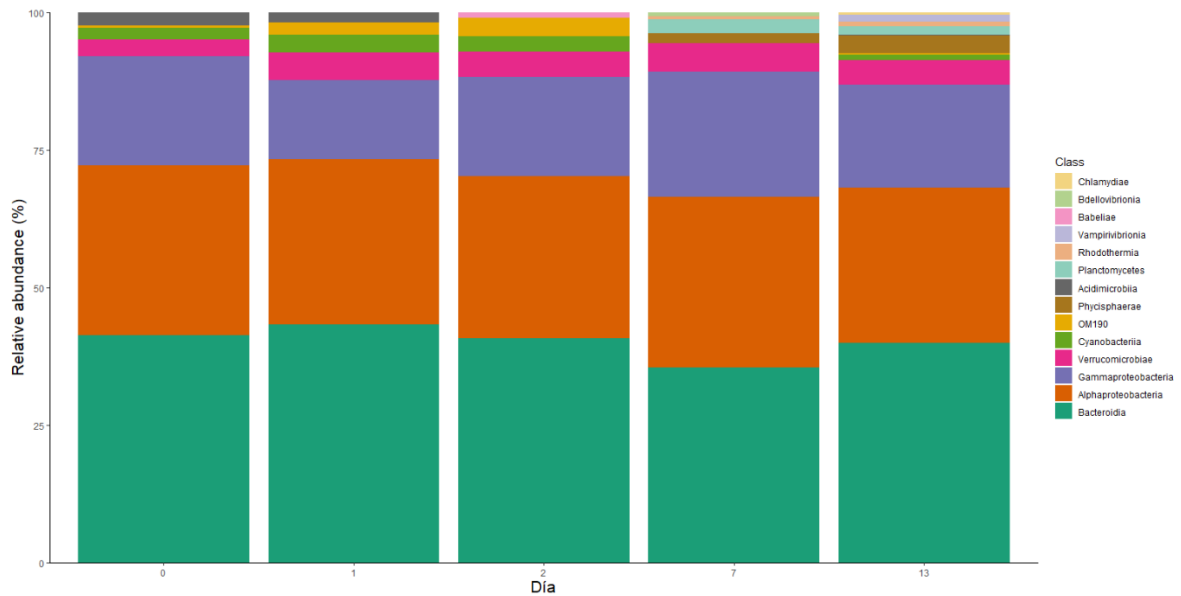


Figura 23. Abundancia relativa de la comunidad bacteriana a nivel de clase en el tratamiento de 10 mg L⁻¹ de la temporada de secas

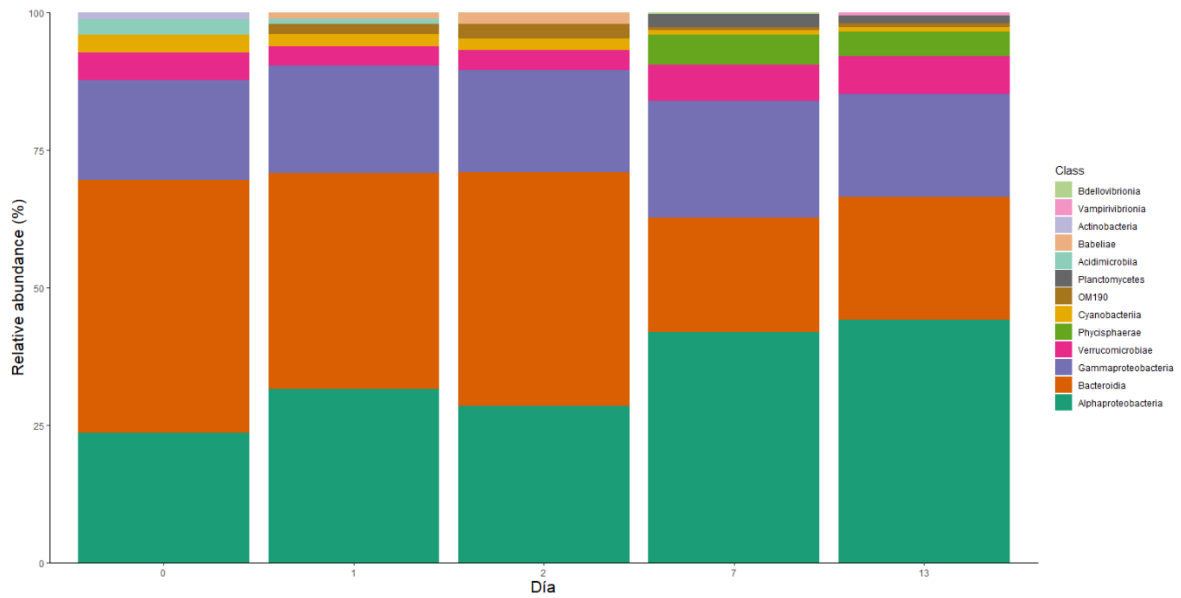


Figura 24. Abundancia relativa de la comunidad bacteriana a nivel de clase en el tratamiento de 40 mg L⁻¹ de la temporada de secas

