



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA



FACULTAD DE INGENIERIA, ARQUITECTURA Y DISEÑO

CARACTERIZACIÓN DE *Nesterenkonia sp.*, UNA CEPA BACTERIANA HALÓFILA MODERADA CON POTENCIAL ACTIVIDAD HIDROCARBONOCLÁSTICA

TESIS PARA CUBRIR LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER
EL TÍTULO DE
BIOINGENIERO

PRESENTA:

FERNANDA GARCÍA MORENO

DIRECTORA:

DRA. HORTENCIA SILVA JIMÉNEZ

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, JUNIO 2023

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE INGENIERIA, ARQUITECTURA Y DISEÑO

CARACTERIZACIÓN DE *Nesterenkonia sp.*, UNA CEPA BACTERIANA HALÓFILA MODERADA CON POTENCIAL ACTIVIDAD HIDROCARBONOCLÁSTICA

TESIS PARA CUBRIR LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER EL TÍTULO DE **BIOINGENIERO**

PRESENTA:

FERNANDA GARCÍA MORENO

Dra. Hortencia Silva Jiménez

Director

APROBADA POR:

Dr. Priscy Alfredo Luque Morales

Co-Director

Dra. Ninfa Ramírez Durán

Sinodal

Dr. Rubén César Villarreal Sánchez

Sinodal

Dra. Claudia Mariana Gómez Gutiérrez

Sinodal

Agradecimientos

A mi directora de tesis, Dra. Hortencia Silva Jiménez, con quien estoy profundamente agradecida con mi asesor, por su apoyo y orientación a lo largo de mi proyecto de tesis, así como por el abrirme las puertas a más oportunidades. Su experiencia y paciencia han sido invaluable para mí y han jugado un papel crucial en el éxito de esta tesis.

A mi tutor, Dr. Priscy Alfredo Luque Morales por apoyarme no solamente con mi tesis, si no también durante toda mi formación académica universitaria.

A la Dra. Cynthia Lizzeth Araujo Palomares, por apoyarme en todos y cada uno de los experimentos del proyecto. Por haberme tomado bajo su ala; escuchándome y brindando invaluable consejos que me beneficiarán a lo largo de mi vida personal y académica.

A mi madre, cuyo apoyo incondicional me mantiene inspirada a seguir estudiando a pesar de los obstáculos en el camino.

A mis compañeras de laboratorio Ileana Ramos, Andrea Barrios, Anahí Sampayo, por haber hecho de mi estadía una experiencia más agradable, con sus anécdotas, consejos y apoyo moral.

A mi compañero y amigo Tadeo Briseño, quien me ayudo emocional, psicológica y presencialmente en todo momento, convirtiéndose en un pilar para mí durante este largo proceso; estoy muy agradecida y contenta de poder haber formado una gran amistad.

A mis personas, la familia que elegí y volvería elegir, Adela Flores Galicia y Karla Iliana Juárez; quienes me apoyaron no solo desde el inicio del proyecto sino desde el momento que las conocí, manteniéndome sana y feliz en cada momento que he compartido con ellas. Espero con ansias el resto de experiencias que nos esperan en el futuro juntas.

Contenido

1. Introducción	11
1.1 Contaminación Ambiental	11
1.2 Contaminación Marina	12
1.3 Composición de petróleo: Hidrocarburos	16
1.3.1 Naftaleno	20
1.3.2 Fenantreno.....	20
1.3.3 Pireno	21
1.4 Remoción de HAP: Biorremediación	22
2. Antecedentes	24
3. Hipótesis	25
4. Objetivos	25
4.1 Objetivo general	25
4.2. Objetivos particulares	25
5. Materiales y Métodos.....	26
5.1 Microorganismo de estudio y medios de cultivo	26
5.2 Pruebas de salinidad en medio sólido	26
5.3 Rango de concentraciones de hidrocarburos aromáticos policíclicos en medio sólido.	26
5.4 Curva de Crecimiento Bacteriano	27

5.5 Crecimiento de la cepa bacteriana en Petróleo	28
5.6 Producción de Biopelículas	28
5.7 Prueba cualitativa de producción de biosurfactantes.....	29
5.8 Ensayo de emulsificación E24.....	29
5.9 Extracción de ADN genómico	30
5.10 Detección de genes de degradación de hidrocarburos.....	31
6. Resultados.....	33
6.1 Pruebas de Salinidad en Medio Sólido.....	33
6.2 Rango de Concentraciones de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en Medio Solido	34
6.3 Curva de Crecimiento Bacteriano.....	37
6.4 Crecimiento de la Cepa Bacteriana en Petróleo.....	40
6.5 Producción de Biopelículas	42
6.6 Prueba cualitativa de Producción de Biosurfactantes.....	45
6.7 Ensayo de Emulsificación E24.....	46
6.8 Detección de genes de degradación	52
7. Discusión.....	53
8. Conclusiones.....	58
9. Referencias.....	59

Lista de figuras

Figura 1. Rutas de contaminación marina.....	13
Figura 2. Contaminación por transporte marítimo.....	15
Figura 3. Contaminación por transporte marítimo.....	16
Figura 4. Clasificación de hidrocarburos	18
Figura 5. Estructura esquelética de naftaleno	20
Figura 6. Estructura esquelética de fenantreno	21
Figura 7. Estructura esquelética de pireno	21
Figura 8. Curva de crecimiento bacteriano en medio BH.....	38
Figura 9. Producción de películas.....	42
Figura 10. Biopelículas suspendidas en etanol 70%. Estación de húmeda, donde las biopelículas que se dejaron al aire para secar fueron re suspendidas en etanol al 70%,.....	43
Figura 11. Cuantificación de biopelículas.	44
Figura 12. Prueba cualitativa de producción de biosurfactantes.....	45
Figura 13. Producción de biosurfactantess en medio LB.	46
Figura 14. Ensayo de emulsificación sin hidrocarburo.....	48
Figura 15. Producción de biosurfactantes en medio LB con 0.1gL^{-1} fenantreno.	49
Figura 16. Ensayo de emulsificación con hidrocarburo.....	50
Figura 17. Detección de genes involucrados en degradación de hidrocarburos. A) Amplificación de gen alcanos mono-oxigenasa (100pb), B) Amplificación de gen Tolueno/Bifenilo dioxigenasa (505pb) C) Amplificación de gen pahE (377 pb). L=Ladder 1Kb, C+=Control positivo (ADN de	

Rhodococcus ruber MSA14 para *alkB* y *Tol/Bifenilo* y ADN de *Acinetobacter lwoffii* para *pahE*), ADN=ADN de *Nesterenkonia* sp. El asterisco rojo representa el amplicón del control positivo, mientras que el asterisco amarillo indica al amplicón obtenido en *Nesterenkonia* CSB8-2. 52

Lista de tablas

Tabla 1. Composición elemental de petróleo crudo.....	17
Tabla 2. Los 16 PAH contaminantes prioritarios.....	19
Tabla 3. Prueba de salinidad en medio Luria- Bertani.....	33
Tabla 4. Crecimiento de <i>Nesterenkonia</i> en diferentes HAP.	34
Tabla 5. Crecimiento de <i>Nesterenkonia</i> en diferentes HAP.	35
Tabla 6. Crecimiento de <i>Nesterenkonia sp.</i> CSB8-2 en petróleo crudo fracción pesada.	40

Resumen

De la tesis de Fernanda García Moreno, presentada como requisito para la obtención del título de Bioingeniero, Ensenada, Baja California, junio de 2023.

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) son un gran grupo de sustancias químicas que han causado una gran preocupación debido a su amplia distribución en el medio ambiente, potencial de bioacumulación, efectos nocivos y resistencia a la biodegradación. La contaminación por HAP del suelo y el agua se atribuye principalmente a los hidrocarburos de las refinerías de petróleo, las industrias petroquímicas, el tráfico marítimo, las actividades humanas y otras fuentes. Una estrategia para eliminar este grupo de contaminantes es el uso de bacterias hidrocarbonoclásticas nativas. Por lo tanto, este trabajo tuvo como objetivo investigar la capacidad hidrocarbonoclástica de *Nesteronkonion sp.*, una bacteria aislada de la Costa de Baja California.


La cepa CSB8-2 fue aislada de sedimentos marinos en la costa del puerto de Rosarito en Baja California, México. La cepa aislada se identificó como *Nesteronkonion sp.* por secuenciación del gen 16S rDNA. La cepa CSB8-2 puede crecer eficientemente en placas de medios nutritivos suplementados con NaCl al 3% y diferentes concentraciones de naftaleno, fenantreno o pireno en un rango de 0.1g L⁻¹ a 40g L⁻¹. Estos estudios sugieren que CSB8-2 es un microorganismo moderadamente halófilo con un alto potencial para utilizar HAP de bajo y alto peso molecular como fuente de carbono y energía. Por lo tanto, CSB8-2 podría ser una herramienta factible para la biorremediación en ambientes salinos contaminados con HAP.

Resumen aprobado por:



Dra. Hortencia Silva Jiménez

Director



Dr. Priscy Alfredo Luque Morales

Co-Director

Palabras clave: *Nesteronkonion sp.*, hidrocarburos aromáticos policíclicos, hidrocarbonoclástica, biorremediación, halófilo

1. Introducción

1.1 Contaminación Ambiental

La contaminación, en *stricto sensu*, es la introducción en el medio ambiente de sustancias nocivas de origen antropogénico o de sustancias naturales fuera de su proporción o lugar normales, según lo menciona Rudin (1997)^[1]; de similar forma Parker y McGraw-Hill Book Company (1997) la describen como la destrucción o deterioro de la pureza del medio ambiente^[2] y en “El gran diccionario del medio ambiente y de la contaminación” la explican como una alteración de los elementos necesarios para la vida, tierra, agua o aire, o perturbación sobre los seres vivos que se origina como consecuencia de dicha alteración^[3]. A pesar de la infinidad de conceptos que se tiene para esta palabra, se pueden rescatar puntos en común de su significado, por lo que se puede concluir que la contaminación es la presencia de componentes en un ambiente de tal forma que genera consecuencias negativas.

En general, la contaminación ambiental es mayor en los países de medianos y bajos ingresos que en los países desarrollados, posiblemente debido a la pobreza, la mala legislación y el desconocimiento de las formas de contaminación; los humanos se enfrentan a la contaminación diariamente sin saberlo^[4]. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que 8,9 millones de personas mueren cada año por enfermedades provocadas por la contaminación, 8,4 millones (94 %) de ellas en países pobres^[5]; en comparación, el VIH/SIDA causa 1,5 millones de muertes por año^[6], y la malaria y la tuberculosis causan menos de 1 millón de muertes cada una^[7]. Los productos químicos tóxicos son causas cada vez más importantes de contaminación en todo el mundo, se utilizan en una amplia gama de productos, están difundidos en el medio ambiente global y hoy en día son detectables en los cuerpos de la mayoría de las personas; muchos nunca han sido probados adecuadamente para la seguridad^[8]. Los impactos no son solo sobre los humanos sino también sobre otros animales acuáticos y terrestres, incluidos los microorganismos, que por su abundancia y diversidad tienden a mantener su función biogeoquímica necesaria para el sostenimiento del ecosistema^[9].

Existen diferentes rutas por la cual el ambiente es contaminado como lo es la contaminación acústica, la que se produce con cualquier ruido excesivo ya sea en proporción, frecuencia, tono, volumen o ritmo^[10]; la contaminación lumínica, que viene en muy diversas

formas, incluyendo el halo luminoso nocturno, la invasión lumínica, el brillo deslumbrante y la iluminación excesiva ^[11]; la contaminación visual, aquella que en determinado momento perturba la visualización de un espacio público irrumpiendo con la estética del paisaje y que a su vez genera una estimulación visual excesiva, simultánea e invasiva, por elementos llamados distractores ^[12]; la contaminación térmica, es aquella que contribuye al calentamiento global hasta que la temperatura global alcanza un nivel en el que este calor también se emite al espacio ^[13]; la contaminación atmosférica, se puede definir como la presencia de compuestos químicos en el aire atmosférico que son tóxicos y están presentes en concentraciones que pueden ser perjudiciales para la vida y el aire ^[9,14]; la contaminación terrestre o del suelo, esta puede entenderse como una degradación química que conlleva la pérdida de productividad, a parte de los desastres naturales que tienden a dañar el suelo, las principales fuentes de contaminación del suelo son los desechos industriales y domésticos entre estos se incluyen metales pesados, hidrocarburos, solventes inorgánicos y orgánicos^[9,15]; la contaminación hídrica o marina, afecta a ríos, fuentes de agua subterránea, lagos y mar cuando se liberan residuos contaminantes que provienen tanto de fuentes naturales como artificiales ^[9,16].

Entre los diferentes tipos de contaminación se ha notado un creciente interés respecto la contaminación hídrica, Este tipo de contaminación es un problema generalizado, cada vez peor y mal controlado que afecta directamente a la salud humana y de los ecosistemas. El agua, que representa el 70 % de la superficie de nuestro planeta, juega un papel fundamental en la salud ambiental y de quienes lo habitan ^[17]. Por otro lado, se estima que, a nivel mundial, el 80 % de las aguas residuales industriales y municipales se vierten en el medio ambiente sin ningún tratamiento previo, esta proporción es mayor en los países menos adelantados, donde las instalaciones de saneamiento y tratamiento de aguas residuales son muy deficientes ^[18].

1.2 Contaminación Marina

Los humanos han utilizado ambientes marinos desde que el planeta ha estado poblado, inicialmente alimentándose en la orilla de mariscos y otros alimentos, los cuales sin duda dejaron residuos que el mar eliminó. Hasta el siglo XVIII, casi todos los desechos vertidos en el mar eran probablemente orgánicos y podían degradarse en el medio ambiente, pero con la expansión de las

poblaciones humanas y la revolución industrial, que promovió el desarrollo de la economía y tecnología como barcos, mercados desarrollados en los puertos y manufacturación de productos, la escala de eliminación de desechos y la gama de sustancias aumentó drásticamente y comenzó a exceder la capacidad del medio ambiente para asimilar los residuos ^[19].

La contaminación llega al mar a través de una amplia variedad de rutas, las principales vías que transportan contaminantes al mar incluyen descargas directas de la industria y obras municipales, aportes fluviales, fuentes atmosféricas y contaminantes de eliminación en el océano (Fig. 1) ^[20].

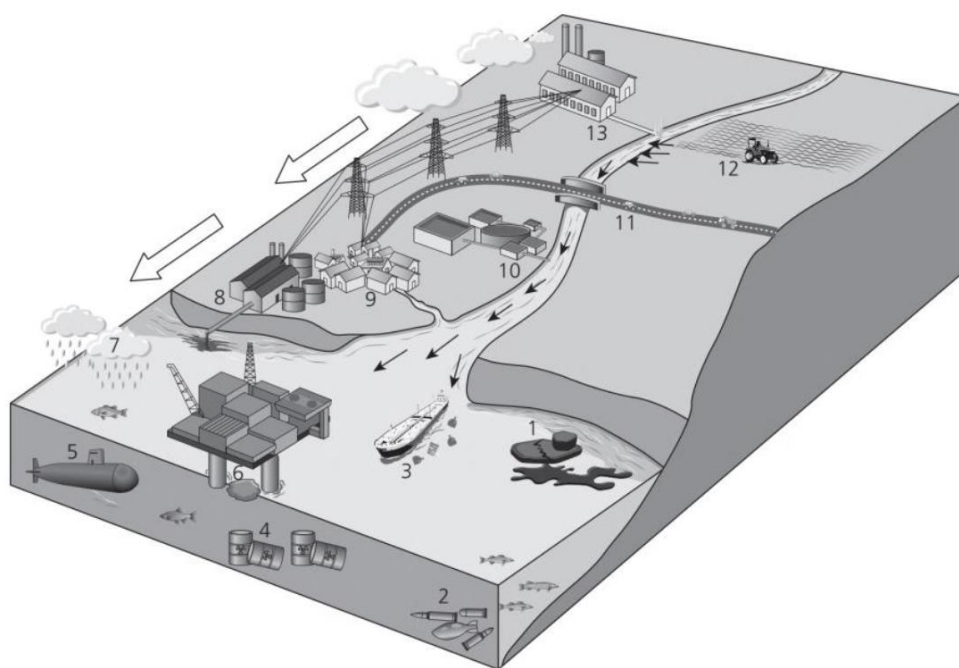


Figura 1. Rutas de contaminación marina. 1. Derrames de petróleo; 2. Municiones pérdidas o tiradas; 3. Residuos de barcos; 4. Vertidos de residuos nucleares e industriales; 5. Embarcaciones extraviadas o abandonadas, sus cargamentos y centrales eléctricas; 6. Recortes de perforación contaminados; 7. Lavado de contaminantes atmosféricos, incluidos metales pesados e hidrocarburos; 8. Vertidos de residuos industriales; 9. Aguas residuales urbanas y drenaje de calles; 10. Efluentes de aguas residuales; 11. Escapes de vehículos (a través de la atmósfera); 12. Fertilizantes y plaguicidas agrícolas; 13. Agua de refrigeración (calor residual)

Dado que la contaminación es un proceso antropogénico y la mayoría de las actividades humanas tienen lugar en la tierra, los hábitats terrestres son el origen de la mayoría de los contaminantes ambientales. Sin embargo, estos contaminantes son transportados al mar por tres vías principales: vía atmosférica, por aporte fluvial (ríos) y por vertido directo al mar ^[21].

El **aporte fluvial (Fig. 1. 8-10,12)** incluye el agua de escorrentía contaminadas y efluentes de desechos líquidos de alcantarillado e industria; los estuarios, la interfaz entre los ecosistemas fluviales y marinos, actúan como filtros que retienen un alto porcentaje de los materiales transportados por los ríos, incluidos los contaminantes a escala global. Los mecanismos relevantes que explican esto son la precipitación de elementos disueltos asociados al aumento de la salinidad, la floculación (aglomeración de partículas) de coloides y la sedimentación de materia en suspensión debido a la disminución de la velocidad de la corriente y la dinámica de las mareas en la desembocadura del río ^[21, 22].

El **aporte atmosférico (Fig. 1. 7,11,13)** sucede por los contaminantes con baja presión de vapor que se evaporan de fuentes terrestres, como los hidrocarburos livianos provenientes de las partículas y gases resultantes de la combustión de materia orgánica, incluidos los combustibles fósiles y su contenido de metales, los plaguicidas y otros productos utilizados como aerosoles. Todos estos contaminantes pueden ser lavados por la lluvia en la superficie del mar ^[21, 22]. Un ejemplo de ello es el hierro (Fe), un micronutriente esencial para los organismos fotosintéticos marinos, es el nutriente que limita la productividad primaria biológica ^[23]. La principal fuente de hierro en mar abierto es la deposición atmosférica, ya que las grandes entradas de hierro al océano desde los ríos se eliminan en gran medida a los sedimentos cerca de la costa ^[24, 25]. El mayor interés por el hierro fue estimulado por Martin, J.H (1990), que sugirió el aumento resultante de la productividad biológica marina, debido al hierro, provocó una reducción adicional de la energía atmosférica. dióxido de carbono, afectando así al clima ^[24, 25].

