

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS**



**DISEÑO DE UN CONSORCIO BACTERIANO SINTÉTICO CON CEPAS AISLADOS
DE SEDIMENTOS MARINOS DE LA COSTA DE BAJA CALIFORNIA PARA LA
DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS (HAP)**

PROYECTO DE T E S I S

**PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA**

PRESENTA

Lic. Andrea Fernanda Barrios Navarro

Ensenada, Baja California, México

Agosto, 2024

RESUMEN

En el medio marino, los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) son una variedad de compuestos con diferentes propiedades fisicoquímicas y estructurales, confiriendo en los organismos efectos carcinogénicos, mutagénicos y tóxicos. Se realizó el diseño de consorcios bacterianos sintéticos con la herramienta de BSocial con 8 cepas bacterianas previamente seleccionadas. Los resultados permitieron el análisis de las interacciones sociales y crecimiento en el diseño de 255 combinaciones, se obtuvo 1 cepa con interacciones positivas (ZE) y 5 cepas con interacciones neutras (PA, ST, CF, CZ, RR). Con ellas, se diseñaron 2 consorcios sociales: X58 o A conformada por *Zobellella endophytica* (ZE), *Salinicola tamaricis* (ST) y *Rhodoccus ruber* (RR) y el consorcio X221 o B por *Paracoccus alcaliphilus* (PA), *Salinicola tamaricis* (ST), *Citrococcus zhacaiensis* (CZ), *Cellulosimicrobium funkei* (CF) y *Rhodoccus ruber* (RR). En los ensayos de degradación, las cepas PA, ZE y RR tuvieron una ligera disminución de fenantreno (PHE) y pireno (PYR) en 12 días, mientras que, en consorcio, la degradación de PHE se vio afectada por factores fisicoquímicos y, en el caso de PYR, la degradación no presentó cambios significativos. Los resultados indicaron que las interacciones sociales entre especies bacterianas pueden verse afectadas en su capacidad de división de labor en la degradación de HAP. Por lo que el estudio de las relaciones sinérgicas y antagonistas sugieren ser bastantes complejas al verse afectadas tanto por procesos físicos y sociales.

Palabras clave: Hidrocarburos aromáticos policíclicos, consorcios bacterianos sintéticos, biodegradación, interacciones sociales.

**FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS
POSGRADO EN OCEANOGRAFÍA COSTERA**

**DISEÑO DE UN CONSORCIO BACTERIANO SINTÉTICO CON CEPAS AISLADOS
DE SEDIMENTOS MARINOS DE LA COSTA DE BAJA CALIFORNIA PARA LA
DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS (HAP)**

T E S I S

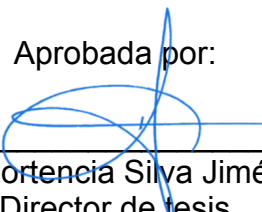
**QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA
OBTENER EL GRADO DE**

MAESTRO EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

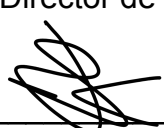
PRESENTA

ANDREA FERNANDA BARRIOS NAVARRO

Aprobada por:



Dra. Hortencia Silva Jiménez
Director de tesis



Dra. Jessica Purswani
Codirector de tesis



Dra. Elisabet Aranda Ballesteros
Sinodal



Dra. Nancy Ramírez Álvarez
Sinodal

Asunto: Voto aprobatorio sobre trabajo
de tesis de grado de Maestría

Dra. Ivone Giffard Mena
Coordinadora de Investigación y
Posgrado, F.C.M.
Presente

Estimada Dra. Giffard

Me dirijo a usted en mi calidad de Directora de tesis encargado de revisar la tesis de Maestría presentada por la estudiante **Andrea Fernanda Barrios Navarro** como parte de los requisitos para obtener el grado de **Maestro en Ciencias en Oceanografía Costera**.

Tras llevar a cabo una revisión minuciosa y exhaustiva del trabajo mencionado, es mi deber informarle que he emitido mi **Voto Aprobatorio** sobre la tesis titulada:

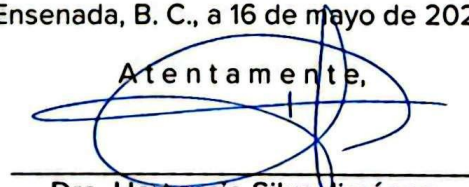
DISEÑO DE UN CONSORCIO BACTERIANO SINTÉTICO CON CEPAS AISLADOS DE SEDIMENTOS MARINOS DE LA COSTA DE BAJA CALIFORNIA PARA LA DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICICLICOS (HAP).

He realizado esta revisión con el compromiso de asegurar que el trabajo cumple con los estándares de calidad y excelencia académica requeridos por nuestro programa de posgrado. Después de un análisis detenido, he llegado a la conclusión de que el trabajo de tesis satisface plenamente estos criterios y representa una contribución valiosa al campo de la Oceanografía Costera.

El trabajo exhibe una sólida base teórica, una metodología rigurosa y una presentación coherente de los hallazgos. Las referencias bibliográficas están actualizadas y pertinentes, y las figuras y tablas son claras y respaldan eficazmente los argumentos del texto. La sección de conclusiones proporciona un resumen sólido de los resultados y sus implicaciones, la referencias y citas están actualizadas y son pertinentes.

Ensenada, B. C., a 16 de mayo de 2024

Atentamente,



Dra. Hortencia Silva Jiménez
Directora de tesis

c.c.p. Expediente del alumno

**Asunto: Voto aprobatorio sobre trabajo
de tesis de grado de Maestría**

Dra. Ivone Giffard Mena
Coordinadora de Investigación y
Posgrado, F.C.M.
Presente

Estimada Dra. Giffard

Me dirijo a usted en mi calidad de **Co-Directora de Tesis** encargado de revisar la tesis de Maestría presentada por la estudiante **Andrea Fernanda Barrios Navarro** como parte de los requisitos para obtener el grado de **Maestro en Ciencias en Oceanografía Costera**.

Tras llevar a cabo una revisión minuciosa y exhaustiva del trabajo mencionado, es mi deber informarle que he emitido mi **Voto Aprobatorio** sobre la tesis titulada:

DISEÑO DE UN CONSORCIO BACTERIANO SINTÉTICO CON CEPAS AISLADOS DE SEDIMENTOS MARINOS DE LA COSTA DE BAJA CALIFORNIA PARA LA DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS (HAP).

He realizado esta revisión con el compromiso de asegurar que el trabajo cumple con los estándares de calidad y excelencia académica requeridos por nuestro programa de posgrado. Después de un análisis detenido, he llegado a la conclusión de que el trabajo de tesis satisface plenamente estos criterios y representa una contribución valiosa al campo de la Oceanografía Costera.

El trabajo exhibe una sólida base teórica, una metodología rigurosa y una presentación coherente de los hallazgos. Las referencias bibliográficas están actualizadas y pertinentes, y las figuras y tablas son claras y respaldan eficazmente los argumentos del texto. La sección de conclusiones proporciona un resumen sólido de los resultados y sus implicaciones, la referencias y citas están actualizadas y son pertinentes.

Ensenada, B. C., a 16 de mayo de 2024

Atentamente,

PURSWANI JESSICA
RENUKA MOHAN -
X5896703D
Firmado digitalmente por
PURSWANI JESSICA RENUKA
MOHAN - X5896703D
Fecha: 2024.08.06 12:55:57
+02'00'
Dra. Jessica Purswani
Co-Directora de tesis

c.c.p. Expediente del alumno

Asunto: Voto aprobatorio sobre trabajo
de tesis de grado de Maestría

Dra. Ivone Giffard Mena
Coordinadora de Investigación y
Posgrado, F.C.M.
Presente

Estimada Dra. Giffard

Me dirijo a usted en mi calidad de Sinodal encargado de revisar la tesis de Maestría presentada por la estudiante **Andrea Fernanda Barrios Navarro** como parte de los requisitos para obtener el grado de **Maestro en Ciencias en Oceanografía Costera**.

Tras llevar a cabo una revisión minuciosa y exhaustiva del trabajo mencionado, es mi deber informarle que he emitido mi **Voto Aprobatorio** sobre la tesis titulada:

DISEÑO DE UN CONSORCIO BACTERIANO SINTÉTICO CON CEPAS AISLADOS DE SEDIMENTOS MARINOS DE LA COSTA DE BAJA CALIFORNIA PARA LA DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS (HAP).

He realizado esta revisión con el compromiso de asegurar que el trabajo cumple con los estándares de calidad y excelencia académica requeridos por nuestro programa de posgrado. Después de un análisis detenido, he llegado a la conclusión de que el trabajo de tesis satisface plenamente estos criterios y representa una contribución valiosa al campo de la Oceanografía Costera.

El trabajo exhibe una sólida base teórica, una metodología rigurosa y una presentación coherente de los hallazgos. Las referencias bibliográficas están actualizadas y pertinentes, y las figuras y tablas son claras y respaldan eficazmente los argumentos del texto. La sección de conclusiones proporciona un resumen sólido de los resultados y sus implicaciones, la referencias y citas están actualizadas y son pertinentes.

Ensenada, B. C., a 16 de mayo de 2024

Atentamente,

Firmado por **ARANDA BALLESTEROS ELIZABET** - 74655901V el día 02/08/2024 con un certificado emitido por AC FNMT Usuarios

Dra. Elisabet Aranda Ballesteros
Sinodal

c.c.p. Expediente del alumno

Asunto: Voto aprobatorio sobre trabajo
de tesis de grado de Maestría

Dra. Ivone Giffard Mena
Coordinadora de Investigación y
Posgrado, F.C.M.
Presente

Estimada Dra. Giffard

Me dirijo a usted en mi calidad de Sinodal encargado de revisar la tesis de Maestría presentada por la estudiante **Andrea Fernanda Barrios Navarro** como parte de los requisitos para obtener el grado de **Maestro en Ciencias en Oceanografía Costera**.

Tras llevar a cabo una revisión minuciosa y exhaustiva del trabajo mencionado, es mi deber informarle que he emitido mi **Voto Aprobatorio** sobre la tesis titulada:

DISEÑO DE UN CONSORCIO BACTERIANO SINTÉTICO CON CEPAS AISLADOS DE SEDIMENTOS MARINOS DE LA COSTA DE BAJA CALIFORNIA PARA LA DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMATICOS POLICÍCLICOS (HAP).

He realizado esta revisión con el compromiso de asegurar que el trabajo cumple con los estándares de calidad y excelencia académica requeridos por nuestro programa de posgrado. Después de un análisis detenido, he llegado a la conclusión de que el trabajo de tesis satisface plenamente estos criterios y representa una contribución valiosa al campo de la Oceanografía Costera.

El trabajo exhibe una sólida base teórica, una metodología rigurosa y una presentación coherente de los hallazgos. Las referencias bibliográficas están actualizadas y pertinentes, y las figuras y tablas son claras y respaldan eficazmente los argumentos del texto. La sección de conclusiones proporciona un resumen sólido de los resultados y sus implicaciones, la referencias y citas están actualizadas y son pertinentes.

Ensenada, B. C., a 16 de mayo de 2024

Atentamente,


Dra. Nancy Ramírez Álvarez
Sinodal

c.c.p. Expediente del alumno

ÍNDICE

RESUMEN	2
DEDICATORIA.....	14
AGRADECIMIENTOS	15
1. INTRODUCCIÓN	17
2. MARCO TEÓRICO	18
2.1 Hidrocarburos del petróleo.....	18
2.2 Remediación de hidrocarburos.....	21
2.3 Consorcios bacterianos.....	24
3. ANTECEDENTES.....	25
3.1 Presencia de HAP en la Costa de Baja California.....	25
3.2 Bacterias con capacidad de degradación.....	26
3.3 Diseño de consorcios sociales sintéticos.....	27
4. JUSTIFICACIÓN.....	29
5. HIPÓTESIS.....	30
6. OBJETIVOS.....	30
6.1 General	30
6.2 Específicos.....	30
7. MATERIALES Y METODOLOGÍA.....	31
7.1 Selección de cepas bacterianas para el diseño del consorcio.....	31
7.2 Prueba de selección de crecimiento y tolerancia de las cepas en diferentes..... hidrocarburos y petróleo crudo ligero.....	32
7.3 Amplificación de genes marcadores <i>alkB</i> y <i>pahE</i>	33
7.4 Crecimiento de alto rendimiento (HT-Growth).....	35
7.5 Interacciones sociales en consorcios bacterianos sintéticos (BSocial).....	37

7.6	Evaluación de la degradación de HAP en consorcios bacterianos sintéticos.....	38
7.6.1	Método de extracción.....	38
8.	RESULTADOS.....	40
8.1	Evaluación de la tolerancia de distintos HAP en ensayos cualitativos en placa.....	40
8.2	Ensayo de tolerancia en fracción ligera de petróleo en las cepas potenciales.....	42
8.3	Identificación de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos.....	44
8.4	Comportamientos Sociales.....	46
8.5	Análisis de las variables de crecimiento de los consorcios.....	47
8.6	Interacciones sociales bacterianos.....	48
8.7	Efecto en el aumento de la biodiversidad.....	50
8.8	Efecto de la riqueza del consorcio social sobre la estabilidad de la población.....	53
8.9	Degradación de HAP.....	54
8.9.1	Cepas individuales.....	54
8.10	Degradación de los consorcios bacterianos sociales por 12 días.....	57
8.10.1	Degradación de consorcios sociales y de crecimiento por 30 días.....	58
9.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	60
9.1	Análisis estadístico de la degradación por cepas individuales.....	60
9.1.1	Fenantreno (PHE).....	60
9.2	Análisis estadístico de la degradación de PHE y PYR por los consorcios sociales durante 12 días	61
9.2.1	Fenantreno (PHE).....	61
9.2.2	Pireno (PYR).....	62

9.3	Degradación de PHE y PYR por los consorcios sociales y de crecimiento a los 30 días	63
9.3.1	Fenantreno (PHE)	63
9.3.2	Pireno (PYR)	64
10.	DISCUSIÓN	65
10.1	Comportamientos sociales de las especies bacterianas	65
10.2	La estabilidad de los consorcios está relacionada con el aumento de la diversidad	67
10.3	Cuantificación de la degradación de HAP	68
11.	CONCLUSIONES	70
12.	PERSPECTIVAS	71
14.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Composición general del petróleo.....	19
Fig. 2 16 HAP en lista de contaminantes prioritarios de acuerdo con USEPA.	21
Fig. 3 Destino de los HAP en los mecanismos de degradación.	22
Fig. 4 Interacciones microbianas a partir de un sustrato (contaminante) y señalización por metabolitos dentro de un consorcio bacteriano.	25
Fig. 5 Ensayos de prueba para la selección de 8 cepas potenciales para la degradación de HAP..	33
Fig. 6 Metodología para el análisis de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos alifáticos (alkB), monoaromáticos (tolueno/bifenilo) y HAP (pahE1).....	35
Fig. 7 Protocolo de HT-Growth por Purswani et al. (2017). Obtención de los datos de interacciones sociales de acuerdo a las variables de crecimiento de las 255 combinaciones.	37
Fig. 8 Aplicación del protocolo de extracción de HAP para cepas individuales y consorcios sociales. Metodología reportada por Aranda et al. (2009).	39
Fig. 9 Aparición de turbidez en diferentes cepas en presencia de la fracción ligera de petróleo con medio Bushnell-Haas.	44
Fig. 10 Crecimiento de los 255 consorcios basado en el número de generaciones durante la fase logarítmica.....	47
Fig. 11 Fitness asignados para el comportamiento social de cada cepa en los consorcios representado como un diagrama de cajas.....	49
Fig. 12 Efecto de la riqueza de las especies sobre el fitness de la población. Efecto del fitness según la riqueza de las especies del consorcio según el número de generaciones (I) o la tasa de crecimiento (II).	51
Fig. 13 Efecto del aumento de la diversidad sobre el fitness de cada consorcio según el número de generaciones (I) o la tasa de crecimiento (II).	52
Fig. 14 Coeficiente de variación (CV) para la determinación de la estabilidad del consorcio respecto a la riqueza de diversidad.	53
Fig. 15 Degradación de PHE de las 8 cepas bacterianas potenciales.	55
Fig. 16 Degradación de PYR de las 8 cepas bacterianas potenciales	56
Fig. 17 Degradación de consorcios bacterianos en presencia de PHE durante 12 días.	57
Fig. 18 Degradación de consorcios bacterianos en presencia de PYR durante 12 días.	58

Fig. 19 Degradación de PHE durante 30 días por consorcios sociales (A y B) y consorcios con mejor crecimiento (C y D). Las barras de error representan los valores de desviación estándar.	59
Fig. 20 Degradación de PYR durante 30 días por consorcios sociales (A y B) y consorcios con mejor crecimiento (C y D).	59
Fig. 21 Comparación de los Intervalos de confianza de las cepas individuales en PHE utilizando Fischer $\alpha= 0.05$.	61
Fig. 22 Comparación de los Intervalos de confianza de los consorcios sociales con PHE utilizando Fischer $\alpha= 0.05$ p.	62
Fig. 23 Comparación de los Intervalos de confianza de los consorcios sociales con PYR utilizando Fischer $\alpha= 0.05$ p con la prueba de LSD.	63
Fig. 24 Comparación de los Intervalos de confianza de los consorcios sociales con PHE utilizando Fischer $\alpha= 0.05$ p.	64
Fig. 25 Comparación de los Intervalos de confianza de los consorcios sociales con PYR utilizando Fischer $\alpha= 0.05$ p.	65

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I Cepas evaluadas en ensayos de crecimiento y tolerancia aisladas de sedimentos y agua superficial en el Puerto de Rosarito, y en el Puerto El Sauzal, B.C.....	31
Tabla II Condiciones para PCR punto final. Amplificación de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos.....	34
Tabla III Volúmenes necesarios de acuerdo con el número de cepas utilizadas para realizar las combinaciones para cada consorcio.....	36
Tabla IV Ensayo de crecimiento de las 14 cepas potenciales para el CBS en diferentes hidrocarburos durante 14 días.....	41
Tabla V Ensayo de crecimiento en fracción ligera del petróleo en cepas potenciales para el diseño de un CBS durante 14 días.	42
Tabla VI Amplificación de los genes marcadores asociados a hidrocarburos alifáticos (<i>alkB</i>) asociado a la degradación de tolueno/bifenilo y el gen <i>pahE1</i> para HAP.	45
Tabla VII Representación de los individuos presentes en los 10 mejores consorcios bacterianos en orden descendente (del más apto al menos apto) según el número de generaciones. Las celdas sombreadas de colores representan la presencia de la cepa bacteriana en el consorcio;.	48
Tabla VIII Asignación del comportamiento social según la prueba t-Student ($p \leq 0.05$) de la herramienta BSocial para la selección de las mejores cepas según el número de generaciones o la tasa de crecimiento.....	50
Tabla IX Condiciones de análisis de varianza (ANOVA).....	60

DEDICATORIA

A mi madre, Blanca Alicia Navarro Palacios, por ser un pilar fundamental en mi vida y a lo largo de este proceso, gracias por ser mi fortaleza cuando más lo necesitaba.