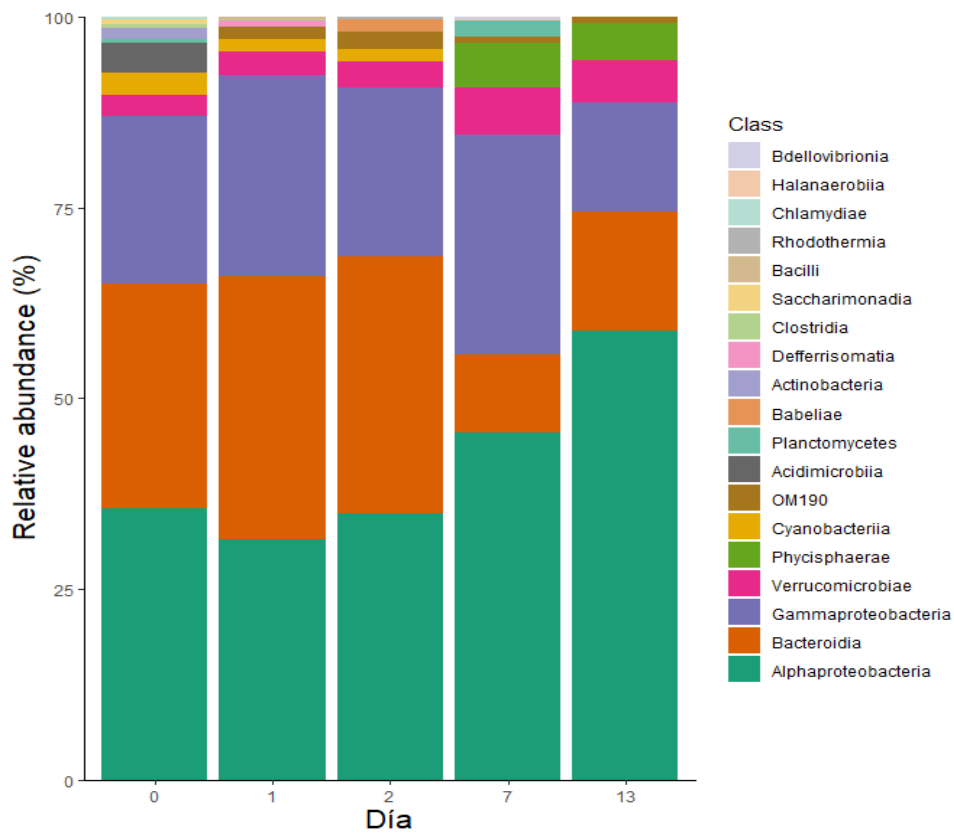


Figura 25. Abundancia relativa de la comunidad bacteriana a nivel de clase en el tratamiento de 80 mg L⁻¹ de la temporada de secas

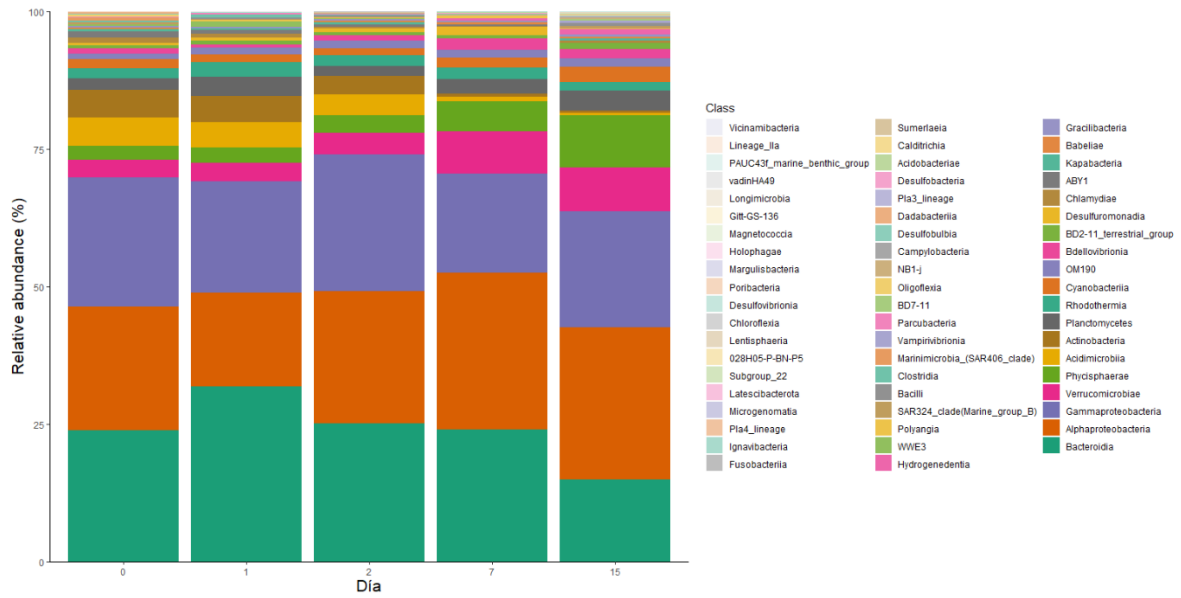


Figura 26. Abundancia relativa de la comunidad bacteriana a nivel de clase en el tratamiento de 40 mg L-1 de la temporada de nortes