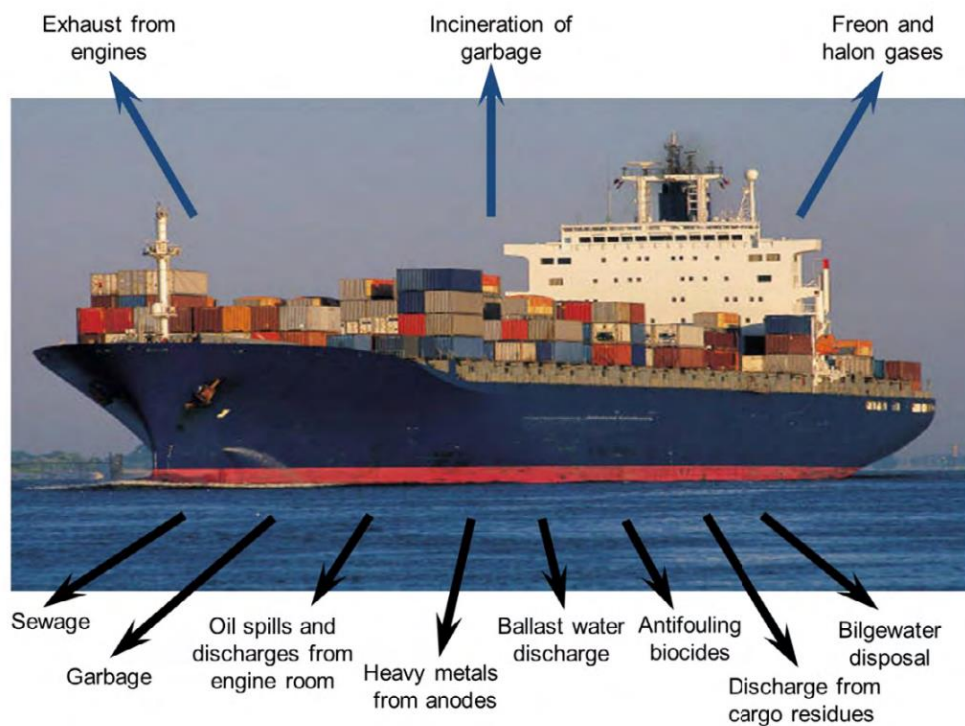
El **aporte directo (Fig. 1. 1-6)** de contaminantes al mar puede ser resultado de vertidos intencionales de desechos, actividades de plataformas petroleras o debido a accidentes de navegación que involucran a petroleros u otros barcos que transportan sustancias peligrosas. El vertido marítimo sigue siendo un procedimiento común para los materiales de dragado. El descarte

de redes de pesca fabricadas con materiales plásticos no degradados en el mar es otro problema ambiental no resuelto ^[21].



Figura 2. Contaminación por transporte marítimo. Fotografía: Danish Siddiqui/Reuters.

La actividad del transporte marítimo, al ser considerado como un aporte directo, puede contaminar debido a un compartimento específico, diseñado para capturar toda el agua que no se escurra por el costado de la cubierta, es la sentina, según el diseño y la función del buque, el agua de sentina puede contener agua, aceite, orina, detergentes, disolventes, productos químicos, brea, partículas y otros materiales. Por lo tanto, la limpieza del tanque de sentina seguramente liberará una cantidad de contaminantes ^[20]. Por otro lado, la prevención del biofouling (contaminación biológica) presenta un peligro ambiental en sí mismo, ya que las capas de pintura y agentes antifouling que cubren todos los costados del barco contienen biocidas (Fig. 3), productos que están diseñados para acabar con los diferentes organismos marinos que intentan adherirse al casco, favoreciendo así la corrosión o disminuyendo el carácter hidrodinámico del barco. Con el tiempo, estos biocidas se disolverán de la matriz de pintura en la que se aplicaron originalmente y terminarán en el mar. Del mismo modo, está el zinc y el aluminio provenientes de la corrosión de los ánodos de sacrificio: bloques de un metal menos noble instalados en contacto con el casco de acero más noble del barco para servir como protección galvánica. Los iones de zinc que se disuelven en estos ánodos terminan en el agua que rodea el casco ^[20].



Figura

3. Contaminación por transporte marítimo

Los vertidos de petróleo son la forma acuática cuantitativamente mayor de contaminación causada por el sector marítimo,

1.3 Composición de petróleo: Hidrocarburos

El aceite de petróleo es un líquido inflamable de color oscuro que se encuentra en todo el mundo en bolsas subterráneas en la capa exterior de rocas de la tierra. En su estado más crudo es una mezcla compleja compuesta por una vasta cantidad de compuestos de hidrocarburos en diferentes proporciones (Tabla 1)^[26].

Tabla 1. Composición elemental de petróleo crudo (Roussel & Boulet, 1995c; Shishkova, 2022)

Elemento	Composición (wt%)
Carbono	83.0 – 87.0
Hidrógeno	10.0 - 14.0
Azufre	0.05 – 9.0
Nitrógeno	0.05 – 3
Oxígeno	0.05 – 2.0
Ni	< 237 ppm
V	< 1200 ppm

Los hidrocarburos son compuestos orgánicos que contienen únicamente carbono e hidrogeno, considerados como los esqueletos básicos en los que se insertan los grupos funcionales ^[29]. Estos compuestos son divididos en dos grandes grupos: alifáticos y aromáticos o arenos, los cuales pueden ser sub-divididos según su grado de saturación, naturaleza o número de ciclos ^[29].

Los hidrocarburos alifáticos son aquellos que no contienen el grupo benceno, es decir, no son de carácter aromático, estos pueden dividirse acíclicos y alicíclicos, que como su nombre lo dice, son estructuras en cadena y de anillos respectivamente ^[30,31]. A diferencia de los alifáticos, los hidrocarburos aromáticos son distinguidos debido a que están compuestos por al menos un anillo de benceno; los hidrocarburos monocíclicos son compuestos que están conformados por un solo ciclo o anillo aromático y presentan ramificaciones de hidrocarburos alifáticos, mientras que los hidrocarburos policíclicos son aquellos conformados por la unión de varios anillos bencénicos (polinucleares) (Fig. 4) ^[30,31].

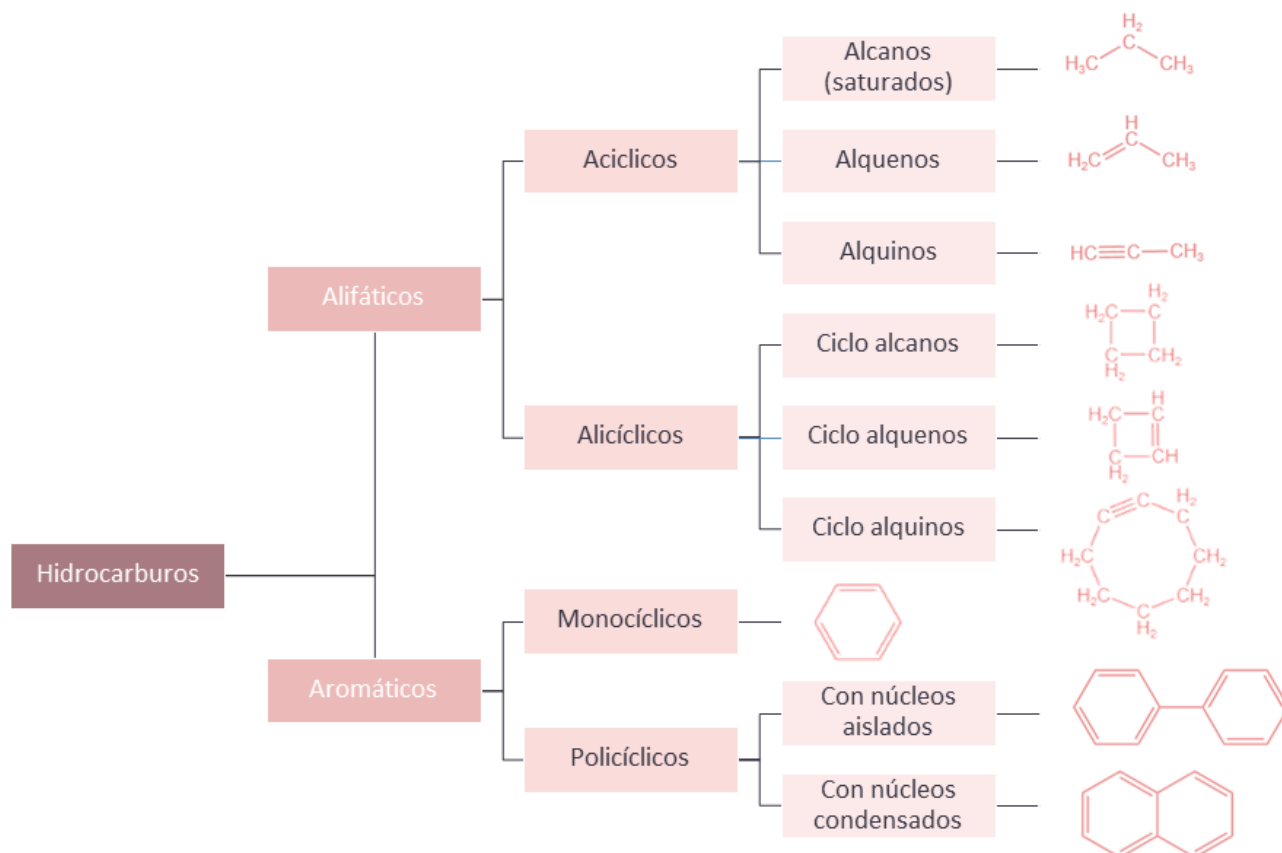


Figura 4. Clasificación de hidrocarburos

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) son los grupos químicos ambientales más grandes, ubicuos y cancerígenos ^[32]; son considerados estables debido a sus anillos estructurales, lo que les permite persistir en el medio ambiente mucho después de que otros componentes de los productos del campo petrolero se hayan degradado, estas sustancias se encuentran de forma natural en el medio ambiente, pero también pueden ser producidas como compuestos individuales. La Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA) de EE. UU. ha clasificado 16 de los HAP como contaminantes prioritarios en función de la toxicidad, el potencial de exposición humana, la frecuencia de ocurrencia en sitios de desechos peligrosos y el alcance de la información disponible (Tabla 2) ^[33].

Tabla 2. Los 16 PAH contaminantes prioritarios de la EPA de EE. UU. y propiedades físico-químicas seleccionadas (Bojes & Pope, 2007)

Hidrocarburos aromáticos policíclicos	Estructura (# de anillos)	Peso molecular (g/mol)	Solubilidad (mg/l)
Acenafteno	3	154.21	3.8
Acenaftileno	3	152.20	16.1
Antraceno	3	178.23	0.045
Benzo[a]antraceno	4	228.29	0.011
Benzo[a]pireno	5	252.32	0.0038
Benzo[b]fluoranteno	5	252.32	0.0015
Benzo[g,h,i]perileno	6	276.34	0.00026
Benzo[k]fluoranteno	5	252.32	0.0008
Criseno	4	228.29	0.0015
Dibenzo[a,h]antraceno	6	278.35	0.0005
Fluoranteno	4	202.26	0.26
Fluoreno	3	166.22	1.9
Indeno[1,2,3-c,d]pireno	6	276.34	0.062
Fenantreno	3	178.23	1.1
Pireno	4	202.26	0.132
Naftaleno	2	128.17	31

Varios HAP han causado tumores en los animales de laboratorio que han respirado, consumido o entrado en contacto a través de la piel durante largos períodos con estos compuestos; así como en los animales, los estudios realizados en los seres humanos demuestran que las personas expuestas durante largos períodos con mezclas que contienen HAP también pueden contraer cáncer ^[35]. Sin embargo, estos solo son los daños a la salud, por la parte ambiental la

bioacumulación de HAP (como naftaleno, fenantreno y pireno) también puede perturbar el medio ambiente marino a nivel de ecosistema, y los efectos se exageran cuando se combinan con otros impactos ambientales asociados con el cambio climático como el calentamiento global ^[36].

1.3.1 Naftaleno

El naftaleno (Fig. 5) es el miembro más volátil de los HAP. Es ubicuamente descargado al ambiente por procesos de combustión incompletos de fuentes industriales, domésticas y naturales ^[37]. La mayor parte de la liberación de naftaleno al ambiente es atribuible a la atmósfera (90 %), con liberaciones menores al agua (5 %) y al suelo (3 %) ^[38].

La exposición al naftaleno se ha asociado con efectos sobre la salud cancerígenos y no cancerígenos; entre estos se encuentra la incidencia de adenomas epiteliales respiratorios nasales (un tumor benigno), neuroblastomas epiteliales olfativos de la nariz (un tumor maligno) y adenomas alveolares/bronquiolares pulmonares (un tumor benigno) en ratones ^[39,40]. En humanos, se ha documentado el aumento del cáncer colorrectal entre pacientes nigerianos con antecedentes de tomar un tratamiento autóctono que contiene naftalina para problemas ano rectales ^[41,42].

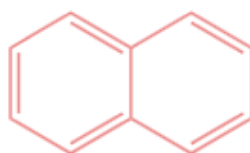


Figura 5. Estructura esquelética de naftaleno

1.3.2 Fenantreno

El fenantreno (Fig. 6) es uno de los HAP de mayor concentración en el diésel, este isómero del antraceno está constituido por una fusión de tres anillos de benceno y corresponde a un hidrocarburo policíclico aromático de bajo peso molecular, es reconocido como componente muy tóxico para los organismos acuáticos y bastante nocivo para el medio ambiente ^[43]. La exposición al fenantreno, en particular, se ha relacionado con efectos en el comportamiento, como la incapacidad para coordinar los movimientos musculares, la locomoción y la respiración lenta en

los anfípodos ^[44], la reproducción reducida en los copépodos ^[45] e incluso la mortalidad en los anfípodos, copépodos y poliquetos.



Figura 6. Estructura esquelética de fenantreno

1.3.3 Pireno

El nivel tóxico de los HAP tiende a aumentar a medida que aumenta la estructura del miembro del anillo aromático, como lo es en el caso del pireno: es uno de los PAH con un nivel de toxicidad relativamente alto debido a su estable estructura de 4 anillos de benceno ^[46].

El pireno (Fig. 7) se puede derivar del alquitrán de hulla, pero no hay producción comercial ni uso comercial conocido de este compuesto. El pireno del alquitrán de hulla se ha utilizado como material de partida para la síntesis de benzo[a]pireno (IARC, 1983) ^[47].



Figura 7. Estructura esquelética de pireno

El pireno generalmente se forma cuando un material, como la gasolina o la madera, se quema de forma incompleta, este se adhiere a partículas muy pequeñas que van al aire y se depositan en el suelo o en estanques, lagos o ríos. El pireno también puede ser arrastrado al agua por la lluvia y asentarse en los sedimentos marinos, cuando se adhiere a partículas en el suelo o el agua, los animales, incluidos los peces, o las plantas pueden consumirlo afectando el medio ambiente. Como una de las características de los HAP, el pireno es difícil de degradar, ya que se

acumula en el medioambiente incluyendo a organismos vivos; aparentemente este componente ha sido liberado en el ambiente por un largo tiempo, por lo que en combinación con los efectos del cambio climático puede interrumpir el balance ecológico ^[48].

1.4 Remoción de HAP: Biorremediación

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) están muy extendidos en medios naturales como suelos, sedimentos, agua y aire; debido a su hidrofobicidad y baja solubilidad en agua, están fuertemente asociados con sedimentos en medios naturales completos durante sus ciclos de vida. ^[49,50]. Se ha prestado mucha atención a los HAP como contaminantes predominantes porque su exposición a los organismos acuáticos puede causar un peligro ecotóxico que resulta en el peligro potencial de bioacumulación ^[51]. Afortunadamente, gracias a los continuos avances tecnológicos, se han desarrollado diferentes técnicas conocidas como *remediación*; estas técnicas se pueden dividir generalmente en dos grandes grupos, los cuales son fisicoquímicas y biológicas. Por otra parte, cuando se habla específicamente de *remediación marina*, esta se clasifica en 4 principales grupos: métodos físicos, químicos, térmicos y biológicos ^[52,53].

Las técnicas **físicas** incluyen barreras, skimmers y materiales absorbentes; las barreras contienen el derrame de petróleo, evitando que se propague, que posteriormente se limpia mediante el uso de skimmers conocidos también como desnatadores (en discos, correas, tambores y cepillos.) y/o materiales absorbentes o alguna otra técnica de remediación ^[54].

Los métodos **químicos** modifican las propiedades físicas y químicas del aceite. Por lo general, son más baratos, se utilizan en combinación con métodos físicos y requieren menos mano de obra que la recuperación mecánica de petróleo, sin embargo, alteran las propiedades del aceite, impidiendo la reutilización del aceite recolectado ^[55]. Se utilizan dispersantes, desemulsionantes, solidificantes y/o productos químicos de película superficial; la remediación físico-química es una remediación a corto plazo e incompleta, alrededor del 10-15% de los contaminantes se pueden eliminar de los medios marinos ^[56].

En las técnicas de remediación **térmica**, el derrame de petróleo contenido por las barreras simplemente se incendia. Este método de respuesta ante derrames de petróleo es efectivo en

condiciones de viento en calma y derrames de petróleo fresco o productos refinados livianos que se queman rápidamente sin causar ningún peligro para el medio marino ^[52,53].

Por último, la remediación **biológica** también conocida como **Biorremediación**, es una técnica donde los microorganismos transforman o metabolizan cualquier sustancia química y restablecen la calidad ambiental. Los microorganismos aceleran el proceso de degradación natural de los contaminantes al asimilar moléculas orgánicas a biomasa celular con dióxido de carbono, agua y calor como subproductos ^[57]. Por ejemplo, en el caso de un derrame de petróleo marino, los microorganismos nativos del ambiente autóctono tienen la capacidad de degradar los hidrocarburos. Tanto los hidrocarburos alifáticos como los aromáticos pueden ser degradados por una variedad de microorganismos, pero tienen diferentes velocidades de degradación ^[52]. Aquellos organismos que tienen afinidad por la degradación de hidrocarburos se les conoce como bacterias hidrocarbonoclastas (HCB), que utilizan a estos compuestos orgánicos como fuente complementaria de carbono y energía para su crecimiento; también existen las hidrocarbonoclastas obligadas (OHCB) las cuales se alimentan casi exclusivamente de los hidrocarburos (un rasgo metabólico, denominado "paradigma OHCB" denominado así por Yakimov, 2022) ^[58]

Hasta la fecha se conoce una amplia variedad de bacterias degradadoras de hidrocarburos de petróleo, la mayoría de las bacterias hidrocarbonoclasticas metabolizan hidrocarburos alifáticos o aromáticos, aunque se ha demostrado que algunas bacterias como las cepas de *Pseudomonas* y *Rhodococcus* degradan ambos tipos de hidrocarburos ^[59].