A mi hermano y a mi padre, por toda la paciencia otorgada.

A mi novio, Alejandro Villegas, por apoyarme y motivarme.

A mi abuelo, René Navarro Padilla.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Hortencia Silva Jiménez, por depositar su confianza y abrirme las puertas de su laboratorio en estos dos años. Agradecida de coincidir con una persona como usted, por su apoyo, cariño y no permitir que me desanimara. No tengo palabras para agradecer todo su apoyo tanto académico como emocional. Gracias por hacer tan bonito el ámbito de la ciencia.

A la Dra. Jessica Purswani, Dra. Elisabet Aranda y Dra. Nancy Ramírez. Jessi y Eli, gracias por permitirme estar con personas tan talentosas, por su paciencia -bastante paciencia-. Así como sus consejos y apoyo. Dra. Nancy, gracias por hacerme ver que no todo es tan difícil como me gusta pintar, por su atención y consejos.

A mi novio, Alejandro Villegas, por darme todos esos ánimos que ni yo misma podía, por confiar y darme todo el amor que necesitaba. No olvido los desvelos, trabajos y frustraciones que compartías a mi lado, gracias por ser mi apoyo incondicional.

A mis compañeros de laboratorio, a los que están y estuvieron, agradezco a cada uno sus enseñanzas en mi vida, las risas y el trabajo en equipo que pude aprender gracias a ustedes. Especialmente a Ileana, gracias por ser mi maestra, compañera y amiga.

A mis compañeros y amigos de Granada. A mi doble española, María, por integrarme y regalarme tu amistad durante los 3 meses que estuve de estancia. Por las noches de juego de mesa, ver series y trabajo extenso en el laboratorio. Estuviste en mis buenos y en mis malos momentos regalándome una sonrisa y un abrazo, gracias por darme tu amistad y cariño. Al equipo estrés: Aurora, Sandra y Chema. Fue un placer coincidir con ustedes, por los días en el potenciómetro, haciendo medios de cultivo y regando recipientes de tierra todas las tardes. Los llevo en mi corazón siempre. A Auro, Ángeles, Elena, Sara, Pame, Alessandro, Antonio, Abraham, María y a todos los compañeros del Instituto, fue grato conocerlos y compartir experiencias -y muchas tazas de café y medias tostadas- juntos.

Agradezco al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología CONAHCYT (antes CONACYT) por el apoyo económico brindando que me permitió realizar este trabajo de tesis de Maestría durante estos 2 años.

Finalmente, a mi familia, por estar siempre a mi lado, motivándome a seguir, aunque sintiera que no podía, por escucharme quejarme, llorar, alegrarme y emocionarme estos 2 años. Por darme la oportunidad de conocer otro lado del mundo. Por su paciencia infinita y su amor, gracias.

1. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, el aumento acelerado de las actividades antropogénicas, representan una amenaza al medio ambiente, especialmente a los ecosistemas marinos (Nunes & Leston, 2020). Los océanos y las zonas costeras son lugares donde ocurren procesos biogeoquímicos cruciales. Sin embargo, debido a su ubicación y el aumento de asentamientos de la población, así como de zonas industriales, estos sistemas costeros están expuestos y han sufrido impactos significativos debido a la introducción de un mayor número de contaminantes, así como un aumento en su concentración (Lu *et al.*, 2018). Uno de los contaminantes marinos más frecuentes es el petróleo, con estimaciones de derrames accidentales y/o naturales anuales que oscilan entre 1.5 y 10 millones de toneladas al océano (Hazaimah & Ahmed, 2021). La presencia de petróleo causa daños a la biodiversidad marina y a las comunidades microbianas que no pueden tolerar su presencia debido a las propiedades tóxicas, carcinogénicas y mutagénicas que presentan. Estos efectos incluyen irritación en la piel y los ojos, daño al sistema respiratorio, problemas reproductivos, alteraciones en el sistema inmunológico y toxicidad en órganos vitales. Además, los efectos pueden propagarse a través de la cadena alimentaria -conocido como biomagnificación-, afectando a organismos desde los niveles tróficos inferiores hasta los superiores (El-Sayed *et al.*, 2022). Los derrames de petróleo también conllevan a consecuencias económicas y sociales significativas. Pueden afectar a la industria, que dependen de ecosistemas marinos saludables. La recuperación de los ecosistemas afectados por derrames de petróleo puede llevar años o incluso décadas, y los costos asociados con la limpieza y restauración pueden ser enormes.

Para hacer frente a los efectos negativos de los derrames de petróleo en el medio marino, se han implementado con el tiempo medidas de prevención y respuesta por instituciones gubernamentales en países como Estados Unidos y Canadá (National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine, 2022). Estas medidas incluyen regulaciones para la navegación de buques petroleros, mejoras en la tecnología de extracción y transporte de petróleo, así como la capacidad de respuesta rápida para la inmovilización y/o remediación. Sin embargo, la mayoría de estas tecnologías pueden ser difíciles de

adquirir debido a los altos costos de operación y equipo, así como la presencia de metabolitos derivados de la descomposición incompleta que pudieran ser más tóxicos que el mismo contaminante (Ahmed & Fakhruddin, 2018). Por lo que el desarrollo, diseño y aplicación de nuevas tecnologías o mejoras en procesos con un menor costo operacional y amigable con el ambiente como es el caso de la biorremediación, son de vital importancia para contar con herramientas y actuar en eventos de contaminación por derrames de petróleo.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Hidrocarburos del petróleo

Para poder entender como interactúa el petróleo como un contaminante ya dentro de un ecosistema, es indispensable conocer su definición y composición. El petróleo es una mezcla compleja de compuestos orgánicos, como gas natural, metales traza y por hidrocarburos (aproximadamente del 50-98%) (Fingas, 2011; Kumar et al., 2018). Sus productos son utilizados tanto en combustibles, disolventes, así como materia prima en la industria textil, farmacéutica y del plástico. Con ello, el petróleo se puede clasificar según su composición y origen.

Dentro de la composición química del petróleo (Fig. 1), los hidrocarburos más abundantes son los alifáticos, representando el 58% de la mezcla. Estos hidrocarburos pueden presentarse en forma de cadenas lineales, ramificadas o en la formación de estructuras cíclicas. Se caracterizan por ser los constituyentes más abundantes del petróleo y los primeros en ser degradados (Sonawdekar, 2012; Mahjoubi et al., 2018). De acuerdo con su origen, los hidrocarburos alifáticos son encontrados en depósitos de petróleo y gas natural (origen petrogénico) y así como su presencia por plantas vasculares, algas, plancton y bacterias (origen biogénico) (Moore & Ramamoorthy, 1984). El 14% corresponde a compuestos polares como resinas y asfaltenos. De la mezcla de petróleo, los hidrocarburos aromáticos representan el 28% del petróleo crudo. De ese porcentaje, los hidrocarburos aromáticos se dividen en compuestos monoaromáticos, caracterizados por tener un anillo de benceno y por su propiedad de ser muy volátiles, tales como los compuestos BTEX (benceno, etilbenceno, tolueno y xilenos). Mientras que los

hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) se componen de un arreglo de dos o más anillos de benceno fusionados (Prince & Atlas, 2005). Los HAP como fenantreno, naftaleno y pireno, suelen ser muy persistentes en el medio ambiente debido a su estructura que le confiere estabilidad electroquímica, y, en consecuencia, dificultad en su degradación tanto fisicoquímica como biológica (Elumalai *et al.*, 2024). Su presencia en el entorno acuático está clasificada por su origen pirogénico (combustión incompleta) y por su origen petrogénico (derivado de combustible fósil). Las actividades industriales han desatado el aumento acelerado de la presencia y concentración de HAP, ocasionando que las diferentes fuentes de HAP sean ubicuos en el ambiente, (Honda & Suzuki, 2020; Premnath *et al.* 2021).

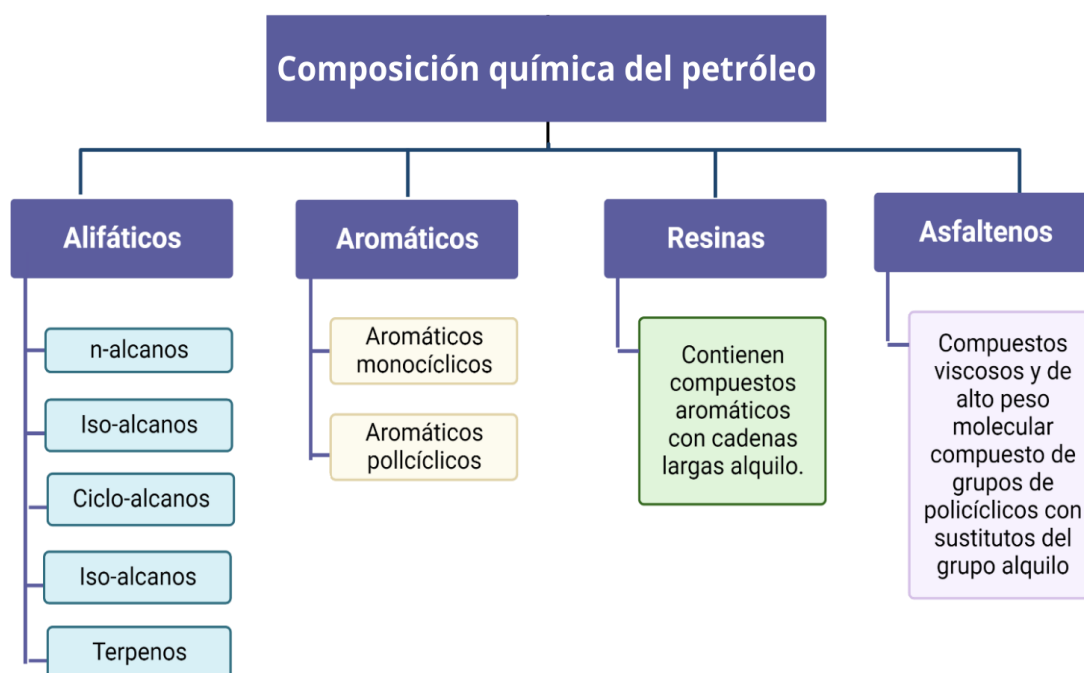


Fig. 1 Composición general del petróleo. Modificado de Daher & Ahmed (2021).

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) son una familia de más de 100 compuestos orgánicos con potencial tóxico y carcinogénico. Debido a su distribución de resonancia de electrones en sus anillos aromáticos, les proporciona una estabilidad que los hace ser persistentes en el medio que se encuentre, por ello, son considerados como

un contaminante ubicuo en el ambiente (Truskewycz *et al.*, 2019) por lo que representan a uno de los grandes grupos de contaminantes distribuidos ampliamente en el medio marino (Macías-Zamora, *et al.* 2002).

Su clasificación está dada por su estructura química, asociado al número de anillos de benceno fusionados, por lo que se divide en HAP de bajo peso molecular (2 a 3 anillos) y HAP de alto peso molecular (4 o más anillos de benceno). Sus características hidrofóbicas, baja solubilidad y absorción a partículas de sedimentos marino, así como su persistencia en el ambiente definen a que sean considerados como un grupo de compuestos potencialmente peligrosos y tóxicos para el medio ambiente y para los organismos vivos presentes, debido a la acumulación de sustancias tóxicas en los sedimentos y tejidos (Goveas *et al.* 2022).

Es por ello que la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (Fig. 2) (USEPA por sus siglas en inglés) consideró 16 de estos compuestos en la lista de contaminantes prioritarios de interés (Srivastava *et al.* 2019).

Cuando los HAP ya son introducidos al medio ambiente, estarán sujetos a fenómenos tanto físicos, químicos y biológicos, incluyendo la volatilización oxidación, degradación microbiana, bioacumulación entre otros, Uno de los procesos de mayor importancia son la transformación total o parcial del contaminante mediante la degradación microbiana, estos mecanismos son utilizados en técnicas potenciales para la biorremediación de manera alternativa o complementaria a otros tratamientos convencionales (Cerniglia, 1993).

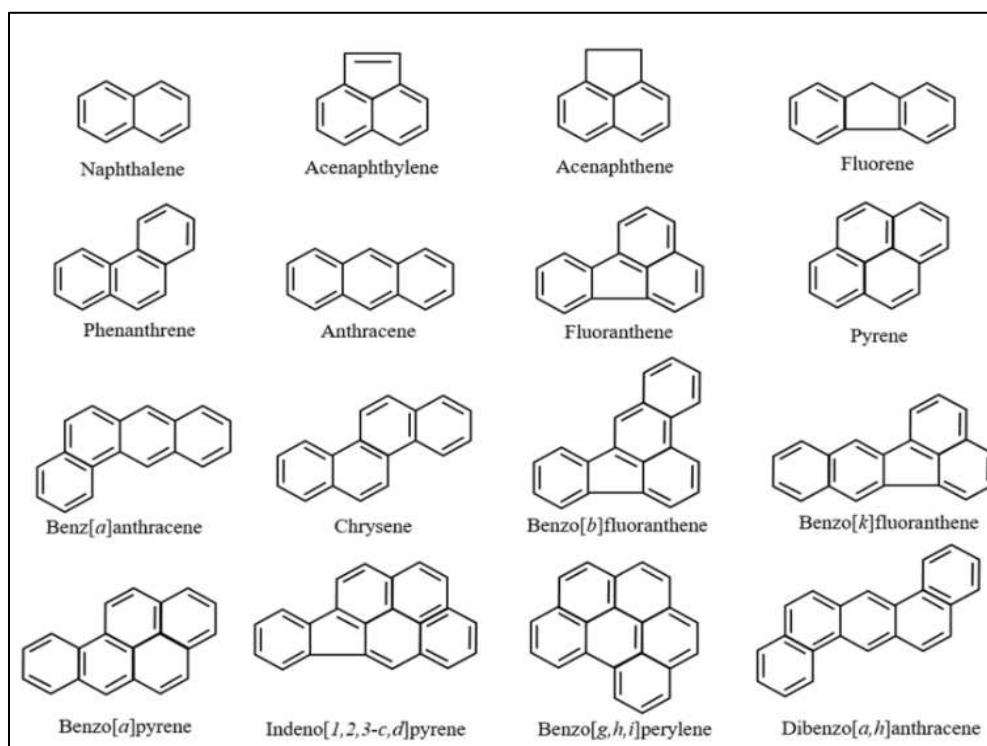


Fig. 2 16 HAP en lista de contaminantes prioritarios de acuerdo con USEPA. Obtenido de Honda & Suzuki, 2020.