La capacidad de una bacteria para degradar los hidrocarburos del petróleo se puede evaluar a partir de su taxonomía y fisiología. El uso de secuencias parciales del gen ribosomal 16S (16S rRNA) permite determinar una ubicación taxonómica, mientras que por otro lado es posible conocer algunas propiedades fisiológicas sobre requerimientos nutricionales mediante el cultivo y manejo de la bacteria *in vitro* ^[60].

2. Antecedentes

En 2018, integrantes del laboratorio de Bacteriología Marina (Instituto de Investigaciones Oceanológicas, Universidad Autónoma de Baja California) aislaron de 52 cepas a partir de muestras de sedimentos marinos y agua de mar superficial recolectadas en tres sitios en la zona costera del puerto de Rosarito, Baja California, México haciendo uso de medio BH suplementado con 25 mgL^{-1} de pireno y recuperando las colonias morfológicamente distintas^[61]. A partir de las mismas muestras recolectadas en la zona de estudio, se aislaron cepas en presencia de 25 mgL^{-1} de fenantreno y se identificaron molecularmente a través de la amplificación y secuenciación del gen ribosomal 16S. El 29.8% de los aislados pertenecen al phylum Actinomycetota y uno de ellos fue identificado como *Nesterenkonia* sp.

Nesterenkonia es un género bacteriano que cuenta con 24 especies. Entre sus características reportadas se encuentra que son células cocoides gram-positivas, quimioorganotróficas, halotolerantes, aeróbicas y mesófilas. Varias cepas de este género son de gran interés biotecnológico puesto que han mostrado tolerancia al crecimiento en ambientes contaminados con hidrocarburos aromáticos policíclicos, ganándose el término de hidrocarbonoclasta^[62-64]. Al ser bacterias hidrocarbonoclastas halotolerantes ofrecen la posibilidad de ser utilizadas para técnicas de biorremediación marina, como la bioestimulación. Debido a lo anterior, se resalta la importancia de estudiar la capacidad metabólica hacia hidrocarburos de cepas de *Nesterenkonia* aislada de zonas impactadas con hidrocarburos con la finalidad de utilizarla como una herramienta para proyectos de biorremediación.

3. Hipótesis

Nesterenkonia sp. CSB8-2 es una cepa halófila capaz de degradar hidrocarburos aromáticos policíclicos y utilizarlos como fuente de carbono y energía, con capacidad de generar biopelículas que ayudan en la estabilización de hidrocarburos dispersos a través de la interfaz agua-petróleo y, por lo tanto, es un método sostenible que puede ser utilizado en la biorremediación marina.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Caracterización de la potencial actividad hidrocarbonoclasta de la cepa *Nesterenkonia* sp. CSB8-2, aislada del Puerto de Rosarito, Baja California, México, en presencia de HAP.

4.2. Objetivos particulares

1. Establecer los niveles de salinidad óptimos para el crecimiento de *Nesterenkonia* sp. CSB8-2.
2. Determinar el rango de concentraciones de naftaleno, fenantreno y pireno para el crecimiento de *Nesterenkonia* sp. CSB8-2 en medio sólido, así como el sustrato preferencial.
3. Observar la capacidad de crecimiento de *Nesterenkonia* sp. CSB8-2 en petróleo.
4. Evaluar el crecimiento de *Nesterenkonia* sp. CSB8-2 en presencia del sustrato preferencial.
5. Evaluar la producción de biosurfactantes y la formación de biopelículas de la cepa *Nesterenkonia* sp. CSB8-2 en presencia del sustrato preferencial.

5. Materiales y Métodos

5.1 Microorganismo de estudio y medios de cultivo

Nesterenkonia sp. CSB8-2 es una cepa bacteriana aislada de sedimentos marinos de la zona costera del Puerto de Rosarito, Baja California, México. La cepa fue aislada en medio Bushnell Haas suplementado con 25 mgL^{-1} de fenantreno. *Nesterenkonia sp.* CSB8-2 fue identificada como *Nesterenkonia sp.* CSB8-2 a partir de la secuenciación del gen 16S ribosomal. Los medios utilizados durante este trabajo fueron Luria-Bertani (LB), Zobell (MZ) y Bushnell Haas (BH). El medio Luria-Bertani está compuesto por 1 g de triptona, 0.5 g de extracto de levadura y 1 g de cloruro de sodio (NaCl) por cada 100 mL de agua destilada. El medio Zobell está compuesto 0.5 g de por peptona, 0.1 g extracto de levadura, 100 μL de cloruro férrico (FeCl_3), 75 mL agua de mar y 24.9 mL agua destilada para un total de 100 mL de medio líquido. El medio Bushnell Haas contiene 0.32 g de sales Bushnell-Haas (las cuales por cada 100 mL contienen 0.02g de MgSO_4 , 0.002 g de CaCl_2 , 0.10 g de KH_2PO_4 , 0.10 g de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 0.10 g de KNO_3 , 0.01 g de FeCl_3) y 1.5g de cloruro de sodio (NaCl) por cada 100 mL de agua destilada.

Para los medios sólidos, a éstos se les adicionó agar bacteriológico en una razón de 15gL^{-1} .

5.2 Pruebas de salinidad en medio sólido

Para determinar si la cepa CSB8-2 es una bacteria halotolerante o halófila se creció en placas con medio LB y agar suplementadas con distintos porcentajes de NaCl (0,1, 3, 5, 10, 15 y 20%). La prueba se realizó colocando 50 μL de un pre-inóculo de 48 h con densidad óptica inicial de 0.1 medida en un espectrofotómetro. Las placas se incubaron a temperatura ambiente y el crecimiento se monitoreó visualmente durante 10 días.

5.3 Rango de concentraciones de hidrocarburos aromáticos policíclicos en medio sólido.

Para determinar el rango de hidrocarburos aromáticos policíclicos que utiliza y/o que puede tolerar la cepa CSB8-2 se hizo uso de placas con medios sólidos MZ y BH suplementados con

naftaleno, fenantreno o pireno a las concentraciones de 0, 0.1, 0.5, 1, 3, 5 o 10 gL⁻¹. Las pruebas en los medios MZ se incubaron durante 10 días mientras que los cultivos en BH se incubaron por 20 días.

5.4 Curva de Crecimiento Bacteriano

Una vez estimado el porcentaje de salinidad óptimo, así como la concentración de hidrocarburos que puede tolerar la cepa CSB8-2, y cuál es su sustrato preferencial, se inició con la curva de crecimiento. Para ello, fue preparado un pre-inóculo en 25 mL de medio líquido LB con un porcentaje de sal de 3% para dejarlo crecer durante 48 horas a 25 °C en agitación. Una vez pasadas las 48 horas fue necesario realizar un lavado celular para eliminar productos del metabolismo, entre otras moléculas que no sean las células bacterianas. Dicho lavado consistió en centrifugar en tubos falcón el pre-inóculo por 15 minutos a 6.5 k rpm, al terminar este paso se descartó el sobrenadante cuidando de no perder la pastilla celular la cual será suspendida en 1mL de medio BH en un tubo Eppendorf. Una vez re-suspendido se centrifugó por 1 minuto a 13 k rpm, este último paso se repitió tres veces más antes de re-suspender la pastilla celular por última vez en medio LB.

Haciendo uso del espectrofotómetro de UV-visible, se midió la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm (OD₆₀₀) del pre-inóculo para determinar el volumen a colocar en los matraces a inocular para obtener una OD₆₀₀ inicial de 0.100. Se utilizó un blanco, el cual fue medio LB, para que el espectrofotómetro realice la diferencia entre las células bacterianas y los nutrientes del medio.

Para realizar la curva de crecimiento se utilizó medio LB + NaCl óptimo suplementado con 0, 0.025, 0.05 o 0.1 gL⁻¹ del sustrato preferencial. Los matraces con el medio suplementado con el HAP preferencial fueron inoculados a una OD₆₀₀ = 0.100, es decir, que todos los cultivos empezaron con las mismas condiciones iniciales respecto a la cantidad de células.

Desde el momento de inoculación se consideró como inicio del experimento, es decir, la hora cero (0). El crecimiento bacteriano se monitoreó espectrofotométricamente (OD₆₀₀) cada dos horas durante 30 horas en medio LB.

De igual forma, se realizó una curva de crecimiento bacteriano haciendo uso de medio BH para los lavados y los matraces inoculados que fueron monitoreados. A diferencia de la curva realizada en medio LB, se monitoreó el experimento por 7 días.

5.5 Crecimiento de la cepa bacteriana en Petróleo

Para observar el comportamiento de *Nesterenkonia sp.* CSB8-2 en presencia de petróleo se inocularon tubos de ensayo con medio LB y se les adicionó 1% de petróleo crudo pesado diluido 1:5 (v/v) con hexano para facilitar la inserción en el medio.

Los cultivos líquidos se incubaron a temperatura ambiente y en agitación constante durante 30 días. El crecimiento bacteriano fue monitoreado visualmente por la aparición de turbidez y por la desaparición de la mezcla de petróleo en el medio. El medio LB con 1% de la dilución de petróleo y sin inocular se utilizó como control abiótico.

5.6 Producción de Biopelículas

La producción de las biopelículas por *Nesterenkonia sp.* CSB8-2 se cuantificó siguiendo el método reportado por O'Toole y Kolter (1998) con algunas modificaciones. Al igual que en la curva de crecimiento se utilizó un pre-inóculo de 48 horas a 25°C en agitación para después realizarle un lavado celular.

Se prepararon placas Petri de 50 mm de diámetro con 10 mL de medio LB suplementado con 0, 0.025, 0.05 o 0.1 gL⁻¹ de fenantreno.

Cada muestra tuvo su respectivo control negativo, por lo que se obtuvieron placas con las mismas condiciones que las mencionadas, sin embargo, no se inocularon. La prueba se realizó con un tiempo de incubación de 48 horas, una vez finalizado se desechó el medio de cultivo por pipeteo, se le colocaron 2 mL de cristal violeta 4% y se dejó tiñendo por 15 minutos. Al terminar el tiempo de tinción se descartó el tinte por medio de pipeteo y se realizaron 3 lavados con agua cuidando de no desprender la capa de biopelículas para luego dejarlas secar durante 24 horas.

Terminadas las 24 horas de secado se le colocaron 10 mL de EtOH 70% a cada caja Petri ^[18]. La solución obtenida se midió en un espectrofotómetro a 540 nm.

5.7 Prueba cualitativa de producción de biosurfactantes

La prueba de agar azul de metileno es un ensayo semicuantitativo para la detección de tensioactivos aniónicos extracelulares, desarrollado por Sigmund y Wagner (1991), debido a dicho ensayo se utilizó agar mineral con bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) y azul de metileno (MB) para detectar la producción de ramnolípidos gracias a la formación de unos halos de color azul debido a la interacción entre el ramnolípidos, el CTAB y el azul de metileno en la placa de agar. Como control positivo se utilizaron una solución de dodecilsulfato sulfato de sodio (SDS) al 1%, un surfactante aniónico.

5.8 Ensayo de emulsificación E24

Haciendo uso de la curva de crecimiento obtenida se eligieron los tiempos 0, 6, 10, 14, 26 y 30 después de la inoculación como puntos de monitoreo para la prueba de producción de biosurfactantes. De igual forma que en experimentos anteriores, se inoculó un matraz con medio LB + NaCl 3% a OD₆₀₀ inicial y se incubaron a 25°C, 48 h y en agitación constante. En cada tiempo seleccionado, se midió la DO₆₀₀ y se tomaron muestras de cada cultivo. Para el ensayo se utilizaron dos tipos de muestras: con células y sin células. En el primer caso, se colocaron 500 µL del cultivo en un tubo de ensayo; mientras que, en el segundo caso, la muestra sustraída del medio de cultivo se centrifugó por 1 minuto a 13 k rpm en un tubo de 1.5 mL. Cuidando de no tocar la pastilla celular, se transfirieron 500 µL del sobrenadante a un tubo de ensayo.

A los tubos que contienen las muestras de ambos tratamientos, se les colocaron tolueno y se agitaron en vórtex por 1 minuto. Por último, se dejaron en reposo por 24 horas. Esto fue repetido para cada tiempo de monitoreo designado.

El índice de emulsificación (E24) se calculó como porcentaje de la altura de la capa emulsionada (mm) dividido por la altura total de la columna de líquido (mm).

Dicho experimento fue repetido agregando al medio de cultivo 0, 0.025, 0.05 o 0.1 gL⁻¹ del hidrocarburo utilizado en la curva de crecimiento bacteriano realizada. Como control positivo se utilizó SDS (dodecilsulfato de sodio) al 1% y como control negativo se utilizó medio LB sin inocular.

5.9 Extracción de ADN genómico

Para poder realizar pruebas de detección de genes de degradación de hidrocarburos fue necesario extraer el ADN que se utilizó en la reacción en cadena de la polimerasa. Se vertió 1.5 mL de un de pre-inóculo en medio LB en un tubo de ensayo incubado por 24 horas en agitación a un tubo de 1.5 mL y se centrifugó por 1 minuto a 13,000 rpm. El sobrenadante se descartó para suspender y mezclar la pastilla celular en 450 µL de Tris clorhidrato (TE, Tris HCl) obteniendo una mezcla homogénea que fue centrifugada por 2 minutos a 13,000 rpm, esta fase se repitió 3 veces en total. A la pastilla celular lavada se le agregarán 200 µL de TE y 20 µL de lisozima 40 mg*mL⁻¹ y se dejó en reposo toda la noche a 37 °C.

Al siguiente día, a la solución incubada toda la noche, se le adicionaron 50 µL de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 10% y se mezcló por inversión y posteriormente se incubó por 4 horas a 65 °C. Fue necesario dejar enfriar los tubos una vez finalizada la incubación, puesto que se agregó 3 µL de RNasa y nuevamente se dejó en incubación a 37 °C por 30 minutos. Posteriormente se adicionaron 100 µL de NaCl 5 M y volvió a ser incubado a 65°C por 10 minutos. Después de ello, se añadieron 80 µL de Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) y se incubó por 20 minutos a 65 °C.

Terminada la serie de incubaciones se mezcló 700 µL de Cloroformo alcohol-isoamílico (CLA) y centrifugó por 10 minutos a 13,000 rpm, en este paso se pudo observar una capa que divide dos fases líquidas, donde la parte superior, es decir la fase acuosa, se recuperó y se colocó en un tubo nuevo al cual se le integró 60% del volumen recuperado de Fenol cloroformo alcohol-isoamílico (FCI), para proseguir a centrifugar la mezcla por 5 minutos. Se recuperó la capa superior y se trasladó a un tubo nuevo agregándole 60% del volumen recuperado de CLA y se centrifugó por 5 minutos. Cada vez se obtuvo una capa más fina debajo de la fase líquida superior por lo que fue necesario tener cuidado de no romperla y solamente obtener el sobrenadante que se colocó en

otro tubo con 60% del volumen recuperado de isopropanol. Se debió mezclar por inversión y dejar reposar por 5 minutos en el congelador.

La mezcla se centrifugó por 10 minutos a 13,000 rpm para recuperar el material genético, el cual se lavó 3 veces con 500 μ L de etanol al 70%. Después del último lavado con etanol al 70%, se recuperó la pastilla que contiene el material genético por centrifugación por 5 minutos. El ADN recuperado fue secado a 37 °C hasta no ver humedad. Por último, el ADN se re suspendió 30 μ L de TE y se incubó toda la noche a 4 °C.

Se corrieron las mezclas obtenidas en un gel de agarosa 1.5% para verificar que se obtuvo ADN exitosamente.

5.10 Detección de genes de degradación de hidrocarburos

Se realizaron pruebas de reacción en cadena de la polimerasa (PCRs) en el termociclador Bio Rad T100™ Thermal Cycler para detectar presencia de los genes *alkB* (Alcano monooxigenasa) y *pahE* (Aldolasa hidratasa). Para el análisis de *alkB*, se amplificó un fragmento de 100 pb utilizando los primers (Forward: 5'AACTACMTCGARCAYTACGG3', Reverse: 5'TGAMGATGTGGTYRCTGTTCC3') y condiciones detalladas en la literatura de Liu Q (2015) [66]. Con respecto al fragmento de 377pb del gen *pahE*, los primers (Forward: 5'TGCGGCGGGTGTNAAYGGNAT3', Reverse: 5'CCTGAGGAATCTCGGACATYTSTGCCCARAA3') y sus condiciones son basados en el artículo elaborado por Liang C, (2019) [67]. Cabe mencionar que las condiciones fueron modificadas para ser adaptadas al termociclador del laboratorio, por lo que para *alkB* la etapa de desnaturalización inicial es a 94°C por 5 minutos, la desnaturalización a 94C por 60 segundos, la etapa de anillamiento a 59C por 2 minutos y la extensión final a 72C por 1 minuto, manteniendo los 35 ciclos. Mientras que para *pahE*; la etapa de desnaturalización inicial es a 94°C por 5 minutos, la desnaturalización a 94C por 30 segundos, la etapa de anillamiento a 60C por 45 segundos y la extensión final a 72C por 30 segundos, manteniendo los 35 ciclos.

El ADN de las cepas MSA14 de *Rhodococcus ruber* (Silva-Jiménez y col. 2018) y RPhXX de *Acinetobacter lwoffii* fue utilizado como control positivo para los genes *alkB*, *Tol/Bifenilo* y *pahE*.

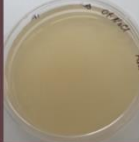

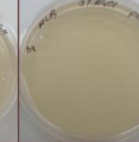
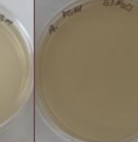
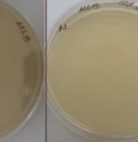
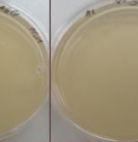
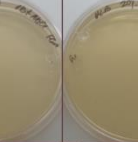
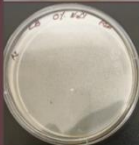




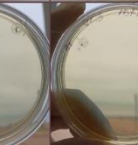

Los resultados se observaron por medio de electroforesis en geles de agarosa 1.5% haciendo uso del transiluminador de luz UV.

6. Resultados

6.1 Pruebas de Salinidad en Medio Sólido

Para determinar el porcentaje de NaCl óptimo, *Nesterenkonia sp.* CSB8-2 fue crecida en distintas concentraciones de NaCl. Durante las primeras 24 horas de incubación ninguna de las placas mostró crecimiento; no fue sino hasta las 72 horas cuando se notó crecimiento en las placas inoculadas; en 0% de NaCl hubo ligero crecimiento, en 1% de NaCl ligero crecimiento con colonias incoloras y en 3% de NaCl se observó un abundante crecimiento de la cepa, presentando una coloración naranja característica de la cepa, mientras que en 5% y 10% de NaCl apenas era visible el crecimiento y por último, en 15% y 20% de NaCl no se observó crecimiento (Tabla 3).

Tabla 3. Prueba de salinidad en medio Luria- Bertani

NaCl	0%	1%	3%	5%	10%	15%	20%
Día 0							
Medio Nutritivo							
Día 5							

En el cuarto y quinto día solo hubo cambios en las placas de 3% de NaCl, donde la superficie acaparada por la bacteria era aún mayor que los días anteriores y su característico color naranja se mostró más pronunciado. Debido a esto, y la gran rapidez con la que creció la cepa, se determinó que su porcentaje de salinidad óptimo de crecimiento es de 3% (Tabla 3).

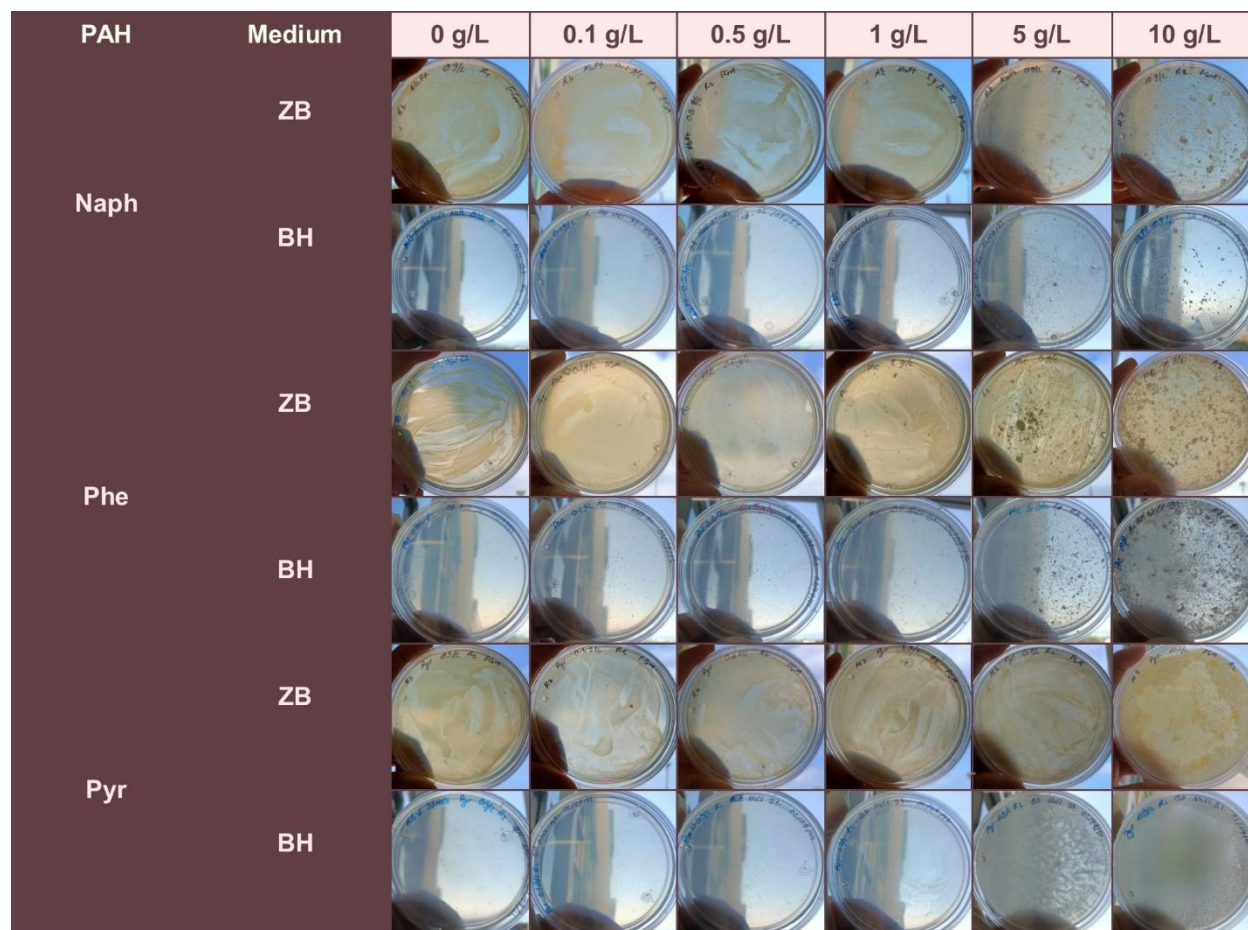
6.2 Rango de Concentraciones de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en Medio Solido

A partir de este experimento se entra en el tema principal de esta investigación, dado que el interés generado por *Nesterenkonia sp.* CSB8-2 es su potencial actividad hidrocarbonoclasta. Se utilizaron dos medios distintos que permitieron evaluar la adaptación de la cepa según los hidrocarburos y nutrientes proporcionados, el tiempo de incubación duró 20 días para las placas Bushnell-Haas y 10 para las placas Zobell. En el día 0 no hubo crecimiento alguno. En las imágenes de la tabla 4, es importante no confundir los cristales de hidrocarburo (en las concentraciones más altas) con colonias bacterianas.

Tabla 4. Crecimiento de *Nesterenkonia* en diferentes HAP. La cepa CSB8-2 se inoculó en medio ZB y BH suplementado con Naph, Phe o Pyr a diversas concentraciones y se incubó durante 10 días para medio ZB y 20 días para medio BH. Las imágenes corresponden al día de la inoculación.

PAH	Medium	0 g/L	0.1 g/L	0.5 g/L	1 g/L	5 g/L	10 g/L
Naph	ZB						
	BH						
Phe	ZB						
	BH						
Pyr	ZB						
	BH						

Tabla 5. Crecimiento de *Nesterenkonia* en diferentes HAP. La cepa CSB8-2 se creció en medio ZB y BH suplementado con Naph, Phe, Pyr a diversas concentraciones. Las placas inoculadas con la cepa CSB8-2 se dejaron incubar durante 10 días para medio ZB y 20 días para medio BH. Las imágenes corresponden al último día de incubación en cada medio de cultivo.



En las placas de medio Zobell (ZB) con naftaleno se observa el crecimiento desde el tercer día en las concentraciones de 0 a 10 gL⁻¹. De forma contraria, en las placas Bushnell-Haas (BH) no se obtuvo crecimiento alguno (Tabla 5).

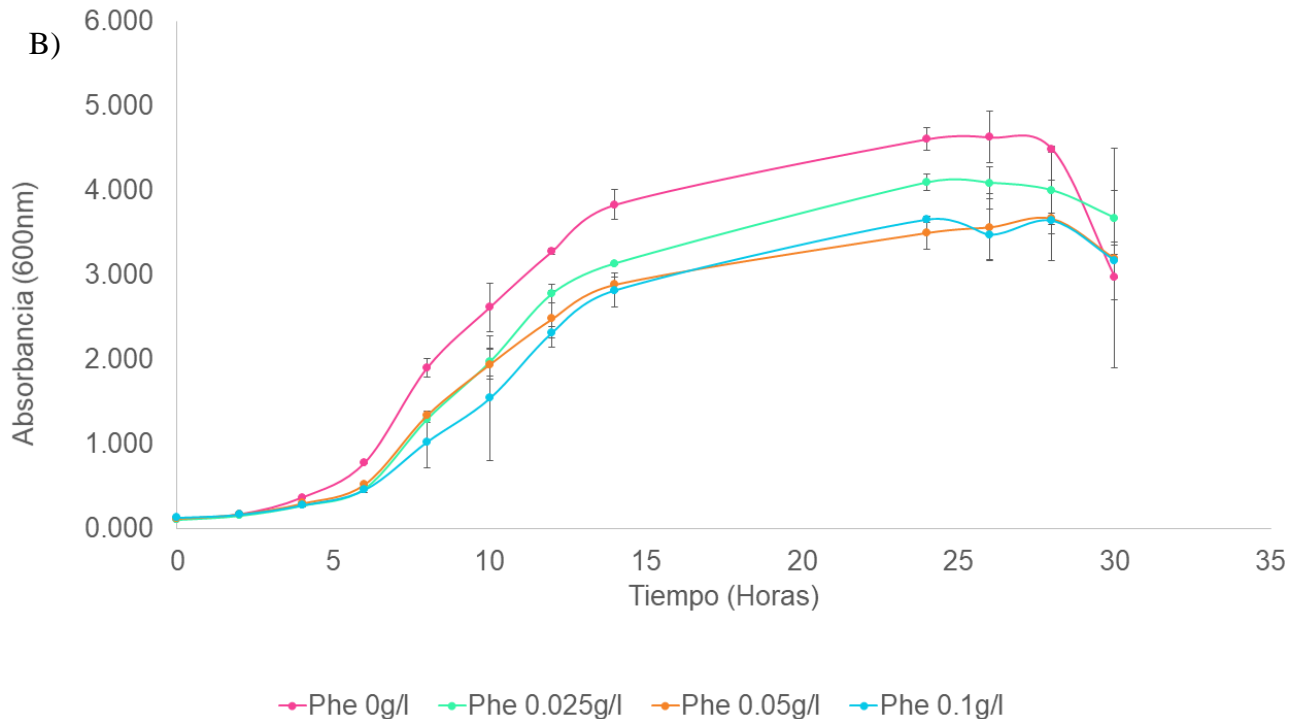
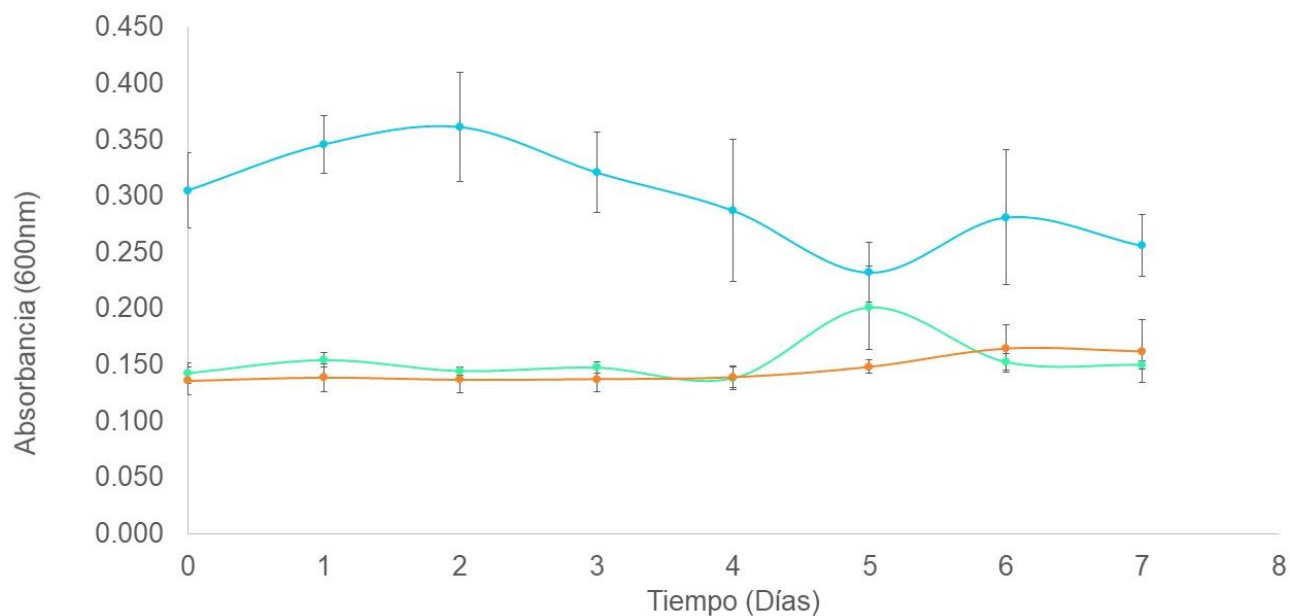
Con fenantreno en ZB hubo crecimiento a las 72 horas de incubación, pero solamente en las placas de 0 a 5gL⁻¹ y desde las 48 horas en la concentración de 0.1gL⁻¹. A partir del día 6 la placa de 10 gL⁻¹ mostró el mismo crecimiento que el resto de las concentraciones, para el décimo día todo el rango de tolerancia contenía un buen crecimiento con coloración naranja por toda la superficie. Una vez más, no hubo crecimiento en las placas BH suplementadas con fenantreno (Tabla 5).

Las placas ZB con pireno obtuvieron crecimiento en las concentraciones de $0-5\text{gL}^{-1}$ hasta el tercer día y terminado los 10 días todas las concentraciones contenían un buen crecimiento con coloración naranja en la mayoría del área superficial de las placas. Cabe mencionar que tanto en naftaleno como pireno el área de crecimiento era mucho menor en comparación con fenantreno durante los primeros días de desarrollo (Tabla 5).

6.3 Curva de Crecimiento Bacteriano

Se ha determinado que en un sistema cerrado (sin agregar alimentos, sin eliminar desechos) las bacterias crecerán en un patrón predecible, lo que dará como resultado una curva de crecimiento compuesta por cuatro fases distintas de crecimiento: la fase de latencia, la exponencial o logarítmica, la fase estacionaria y la fase de muerte o decadencia. Además, a partir de la curva de crecimiento se puede calcular tiempo de generación para un organismo en particular, es decir, la cantidad de tiempo que tarda la población en duplicarse. La curva de crecimiento es un experimento esencial en la caracterización de cepas bacterianas debido a que nos informa sobre sus funciones fisiológicas y metabólicas, y también es útil para obtener un número exacto de células de la bacteria para aplicaciones posteriores.

Para determinar la concentración óptima de crecimiento en fenantreno y si el sustrato preferencial le sirve como fuente de carbono y energía, se realizaron curvas de crecimiento en medio BH con 3% NaCl y en medio LB con 3% NaCl suplementados con las diferentes concentraciones de fenantreno, 0.025 gL^{-1} , 0.05 gL^{-1} o 0.1 gL^{-1} (Fig. 8).



B) una semana. **B)** *Nesterenkonia* sp. se creció en diferentes concentraciones de fenantreno en medio LB + NaCl al 3%. El crecimiento fue monitoreado cada dos horas durante se midieron las muestras en el espectrofotómetro, hasta llegar a las 30 horas. En ambos casos, el crecimiento fue seguido por medir la densidad óptica (DO) a 600 nm en un espectrofotómetro. Las barras verticales representan la desviación estándar (n=3).

El crecimiento de *Nesterenkonia* sp. CSB8-2 en medio BH + 3% NaCl fue monitoreado durante una semana y no se observó un aumento de la absorbancia a 600 nm en ninguna de las concentraciones evaluadas (Fig. 8-A). Sin embargo, cuando la cepa *Nesterenkonia* sp. CSB8-2es

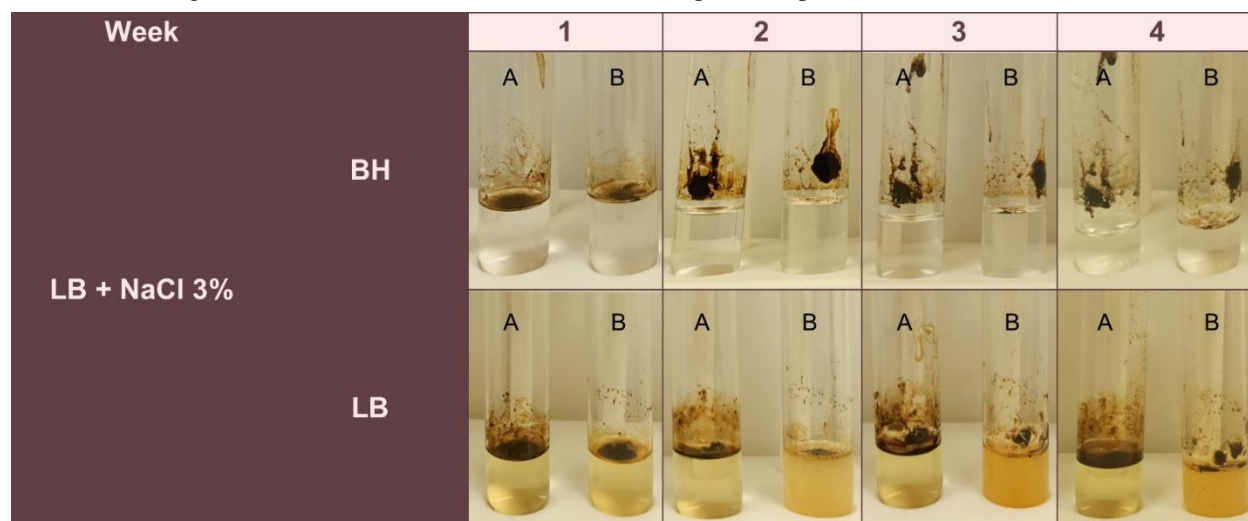
crecida en medio LB + 3% NaCl suplementado con las tres concentraciones de fenantreno si se observa un aumento en la D.O._(600 nm) (Fig. 8-B). , Al observar las gráficas correspondientes al crecimiento sin y con fenantreno, se puede ver que de las 0 a 6 horas se encuentra la fase de latencia, a partir de ahí hasta aproximadamente las 14 horas abarca su fase exponencial, y su fase estacionaria va de las 14 horas hasta las 30 horas, donde finalmente comienza la fase de muerte.

Por otro lado, al analizar el efecto que tiene el fenantreno en el crecimiento de *Nesterenkonia sp.* CSB8-2 se puede observar que, con respecto al crecimiento en LB + 3% NaCl, las concentraciones de 0.025, 0.05 y 0.1 gL⁻¹ de fenantreno no afectan considerablemente el crecimiento de CSB8-2.

6.4 Crecimiento de la Cepa Bacteriana en Petróleo

Con la finalidad de ver la potencialidad de *Nesterenkonia sp.* CSB8-2 para la degradación de una mezcla compleja de hidrocarburos, la cepa fue crecida con 1% de petróleo crudo pesado diluido 1:5 (v/v) con hexano en medio LB y BH.