2.2 Remediación de hidrocarburos

La remediación de sitios contaminados con derivados del petróleo debe tener una especial atención debido a la frecuencia de derrames, pequeñas fugas en tanques de almacenamiento en actividades industriales y el transporte marítimo, cuentan con la probabilidad de encontrarse en el medio de manera continua a lo largo del tiempo, ocasionando daños que podrían llegar a ser irreparables para el entorno que lo rodea.

Conforme a lo anterior, la búsqueda de estrategias de remediación que impliquen la reducción o transformación completa de los contaminantes en el ambiente es necesaria (Fig. 3). Para restaurar el entorno por la contaminación de hidrocarburos estrategias físicas (quema controlada, desnatado y absorción), químicas (por ejemplo, dispersión y solidificación) y biológicas (biorremediación: fitorremediación, bioaumentación, consorcios bacterianos) se han ido desarrollando (Xue *et al.* 2015). Sin embargo, gran parte de este tipo de técnicas de remediación presentan inconvenientes en cuanto al

costo y en los impactos que pueden afectar al ecosistema durante su tratamiento (Peng *et al.*, 2018).

En el caso de estos métodos aplicados en el ecosistema marino, a partir de estrategias físicas, como las barreras y utilización de materiales absorbentes, son considerados como primera línea en eventos de lugares contaminados como los vertidos de petróleo en el océano los cuales muy pocas veces se consigue inmovilizar o remediar el sitio por completo. Por otro lado, los métodos químicos como los dispersantes, compuestos por una mezcla de tensioactivos, reducen la tensión superficial entre el agua y el contaminante, facilitando su dispersión. Aunque han sido utilizados como medida de respuesta, solo están permitidos bajo ciertas propiedades y condiciones de las costas ya que generan un daño a la calidad de la columna de agua (Nikolopoulou & Kalogerakis, 2009).

En los últimos años, con la mejora de la concienciación medioambiental y el desarrollo de nuevas tecnologías más amigables con el ambiente, así como de bajo costo y mayor eficiencia, ha tomado relevancia el uso de métodos relacionados con la biodegradación.

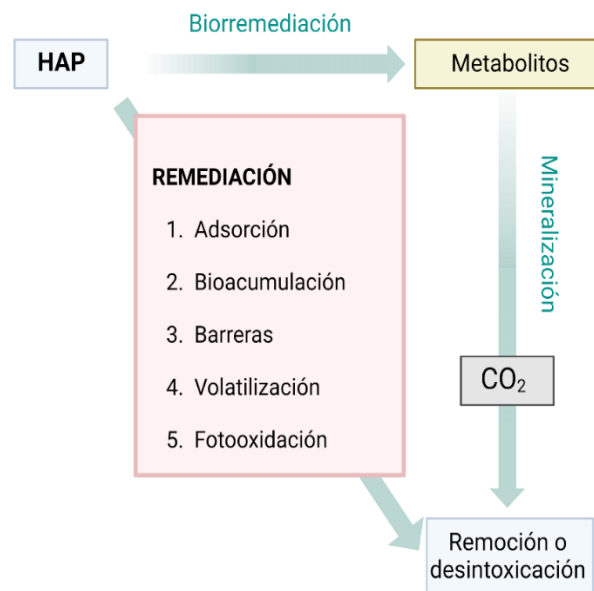


Fig. 3 Destino de los HAP en los mecanismos de degradación. Modificado de Cerniglia (1993).

La biorremediación es una tecnología que aprovecha la capacidad de organismos vivos para reducir, degradar y/o eliminar contaminantes a partir de la transformación compuestos tóxicos a otros compuestos o en productos inocuos, minimizando el riesgo por la presencia del contaminante y así restaurar al ecosistema a su estado normal (Santos *et al.*, 2018).

La biorremediación de forma general se enfoca en promover la degradación biológica de manera natural, presentándose como una tecnología que emplea enzimas, sustancias estimulantes, microorganismos como bacterias y hongos, así como plantas, para convertir compuestos orgánicos presentes en suelos, aire y agua como fuente de energía por la transformación del contaminante a tratar (Mahjoubi *et al.*, 2018).

Dentro de ellos, el empleo de microorganismos aislados de sitios previamente contaminados ha demostrado tener mecanismos y habilidades de cometabolizar HAP debido a su adaptación al ambiente para sobrevivir en presencia de estos contaminantes (Ghosal *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2021).

Existen diferentes estrategias de biorremediación utilizadas para la descontaminación de compuestos como HAP tales como la bioaumentación y bioestimulación.

La bioaumentación es el proceso de adición de cepas seleccionadas para la mejorar de la degradación de ciertos compuestos. Este tipo de estrategia comprende el enriquecimiento con microorganismos nativos junto con microorganismos no nativos, elaborando una mezcla de especies en comunidad, con el fin de que cuenten con la capacidad de degradación de contaminantes objetivos (Huang & Ye, 2020). Por otra parte, la bioestimulación comprende a la adición de nutrientes limitantes o sustratos específicos que aumentan la capacidad de degradación y estimula la actividad metabólica tales como potasio, nitrógeno y fósforo. La adición de biosurfactantes potencia la degradación de compuestos contaminantes como hidrocarburos alifáticos. Para esta técnica es necesario llevar un control que monitoree los nutrientes necesarios para la degradación (Hazaimah & Ahmed, 2021).

2.3 Consorcios bacterianos

En la naturaleza, las bacterias suelen existir en comunidades diversas en términos de taxonomía y genotipo. Estas comunidades bacterianas compiten entre sí por recursos limitados como nutrientes y minerales. Además, a través de sus actividades metabólicas, las bacterias pueden modificar su entorno, lo que provoca cambios significativos en el crecimiento y metabolismo de otros organismos que cohabitan con ellas. Estas presiones selectivas derivadas de la competencia y la modificación del entorno han provocado el desarrollo de diversas estrategias bacterianas para sobrevivir y reproducirse. Así, se han generado una amplia gama de interacciones ecológicas y una gran diversidad de adaptaciones bacterianas (D'Souza *et al.* 2018).

Al grupo de microorganismos diversos que tienen la capacidad de actuar juntos como comunidad se les denomina consorcios bacterianos. Estas comunidades presentan grandes ventajas en los procesos de biorremediación, ya que realizan diversas interacciones que da adaptación y supervivencia a cada microorganismo, confiriéndoles estabilidad y aptitud ante los cambios ambientales (Zafra *et al.*, 2017). El uso de los consorcios bacterianos a partir de sus interacciones sinérgicas puede mejorar la degradación de compuestos tóxicos debido a la coordinación metabólica (Gupte *et al.* 2016; Edwards & Kjellerup, 2013). Lo que caracteriza a los consorcios bacterianos es la capacidad de realizar funciones que requieren múltiples pasos, así como tareas más complejas para utilizar los recursos disponibles en el entorno. Los consorcios son un buen modelo para el estudio de las interacciones entre comunidades bacterianas en procesos de biodegradación, ya que presuponen la aplicación de diferentes mecanismos sobre un sustrato, mediante la (Desai *et al.* 2010).

Mientras que los consorcios bacterianos naturales se componen de una mezcla de bacterias con funciones a menudo desconocidas, la construcción de consorcios bacterianos sintéticos (CBS, por sus siglas), permite generar sistemas con una función conocida (Großkopf & Soyer, 2014). Los CBS son entonces, comunidades de microorganismos diseñados en condiciones relativamente bien definidas que interactúan entre sí y son capaces de producir los comportamientos deseados, como por ejemplo en

la producción o degradación de una sustancia de interés (Kong *et al.* 2018; Hays *et al.* 2015). Estas herramientas permiten aplicar las comunidades bacterianas a problemas del mundo real en los que los atributos naturales de los consorcios son de gran valor gracias a sus interacciones entre ellas.

Las interacciones pueden clasificarse en un impacto positivo, negativo o neutro. La división de labor, la competencia y el comensalismo pueden ejercer funciones esenciales en un consorcio bacteriano. Un factor importante para los consorcios son la producción de enzimas clave que pueden complementarse entre sí. En la Fig. 4 se presenta un esquema representativo de las interacciones microbianas a partir de un sustrato.

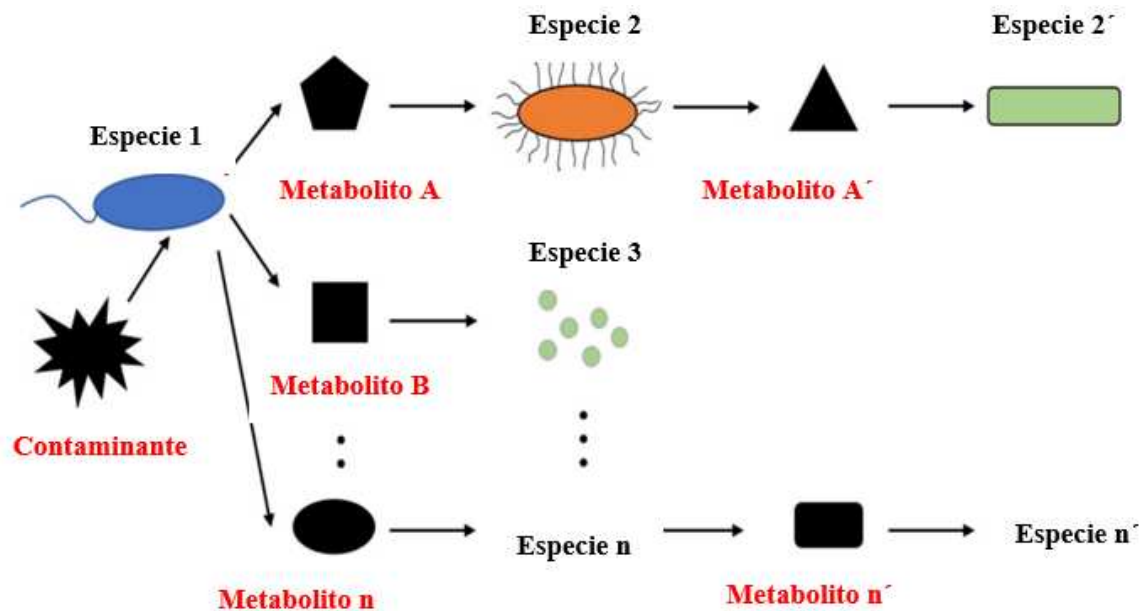


Fig. 4 Interacciones microbianas a partir de un sustrato (contaminante) y señalización por metabolitos dentro de un consorcio bacteriano.

3. ANTECEDENTES

3.1 Presencia de HAP en la Costa de Baja California

La presencia de HAP a lo largo de la costa de Baja California (CBC) ha sido objeto de estudio en los últimos años. La CBC, al compartir frontera con Estados Unidos (USA, por sus siglas en inglés), se ve afectada por la contaminación de aguas residuales sin tratamiento, actividades como la acuicultura, agricultura, transporte marítimo, así como

el crecimiento acelerado de ciudades como California (USA), Tijuana, Rosarito y Ensenada (Baja California, B.C.) (Ramos-Mendoza *et al.*, 2024; Briseño-Guerrero, 2024). Entre las investigaciones que se han realizado se encuentran los estudios llevados a cabo por Macias-Zamora (1996) en donde se realizaron análisis cuantitativos en sedimentos marinos, encontrando la presencia de HAP de origen antropogénico. Posteriormente, en 2002, Macias-Zamora *et al.* reportaron concentraciones de HAP en la Bahía de Todos Santos, donde la mayor concentración de HAP en la zona de muestreo fue representado por HAP de 3 a 4 anillos de origen pirogénico. La deposición atmosférica y las descargas de aguas residuales municipales en la Bahía Todos Santos resultaron ser las fuentes de HAP más importantes. En 2014, Macías-Zamora *et al.* detectaron la presencia de contaminantes prioritarios como PYR antraceno, fluoreno, naftaleno, PHE, criseno y benzo[a]pireno. El origen de estos contaminantes está relacionado con el transporte de las descargas de aguas residuales de la planta de tratamiento de Tijuana, así como la circulación local.

Recientemente, Ramos-Mendoza *et al.* (2024) y Briseño-Guerrero (2024), reportaron la presencia de HAP en sedimentos marinos de 33 puntos de la Costa Noroccidental de Baja California, así como la presencia del gen *pahE* relacionado con la degradación de HAP en zonas de muestreo cercanas a las plantas de tratamiento y en puntos de mayor actividad antropogénica. Estos estudios confirman la presencia de HAP en la costa, por lo que los efectos negativos de dichos contaminantes están latentes en la costa de Baja California.

3.2 Bacterias con capacidad de degradación

Se ha documentado el papel esencial de las bacterias en la remoción de HAP en ambientes contaminados. En el caso de ambientes marinos, existen géneros bacterianos presentes en la degradación de HAP. Wang *et al.* (2022) aislaron una cepa hidrocarbonoclasta obligada del género *Cycloclasticus* con la capacidad de degradar naftaleno, fenantreno, pireno entre otros HAP en más del 57% por 5 días. En otros estudios, se describieron dos cepas del género *Bacillus* y *Acinetobacter* aisladas de una esponja de mar con la capacidad de degradar naftaleno (NAPH) (Marzuki *et al.*, 2021).

Además de ello, nuestro grupo de trabajo ha realizado la búsqueda de bacterias hidrocarbonoclastas en la región, es decir, bacterias capaces de degradar hidrocarburos. En un trabajo reportado por Silva Jiménez *et al.* (2018) se realizaron análisis de HAP en muestras de sedimentos y columna de agua del Puerto de Rosarito y el Sauzal, el primero debido a que hay una monoboya utilizada para la carga y almacén de combustible de Petróleos mexicanos (PEMEX) que provee de combustible a todo el estado de Baja California, y el Puerto del Sauzal por la gran actividad industrial que se realiza en la zona. En las muestras, encontraron concentraciones de pireno, naftaleno, bifenilo y antraceno. Además, lograron aislarse 52 bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Kocuria* y *Zobellella*; presentes en las muestras y en presencia de HAP (pireno). Lo que nos habla de que sí hay una diversidad bacteriana con potencial degradación y/o tolerancia a los HAP en la CBC.

Del mismo modo, se caracterizó la cepa de *Rhodococcus ruber* MSA14 con la alta capacidad de tolerancia a concentraciones de PYR, PHE y NAPH. En el ensayo de degradación con PYR, se obtuvo una eliminación del 30% en un periodo de 27 días (Embarcadero-Jiménez, 2024).

En un trabajo reciente reportado por Ramos-Mendoza *et al.* (2024) investigaron la diversidad bacteriana que existe a lo largo de los sedimentos marinos de la costa de Baja California y su capacidad metabólica para la potencial degradación de HAP utilizando técnicas independientes de cultivo; realizaron análisis metagenómicos que infieren la presencia de comunidades bacterianas hidrocarbonoclastas con potencial metabólico para degradar HAP en los sedimentos marinos de la CBC.

Con ello, el aislamiento y el conocer la capacidad catabólica de bacterias hidrocarbonoclastas permitirá el diseño de un consorcio bacteriano sintético, a partir de la sinergia y la división de trabajo entre diferentes cepas aisladas.

3.3 Diseño de consorcios sociales sintéticos

Es poco común que los microorganismos aislados con capacidad de metabolizar contaminantes cuenten con todos los genes requeridos para su degradación, por lo que

se ha desarrollado el diseño de consorcios bacterianos sintéticos (CBS) para la completa degradación donde cada microorganismo tiene un papel específico en el proceso metabólico. Para llevarlo a cabo, se han desarrollado diferentes estrategias para el diseño de un CBS. Las principales técnicas utilizadas para su diseño son: La aproximación *top-down* y la aproximación *bottom up*.

La aproximación *top-down* utiliza una comunidad microbiana nativa para realizar funciones deseadas por la modificación de variables fisicoquímicas del ambiente en que se encuentre; tales como pH, temperatura, condiciones redox, entre otros. Se realiza a partir del enriquecimiento artificial y el cribado de consorcios sintéticos funcionales. En este caso, los consorcios se consideran como una unidad con funciones definidas sin considerar la división de trabajo entre especies presentes (Li *et al.*, 2021).

Otra metodología aplicada es la aproximación *bottom-up*, la cual selecciona microorganismos de una muestra ambiental para obtener comunidades bacterianas capaces de realizar los procesos metabólicos de interés en base a interacciones sinérgicas o el mutualismo, se construye las conexiones metabólicas entre las especies por medio del cometabolismo (Cao *et al.*, 2022). Esta cuenta con la desventaja de que, a pesar de obtener muestras de gran diversidad, puede afectar la presencia de organismos que no aportan en las tareas de degradación y competir por los recursos, habiendo dominancia de ciertos microorganismos (Gilmore *et al.* 2019; Cao *et al.* 2022).