Tabla 6. Crecimiento de *Nesterenkonia sp.* CSB8-2 en petróleo crudo fracción pesada. La cepa *Nesterenkonia sp.* CSB8-2 se creció en medio BH y LB suplementado con 1% de petróleo diluido 1:5 con hexano y se monitoreo la turbidez como signo de crecimiento, así como los cambios de aspecto del petróleo durante 30 días.



En los cultivos en BH no se observó crecimiento de la cepa ni cambios en la apariencia del petróleo durante las cuatro semanas de incubación. Aunque en la figura parece ser que hubo una ‘degradación’ se puede observar como el petróleo que se encontraba en la superficie se adhirió en las paredes, esto es debido a la constante agitación durante su incubación (Tabla 6). Los resultados en medio BH corroboran lo observado en los ensayos de crecimiento en placa y en medio líquido, dónde no se detecta aumento de la biomasa de *Nesterenkonia sp.* CSB8-2, posiblemente porque requiere de otros nutrientes (Fig. 8-A).

En cuanto a los cultivos de *Nesterenkonia sp.* CSB8-2 en LB, así como en su control abiótico, durante la primera semana de incubación, no se observaron cambios en la turbidez ni en

la apariencia del petróleo. En cambio, durante la segunda semana post-inoculación, se comenzó a notar turbidez, así como la fragmentación en gotas del petróleo, mientras que el control se mostraba sin cambios, tal como se esperaba. En la tercera semana el petróleo que una vez que encontraba esparcido en la superficie se mostraba de dos formas; compacto en la superficie y gotas flotando en la parte media de la columna. Finalizada la semana cuatro se notó aún más crecimiento de la cepa, así como la casi nula presencia de petróleo en la superficie (Tabla 6).

6.5 Producción de Biopelículas

Una de las principales limitaciones que enfrenta el proceso de biorremediación es la biodisponibilidad de los compuestos orgánicos en el sitio, estudios previos indican que las bacterias formadoras de biopelículas pueden emplearse para superar esta limitación; ya que las células en biopelículas tienen más posibilidades de supervivencia y adaptabilidad, especialmente durante las condiciones de estrés [68]. Por ello se decidió poner a prueba la capacidad de *Nesterenkonia sp.* CSB8-2 para la producción de biopelículas.

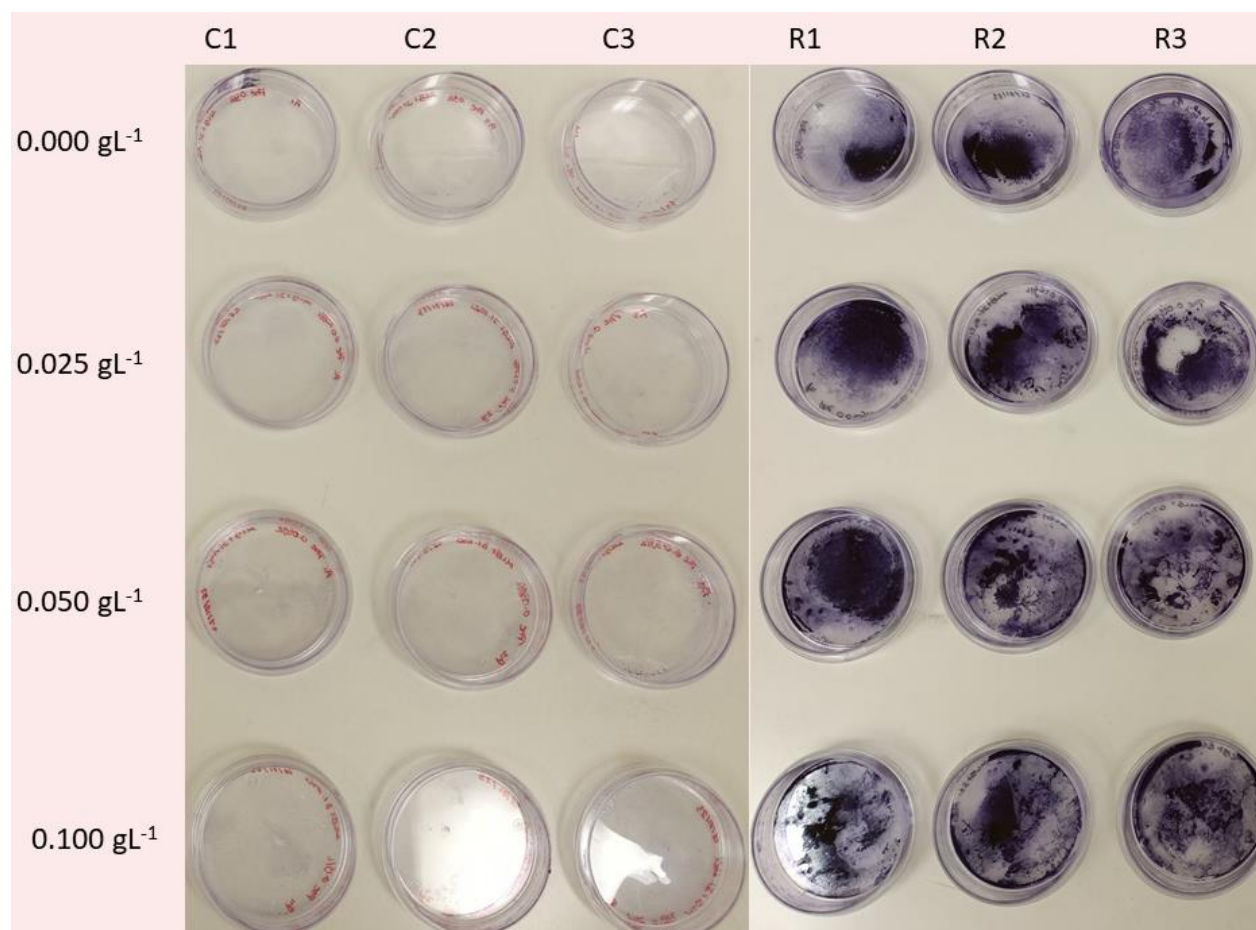


Figura 9. Producción de películas. Placas para prueba de producción de biopelículas en la estación seca, donde C indican los controles y R aquellas placas que fueron inoculadas. En la columna izquierda se indican las concentraciones de hidrocarburo colocadas en la fila correspondiente.

En la figura 9 se presentan las placas inoculadas las cuales están etiquetadas como R y los controles etiquetados como C. Una vez lavadas las placas se les colocó cristal violeta 4% para teñir los exopolisacáridos producidos por la cepa, por lo tanto, los controles deberán tener una baja

probabilidad de tinción, pero no nula ya que al ser plástico pueden quedar restos del tinte. En las placas R se encuentra una gran cantidad de cristal violeta, indicando la presencia de biopelículas. A simple vista se puede describir que en las concentración más baja y más alta la superficie de tinción es mucho menor a las concentraciones de 0.025 y 0.050 gL^{-1} , donde el morado es intenso, compacto y ocupa toda el área superficial de la placa; esto indica la posibilidad de encontrar una mayor cantidad de exopolisacáridos.

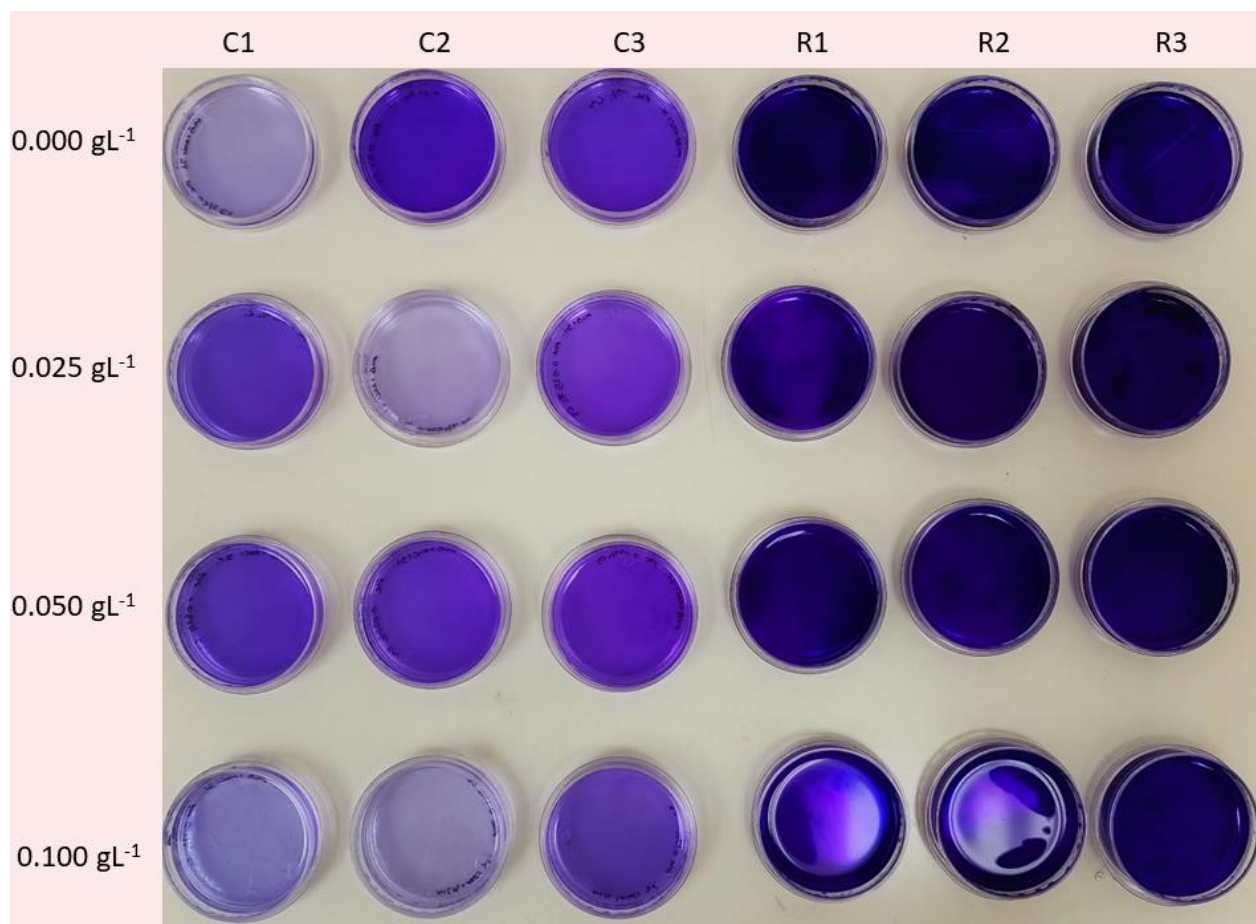


Figura 10. Biopelículas suspendidas en etanol 70%. Estación de húmeda, donde las biopelículas que se dejaron al aire para secar fueron re suspendidas en etanol al 70%,

En la figura 10 se encuentra la suspensión, en etanol al 70%, de las biopelículas teñidas; los controles presentan una coloración base debido al residuo del tinte en las placas, ya que el material de las placas puede llegar a absorber el colorante. Las placas R, en comparación de los controles, la tinción fue muy intensa, por lo que se tuvieron que hacer diluciones para poder realizar las mediciones en el espectrofotómetro.

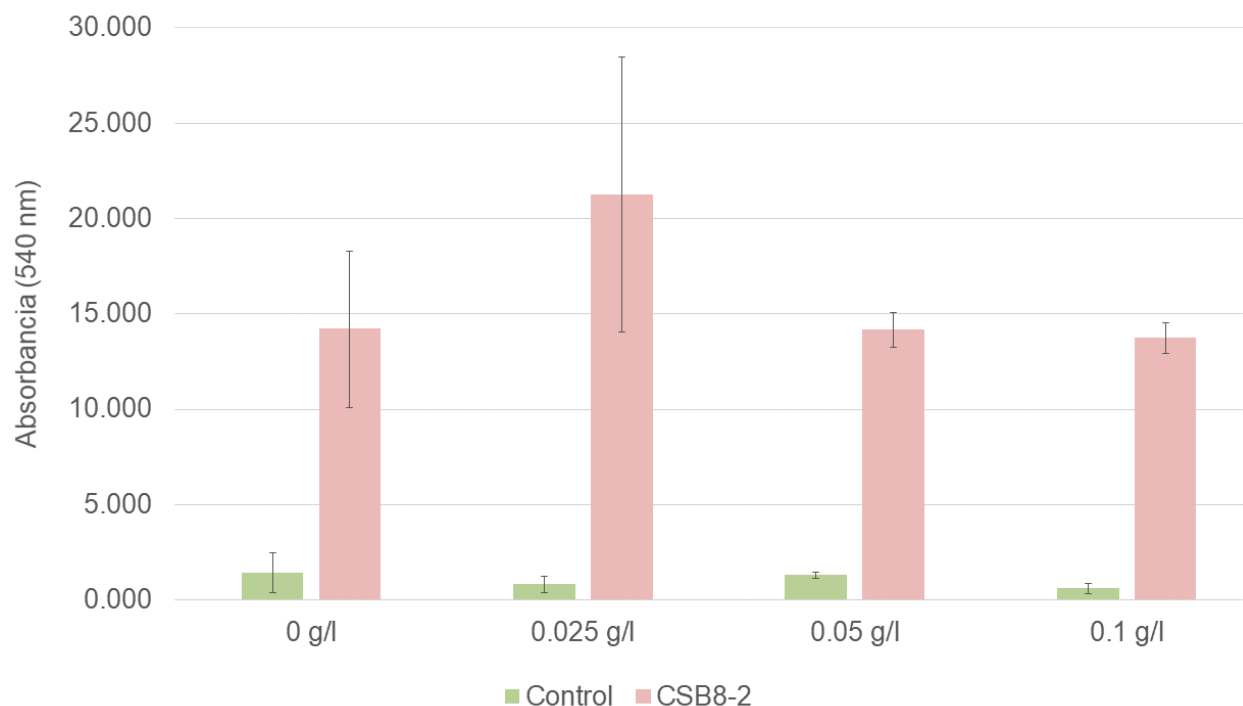


Figura 11. Cuantificación de biopelículas. Las barras verdes indican los controles (placas no inoculadas) y las barras rosas representan los objetos de estudio (placas inoculadas). Las barras verticales representan la desviación estándar (n=3).

Las concentraciones de 0, 0.05 y 0.1 gL⁻¹ mantienen valores de absorbancia muy parecidos de 14.200, 14.150 y 13.750 nm respectivamente; aunque en la concentración de 0.025 gL⁻¹ se obtuvo el valor más alto de 21.250 nm, no parece ser significativo, dado su desviación estándar tan grande.

6.6 Prueba cualitativa de Producción de Biosurfactantes

Para verificar que *Nesterenkonia sp.* CSB8-2 produce biosurfactantes y si son del tipo glucolípidos, se realizó una prueba cualitativa en agar azul descrita por Siegmund & Wagner (1991), donde se debe de obtener un halo azul en caso de presencia de biosurfactantes del tipo ramnolípidos.

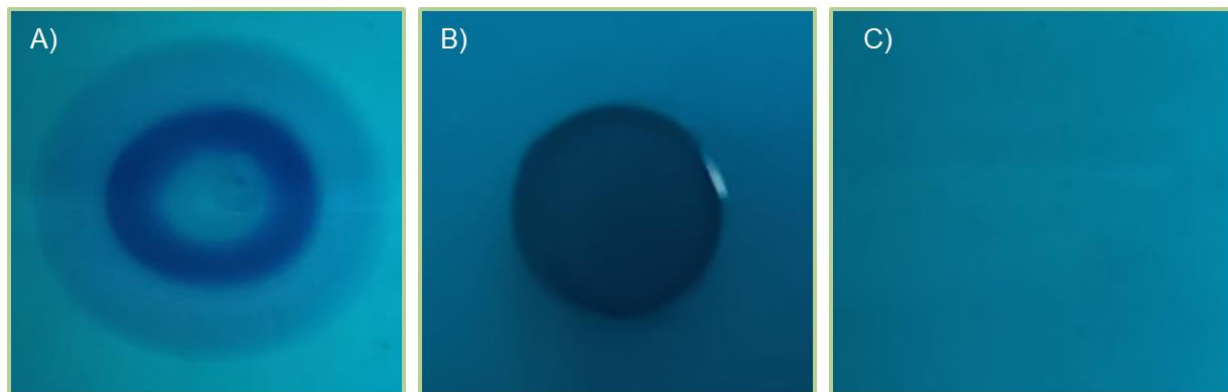


Figura 12. Prueba cualitativa de producción de biosurfactantes. Donde A) Control Positivo: SDS al 1%, B) Cultivo de *Nesterenkonia sp.*, C) Control negativo: BH +3% NaCl

El cultivo y sus controles se dejaron incubando por 24 horas, una vez finalizadas, se obtuvieron los resultados mostrados en la figura 12; donde se observa claramente que el cultivo de *Nesterenkonia sp.* CSB8-2 produce un halo de color azul oscuro similar al control positivo, indicando que esta cepa es productora de biosurfactante del tipo ramnolípidos

6.7 Ensayo de Emulsificación E24

Otro ensayo que permite corroborar la producción de compuestos tensioactivos y su poder emulsificante es el índice de emulsificación E24.