Cuando se está construyendo un consorcio bacteriano sintético, se ha visto la problemática en la selección de cepas potenciales que puedan coexistir con otras y al mismo modo, contar con un desempeño óptimo en la degradación de contaminantes. Debido a ello, se ha desarrollado una técnica para diseñar consorcios microbianos descifrando de manera individual, el comportamiento social de cada cepa, sólo utilizando los que aporten una mejora positiva a la comunidad o aquellos que, no afecten de manera neta a la comunidad (interacción neutral). Dado a la complejidad de utilizar un modelo que determine las interacciones de más de dos especies, se desarrolló una herramienta denominada BSocial, la cual, utilizando el método de High Throughput-Growth (HT-

Growth) permite observar dichas interacciones a través de variables como la velocidad de crecimiento (k) y el número de generaciones (n) de las combinaciones factoriales, teniendo como resultado la asignación un comportamiento social individual neto: positivo, negativo y neutro (Purswani *et al.* 2017).

La aplicación de este novedoso método ha sido reportada por Purswani *et al.* (2017) en la degradación de aditivos de combustible (éter metil tert-butílico y etil tert-butílico) y por Ángeles de-Paz *et al.* (2023), en este último realizaron el diseño de un consorcio con aislados de cepas bacterianas y hongos para la degradación de contaminantes emergentes, en este caso, compuestos farmacéuticos.

El método BSocial para el diseño de un consorcio bacteriano en la degradación de HAP dará un nuevo Estado del Arte para el estudio de técnicas de biorremediación a partir de bacterias nativas de las costas de Baja California en degradación de compuestos de hidrocarburos como lo son los HAP, así como la construcción de una tecnología para la biorremediación que pueda llegar a tener una aplicación *in situ* como *ex situ*.

4. JUSTIFICACIÓN

La presencia de HAP en zonas costeras ha generado un gran impacto por los efectos negativos que las actividades antropogénicas provocan tanto para la salud del medio ambiente como del ser humano. Los ecosistemas costeros, que son zonas de transición tan importantes entre el medio marino y el terrestre, son muy sensibles a la introducción de compuestos contaminantes y a concentraciones por arriba de lo normal como es el caso de hidrocarburos aromáticos policíclicos HAP.

En el grupo de investigación, ya se ha reportado la presencia de hidrocarburos aromáticos, así como de HAP en la CBC, a su vez, se ha realizado la búsqueda e identificación de la diversidad procariota con capacidad hidrocarbonoclasta por medio de técnicas tanto dependientes como independientes de cultivo, así como la evaluación de los diferentes mecanismos que cuentan las bacterias para la degradación de HAP en ambientes costeros.

Teniendo en cuenta lo anterior, se abre la oportunidad de diseñar consorcios sintéticos a partir de bacterias nativas aisladas de sedimentos marinos de la costa de Baja California. La selección de cepas potenciales para el estudio de las interacciones sociales entre las cepas que se encuentran en un entorno con presencia de estos contaminantes tendrá un papel importante en la división de labor de las rutas metabólicas cooperativas entre ellas, por lo que conllevarán a una eficiencia en la degradación de HAP mayor que con el uso de cepas individuales.

5. HIPÓTESIS

El diseño de un consorcio bacteriano sintético (CBS) conformado por bacterias hidrocarbonoclastas aisladas de sedimentos marinos de Baja California tendrá una gran capacidad de degradación en hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) frente al uso de cepas individuales.

6. OBJETIVOS

6.1 General

Diseñar un consorcio bacteriano sintético con interacciones sociales positivas de bacterias hidrocarbonoclastas con gran capacidad de biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP).

6.2 Específicos

1. Seleccionar cepas bacterianas previamente aisladas de sedimentos marinos en la costa de Baja California con capacidad de crecimiento en diferentes compuestos de HAP y la presencia de genes marcadores asociados a la degradación de HAP.
2. Obtener las combinaciones de cocultivos para evaluar las interacciones sociales entre cepas para el diseño de consorcios bacterianos sintéticos empleando los métodos HT-Growth y BSocial.
3. Evaluar el potencial en degradación de HAP de cada consorcio bacteriano sintético seleccionado mediante la detección de la tasa de degradación de los hidrocarburos por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

7. MATERIALES Y METODOLOGÍA

7.1 Selección de cepas bacterianas para el diseño del consorcio

Catorce cepas tolerantes al pireno y al fenantreno pertenecientes al acervo bacteriano del laboratorio de Bacteriología Marina del Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO), aisladas de muestras de sedimento y aguas superficiales de la zona costera del Puerto de Rosarito (Silva-Jiménez, *et al.* 2018) y del Puerto El Sauzal, Baja California, previamente identificadas molecularmente por la amplificación del gen ribosomal 16SRNA (Tabla I), fueron evaluadas por medio de ensayos de tolerancia y crecimiento en presencia de HAP. Para el mantenimiento de cada cepa, éstas se crecieron en placas con medio Zobell, que contiene en 1 L: Peptona 5 g, extracto de levadura 1 g, FeCl₂ 1mL, agua de mar 700 mL y agua destilada 300 mL, añadiendo 100 mg/L de pireno al medio y adicionando 1.5% de Bacto-Agar en el caso de medio sólido.

Tabla I Cepas evaluadas en ensayos de crecimiento y tolerancia aisladas de sedimentos y agua superficial en el Puerto de Rosarito, y en el Puerto El Sauzal, B.C.

Código	Género	Especie
HC2	<i>Citricella</i>	<i>sp.</i>
HC19	<i>Halomonas</i>	<i>titanicae</i>
HC20	<i>Paracoccus</i>	<i>alcaliphilus</i>
HC28	<i>Zobellia</i>	<i>sp.</i>
HC51	<i>Kocuria</i>	<i>sp.</i>
CSA2	<i>Microbacterium</i>	<i>estearomaticum</i>
CSA4-1	<i>Salinicola</i>	<i>tamaricis</i>
CSA5	<i>Citrococcus</i>	<i>stutzeri</i>
CFELA6	<i>Psychrobacter</i>	<i>sp.</i>
CFESA7	<i>Cellulosimicrobium</i>	<i>sp.</i>
Rph3	<i>Acinetobacter</i>	<i>iwoffi</i>
Rph17	<i>Micrococcus</i>	<i>luteus</i>
Rph30	<i>Pseudomonas</i>	<i>pachastrellae</i>
Rph50	<i>Rhodococcus</i>	<i>ruber</i>

7.2 Prueba de selección de crecimiento y tolerancia de las cepas en diferentes hidrocarburos y petróleo crudo ligero.

Las cepas preseleccionadas fueron evaluadas (Fig. 5) mediante crecimiento en placa en medio mínimo de sales Bushnell Hass (BH), el cual contiene (en 1 litro): 0.2 g MgSO_4 , 0.02 g CaCl_2 , 1.0 g KH_2PO_4 , 1.0 g K_2HPO_4 , 1.0 g NH_4NO_3 , 0.05 g FeCl_3 y 15 g NaCl adicionando 1.5% de Bacto-Agar, utilizando distintos hidrocarburos como única fuente de carbono y de energía. Se evaluó el crecimiento y la tolerancia en hexadecano ($\text{C}_{16}\text{H}_{34}$) un hidrocarburo alifático; en compuestos aromáticos como el fenol ($\text{C}_6\text{H}_6\text{O}$) y bifenilo ($\text{C}_{12}\text{H}_{10}$). Se utilizaron 3 diferentes HAP: naftaleno (NAPH), fenantreno (PHE) y pireno (PYR), los cuales son representativos de las moléculas de bajo y alto peso molecular. La concentración utilizada para cada hidrocarburo fue de 0.2 g/L a partir de su stock inicial disuelto en acetona. Para su crecimiento, las cepas se sembraron a partir de pre-inóculos de un volumen de 3 mL de cada cepa en incubación de toda la noche a 30°C y una agitación de 160 rpm utilizando medio líquido Luria Bertani (LB) que contiene: 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 10 g de NaCl en 1 L de agua destilada, ajustando el pH a 7.2 ± 0.2 . Después, los cultivos se centrifugaron a 13,000 rpm por 1 minuto para recuperar la pastilla celular. Posteriormente se realizaron 3 lavados celulares con medio BH para ajustar la densidad óptica ($\text{D.O}_{600\text{ nm}}$) inicial de 0.1.

Para el crecimiento en diferentes hidrocarburos, se prepararon placas de medio BH con cada hidrocarburo a utilizar, en el caso del NAPH, PHE, PYR, bifenilo y fenol se añadieron al medio BH antes de solidificar, mientras que a hexadecano se añadió después de que las placas estuvieran ya sólidas, esparciéndose en la superficie con un asa de vidrio. De cada cultivo celular previamente lavado, se añadieron 20 μL en la placa de medio BH con diferente hidrocarburo. Por último, se incubaron las placas durante 2 semanas a 30°C. Se anotaron observaciones de crecimiento durante el periodo de tiempo de incubación.

Para el crecimiento en petróleo, se inoculó cada cepa a una $\text{D.O}_{600\text{ nm}}$ inicial de 0.1 en 5 mL de medio BH líquido con 50 μL de crudo ligero (1%). La incubación y observación se realizó durante 4 semanas a una temperatura de 30°C y una agitación de 160 rpm.

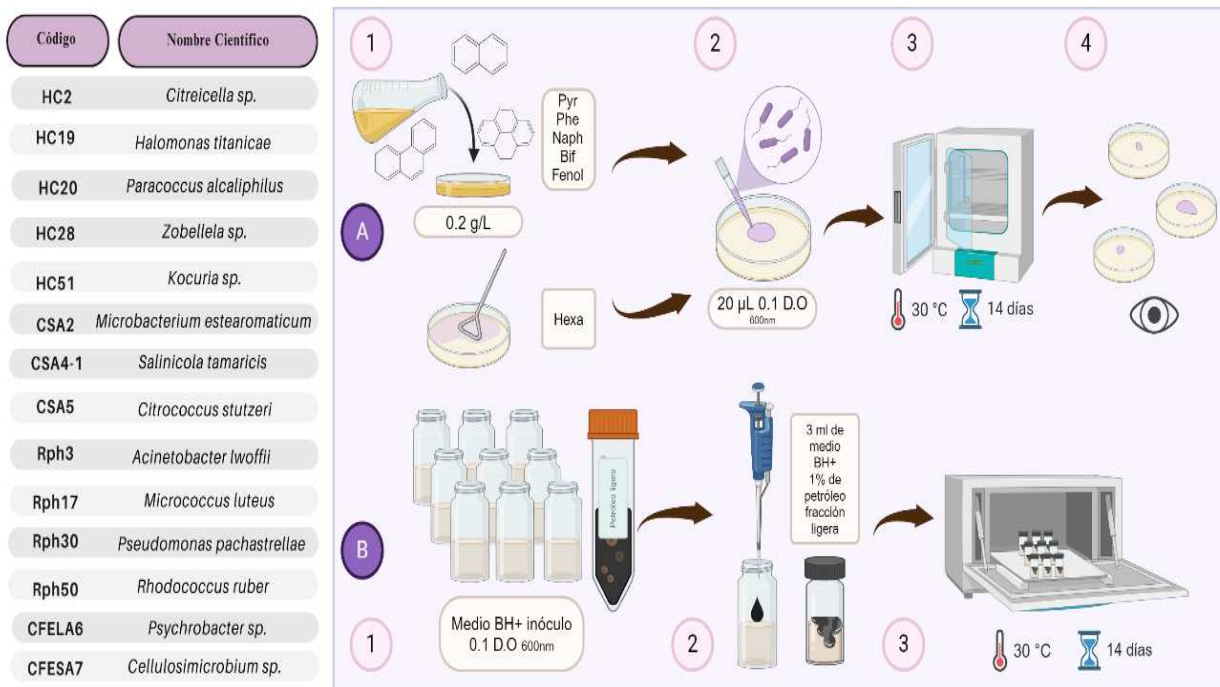


Fig. 5 Ensayos de prueba para la selección de 8 cepas potenciales para la degradación de HAP. A: Ensayo de crecimiento y tolerancia en HAP, aromáticos y alcanos durante 14 días. B: Ensayo de tolerancia en petróleo fracción ligera durante 30 días. Hecho en BioRender.

7.3 Amplificación de genes marcadores *alkB* y *pahE*

Para evaluar el potencial metabólico de cada cepa en la degradación de hidrocarburos alifáticos y aromáticos policíclicos se efectuó la amplificación de genes marcadores *alkB* y *pahE* respectivamente, así como el gen tolueno/bifenilo para monoaromáticos (ADB1/BPHD) (Fig. 6).

Para la amplificación del gen *alkB* se utilizaron los primers reportados por Liu *et al.* (2015): *alkBFw* (3'-AACTACMTCGARCAYTACGG-5') y *alkBRv* (3'-TGAMGATGTGGTYRCTGTTCC-5') con un tamaño esperado de 100 pb.

Para el gen tolueno/bifenilo, se utilizaron los primers *adoB1-F* (5' GAGCAGTTYTGCAGYGACATGTACCA 3') y *BPHD-r1* (5' ACCCAGTTYTCICCRCTCGTC 3') con un tamaño de 505 pb.

Para el gen *pahE1* se aplicaron los primers reportados en el trabajo de Liang *et al.* (2019): *pahEFw* (3'-TGCGGCGGGGTGTNAAAYGGNAT-5') y *pahE1* (3'-CCTGAGGAATCTCGGACATYTSTGCCCARAA-5') con un tamaño esperado de 377 pb. Las condiciones de PCR utilizadas para cada gen amplificado se encuentran en la tabla II.

La presencia/ausencia del gen amplificado fue analizada mediante una electroforesis de gel de agarosa al 1.5% en buffer TAE 1X a 80 V durante 40 minutos. Como colorante de ADN se utilizó SYBR Gold y de escalera de peso molecular se utilizó DNA Ladder de PROMEGA de tamaño de 1kb.

Tabla II Condiciones para PCR punto final. Amplificación de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos. T= temperatura °C; t= tiempo; NC= número de ciclos

Genes marcadores asociados a degradación de hidrocarburos									
<i>alkB</i>			<i>pahE1</i>			<i>Tol/bif</i>			Ciclos PCR
T	t	NC	T	t	NC	T	t	NC	
94 °C	5 min	1	94 °C	5 min	1	95 °C	5 min	1	Desnaturalización inicial
94 °C	6 s	35X	94 °C	30 s	35X	95 °C	30 s	35x	Desnaturalización
59 °C	2 min		60 °C	45 s		55 °C	30 s		Alineamiento
72 °C	60 s		72 °C	60 s		72 °C	60 s		Elongación
72 °C	7 min	1	72 °C	10 min	1	72 °C	7 min	1	Elongación final

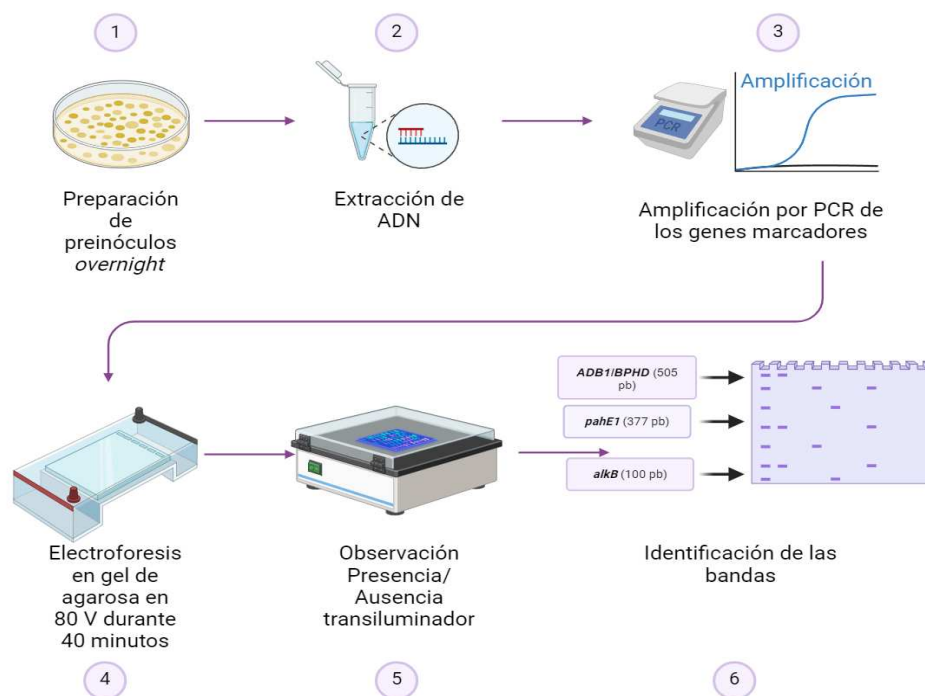


Fig. 6 Metodología para el análisis de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos alifáticos (*alkB*), monoaromáticos (tolueno/bifenilo) y HAP (*pahE1*). Hecho en BioRender.