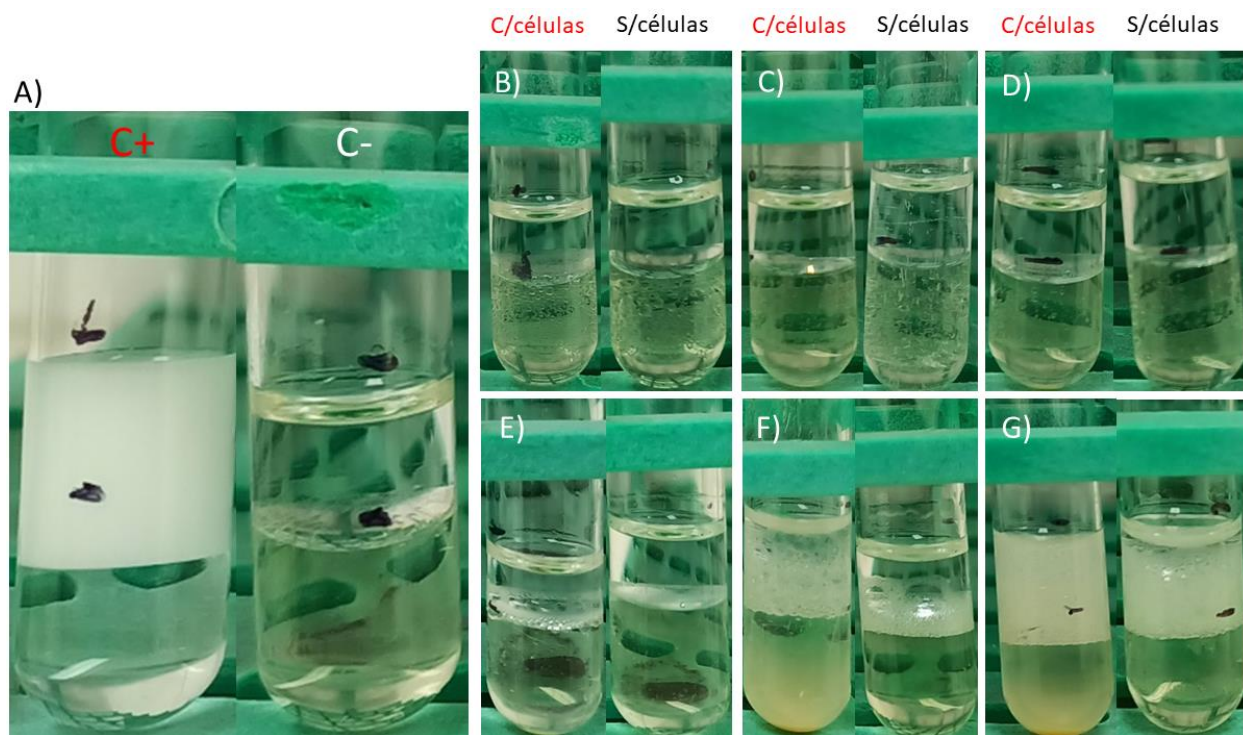
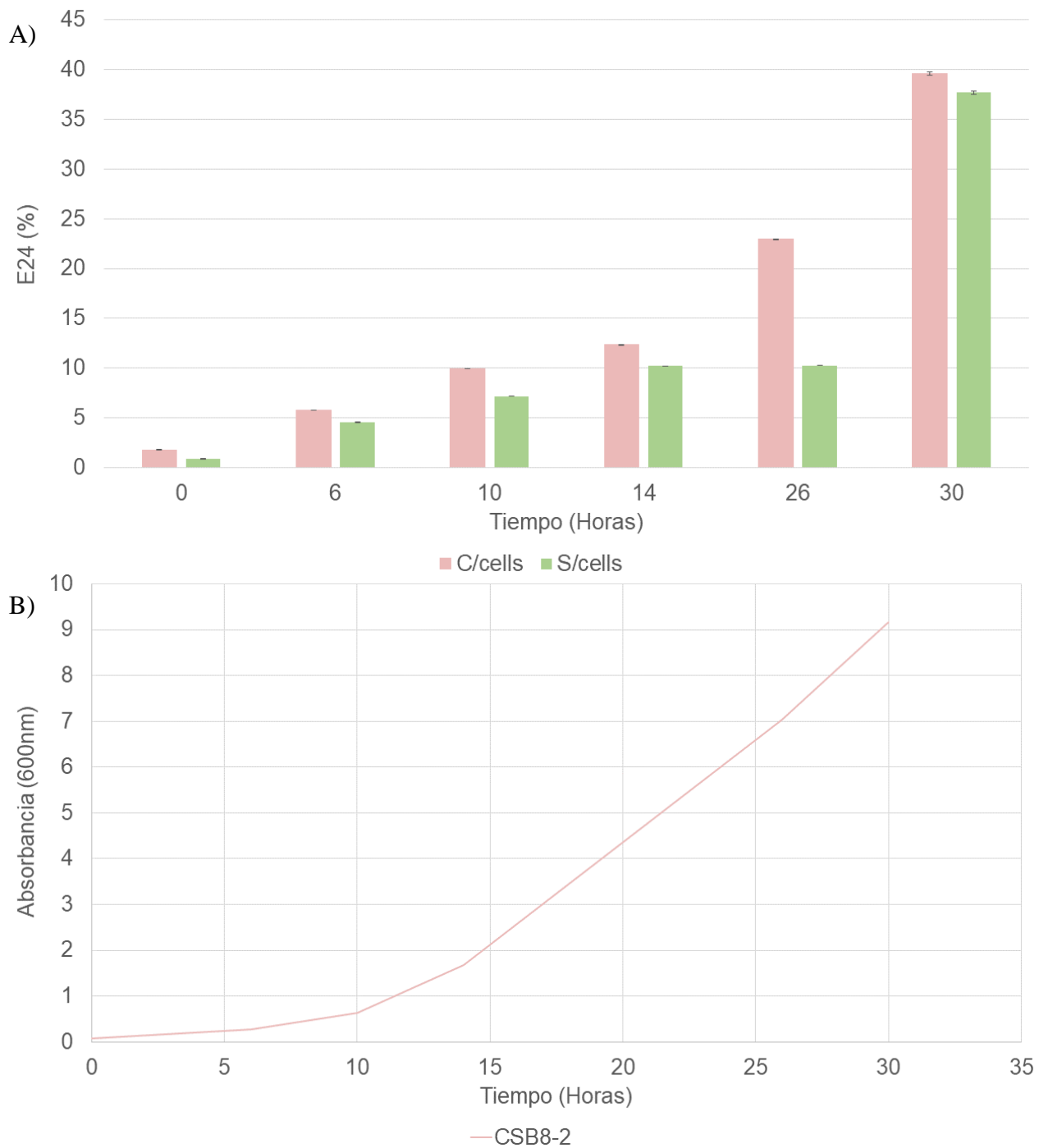


Figura 13. Producción de biosurfactantes en medio LB. A) Control positivo: SDS al 1%, Control Negativo: medio LB sin inocular, B) T=0 C) T=6 D) T=10 E) T=14 F) T=26 G) T=30. Donde T es el tiempo en horas.

El ensayo se realizó en medio sin y con el sustrato preferencia. Para el ensayo de emulsificación sin HAP se utilizó SDS al 1% como control positivo y medio LB sin inocular como control negativo (Fig. 13-A). Los tiempos seleccionados para el ensayo del índice de emulsificación E24 fueron la hora 0 (al momento de la inoculación del medio), representando el inicio de la fase de latencia; la hora 6, representando el final de la fase de latencia y el inicio de la fase exponencial; la hora 10, el tiempo medio de la fase exponencial; la hora 14, indicando el fin de la fase exponencial y el inicio de la etapa estacionaria; la hora 26, el tiempo medio de la fase exponencial; por último, la hora 30, donde se encontraría en fase de muerte. En el tiempo 0 no hay producción de biosurfactante ya que el cultivo con y sin células no producen emulsificación no habiendo diferencias con el control negativo (Fig. 13-B y C); en las horas 6 y 10 inicia la producción de biosurfactante (Fig. 13-D), tanto en el cultivo con y sin células (Fig. 14-A); en la

hora 14 comienza a apreciarse a simple vista la emulsificación principalmente en el tubo con muestra con células (Fig. 13-E) y se puede constatar con el E24 calculado (Fig. 14-A); en el tiempo 26 tanto en las muestra sin células como en la que si las contiene se observa emulsificación (Fig. 13-F) y el E24 aumenta considerablemente en los cultivos con células (Fig. 14-A); finalmente en la hora 30 la emulsificación es muy similar al control positivo (Fig. 13-G), indicando una producción óptima entre las 26 y 30 horas de incubación desde la inoculación de las muestras.

Cabe recalcar que en cada uno de los tiempos evaluados se observa que las muestras centrifugadas para eliminar células mostraban menor emulsificación que aquellas con células.



La gráfica obtenida del índice E24 y la curva de crecimiento correspondiente confirma lo observado en las muestras (Fig. 14-A y B), la producción de surfactantes aumento con respecto al crecimiento y adaptación de la cepa en el medio donde se encuentra. Sin embargo, a diferencia de la curva obtenida en la Figura 8, a las 30 horas aún se encontraba en su fase exponencial y no en la de muerte.

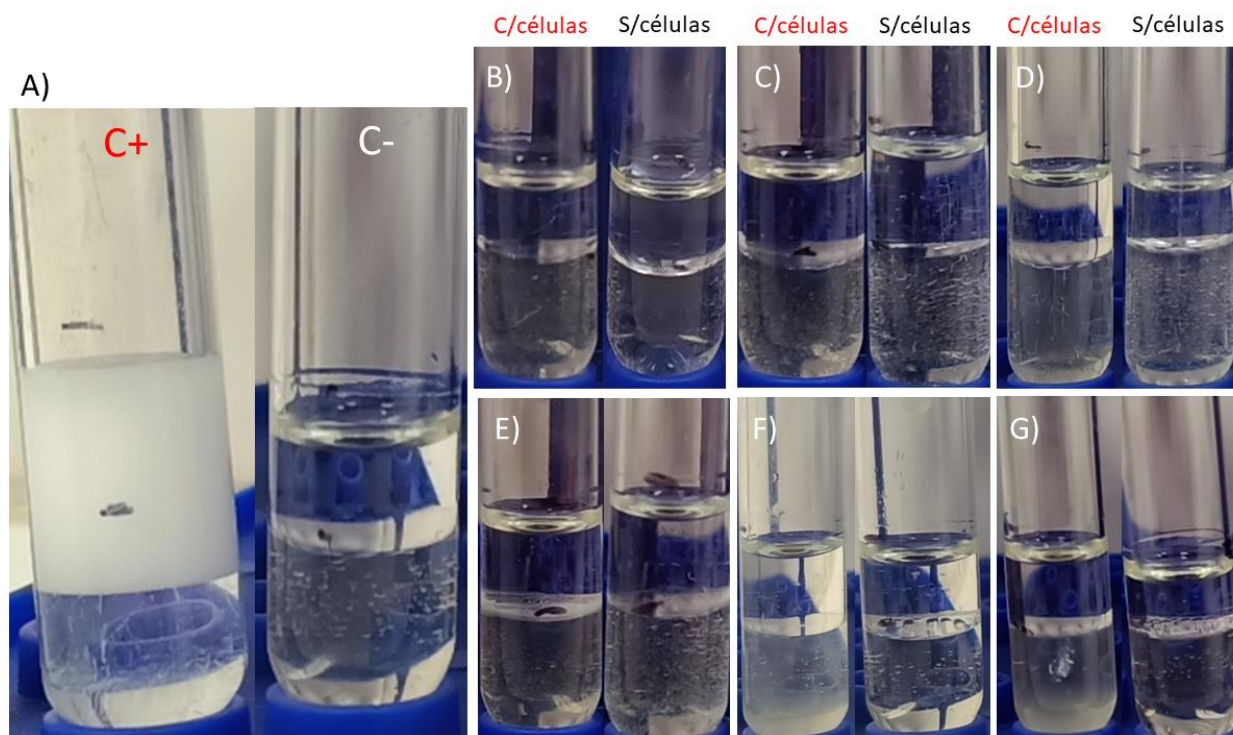
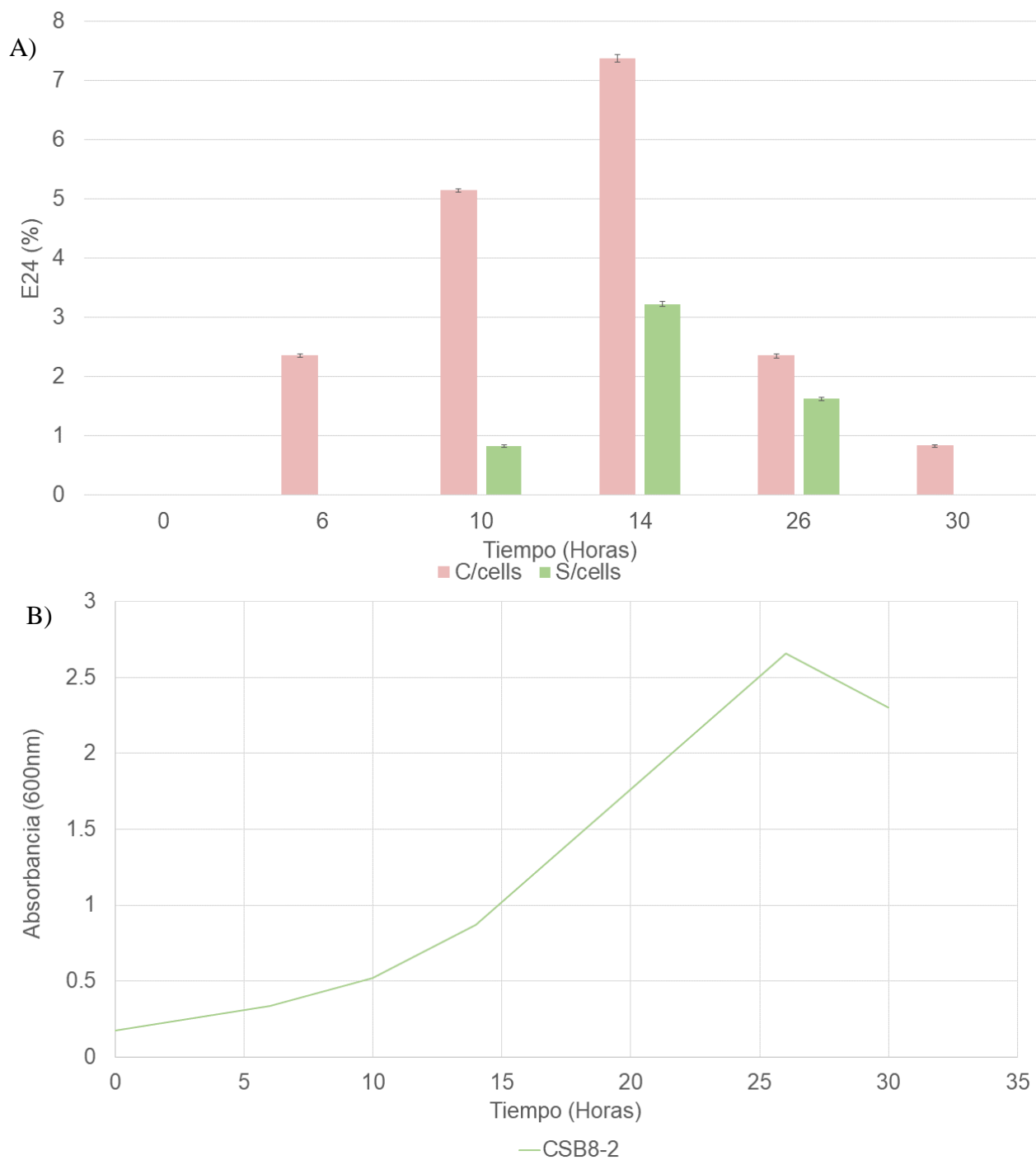


Figura 15. Producción de biosurfactantes en medio LB con 0.1gL^{-1} fenantreno. A) Control positivo: SDS al 1%, Control Negativo: medio LB sin inocular, B) T=0 C) T=6 D) T=10 E) T=14 F) T=26 G) T=30

Se repitió el experimento anterior en las mismas condiciones, pero suplementando los cultivos con 0.1gL^{-1} de fenantreno (Fig. 15). Con la adición del hidrocarburo en el medio de cultivo, ocurrió un cambio drástico en el patrón de producción de biosurfactantes y en el índice de emulsificación. La emulsificación apenas es visible a partir de las 6 horas en las muestras con células (Fig. 15); a las horas 14 horas hay un aumento del índice E24 (Fig. 16-A) pero sin llegar a tener un patrón de emulsificación similar al control positivo; a las 26 y 30 horas hay una disminución en la emulsificación (Fig. 15-F y G) y en el E24 (Fig. 16-A). Al igual que en el

experimento del cálculo de E24 en cultivos de *Nesterenkonia* en LB sin HAP, la producción de biosurfactante es mayor en las muestras de cultivo con células.



Al analizar las gráficas de los experimentos para calcular el E24 en ambas condiciones de cultivos (sin y con HAP), se puede observar que hay un cambio en la cantidad y en qué fase de crecimiento hay producción de biosurfactante. Los cultivos crecidos en presencia de fenantreno presentan una mayor producción de biosurfactantes, a juzgar por un alto E24, durante el inicio de la fase exponencial (Fig. 16-A), mientras que en las muestras de los cultivos sin HAP, la mayor producción del biosurfactante con poder emulsificante es al final de la fase estacionaria (Fig 15-A). Por otro lado, en los cultivos con HAP, la mayor cantidad de biosurfactante producido se queda adsorbido en la superficie de las células y solo una parte es excretado al medio (Fig. 16-A). En el caso de los cultivos sin HAP, el biosurfactante es excretado al medio y adsorbido en la superficie celular en cantidades similares (Fig. 15-A). Finalmente, podemos observar que la presencia del HAP en el medio afecta también en la cantidad de biosurfactante producido, ya que el índice E24 es mucho menor en presencia que en ausencia del fenantreno en el medio de cultivo (Fig. 15-A y 16-A).

6.8 Detección de genes de degradación

Para verificar el potencial hidrocarbonoclasto de CSB8-2, el ADN de esta cepa se utilizó como templado para amplificar 3 genes marcadores funcionales relacionados con el catabolismo de hidrocarburos: el gen *alkB*, encargado de la degradación de alcanos (Fig. 17-A); el gen Tol/Bifenilo, relacionado con la degradación de compuestos aromáticos (Fig. 17-B) y el gen *pahE*, responsable de la degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (Fig. 17-C).

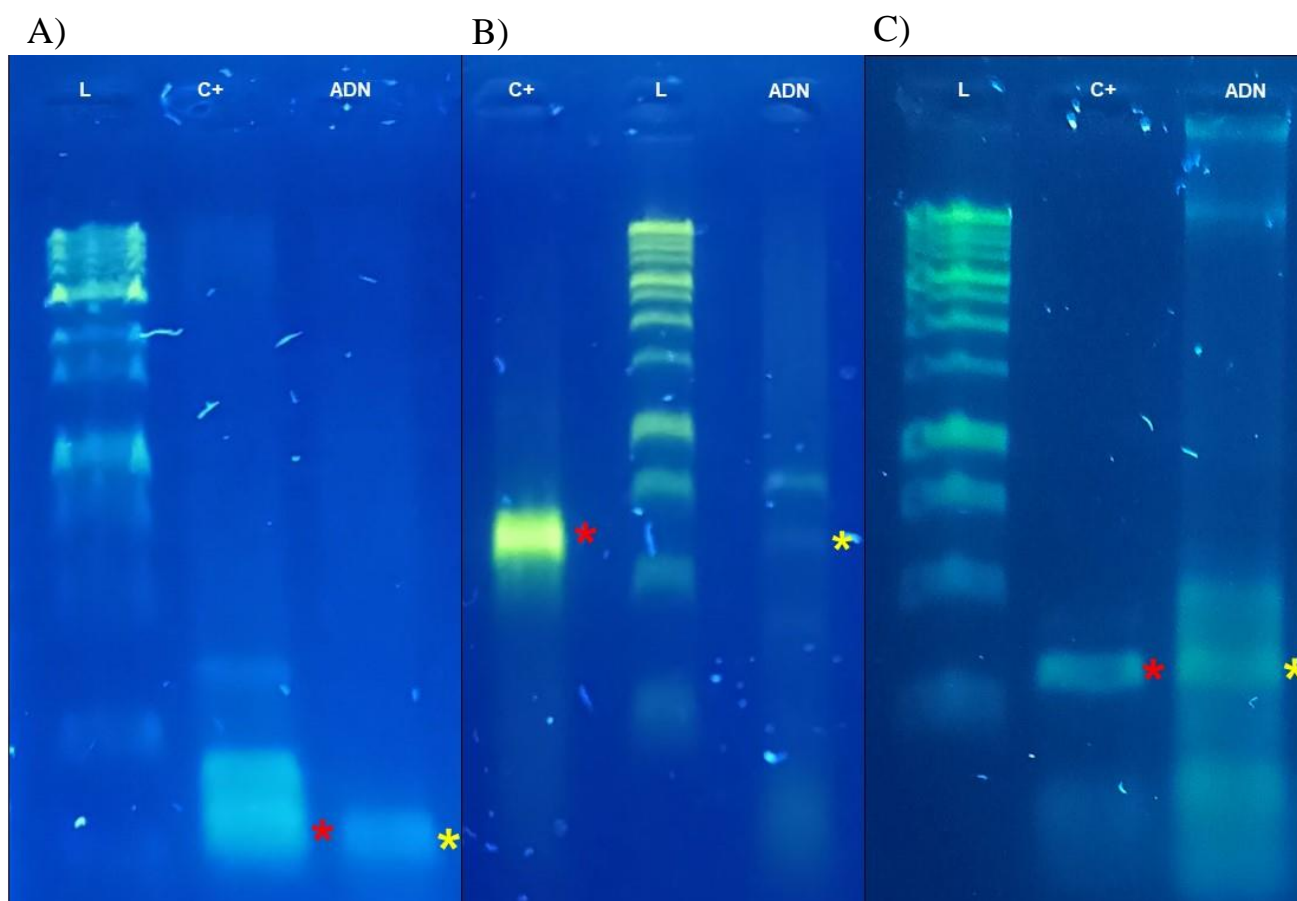


Figura 17. Detección de genes involucrados en degradación de hidrocarburos. A) Amplificación de gen alcano mono-oxigenasa (100pb), B) Amplificación de gen Tolueno/Bifenilo dioxigenasa (505pb) C) Amplificación de gen *pahE* (377 pb). L=Ladder 1Kb, C+=Control positivo (ADN de *Rhodococcus ruber* MSA14 para *alkB* y Tol/Bifenilo y ADN de *Acinetobacter lwoffii* para *pahE*), ADN=ADN de *Nesterenkonia* sp. El asterisco rojo representa el amplicón del control positivo, mientras que el asterisco amarillo indica al amplicón obtenido en *Nesterenkonia* CSB8-2.

La detección de los tres genes marcadores funcionales evaluados por PCR de punto final en la *Nesterenkonia* sp. CSB8-2 . fue positiva. Lo anterior indica que esta cepa tiene un alto

potencial para ser utilizada en procesos que permitan la descontaminación de zonas impactadas por hidrocarburos alifáticos y aromáticos.

7. Discusión

La biorremediación microbiana es una tecnología de limpieza alternativa que se basa en las diversas capacidades metabólicas de los microorganismos para eliminar una amplia gama de contaminantes que conducen a la descontaminación ambiental. Por ende, es fundamental comprender el potencial fisiológico, metabólico y genético de los microorganismos nativos para diseñar una estrategia de biorremediación.

Los microorganismos halófilos constituyen las comunidades microbianas naturales de los ecosistemas hipersalinos, debido a que requieren iones de sodio para su crecimiento y metabolismo. Según el requerimiento óptimo de NaCl para el crecimiento, los halófilos se clasifican en tres categorías diferentes: leves (1-3%); moderado (3-15%); y extremo (15-30%) [69]. A diferencia de los organismos halófilos, aquellos denominados halotolerantes, a pesar de poder crecer en un rango variado de sales, no requieren de estas para su crecimiento [70].

En diferentes artículos basados en el aislamiento e identificación de cepas, se han referido al género *Nesterenkonia* sp. como una halófila moderada, como es en los casos de *Nesterenkonia halobia* la cual crece en 5% de NaCl [71], *Nesterenkonia sandarakina* con crecimiento en 1–15% [72], la cepa *Nesterenkonia* sp. MF2 fue aislada en 10% de NaCl [73] y la *Nesterenkonia* sp. aislada en 7.5% de NaCl [74]. En su investigación para la búsqueda de nuevos métodos de eliminación de colorante violeta reactivo 1 en aguas residuales Prabhakar, Y et. al. realizaron pruebas de decoloración en medios con concentraciones de 2.5-5% NaCl esenciales para el funcionamiento de sus experimentos, por lo que describen a *Nesterenkonia* sp. como una cepa halófila [75].

En el caso de la cepa CSB8-2 de *Nesterenkonia* sp., aislada de las costas del Puerto de Rosarito, B.C. los resultados obtenidos en este trabajo coinciden con lo encontrado en la literatura, e indican que es una halófila, puesto que no creció en los medios sin sal; más específicamente es una halófila moderada ya que su mejor crecimiento fue observado en la concentración de 3% NaCl e incluso mostró ligeros indicios de crecimiento en la concentración de 5% de sal (Tabla.3).

Además, de la salinidad, se encuentran otras condiciones extremófilas en las que las bacterias presentan habilidad para adaptarse tales como las altas o bajas temperaturas, ambientes de pH ácido y alcalino, e incluso condiciones de alta radiación; esto es de importancia puesto que los contaminantes de hidrocarburos de petróleo son frecuentes en los ambientes extremos donde la temperatura, el pH, las concentraciones de sal y/o la presión varían de las condiciones normales; condiciones a las cuales los organismos hidrocarbonoclastos deben adaptarse. ^[76].

Las bacterias hidrocarbonoclasticas son un grupo de procariontes que pueden degradar y utilizar compuestos de hidrocarburos como fuente de carbono y energía; varias de estas bacterias especializadas viven en el mar y se han aislado del agua de mar contaminada ^[77]. En el caso particular del género de *Nesterenkonia* actualmente existen escasos estudios relacionados con la capacidad degradadora de hidrocarburos, entre los que se encuentra lo descrito por Singh y colaboradores, quienes, al analizar el genoma de *Nesterenkonia* sp. PF2B19 aislada del Ártico, identificaron secuencias de genes que podrían estar codificando para enzimas responsables de la degradación de hidrocarburos ^[78].

En el caso de la cepa *Nesterenkonia* sp. CSB8-2 los resultados indican que es una bacteria hidrocarbonoclasta no obligada que puede crecer en medio con fenantreno al 0.1 gL⁻¹ pero suplementado con otra potencial fuente de carbono como triptona o extracto de levadura. Esta conclusión fue tomada debido a la rapidez con la que se esparció la cepa cubriendo por completo la superficie del medio sólido LB + 3% de NaCl y presentando el color naranja intenso característico de la cepa. En cambio, cuando la cepa fue crecida en medio BH + 3% de NaCl suplementado con fenantreno al 0.1 gL⁻¹, no se observa crecimiento.

En ese sentido, en 2019, Radwan y colaboradores realizaron una serie de pruebas sobre la habilidad de las denominadas bacterias hidrocarbonoclasticas obligadas para utilizar sustratos no hidrocarbonados, mejorando así sus actividades. En dicho artículo mencionan que la peptona resultó ser un sustrato utilizable por las ocho cepas hidrocarbonoclasticas probadas, por lo que construyeron curvas de crecimiento para aquellas bacterias utilizando un medio mineral con peptona como única fuente de carbono y energía; entre los hidrocarburos probados, el mejor utilizado fue el C₁₈ cuyas proporciones de consumo oscilaron entre 8 y 17%, el *n*-alcano, C₃₀, con proporciones de consumo entre el 2 y el 11 % se consumió con menos facilidad y el fenantreno

con proporciones de consumo de solo el 2 al 5 % fue el sustrato utilizado con menos facilidad por las ocho especies bacterianas analizadas. Este resultado proporciona una evidencia experimental de que los organismos hidrocarbonoclastos pueden preferir la peptona a los hidrocarburos como fuente de carbono. También confirmaron que, en medios nutritivos con petróleo añadido, durante los primeros días se realiza el consumo de peptona para luego utilizar los hidrocarburos como última fuente de alimento ^[79].

De igual forma, el comportamiento anterior se observó cuando la cepa bacteriana fue crecida en medio líquido LB y BH suplementados con petróleo; en dicho experimento se notó con gran facilidad la ausencia de petróleo en el medio LB una vez pasado el tiempo de incubación, lo que sugiere que sucedió alguna transformación.

Lo anterior indica que *Nesterenkonia sp.* CSB8-2 al parecer no puede utilizar petróleo e hidrocarburos como su única fuente de carbono, si no que necesita nutrientes adicionales para poder prosperar en ambientes contaminados por estos contaminantes.

Los microorganismos hidrocarbonoclastos puede poseer varios mecanismos que facilitan la degradación de los compuestos tóxicos orgánicos, tales como la formación de biopelículas. Las biopelículas se definen como comunidades de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de exopolisacáridos y adheridos a una superficie biótica o abiótica ^[80]. Las bacterias forman biopelículas en respuesta al estrés ambiental, como la exposición a compuestos tóxicos ^[81]. Pero también pueden ayudar al microorganismo a absorber y metabolizar los contaminantes como los hidrocarburos a través de un patrón de expresión de genes controlados por el quorum sensing, que en conjunto con la quimiotaxis puede acrecentar la capacidad de biorremediación ^[82-84].

En el caso de la cepa *Nesterenkonia sp.* CSB8-2, debido a que hay una mayor producción de biopelículas en ausencia del fenantreno, este microorganismo podría estar produciendo biopelículas como protección hacia al estrés realizado por el fenantreno más que como mecanismo para facilitar la degradación de este compuesto orgánico tóxico. En ese sentido, Daoxin Dai et. al. 2022 aislaron cuatro cepas de *Nesterenkonia sp.* de los lagos de la meseta tibetana para identificar sus mecanismos de resistencia al estrés ocasionado por las temperaturas, limitación de nutrientes, osmosis y condiciones ultravioleta y confirmaron la producción de biopelículas como parte de éstos.

Las biopelículas no son los únicos mecanismos por los cuales las bacterias facilitan su estadía en el ambiente en el que se encuentran, estas también hacen uso de los biosurfactantes.

Los biosurfactantes son agentes tensioactivos de bajo peso molecular producidos por las bacterias, cuyo rol es la emulsificación de potenciales nutrientes hidrofóbicos, lubricación para movilidad sobre superficies semisólidas y mantenimiento de estructuras microbianas complejas tales como las biopelículas ^[85-87].

En el caso particular de la cepa *Nesterenkonia sp.* CSB8-2, cuándo es crecida en ausencia y presencia de HAP, ésta produce biosurfactantes con poder emulsificante de tipo ramnolípido o estructuralmente parecidos, esto a juzgar por el E24 y por la prueba del agar azul. Sin embargo, la producción del biosurfactante por parte de la cepa CSB8-2 es menor en presencia del HAP. La literatura sugiere que los biosurfactantes producidos a partir de bacterias marinas eran lo suficientemente capaces de destruir las manchas de petróleo que flotan en la superficie del agua para promover la dispersión del petróleo en el agua formando una emulsión estable, mejorando así la tasa de biodegradación (Kim et al., 1997). En *Nesterenkonia sp.* CSB8-2, si bien tiene habilidades de emulsificación debido a los posibles biosurfactantes que produce, éstas parecen ser afectadas por la presencia de hidrocarburos aromáticos policíclicos, ya que el index de emulsificación baja considerablemente.

Se han identificado varias enzimas y vías para la degradación de los componentes del petróleo crudo. Una de las enzimas activadoras clave en la degradación de los alcanos son las alcano hidroxilasas. Las alcano monooxigenasas (AlkB) y los citocromos P450 (CYP153) catalizan la hidroxilación de alcanos a alcoholes, que posteriormente se oxidan a ácidos grasos, que posteriormente son catabolizados por β -oxidación dando lugar al metabolito intermedio clave, el acetyl CoA ^[88-90]. El catabolismo de los compuestos aromáticos involucra múltiples enzimas que convierten los sustratos aromáticos en intermediarios del ciclo de Krebs a través de vías de escisión orto o meta ^[91].

La conservación de secuencias del gen *alkB* se ha explotado en una variedad de estudios ecológicos moleculares y se ha utilizado como un gen marcador de degradación de alcanos. Entre ellos Wasmund et al. (2009), quienes analizaron la diversidad de *alkB* en extractos genómicos obtenidos de sedimentos asociados a filtraciones de hidrocarburos en el Mar de Timor donde

observaron numerosas secuencias novedosas, muchas de las cuales estaban relacionadas con oxidantes de alcanos conocidos dentro de las γ -Proteobacteria y Actinobacteria, pero distintas de ellos. [92].

Liang (2019) colaboradores al analizar cepas puras por PCR confirmaron que *pahE* puede distinguir específicamente bacterias que degradan PAH lo que sugiere que *pahE* es un biomarcador más poderoso para explorar el papel ecológico y el potencial de degradación de las bacterias degradadoras de PAH en los ecosistemas, lo cual es importante para la biorremediación de la contaminación por PAH [67].

Las dioxigenasas hidroxilantes del anillo aromático (RHDs) catalizan la oxidación de anillos aromáticos mediante la adición de ambos átomos de oxígeno molecular a dos carbonos adyacentes, ejemplo de estas enzimas son las tolueno, naftaleno y bifenilo dioxigenasas las cuales son muy similares en su tamaño, composición y estructura molecular [93].

Los genes marcadores de degradación *alkB*, *Tol/Bifenilo* y *pahE* fueron encontrados en *Nesterenkonia* sp. CSB8-2 sugiriendo que tiene la habilidad de crecer hidrocarburos y posiblemente pueda degradar hidrocarburos alifáticos, mono y poliaromáticos, Sin embargo, teniendo en cuenta los resultados obtenidos durante los ensayos de crecimiento en medio sólido y líquido es necesario aclarar que los HAP probablemente no son utilizados como su principal fuente de carbono o de energía.

8. Conclusiones

Nesterenkonia sp. CSB8-2, aislada de sedimentos marinos de la zona costera del Puerto de Rosarito, es un microorganismo moderadamente halófilo con un alto potencial para utilizar HAP de bajo y alto peso molecular como fuente de carbono. La cepa se identificó como hidrocarbonoclasta no obligada debido a su inhabilidad de poder crecer en medios no nutritivos adicionados con hidrocarburo, sin embargo, tanto en medios sólidos como líquidos logró proliferar en todas las concentraciones extremas de hidrocarburo y petróleo. Además, esta cepa bacteriana posee mecanismos como la formación de biopelículas y la producción de biosurfactantes que facilitan el proceso de degradación. Por lo tanto, CSB8-2 podría ser una herramienta factible para la biorremediación en ambientes salinos contaminados con HAP y petróleo.

9. Referencias

- [1]. Rudin, N. (1997). Dictionary of Modern Biology. Barron's.
- [2]. Parker, S. P. & McGraw-Hill Book Company. (1997). McGraw-Hill Dictionary of Bioscience. McGraw-Hill Education.
- [3]. Seoáñez Calvo, M. (1999). El gran diccionario del medio ambiente y de la contaminación. Ediciones Mundi-Prensa.
- [4]. Duan, Y., Ji, T., & Yu, T. (2021). Reassessing pollution haven effect in global value chains. *Journal of Cleaner Production*, 284, 124705. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.124705>
- [5]. World Health Organization (WHO) (2014) Burden of disease from Household Air Pollution for 2012. WHO, Geneva
- [6]. World Health Organization (2014) Data on the size of the HIV/AIDS epidemic: Number of deaths due to HIV/AIDS. Global Health Observatory Data Repository. WHO, Geneva.
- [7]. World Health Organization (2014) Deaths: Estimated deaths, data by region. Global Health Observatory Data Repository. WHO, Geneva.
- [8]. Landrigan PJ, Goldman LR (2011) Children's vulnerability to toxic chemicals: a challenge and opportunity to strengthen health and environmental policy. *Health Aff* 30(5):842–850
- [9]. Ukaogo, P. O., Ewuzie, U., & Onwuka, C. V. (2020). Environmental pollution: causes, effects, and the remedies. *Microorganisms for Sustainable Environment and Health*, 419-429. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-819001-2.00021-8>
- [10]. Alfie Cohen, Miriam, & Salinas Castillo, Osvaldo. (2017). Ruido en la ciudad. Contaminación auditiva y ciudad caminable. *Estudios demográficos y urbanos*, 32(1), 65-96. Recuperado en 12 de febrero de 2023, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0186-72102017000100065&lng=es&tlng=es.
- [11]. Chepesiuk, R., (2010). Extrañando la oscuridad: los efectos de la contaminación lumínica sobre la salud. *Salud Pública de México*, 52(5),468-477. ISSN: 0036-3634. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=10617417015>
- [12]. Vargas Ramos, C. Martínez Treviño, M.G. (2017). Percepción de la contaminación visual de la población de la Ciudad de H. Matamoros, Tamaulipas. México. *Revista*

- Contribuciones a las Ciencias Sociales. De
<http://www.eumed.net/rev/cccss/2017/03/contaminacion-visual-mexico.html>
- [13]. Nordell, B. (2003). Thermal pollution causes global warming. *Global and Planetary Change*, 38(3-4), 305-312. [https://doi.org/10.1016/s0921-8181\(03\)00113-9](https://doi.org/10.1016/s0921-8181(03)00113-9)
- [14]. Ballester, Ferran. (2005). Contaminación atmosférica, cambio climático y salud. *Revista Española de Salud Pública*, 79(2), 159-175. De http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1135-57272005000200005&lng=es&tlng=es.
- [15]. Ballesta, R. (2017). *Introducción a la contaminación de suelos*. Ediciones Mundi-Prensa.
- [16]. Guadarrama Tejas, R. (2016). Contaminación del agua. *Revista de Ciencias Ambientales y Recursos Naturales*, Vol.2, No.5. De www.ecorfan.org/spain
- [17]. Landrigan, P. J., et al. (2020). Human Health and Ocean Pollution. *Annals of global health*, 86(1), 151. <https://doi.org/10.5334/aogh.2831>
- [18]. Lin, L. (2022, 30 junio). Effects of Water Pollution on Human Health and Disease Heterogeneity: A Review. *Frontiers*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fenvs.2022.880246/full>
- [19]. Frid, C., & Caswell, B. A. (2017). *Marine Pollution*. Oxford University Press.
- [20]. Potters, G. (2012). *Marine Pollution* (1.a ed.) [Adobe acrobat]. Bookboon.
- [21]. Beiras, R. (2018). *Marine Pollution: Sources, Fate and Effects of Pollutants in Coastal Ecosystems*. Elsevier Gezondheidszorg.
- [22]. Fisch, K., Waniek, J. J., & Schulz-Bull, D. E. (2017). Occurrence of pharmaceuticals and UV-filters in riverine run-offs and waters of the German Baltic Sea. *Marine Pollution Bulletin*, 124(1), 388-399. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.07.057>
- [23]. Martin, J.H., 1990: Glacial-interglacial CO₂ change: The iron hypothesis, *Paleoceanography*, 5, 1-13.
- [24]. Jickells, T., Z.S. An et al., 2005: Global iron connections between desert dust, ocean biogeochemistry and climate, *Science*, 308, 67–71.
- [25]. Mahowald, N., A.R. Baker et al., 2005: Atmospheric global dust cycle and iron inputs to the ocean, *Global Biogeochem. Cycles*, 19, GB4025, doi:10.1029/2004GB002402.
- [26]. Fahim, M. A., Alsahhaf, T. A., & Elkilani, A. S. (2010). *Fundamentals of Petroleum Refining*. Elsevier Gezondheidszorg.