7.4 Crecimiento de alto rendimiento (HT-Growth)

El crecimiento de alto rendimiento o HT-Growth es un método analítico que permite probar el mayor número de combinaciones de cepas en cocultivos. El número de combinaciones posibles para poblaciones mixtas o individuales sin repetirse está relacionado con la siguiente ecuación (Ec. 1):

$$\text{Combinaciones} = \sum nCr = \frac{n!}{r!(n-r)!} = 2^n - 1 \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde n representa el número total de cepas individuales y r el número de cepas presentes en una población.

Para este trabajo, se utilizaron las 8 cepas hidrocarbonoclasta potenciales seleccionadas para los análisis de interacciones sociales bacterianas en presencia de HAP, lo cual corresponde a 255 cocultivos. Las combinaciones se realizaron en placas de 96 pocillos,

por lo que se usaron un total de 3 placas para todas las combinaciones. De acuerdo con lo descrito en el trabajo de Purswani *et al.* (2017), las combinaciones de cepas fueron crecidas en medio mínimo de sales (BH) hasta la fase estacionaria y ajustada a una D.O_{595 nm} de 1.0 en un volumen de 160 μ L para una cepa individual, 80 μ L en el caso de una población con dos cepas, y así sucesivamente, hasta llegar a la combinación de 8 cepas (ver tabla III). Además, se añadieron 40 μ L de medio BH ajustado a un volumen final de 200 μ L y 200 μ L de glicerol al 60%, obteniendo un volumen total de 400 μ L. Se tomaron alícuotas de 20 μ L que fueron añadidos en placas de 96 pocillos y almacenadas a -20 °C para su posterior uso.

Tabla III Volúmenes necesarios de acuerdo con el número de cepas utilizadas para realizar las combinaciones para cada consorcio.

Número de cepas en el consorcio	Cantidad de cada cepa	Medio Bushnell-Haas (BH)
1	160 μ L	40 μ L
2	80 μ L	40 μ L
3	53.3 μ L	40 μ L
4	40 μ L	40 μ L
5	32 μ L	40 μ L
6	26.7 μ L	40 μ L
7	22.9 μ L	40 μ L
8	20 μ L	40 μ L

Para los ensayos de crecimiento (Fig. 7) se utilizó un sistema de pipeteo automatizado (EpMotion 5073, Eppendorf). Utilizando placas de 96 pocillos se añadieron 180 μ L de medio BH con la mezcla de PYR y PHE a una concentración de 100 μ M y se mezclaron suavemente por pipeteo. La medición de crecimiento se ejecutó en un espectrofotómetro (SPECTROstar Omega, BMG–Labtech, Alemania) durante intervalos de 1 h a 595 nm y una temperatura de 30°C, por triplicado. Los datos obtenidos fueron utilizados para

describir la aptitud (en inglés denominado fitness) de los consorcios, que es definida como la medición del éxito de la reproducción de una población, utilizando la variable de la tasa de crecimiento (k) y el número de generaciones (n) para cada cepa.

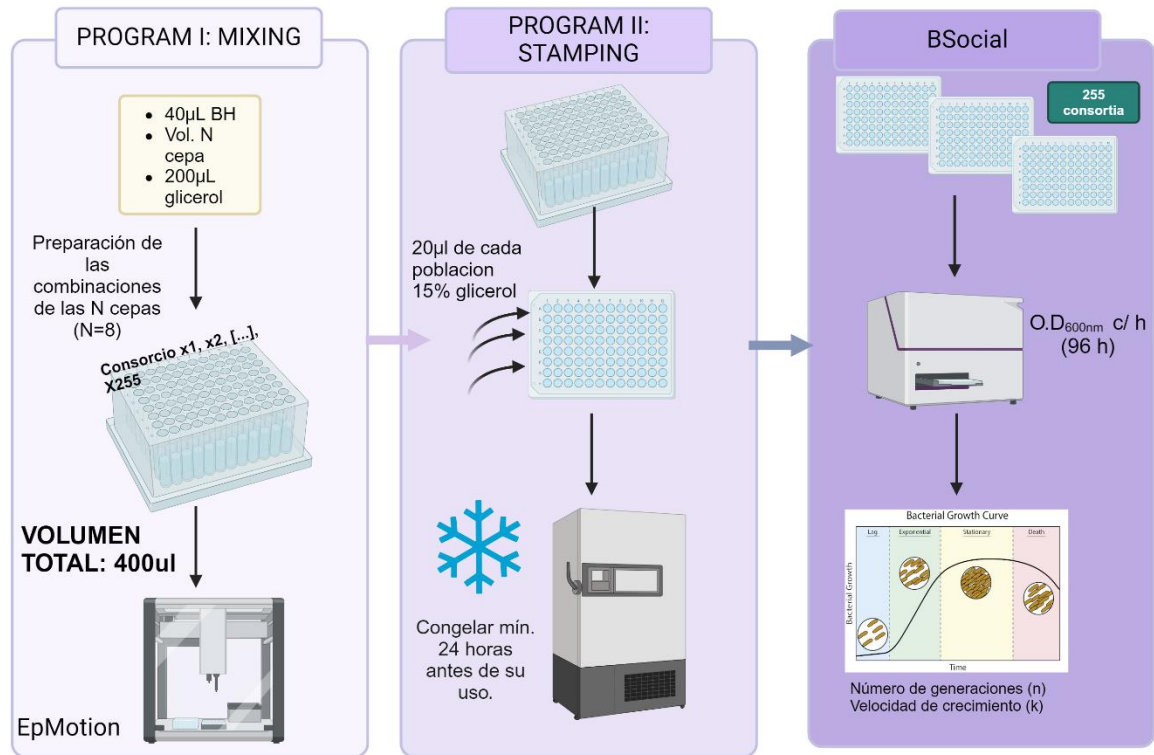


Fig. 7 Protocolo de HT-Growth por Purswani et al. (2017). Obtención de los datos de interacciones sociales de acuerdo a las variables de crecimiento de las 255 combinaciones. Hecho en BioRender.

7.5 Interacciones sociales en consorcios bacterianos sintéticos (BSocial)

La herramienta web de BSocial (http://m4m.ugr.es:3838/web_server/) realiza la evaluación de la función de una cepa de acuerdo con sus interacciones sociales presente o no presente en las combinaciones de las cepas como poblaciones bacterianas, se utilizaron los datos obtenidos por el ensayo de HT-Growth calculando el fitness relativo (w) de las tasas de crecimiento k de cada consorcio con las ecuaciones 2, 3 y 4:

$$w_a^k = \frac{ka}{ki} \quad (\text{Ec. 2})$$

$$w_{np}^k = \frac{knp}{ki} \quad (\text{Ec. 3})$$

$$w_p^k = \frac{kp}{ki} \quad (\text{Ec. 4})$$

Donde a representa cada consorcio individual, np cada consorcio individual donde la cepa no esté presente y p donde hay presencia de la cepa. Con ello, se evaluó los efectos de una cepa dentro de un consorcio cuando se encuentra presente o no. Las interacciones consideradas para el consorcio fueron las interacciones positivas ($w_p > w_{np}$) y neutras ($w_p = w_{np}$). Los resultados promedios de cada consorcio fueron graficados y se realizaron los análisis estadísticos utilizando Origin Pro 8.5 (OriginLab Corp., Northampton, MA, USA) y Minitab, LLC (www.minitab.com). La herramienta BSocial presentó los consorcios más aptos (seleccionados por un alto número de generaciones y por una fase exponencial baja) para su posterior análisis en la degradación de HAP.

7.6 Evaluación de la degradación de HAP en consorcios bacterianos sintéticos.

7.6.1 Método de extracción

Para llevar a cabo los ensayos de degradación de la mezcla de HAP, las 8 cepas hidrocarbonoclastas potenciales fueron analizadas individualmente y en los consorcios diseñados a partir de BSocial para evaluar su capacidad de degradación de PYR y PHE. Cada cepa fue inoculada en 50 mL de caldo de triptona soja (TSB) en matraces Erlenmeyer de 200 mL y se incubaron a 30°C y con una agitación constante de 160 rpm durante toda la noche. Se obtuvieron las pastillas celulares de cada cepa por lavar con medio BH y centrifugar los inóculos individuales a 5,000 rpm por 14 minutos., Cada pastilla celular se resuspendió en medio BH y se ajustó 1 mL de inóculo a una $\text{D.O}_{600\text{ nm}}$ inicial de 1.0. En viales de vidrio de 30 mL se inocularon las cepas a una proporción 1:20 (375 μL) en 6.875mL de medio fresco BH suplementados de con 100 μM de la mezcla de HAP (PHE y PYR), obteniendo un volumen final de 7.5 mL. Se determinó la degradación de la mezcla de HAP de cada cepa a los 0, 4, 8 y 12 días. Todo se llevó a cabo por triplicado.

En cada tiempo, se tomó 1mL de cada vial para las mediciones de $\text{D.O}_{600\text{ nm}}$ y pH. La extracción de los HAP se hizo con etanol desnaturalizado al 96% a una proporción de 1.6 mL por cada 1 mL de volumen de medio de cultivo. Posteriormente, los viales se

sonicaron a 25°C durante 15 minutos. Posteriormente, 1.6 mL de la mezcla se añadieron en microtubos de 2 mL y se centrifugaron a 12,000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se transfirió a un vial ámbar de 2 mL para medir la concentración de HAP a través de un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Fig. 9).

Para el análisis de los HAP para cuantificar la eliminación de PYR y PHE se empleó cromatografía líquida de alta resolución (HPLC Agilent 1200) acoplado a un detector DAD. Las columnas utilizadas fueron Synergy Fusion RP C18 (4 μ m, 4,6 $\times$ 150 mm; Phenomenex®, Madrid, España) y ZORBAX Eclipse Plus C18 (1.8 μ m, 2.1 $\times$ 30 mm). El volumen de inyección fue de 10 μ L. La columna estuvo bajo una presión de 5.1-5.2 Bar y temperatura constante a 25°C. La metodología de separación aplicada fue la descrita en Aranda *et al.* (2009) utilizando Agua + ácido fosfórico al 0.1% (A) y acetonitrilo (B) a un flujo de 1 mL/min. Para la cuantificación de la concentración de PYR y PHE presentes en las muestras se elaboró una curva de calibración de los estándares de PYR y PHE (pureza del 99%) con concentraciones de 0, 20, 40, 60 y 100 μ M.

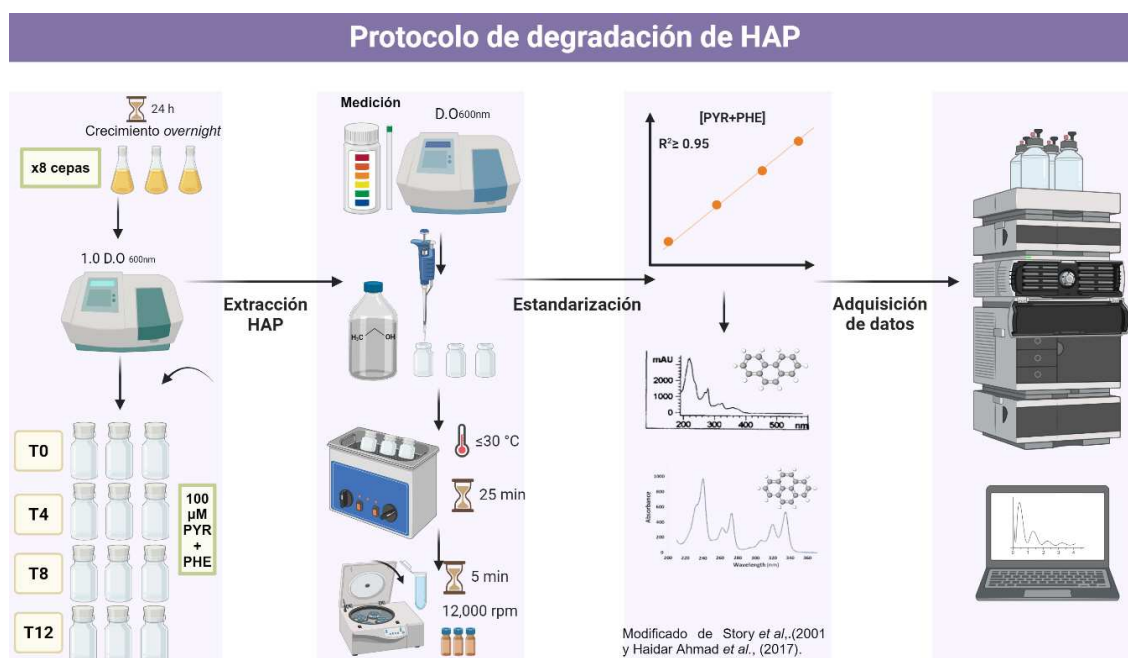


Fig. 8 Aplicación del protocolo de extracción de HAP para cepas individuales y consorcios sociales. Metodología reportada por Aranda *et al.* (2009). Hecho en BioRender.

8. RESULTADOS

8.1 Evaluación de la tolerancia de distintos HAP en ensayos cualitativos en placa.

De acuerdo con los resultados obtenidos a partir de los ensayos de selección por tolerancia y crecimiento en placa sólida con hidrocarburos alifáticos, aromáticos y HAP durante 15 días (Tabla IV), las cepas *Halomonas titanicae* HC19, *Paracoccus alcaliphilus* HC20, *Zobellella endophytica* HC28, *Salinicola tamaricis* CSA4-1, *Citreicella* sp. CSA2, *Cellulosimicrobium funkei* CFESA7, *Acinetobacter iwoffi* Rph3, *Micrococcus luteus* Rph17, *Pseudomonas pachastrallae* Rph30 y *Rhodococcus ruber* Rph50 fueron las que tuvieron un mejor crecimiento en PYR. Las cepas con mejor crecimiento en PHE fueron nuevamente *Halomonas titanicae* HC19 y *Zobellella endophytica* HC28. La cepa CFELA6 tuvo un crecimiento moderado en los 3 HAP evaluados. En cuanto a los ensayos de tolerancia con distintos hidrocarburos aromáticos (bifenilo y fenol) y alifáticos (hexadecano), la cepa HC19 mostró un buen crecimiento en bifenilo, así como en hexadecano, mientras que en fenol fue mínimo; para HC20 se observó un buen crecimiento en el compuesto alifático y moderado en los monoaromáticos; caso contrario de HC28, la cual no tuvo un crecimiento significativo en los otros compuestos utilizados a comparación de HAP. CSA25 destacó su crecimiento en hexadecano, siendo este compuesto en el que se observó un mayor tamaño de crecimiento radial del inóculo comparado con los otros compuestos analizados.

Por otro lado, las cepas Rph3, Rph30 y Rph50, fueron las que tuvieron una mayor gama de crecimiento en todos los compuestos analizados, con resultados de crecimiento abundantes. Rph17 tuvo un crecimiento moderado en bifenilo, pero excelente en los demás compuestos. Con estos resultados cualitativos, podemos sugerir que las 8 bacterias seleccionadas en este ensayo tienen potencial de crecimiento en HAP y en distintos hidrocarburos. Por lo que, con base en lo obtenido, las cepas *Paracoccus alcaliphilus* HC20, *Zobellella endophytica* HC28, *Salinicola tamaricis* CSA4-1, *Citrococcus zhacaiensis* CSA5, *Cellulosimicrobium funkei* CFESA7, *Acinetobacter iwoffi* Rph3, *Pseudomonas pachastrallae* Rph30 y *Rhodococcus ruber* Rph50 fueron las que tuvieron un mejor crecimiento en los distintos hidrocarburos.

Tabla IV Ensayo de crecimiento de las 14 cepas potenciales para el CBS en diferentes hidrocarburos durante 14 días. PYR – pireno; Naph – naftaleno; PHE – fenantreno; Bif – bifenilo; Fe – Fenol; Hex – Hexadecano; ♦ - Atmósfera saturada. Simbología: *- en proceso; ~- No se observó crecimiento; +- Poco crecimiento; ++- Crecimiento moderado; +++ Crecimiento abundante; ++++- Crecimiento muy abundante.

CEPA	0.2 g/L					
	PYR	Naph	PHE	Bif	Fe	Hex
<i>Halomonas titanicae</i> HC19	+++	+++	++	+++	+	++
<i>Paracoccus alcaliphilus</i> HC20	+++	++	+++	++	++	+++
<i>Citricella sp.</i> HC2	+++	++	++	*	*	*
<i>Zobellella endophytica</i> HC28	++	+++	+++	+	+	+
<i>Psychrobacter sp.</i> CFELA6	++	++	++	*	*	*
<i>Cellulosimicrobium sp.</i> CFESA7	++	++	++	*	*	*
<i>Citricoccus stutzeri</i> CSA5	+	++	+	*	*	*
<i>Kocuria sp.</i> HC51	+	+	+	*	*	*
<i>Microbacterium esteraromaticum</i> CSA25	+	+	+	++	+	+++
<i>Salinicola tamaricis</i> CSA4-1	+++	++	++	++	+	+++
<i>Acinetobacter lwolfii</i> Rph3	+++	+++	+++	++++	+++	++++
<i>Micrococcus luteus</i> Rph17	++++	++++	+++	++	+++	++++
<i>Pseudomonas pachastrellae</i> Rph30	++++	++++	++++	++++	++++	++++

<i>Rhodococcus ruber</i> Rph50	++++	++++	++++	++++	++++	++
--	------	------	------	------	------	----

8.2 Ensayo de tolerancia en fracción ligera de petróleo en las cepas potenciales

Para tener una visión general de la tolerancia y crecimiento en una mezcla compleja de hidrocarburos, se realizó el ensayo de tolerancia con las 14 cepas hidrocarbonoclastas potenciales en medio BH suplementado con la fracción ligera de petróleo (Ver tabla V). En este ensayo, HC19, HC20, HC28 y Rph50 fueron las cepas que tuvieron un crecimiento abundante durante el experimento, considerado a través de la aparición de turbidez (Fig. 8). En el caso de CSA25, esta cepa mostró una fuerte tolerancia y crecimiento al petróleo, a juzgar por la alta turbidez observada, así como HC2 y HC51, lo que sugiere que pueden utilizar algún componente de la mezcla de hidrocarburos presentes en el petróleo para su crecimiento. En este ensayo, CFELA6, Rph3 y Rph17 no presentaron un buen crecimiento en comparación con las cepas antes mencionadas. De acuerdo con lo anterior, las cepas HC19, HC20, HC28, CSA25, HC2, HC51 y Rph50 son las que tuvieron una alta tolerancia y un crecimiento abundante en la fracción ligera de petróleo.

Tabla V Ensayo de crecimiento en fracción ligera del petróleo en cepas potenciales para el diseño de un CBS durante 14 días. Simbología; ~- No se observó crecimiento; +- Poco crecimiento; ++- Crecimiento moderado; +++ Crecimiento abundante; ++++- Crecimiento muy abundante.

CEPA	Crecimiento	Datos obtenidos
<i>Rhodococcus ruber</i> Rph50	++++	
<i>Pseudomonas pachastrellae</i> Rph30	++	Muñoz-Morales (datos sin publicar).
<i>Acinetobacter lwolfii</i> Rph3	+	

<i>Micrococcus luteus</i> <i>Rph17</i>	++	
<i>Halomonas titanicae</i> HC19	+++	
<i>Paracoccus alcaliphilus</i> HC20	+++	
<i>Microbacterium esteraromaticum</i> CSA25	+++	
<i>Citreicella sp.</i> HC2	++	
<i>Zobellella endophytica</i> HC28	++	Este trabajo
<i>Kocuria sp.</i> HC51	++	
<i>Psychrobacter sp.</i> CFELA6	+	
<i>Cellulosimicrobium sp.</i> CFESA7	+	
<i>Citricoccus stutzeri</i> CSA5	+++	
<i>Salinicola tamaricis</i> CSA4-1	++++	

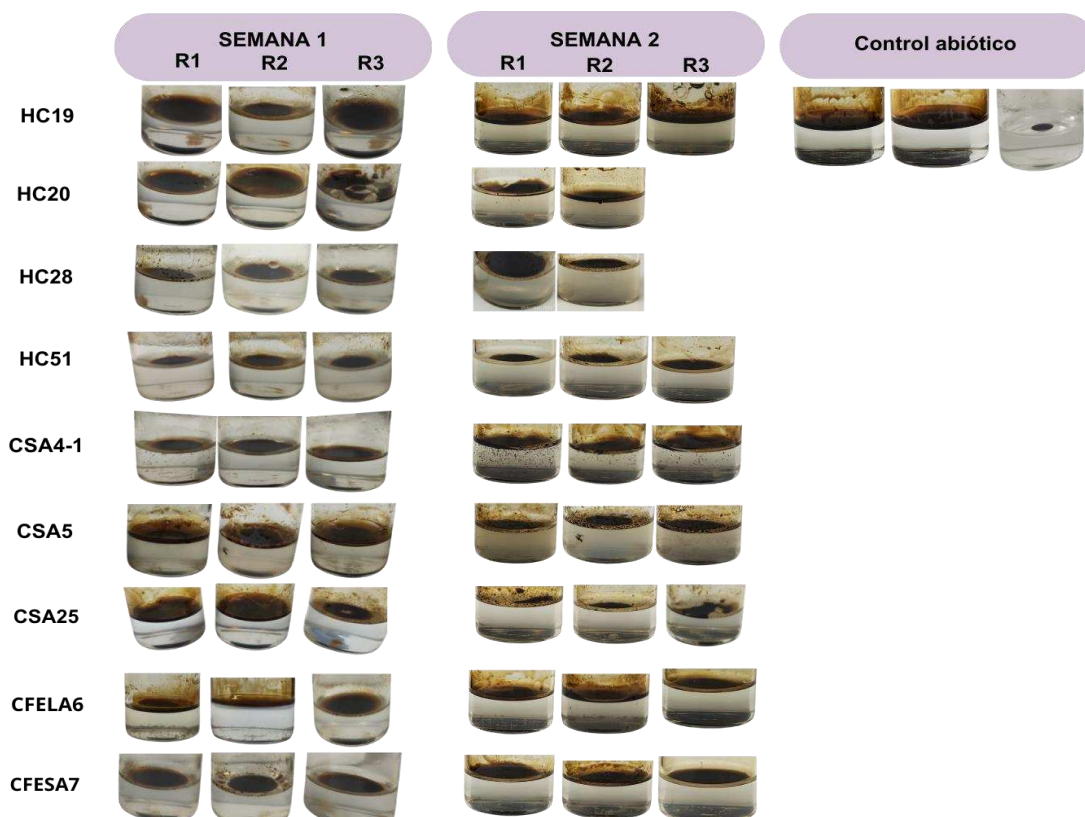


Fig. 9 Aparición de turbidez en diferentes cepas en presencia de la fracción ligera de petróleo con medio Bushnell-Haas.

8.3 Identificación de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos.

La identificación de genes marcadores asociados a los distintos mecanismos de degradación de hidrocarburos alifáticos, aromáticos y los HAP representan una excelente alternativa para contribuir y comprender los efectos de estos contaminantes en ambientes impactados. A su vez, son útiles en la búsqueda potencial de bacterias hidrocarbonoclastas. Para el caso de los HAP, se utilizó el gen *pahE1* (377 pb) como marcador molecular en la degradación aerobia. Se reportó la presencia de este gen en las cepas Rph30, Rph50, Rph3 y Rph17 de acuerdo con lo obtenido por Muñoz-Morales. A su vez, se utilizó el biomarcador correspondiente al gen de la dioxigenasa *tolueno/bifenilo* (505 pb) relacionado con la degradación de compuestos

monoaromáticos, en donde las cepas HC20, HC28, CFELA6, CFESA7, CSA5 amplificaron este gen. Por otro lado, la cepa HC51 no tuvo una amplificación de este gen.

Por último, se evaluó la presencia del gen correspondiente a un alcano monooxigenasa *alkB* (100 pb), implicado en la degradación de compuestos alifáticos en condiciones aerobias. Las cepas correspondientes a HC19, HC20, HC28, CSA5, Rph30, Rph50, Rph3, Rph17 y HC51 amplificaron el fragmento del gen *alkB* (Tabla VI). La cepa CFESA7 no mostró ningún amplicón del tamaño esperado. Con estos resultados, la utilización de genes marcadores relacionados con la degradación de HAP y otros hidrocarburos nos han servido como un criterio en la selección de un grupo de 8 cepas con potencial hidrocarbonoclasta para construir consorcios bacterianos sintéticos.

*Tabla VI Amplificación de los genes marcadores asociados a hidrocarburos alifáticos (alkB) asociado a la degradación de tolueno/bifenilo y el gen pahE1 para HAP. Simbología: ✓- Presencia del gen; ✗- Ausencia del gen; * no se analizó.*

Gen marcador	<i>pahE1</i>	<i>tol/bif</i>
<i>Halomonas titanicae</i> HC19	✓	*
<i>Paracoccus alcaliphilus</i> HC20	*	✓
<i>Citricella</i> sp. HC2	✗	✗
<i>Zobellella endophytica</i> HC28	*	✓
<i>Psychrobacter</i> sp. CFELA6	*	✓
<i>Cellulosimicrobium</i> sp. CFESA7	*	✓
<i>Citricoccus stutzeri</i> CSA5	*	✓
<i>Microbacterium esteraromaticum</i> CSA25	*	*
<i>Pseudomonas pachastrellae</i>	✓	*
<i>Rhodococcus ruber</i> Rph50	✓	*
<i>Acinetobacter iwoffi</i> Rph3	✓	*
<i>Micrococcus luteus</i> Rph17	✓	*
<i>Kocuria</i> sp. HC51	*	✗
<i>Salinicola tamaricis</i> CSA4-1	*	✓

alkB	✓	✓	✓	✓	✓	✗	✓	*	✓	✓	✓	✓	✓	✓
------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

8.4 Comportamientos Sociales

Para el diseño de los consorcios bacterianos sintéticos, se eligieron 8 cepas hidrocarbonoclastas potenciales: *Paracoccus alcaliphilus* HC20, *Zobellella endophytica* HC28, *Salinicola tamaricis* CSA4-1, *Citrococcus zhacaiensis* CSA5, *Cellulosimicrobium funkei* CFESA7, *Acinetobacter iwoffi*, Rph3 *Pseudomonas pachastrallae* Rph30 y *Rhodococcus ruber* Rph50 mediante las pruebas de selección previamente realizadas (crecimiento, tolerancia y la amplificación de marcadores moleculares asociados a la degradación de hidrocarburos alifáticos, aromáticos y HAP). Para el ensayo de los comportamientos sociales a partir de la herramienta BSocial, las cepas fueron identificadas como PA, ZE, ST, CZ, CF, AI, PP y RR respectivamente

En la distribución de los 255 consorcios analizados por BSocial, se obtuvo una gráfica (Fig. 10) donde se aprecia el crecimiento de cada consorcio contra el tiempo en fase logarítmica. Se observa una gran cantidad de las poblaciones situadas en el centro inferior de la gráfica, lo que nos indica que no hubo un aumento en el número de generaciones con el tiempo. Sin embargo, destaca la presencia de un consorcio de 4 cepas con el mayor número de generaciones (círculo morado) y un grupo de 2 consorcios, con 4 y 6 cepas, señalado con círculo naranja. De acuerdo con ello, las poblaciones señaladas con mejor número de generaciones por unidad de tiempo podrían tener un potencial significativo para la degradación de HAP.

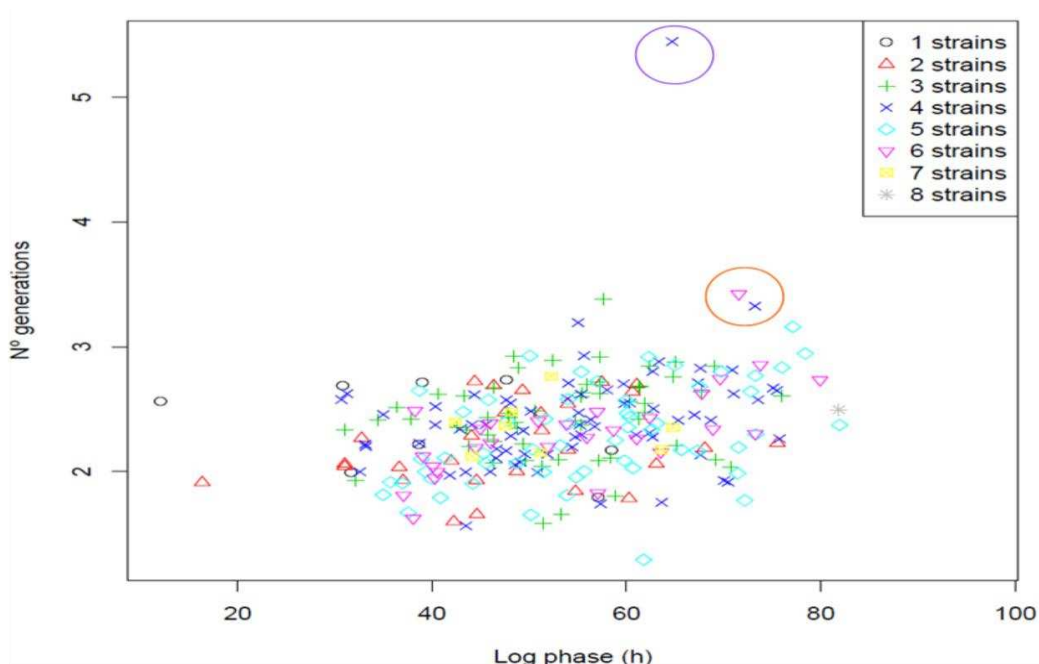


Fig. 10 Crecimiento de los 255 consorcios basado en el número de generaciones durante la fase logarítmica. Se clasificaron los consorcios por el número de cepas incluidas en cada combinación. Las poblaciones señaladas (círculo morado y círculo naranja) corresponden a los consorcios con mayor crecimiento a través del tiempo.

8.5 Análisis de las variables de crecimiento de los consorcios

El análisis de los consorcios diseñados por la herramienta BSocial reveló las 10 poblaciones con mayor crecimiento de los 255 consorcios probados. (Tabla VII), Los CBS obtenidos fueron ordenados a partir del consorcio con el más alto crecimiento tanto en número de generaciones como el consorcio con menor tiempo en alcanzar la fase logarítmica. El consorcio con un mayor crecimiento por número de generaciones fue el consorcio X101, conformado por las cepas PA, ZE, CZ y RR. Mientras que el que presentó un menor tiempo en alcanzar la fase logarítmica fue el consorcio X66 formado por las cepas ZE, CZ, y RR.

Tabla VII Representación de los individuos presentes en los 10 mejores consorcios bacterianos en orden descendente (del más apto al menos apto) según el número de generaciones. Las celdas sombreadas de colores representan la presencia de la cepa bacteriana en el consorcio; Paracoccus alcaliphilus (PA), Zobellella endophytica (ZE), Salinicola tamaricis (ST), Citrococcus zhacaiensis (CZ), Cellulosimicrobium funkei (CF), Acinetobacter iwoffi (AI), Pseudomonas pachastrallae (PP) y Rhodococcus ruber (RR).

Consortio	CEPAS								No. de generaciones	Media de la fase log
	PA	ZE	ST	CZ	CF	AI	PP	RR		
X101									5.44	64.70
X240									3.42	71.56
X58									3.38	57.59
X145									3.33	73.23
X148									3.19	55.03
X173									3.16	77.11
X171									2.95	78.40
X126									2.93	55.63
X170									2.93	50.06
X66									2.92	48.44

8.6 Interacciones sociales bacterianos

El comportamiento social de cada población bacteriana diseñada dependerá de las variables de crecimiento correspondientes al número de generaciones o de la tasa de crecimiento. En los gráficos de la figura 11-I y 11-II se asignaron 3 diagramas para cada cepa de acuerdo con el fitness relativo: (la razón entre el parámetro de crecimiento del consorcio dividido por el parámetro de crecimiento de la cepa a la que queremos evaluar su comportamiento social) el diagrama azul corresponde a los puntos de fitness relativa de cada consorcio normalizado por el valor de la cepa individual a comparar. La caja azul turquesa indica el fitness de cada consorcio cuando la cepa individual a comparar no se encuentra presente en el consorcio (np) y, por último, la caja blanca señala el fitness de los consorcios diseñados cuando la cepa individual a comparar se encuentra presente (p). Como tal, la diferencia significativa entre las medianas de la caja np y p indica si la cepa tiene un comportamiento positivo ($p > np$), neutro ($p = np$) o negativo ($np > p$). El

comportamiento social de las cepas que se exhibe en la figura 11 se ha descrito en la Tabla VIII para mayor comprensión.