- [27]. Roussel, J., and Boulet, R. (1995c) "Fractionation and Elemental Analysis of Crude Oil and Petroleum Fractions," Chapter 2, In "Crude Oil Petroleum Products Process Flowsheets," Petroleum Refining, Vol. 1, Wauquier, J. ed., TECHNIP, France.
- [28]. Shishkova, I., Stratiev, D., Kolev, I. V., Nenov, S., Nedanovski, D., Atanassov, K., Ivanov, V., & Ribagin, S. (2022). Challenges in Petroleum Characterization—A Review. *Energies*, 15(20), 7765. <https://doi.org/10.3390/en15207765>
- [29]. Cámara, J. L. S. (2002). *Química orgánica* (2.a ed.). Síntesis.
- [30]. Chang, R., & Bourneville, E. J. H. D. (2007). *Química* (11.a ed.). McGraw-Hill Education.
- [31]. Morrison, R. T., & Boyd, R. N. (1996). *Química orgánica* (5.a ed.). Pearson Educación.
- [32]. Lee, M. L., Novotny, M. V., & Bartle, K. D. (1981). *Analytical Chemistry of Polycyclic Aromatic Compounds*. Amsterdam University Press.
- [33]. ATSDR, 2005. Toxicology profile for polyaromatic hydrocarbons. ATSDR's Toxicological Profiles on CD-ROM, CRC Press, Boca Raton, FL.
- [34]. Bojes, H. K., & Pope, P. G. (2007). Characterization of EPA's 16 priority pollutant polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in tank bottom solids and associated contaminated soils at oil exploration and production sites in Texas. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 47(3), 288-295. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2006.11.007>
- [35]. ATSDR. (1995). Resumen de Salud Pública: Hidrocarburos aromáticos policíclicos. ATSDR's Toxicological Profiles. https://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs69.html#bookmark7
- [36]. Noyes, P. D., McElwee, M. K., Miller, H. D., Clark, B. W., Van Tiem, L. A., Walcott, K. C., Erwin, K. N., & Levin, E. D. (2009). The toxicology of climate change: Environmental contaminants in a warming world. *Environment International*, 35(6), 971-986. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2009.02.006>
- [37]. Preuss, R., Angerer, J. & Drexler, H. Naphthalene—an environmental and occupational toxicant. *Int Arch Occup Environ Health* 76, 556–576 (2003). <https://doi.org/10.1007/s00420-003-0458->
- [38]. Coons S, Byrne M, Goyer M (1982) An exposure and risk assessment for benzo(a)pyrene and other polycyclic aromatic hydrocarbons: Vol II. Naphthalene. Final draft report. US Environmental Protection Agency, Office of Water Regulations and Standards, Washington, DC

- [39]. NTP. 2000. NTP Technical Report on the Toxicology and Carcinogenesis Studies of Naphthalene (CAS No. 91-20-3) in F344/N Rats (Inhalation Studies) (pp.). Research Triangle Park, NC: National Toxicology Program, 1–173. https://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/lt_rpts/tr500.pdf?utm_source=direct&utm_medium=prod&utm_campaign=ntpgolinks&utm_term=tr500
- [40]. NTP. (1992b). Toxicology and Carcinogenesis Studies of Naphthalene (CAS No. 91-20-3) in B6C3F1 Mice (Inhalation Studies). (TR 410). Research Triangle Park, NC: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/LT_rpts/tr410.pdf
- [41]. Ajao OG, Adenuga MO, Ladipo JK. (1988) Colorectal carcinoma in patients under the age of 30 years: a review of 11 cases. *J R Coll Surg Edinb*. PMID: 3230552.
- [42]. Yost EE, Galizia A, Kapraun DF, Persad AS, Vulimiri SV, Angrish M, Lee JS, Druwe IL. Health Effects of Naphthalene Exposure: A Systematic Evidence Map and Analysis of Potential Considerations for Dose-Response Evaluation. *Environ Health Perspect*.
- [43]. Djomo, J., Dauta, A., Ferrier, V., Narbonne, J., Monkiedje, A., Njine, T., & Garrigues, P. (2004). Toxic effects of some major polyaromatic hydrocarbons found in crude oil and aquatic sediments on *Scenedesmus subspicatus*. *Water Research*, 38(7), 1817-1821
- [44]. Gauthier, P. T., Norwood, W. P., Prepas, E. E., & Pyle, G. G. (2016). Behavioural alterations from exposure to Cu, phenanthrene, and Cu-phenanthrene mixtures: linking behaviour to acute toxic mechanisms in the aquatic amphipod, *Hyalella azteca*. *Aquatic Toxicology*, 170, 377-383. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.10.019>
- [45]. Lotufo, G. R. (1997). Toxicity of sediment-associated PAHs to an estuarine copepod: Effects on survival, feeding, reproduction and behavior. *Marine Environmental Research*, 44(2), 149-166. [https://doi.org/10.1016/s0141-1136\(96\)00108-0](https://doi.org/10.1016/s0141-1136(96)00108-0)
- [46]. Marzuki, I., Nisaa, K., Asaf, R., Athirah, A., Paena, M., Susianingsih, E., Nurhidayah, N., Kadriah, I. A. K., Kamaruddin, K., Sahabuddin, S., Nurbaya, N., Septiningsih, E., Herlinah, H., Hendrajat, E. A., Suwardi, S., & Ramlan, A. (2022). Comparison of Pyrene Biodegradation Using Two Types of Marine Bacterial Isolates. *Sustainability*, 14(16), 9890. <https://doi.org/10.3390/su14169890>
- [47]. IARC (International Agency for Research on Cancer). 1983. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Polynuclear Aromatic Compounds. Part 1.

- Chemical, Environmental and Experimental Data, Vol. 32. World Health Organization, Lyon, France, pp. 431-445
- [48]. Marzuki, I., Asaf, R., Paena, M., Athirah, A., Nisaa, K., Ahmad, R., Kamaruddin, M. (2021). Anthracene and Pyrene Biodegradation Performance of Marine Sponge Symbiont Bacteria Consortium. *Molecules*, 26(22), <https://doi.org/10.3390/molecules26226851>
- [49]. Lin CH, Chen SJ, Huang KL, Lee WJ, Lin WY, Tsai JH, Chaung HC (2008) PAHs, PAH-induced carcinogenic potency, and particle-extract-induced cytotoxicity of traffic-related nano/ultrafine particles. *Environ Sci Technol* 42:4229–4235
- [50]. Li H, Qu R, Li C, Guo W, Han X, He F, Ma Y, Xing B (2014) Selective removal of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from soil washing effluents using biochars produced at different pyrolytic temperatures. *Bioresour Technol* 163:193–198
- [51]. Dong, CD., Tsai, ML., Chen, CW. et al. (2018). Remediation and cytotoxicity study of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated marine sediments using synthesized iron oxide–carbon composite. *Environ Sci Pollut Res* 25, 5243–5253. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9354-1>
- [52]. Dave, D. & Ghaly, A. (2011). Remediation Technologies for Marine Oil Spills: A Critical Review and Comparative Analysis. *American Journal of Environmental Sciences*, 7(5), 423-440. <https://doi.org/10.3844/ajessp.2011.423.440>
- [53]. Dhaka, A., & Chattopadhyay, P. (2021). A review on physical remediation techniques for treatment of marine oil spills. *Journal of Environmental Management*, 288, 112428. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.112428>
- [54]. Dhaka, A., & Chattopadhyay, P. (2021). A review on physical remediation techniques for treatment of marine oil spills. *Journal of Environmental Management*, 288, 112428. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.112428>
- [55]. Hoang, A.T., Pham, V.V., & Nguyen, D.N. (2018). A Report of Oil Spill Recovery Technologies.
- [56]. Office of Technology Assessment (1990), *Coping With An Oiled Sea: An Analysis of Oil Spill Response Technologies*, OTA-BP-O-63, Washington, DC
- [57]. Tewari, Dr & Sirvaiya, Abhinav. (2015). Oil spill remediation and its regulation. *International Journal of Research In Science and engineering*. 1. 2394-8299.

- [58]. Yakimov, M. M., Bargiela, R., & Golyshin, P. N. (2022). Calm and Frenzy: marine obligate hydrocarbonoclastic bacteria sustain ocean wellness. *Current Opinion in Biotechnology*, 73, 337-345. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2021.09.015>
- [59]. Teramoto, M., Queck, S. Y., & Ohnishi, K. (2013). Specialized Hydrocarbonoclastic Bacteria Prevailing in Seawater around a Port in the Strait of Malacca. *PLOS ONE*, 8(6), e66594. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066594>
- [60]. Romo, Dolly & Perdomo, María & Obando, Marcela & Bravo, Daniel & Fernández Izquierdo, Pablo. (2013). Characterization of hydrocarbonoclastic marine bacteria using the 16S rRNA gene: A microcosm case study. *Dyna*.80. 122-129.
- [61]. Silva-Jiménez, H., Araujo-Palomares, C. L., Macías-Zamora, J., Ramírez-Álvarez, N., García-Lara, B., & Escobosa, A. R. C. (2018). Identification by MALDI-TOF MS of Environmental Bacteria with High Potential to Degrade Pyrene. *Journal of the Mexican chemical society*, 62(2). <https://doi.org/10.29356/jmcs.v62i2.411>
- [62]. Encyclopedia Of Life. (2011). Nesteronkonkia. Recuperado de <https://eol.org/>
- [63]. World Register of Marine Species. (2011). Nesterenkonkia. <https://www.marinespecies.org>
- [64]. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. (s.f). Nesteronkonkia. <https://lpsn.dsmz.de/>
- [65]. <https://www.sciencedirect.com/journal/marine-pollution-bulletin>
- [66]. Liu, Q., Tang, J., Bai, Z. et al. Distribution of petroleum degrading genes and factor analysis of petroleum contaminated soil from the Dagang Oilfield, China. *Sci Rep* 5, 11068 (2015). <https://doi.org/10.1038/srep11068>
- [67]. 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>
- [68]. Dasgupta, D., Ghosh, R., & Sengupta, T. K. (2013). Biofilm-Mediated Enhanced Crude Oil Degradation by Newly Isolated Pseudomonas Species. *ISRN Biotechnology (Online)*, 2013, 1-13. <https://doi.org/10.5402/2013/250749>
- [69]. Corral, P., Amoozegar, M. A., & Ventosa, A. (2019). Halophiles and Their Biomolecules: Recent Advances and Future Applications in Biomedicine. *Marine drugs*, 18(1), 33. <https://doi.org/10.3390/md18010033>
- [70]. Ramírez, N, Sandoval, AH, & Serrano, JA. (2004). Las bacterias halófilas y sus aplicaciones biotecnológicas. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 24(1-

- 2), 12-23. Recuperado en 10 de abril de 2023, de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562004000100004&lng=es&tlng=es.
- [71]. Stackebrandt, E., Koch, C., Gvozdiak, O., & Schumann, P. (1995). Taxonomic Dissection of the Genus *Micrococcus*: *Kocuria* gen. nov., *Nesterenkonia* gen. nov., *Kytococcus* gen. nov., *Dermacoccus* gen. nov., and *Micrococcus* Cohn 1872 gen. emend. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45(4), 682-692. <https://doi.org/10.1099/00207713-45-4-682>
- [72]. Jiang, W. L. C. K. Z. P. L. X. (2005b, enero 1). *Nesterenkonia sandarakina* sp. nov. and *Nesterenkonia lutea* sp. nov., novel actinobacteria, and emended description of the genus *Nesterenkonia*. microbiologyresearch.org. <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijms.0.63281-0>
- [73]. Amoozegar, M. A., Ghasemi, A., Razavi, M. R., & Naddaf, S. (2007). Evaluation of hexavalent chromium reduction by chromate-resistant moderately halophile, *Nesterenkonia* sp. strain MF2. *Process Biochemistry*, 42(10), 1475-1479. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2007.07.001>
- [74]. Shafiei, M., Ziaee, A. A., & Amoozegar, M. A. (2010). Purification and characterization of an organic-solvent-tolerant halophilic α -amylase from the moderately halophilic *Nesterenkonia* sp. strain F. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 38(2), 275-281. <https://doi.org/10.1007/s10295-010-0770-1>
- [75]. Prabhakar, Y., Gupta, A., & Kaushik, A. (2019). Enhanced decolorization of reactive violet dye 1 by halo-alkaliphilic *Nesterenkonia* strain: Process optimization, short acclimatization and reusability analysis in batch cycles. *Process Safety and Environmental Protection*, 131, 116-126. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2019.09.004>
- [76]. Rajkumari, J., Bhuyan, B., Das, N. et al. Environmental applications of microbial extremophiles in the degradation of petroleum hydrocarbons in extreme environments. *Environmental Sustainability* 2, 311–328 (2019). <https://doi.org/10.1007/s42398-019-00065->
- [77]. Dashti, N., Ali, N., Elias, M., Khanafer, M., Sorkhoh, N. A., & Radwan, S. S. (2015). Most hydrocarbonoclastic bacteria in the total environment are diazotrophic, which

- highlights their value in the bioremediation of hydrocarbon contaminants. *Microbes and environments*, 30(1), 70–75. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME14090>
- [78]. Singh, P., Kapse, N., Gowdaman, V., Tsuji, M., Singh, S. M., & Dhakephalkar, P. K. (2021). Comparative Genomic Analysis of Arctic Permafrost Bacterium *Nesterenkonia* sp. PF2B19 to Gain Insights into Its Cold Adaptation Tactic and Diverse Biotechnological Potential. *Sustainability*, 13(8), 4590. <https://doi.org/10.3390/su13084590>
- [79]. Radwan, S. S., Khanafer, M., & Al-Awadhi, H. (2019). Ability of the So-Called Obligate Hydrocarbonoclastic Bacteria to Utilize Nonhydrocarbon Substrates Thus Enhancing Their Activities Despite their Misleading Name. *BMC Microbiology*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1406-x>
- [80]. Lasa, I., Pozo, J. L. del, Penadés, J. R., & Leiva, J.. (2005). Biofilms bacterianos e infección. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 28(2), 163-175. Recuperado en 10 de abril de 2023, de http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1137-66272005000300002&lng=es&tlng=es
- [81]. Muhammad, M. H., Idris, A. L., Fan, X., Guo, Y., Yu, Y., Jin, X., Qiu, J., Guan, X., & Huang, T. (2020). Beyond Risk: Bacterial Biofilms and Their Regulating Approaches. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00928>
- [82]. Mani, I. (2020). Biofilm in bioremediation. *Bioremediation of Pollutants*, 375-385. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-819025-8.00018-1>
- [83]. de Carvalho, C. C. C. R. (2018). Marine Biofilms: A Successful Microbial Strategy With Economic Implications. *Frontiers in Marine Science*, 5. <https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00126>
- [84]. Preda, V. G., & Săndulescu, O. (2019). Communication is the key: biofilms, quorum sensing, formation and prevention. *Discoveries (Craiova, Romania)*, 7(3), e100. <https://doi.org/10.15190/d.2019.13>
- [85]. Becerra Gutiérrez, Lizzie Karen, & Horna Acevedo, María Valeria. (2016). Aislamiento de microorganismos productores de biosurfactantes y lipasas a partir de efluentes residuales de canales y suelos contaminados con hidrocarburos. *Scientia Agropecuaria*, 7(1), 23-31. <https://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2016.01.03>
- [86]. Eras-Muñoz, E., Farré, A., Sánchez, A., Font, X., & Gea, T. (2022). Microbial biosurfactants: a review of recent environmental applications. *Bioengineered*, 13(5), 12365–12391. <https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2074621>

- [87]. Saravanan, V., & Vijayakuma, S. (2015). Biosurfactants-Types, Sources and Applications. *Research Journal of Microbiology*, 10(5), 181-192. <https://doi.org/10.3923/jm.2015.181.192>
- [88]. Ratledge C. Degradation of aliphatic hydrocarbons. In: Watkinson I, editor. *Developments in biodegradation of hydrocarbons*. Vol 1. Essex: applied science; 1978. p. 1–45.
- [89]. Rehm H-J, Reiff I. Mechanisms and occurrence of microbial oxidation of long-chain alkanes. *Adv Biochem Eng*. 1981;19:175–216.
- [90]. Radwan SS, The SNA. Lipids of n-alkane-utilizing microorganisms and their application potential. *Adv Appl Microbiol*. 1993;39:29–90
- [91]. Mahjoubi, M., Aliyu, H., Neifar, M., Cappello, S., Chouchane, H., Souissi, Y., Masmoudi, A., Cowan, D. A., & Cherif, A. (2021). Genomic characterization of a polyvalent hydrocarbonoclastic bacterium *Pseudomonas* sp. strain BUN14. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-87487-2>
- [92]. Wasmund K., Burns K. A., Kurtböke I., Bourne D. G. (2009). Novel alkane hydroxylase gene (alkB) diversity in sediments associated with hydrocarbon seeps in the Timor Sea, Australia. *Appl. Environ. Microbiol*. 75, 7391–7398 10.1128/AEM.01370-09
- [93]. Izquierdo Romero, A. R. (2013). Biodegradacion de HAPs durante la biorremediacion aerobica de suelos contaminados con hidrocarburos de petroleo. Analisis de poblaciones bacterianas y genes funcionales. Universitat de Barcelona.