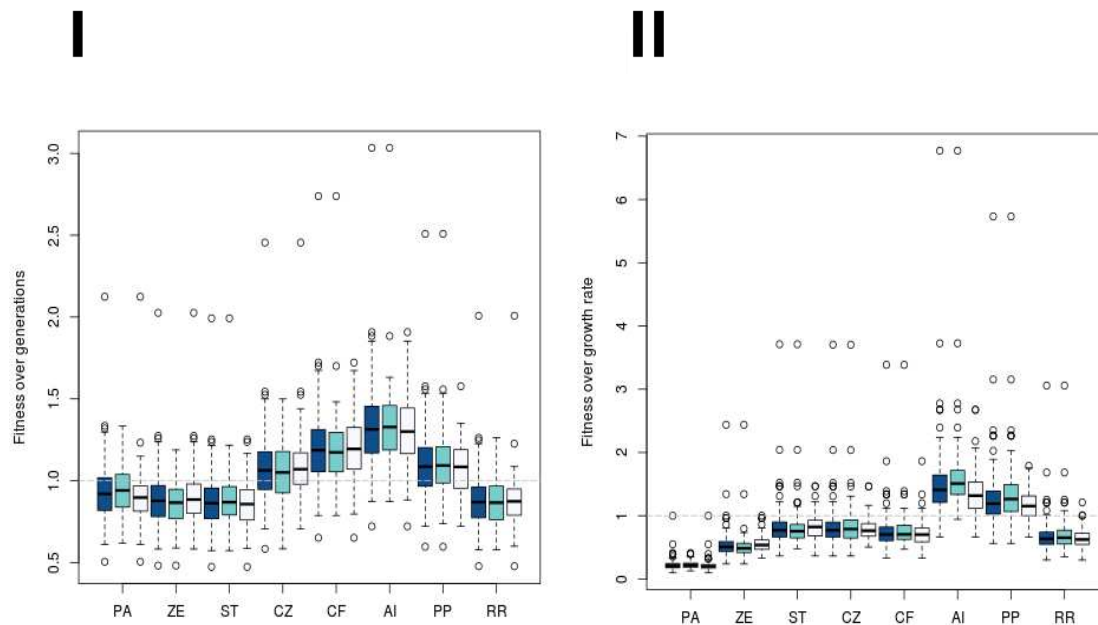


Fig. 11 Fitness asignados para el comportamiento social de cada cepa en los consorcios representado como un diagrama de cajas. En la gráfica I muestra el fitness de cada cepa en base al número de generaciones. En la gráfica II muestra el fitness usando la tasa de crecimiento.

De acuerdo con lo obtenido en la Fig. 11 se describen de manera resumida los comportamientos sociales de los consorcios diseñados utilizando las variables de crecimiento (Tabla VIII). La bacteria *Zobellella endophytica* (ZE) fue la única con un comportamiento social positivo para ambos casos de análisis de crecimiento, número de generaciones y tasa de crecimiento. Por otro lado, las cepas *Salinicola tamaricis* (ST) y *Rhodococcus ruber* (RR) presentaron interacciones neutras en ambos casos, adicionando las cepas *Paracoccus alcaliphilus* (PA), *Citrococcus zhacaiensis* (CZ) y *Cellulosimicrobium funkei* (CF) con comportamiento neutro en la tasa de crecimiento. Finalmente, en el caso de número de generaciones, las cepas *Paracoccus alcaliphilus* (PA), *Citrococcus zhacaiensis* (CZ), *Cellulosimicrobium funkei* (CF), *Acinetobacter iwoffii* (AI) y *Pseudomonas pachastrallae* (PP) mostraron comportamientos negativos en cuanto

a número de generaciones. A su vez, *Acinetobacter iwoffi* (AI) y *Pseudomonas pachastrallae* (PP) también presentaron comportamientos negativos en el caso de la tasa de crecimiento.

Con ello, los consorcios sociales potenciales a diseñar con comportamientos sociales positivos y/o neutros fueron 2 consorcios X58 y X221 compuestos por:

X58: *Zobellella endophytica* (ZE), *Salinicola tamaricis* (ST) y *Rhodoccus ruber* (RR).

X221: *Paracoccus alcaliphilus* (PA), *Salinicola tamaricis* (ST), *Citrococcus zhacaiensis* (CZ), *Cellulosimicrobium funkei* (CF) y *Rhodoccus ruber* (RR).

Tabla VIII Asignación del comportamiento social según la prueba t-Student ($p \leq 0.05$) de la herramienta BSocial para la selección de las mejores cepas según el número de generaciones o la tasa de crecimiento.

Variables de crecimiento	Interacción positiva	Interacción neutra	Interacción negativa
Número de generaciones	ZE	ST, RR	PA, CZ, CF, AI, PP
Tasa de crecimiento	ZE	PA, ST, CZ, CF, RR	AI, PP

8.7 Efecto en el aumento de la biodiversidad

Utilizando las herramientas que el programa BSocial proporciona, se elaboró una gráfica que describe el efecto del aumento diversidad de la población bacteriana (Fig. 12) con respecto al número de generaciones (fig. 12-I) y con la variable de la tasa de crecimiento (fig. 12-II). Se muestra el cálculo del fitness de las poblaciones entre una sola especie (8 poblaciones bacterianas) dos especies bacterianas (28 poblaciones), y así sucesivamente hasta calcular la población de 8 especies (1 población).

Para el número de generaciones, se observó el aumento del fitness a medida que las poblaciones van teniendo un mayor número de cepas, siendo el mayor crecimiento al alcanzar 4 especies bacterianas, después, el fitness disminuye (Fig. 12-I). Por lo que podemos decir que el fitness de nuestros consorcios bacterianos es ideal a partir de aumentar a poblaciones de 3 a 4 especies.

En el caso de comparar el fitness con la tasa de crecimiento, la tendencia al aumentar el número de especies es la disminución del fitness, siendo el más alto a partir de utilizar una sola cepa (Fig. 12-II).

A partir de la determinación de la diversidad de un consorcio, los resultados permitieron delimitar el número óptimo de especies bacterianas degradadoras de hidrocarburos que deben incluirse en un consorcio y obtener un mayor crecimiento.

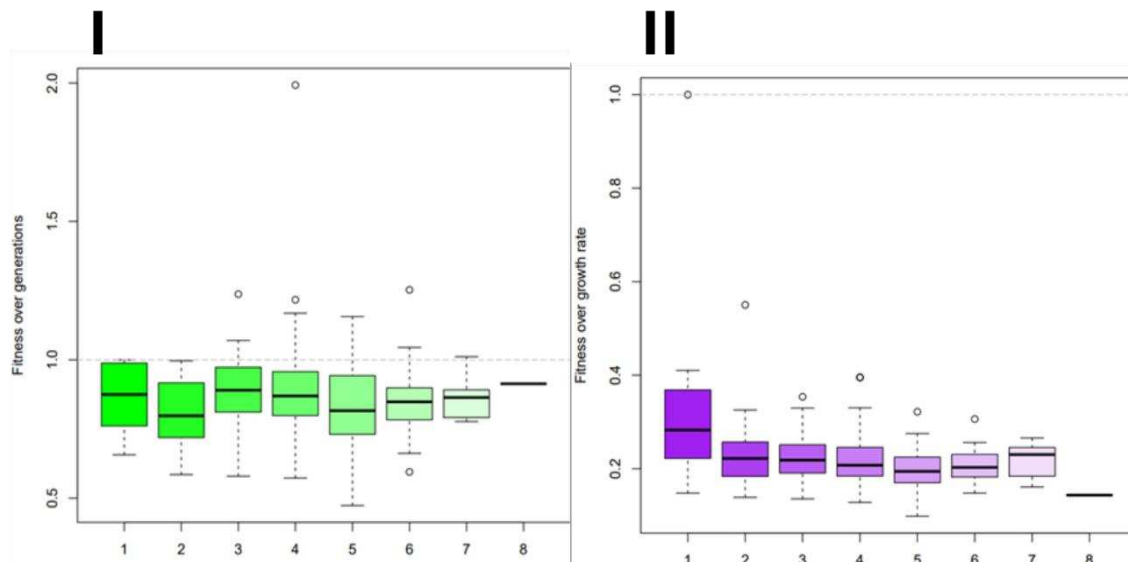


Fig. 12 Efecto de la riqueza de las especies sobre el fitness de la población. Efecto del fitness según la riqueza de las especies del consorcio según el número de generaciones (I) o la tasa de crecimiento (II). El eje X representa el número de cepas presentes en cada consorcio, y el eje Y describe el fitness sobre el crecimiento.

En la Fig. 13 se observa el efecto del aumento de la diversidad representando el mejor consorcio formado por las mejores cepas según el número de generaciones (Fig. 13-I) o la tasa de crecimiento (Fig. 13-II). Es decir, con la mejor cepa, se obtienen todos los consorcios posibles (una sola población), con dos cepas se forman todas las poblaciones posibles al combinarlas con cada individuo (la mejor cepa junto con una cepa con interacción neutra), hasta llegar a las 8 cepas, donde se observan todos los datos de las poblaciones.

En el caso de número de generaciones, se observa un ligero aumento del fitness con el aumento de la diversidad a partir de 4 cepas, pero al alcanzar poblaciones con más de 5 especies presentes, la variación del fitness incrementa conforme aumenta el número de especies presentes en el consorcio. Por otro lado, en la variable de tasa de crecimiento se observa una clara disminución del fitness marcado a partir de combinaciones con solo una cepa.

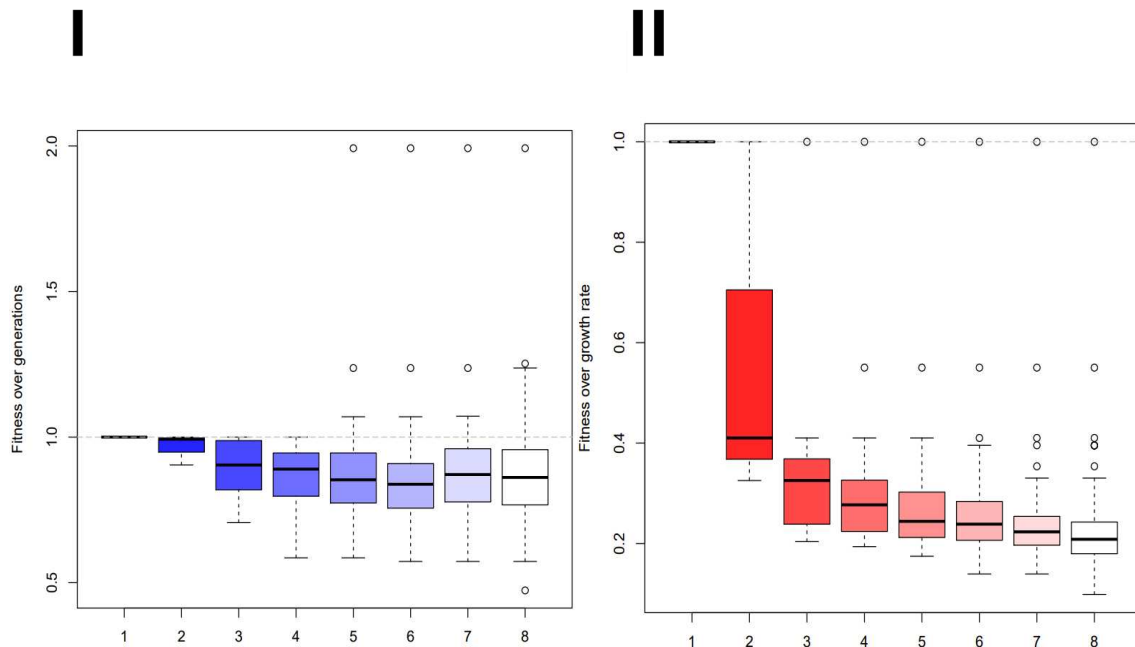


Fig. 13 Efecto del aumento de la diversidad sobre el fitness de cada consorcio según el número de generaciones (I) o la tasa de crecimiento (II). El eje X representa el fitness sobre el crecimiento y el eje Y la población con la mejor cepa (interacción positiva) hasta añadir las 8 cepas.

8.8 Efecto de la riqueza del consorcio social sobre la estabilidad de la población

Para definir la estabilidad de una población se ha utilizado la media del coeficiente de variación (CV, por sus siglas en inglés). El CV permite identificar si el aumento del número de especies en una comunidad supone un aumento en la estabilidad de la misma (Purswani *et al.*, 2017).

En la figura 14, los datos del número de generaciones (Fig. 14-I) muestran una varianza decreciente con el aumento de la riqueza de especies. Sin embargo, dado que la correlación es muy baja ($R^2=0.10935$) no es posible inferir una disminución de la estabilidad con el incremento del número de cepas en las comunidades mixtas. De manera similar ocurre con la gráfica de CV para el caso de tasa de crecimiento (Fig. 14-II), a pesar de que hubo un aumento en la correlación de los coeficientes de variación ($R=0.16614$) no es posible concluir una disminución de la estabilidad con el aumento del número de cepas ya que es un dato no significativo.

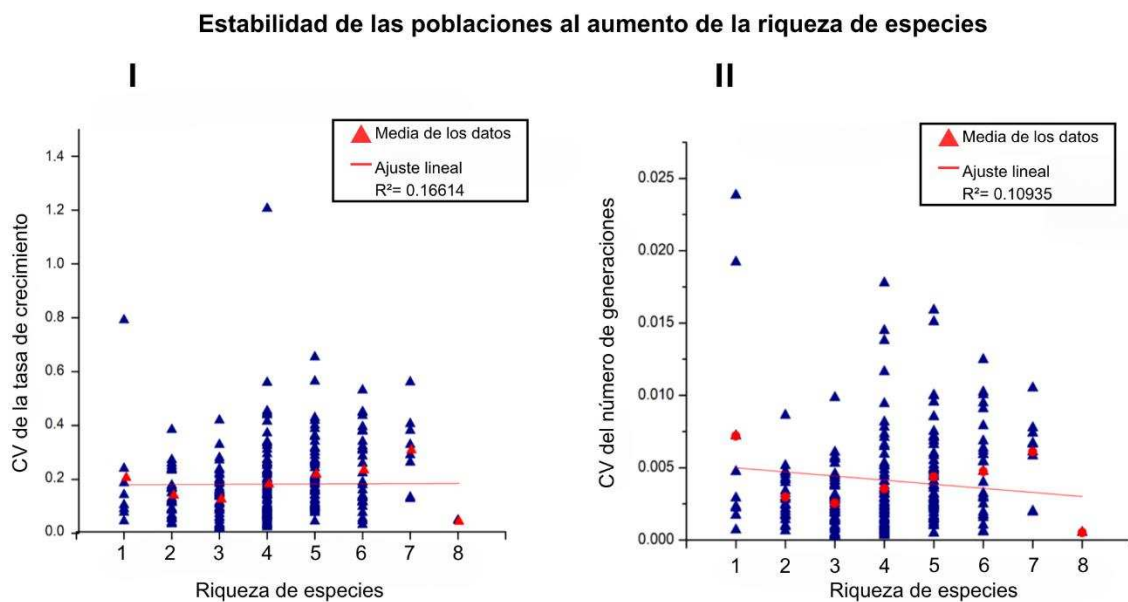


Fig. 14 Coeficiente de variación (CV) para la determinación de la estabilidad del consorcio respecto a la riqueza de diversidad. CV para número de generaciones (I) y CV para tasa de crecimiento (II). Triángulos azules: CV de la población. Triángulos rojos: Media de CV de N especies.

8.9 Degradación de HAP

Una vez obtenido el resultado de las 8 cepas potenciales para el diseño de consorcios bacterianos, así como los ensayos de interacciones sociales y crecimiento con BSocial en presencia de PYR y PHE, se evaluó la capacidad de degradación de una mezcla de PYR y PHE a 100 μ M, en cada cepa individual y en los dos consorcios sociales nombrados consorcio A (ZE, ST y RR) y consorcio B (PA, ZE, ST, CZ, CF y RR), junto con los 2 consorcios con mejor crecimiento nombrados como consorcio C (PA, ZE, CZ y RR) y D (PA, ZE, CZ, CF, AI y RR).

8.9.1 Cepas individuales

De acuerdo con los resultados obtenidos, se observó que a partir del día 8, las cepas *Paracoccus alcaliphilus* HC20 (Fig. 15-I) y *Zobellella endophytica* HC28 (Fig. 15-II) disminuyeron ligeramente la concentración de PHE en el medio, siguiendo con dicha tendencia en el día 12. En el caso de *Salinicola tamaricis* ST (Fig. 15-III) y *Rhodococcus ruber* RR (Fig. 15-VIII), a partir del día 12 se observa una ligera disminución de la concentración de PHE en el medio. Por último, en las cepas *Citrococcus zhacaiensis* CZ (Fig. 15-IV), *Cellulosimicrobium funkei* CF (Fig. 15-V), *Acinetobacter iwoffi* AI (Fig. 15-VI) y *Pseudomonas pachastrallae* PP (Fig. 15-VII) no se observaron cambios significativos de la concentración de PHE con respecto al control abiótico.

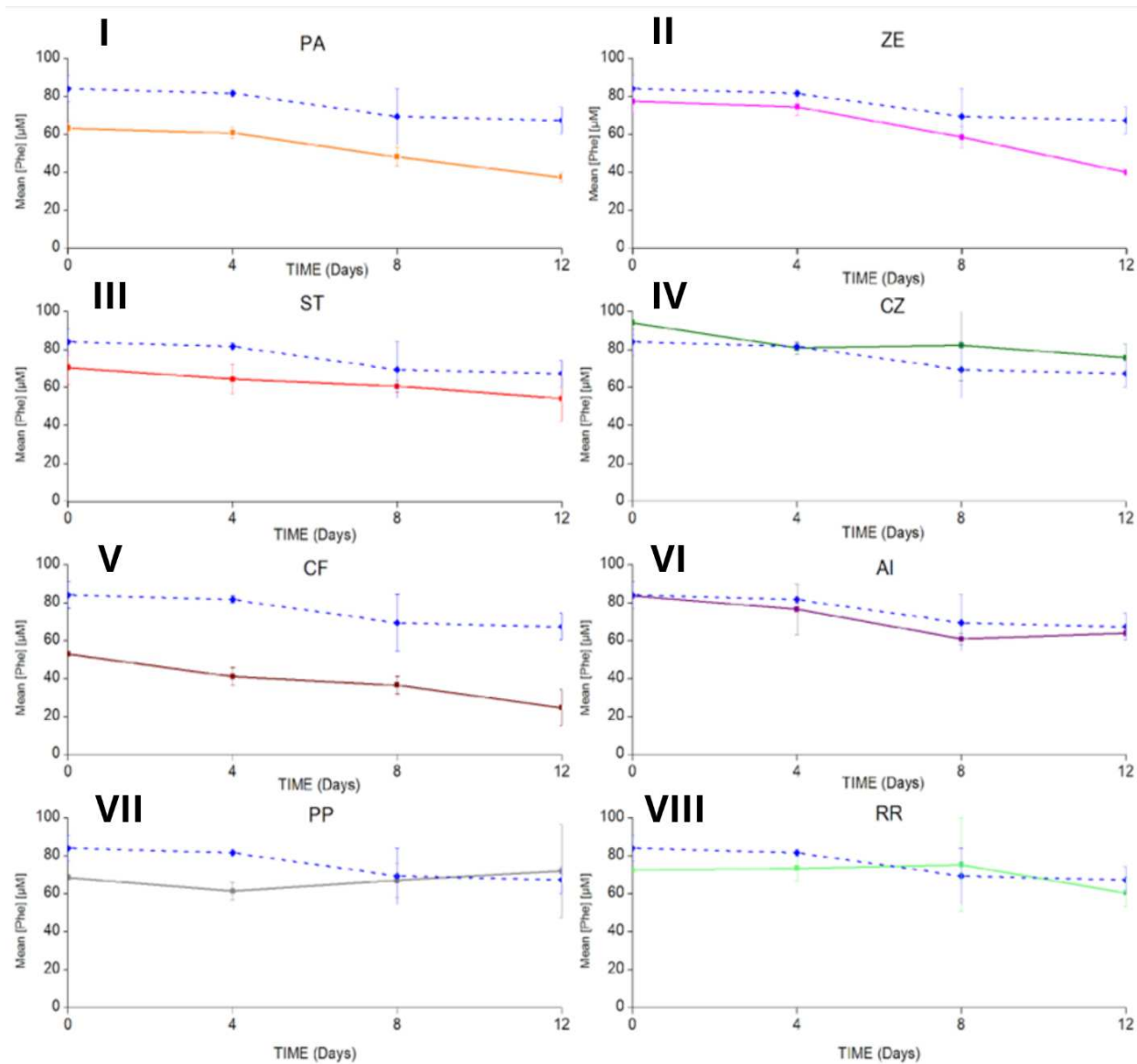


Fig. 15 Degradación de PHE de las 8 cepas bacterianas potenciales. *Paracoccus alcaliphilus* (PA), *Zobellella endophytica* (ZE), *Salinicola tamaricis* (ST), *Citrococcus zhacaiensis* (CZ), *Cellulosimicrobium funkei* (CF), *Acinetobacter iwoffi* (AI), *Pseudomonas pachastrallae* (PP) y *Rhodococcus ruber* (RR). Líneas azules punteadas: Control Abiótico.

En el caso de la tasa de eliminación del PYR, (Fig. 16) la cepa *Paracoccus alcaliphilus* HC20 (Fig. 16-I) mostró una ligera disminución de la concentración del HAP a partir del día 12. En cuanto a la cepa *Zobellella endophytica* ZE (Fig. 16-II) y *Rhodococcus ruber*

RR (Fig. 16-VIII), hubo una ligera disminución de la concentración del PYR a partir del día 8, siguiendo dicha tendencia al día 12. Caso contrario sucedió con las cepas *Salinicola tamaricis* ST (Fig. 16-III), *Citrococcus zhacaiensis* CZ (Fig. 16-IV), *Cellulosimicrobium funkei* CF (Fig. 16-V), *Acinetobacter iwoffi* AI (Fig. 16-VI) y *Pseudomonas pachastrallae* PP (Fig. 16-VII) las cuales no mostraron algún cambio significativo en la concentración de PYR comparado con el control abiótico.

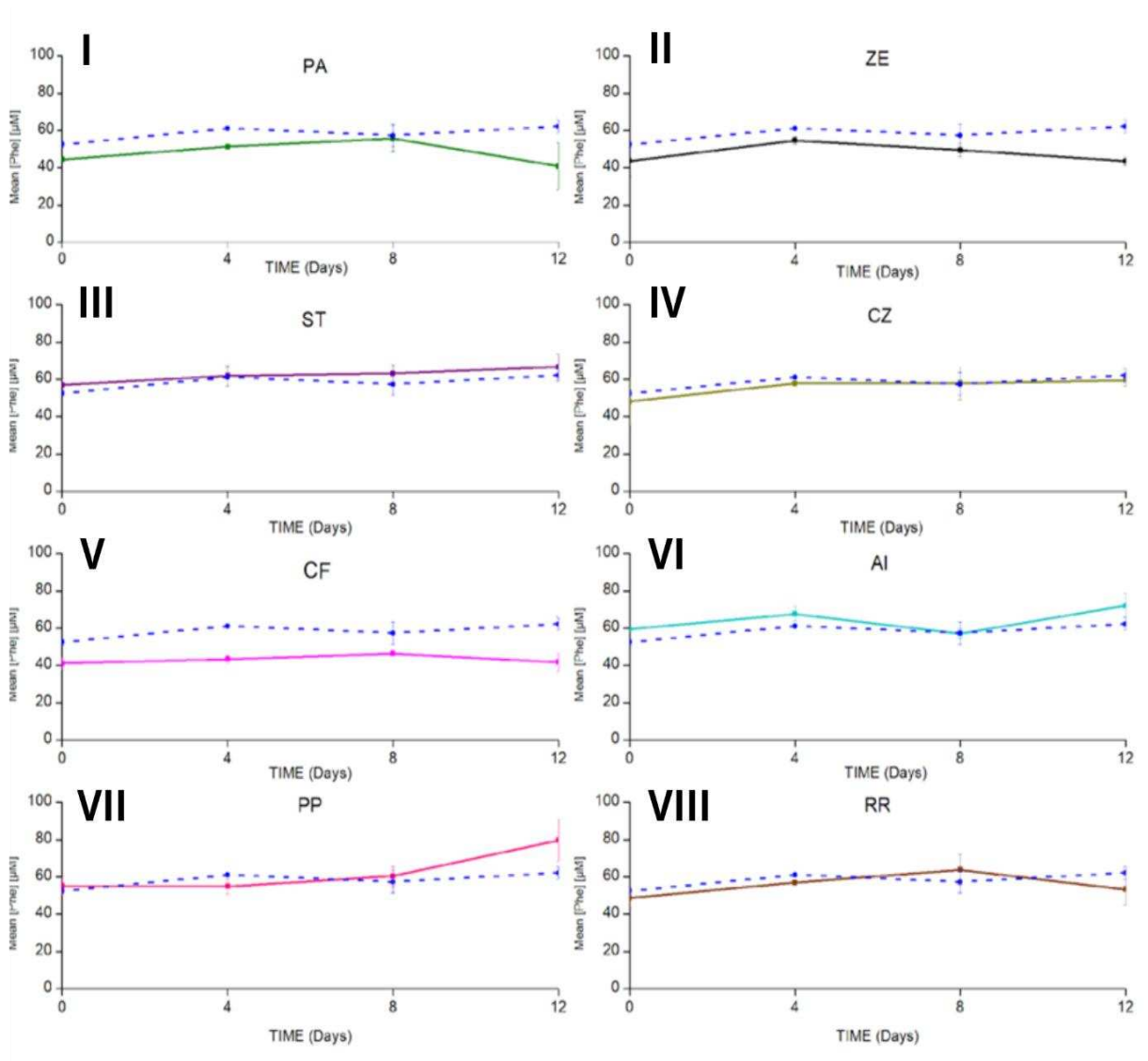


Fig. 16 Degradación de PYR de las 8 cepas bacterianas potenciales. *Paracoccus alcaliphilus* (PA), *Zobellella endophytica* (ZE), *Salinicola tamaricis* (ST), *Citrococcus zhacaiensis* (CZ), *Cellulosimicrobium funkei* (CF), *Acinetobacter iwoffi* (AI),

Pseudomonas), *pachastrallae* (PP) y *Rhodococcus ruber* (RR). Líneas azules punteadas: Control Abiótico.

8.10 Degradación de los consorcios bacterianos sociales por 12 días

Los consorcios sociales A (Fig. 17-I) y B (Fig. 17-II) fueron de igual manera estudiados para determinar su capacidad de eliminación de PHE y PYR durante 12 días. Para PHE, se observa que hubo una pérdida de PHE tanto en el control abiótico como en las muestras a las mismas tasas de degradación, por lo que no se tienen resultados concluyentes.

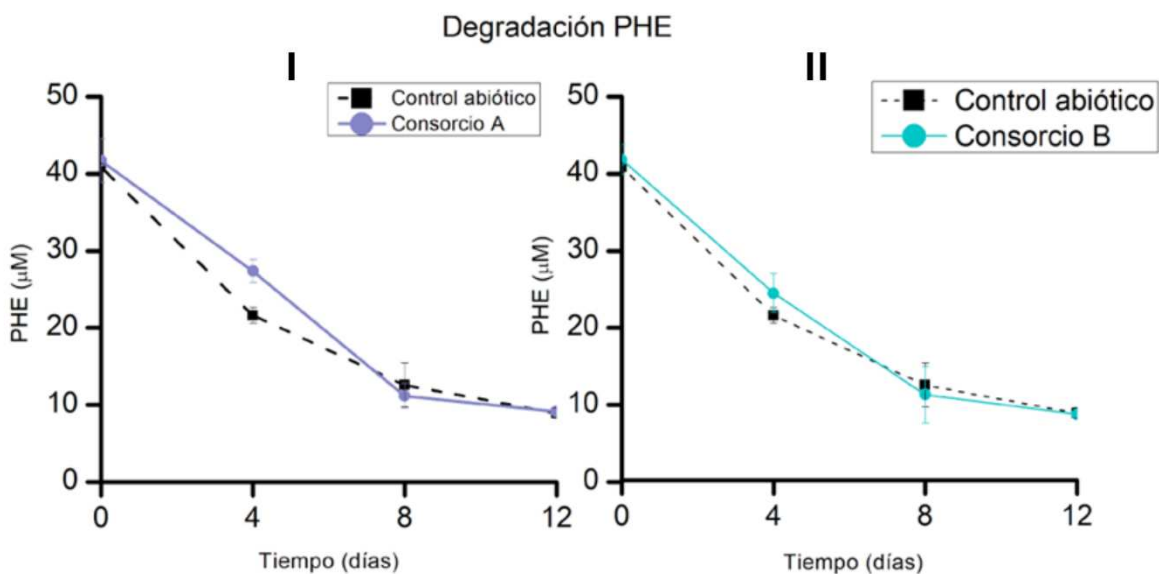


Fig. 17 Degradación de consorcios bacterianos en presencia de PHE durante 12 días. Consorcio A (ZE, ST y RR) y Consorcio B (PA, ZE, ST, CZ, CF y RR). Las barras de error representan los valores de desviación estándar.

En el caso de la eliminación del compuesto PYR, los consorcios no degradaron el compuesto de PYR en el transcurso de 12 días. Dado al hecho que este comportamiento se repitió tanto en el ensayo de degradación por cepas individuales como en el ensayo utilizando los consorcios sociales y a que estas cepas trabajo son de origen marino, su crecimiento suele ser lento (Kirchman, 2016), se propuso aumentar el tiempo de evaluación a 30 días para observar si había una mayor tasa de degradación a la obtenida en los consorcios sociales (Fig. 18).

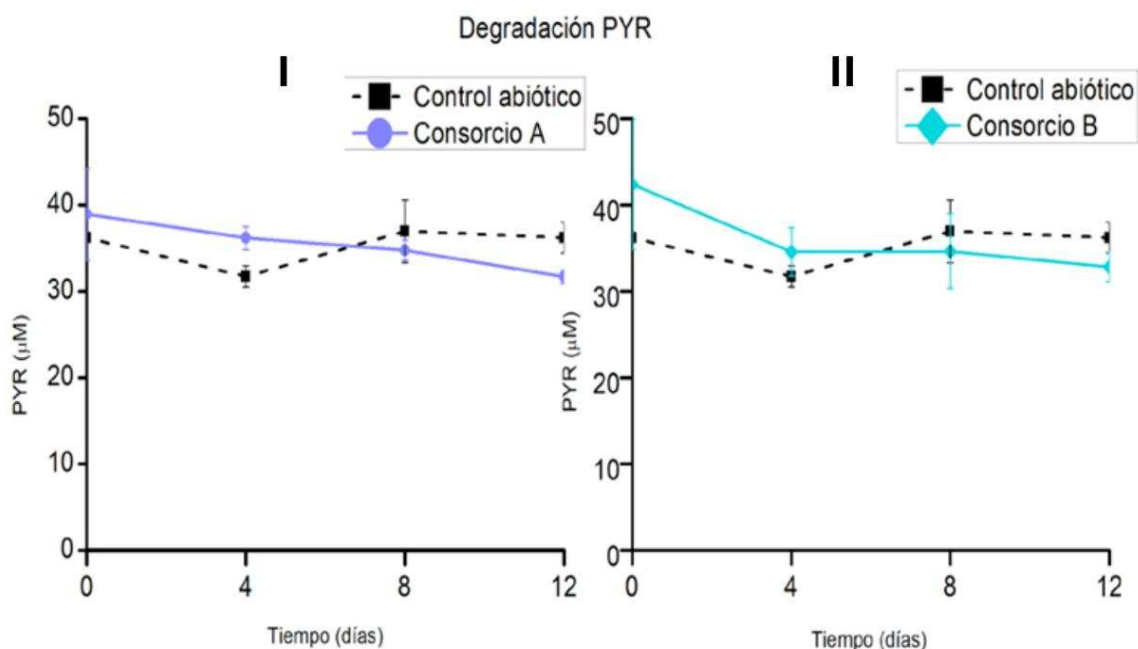


Fig. 18 Degradación de consorcios bacterianos en presencia de PYR durante 12 días. Consorcio A (ZE, ST y RR) y Consorcio B (PA, ZE, ST, CZ, CF y RR). Las barras de error representan los valores de desviación estándar.

8.10.1 Degradación de consorcios sociales y de crecimiento por 30 días

Se realizó un ensayo de degradación a los dos consorcios sociales (A: PA, ST y RR; B: PA, ZE, ST, CZ, CF y RR) y a los dos consorcios con el mejor crecimiento (C: PA, ZE, CZ y RR; D: PA, ZE, CZ, CF, AI y RR) obtenidos por la herramienta de BSocial aumentando el número de 12 a 30 días. Se tomaron muestras el día 015 (T0), día 15 (T15) y día 30 (T30) y las mediciones de la concentración de PYR y PHE se llevó a cabo con el equipo de HPLC.

En el caso de PHE (Fig. 19) se obtuvo el mismo comportamiento que el ensayo realizado a 12 días, con una pérdida del HAP tanto en las muestras correspondiente a los consorcios como en el control abiótico.

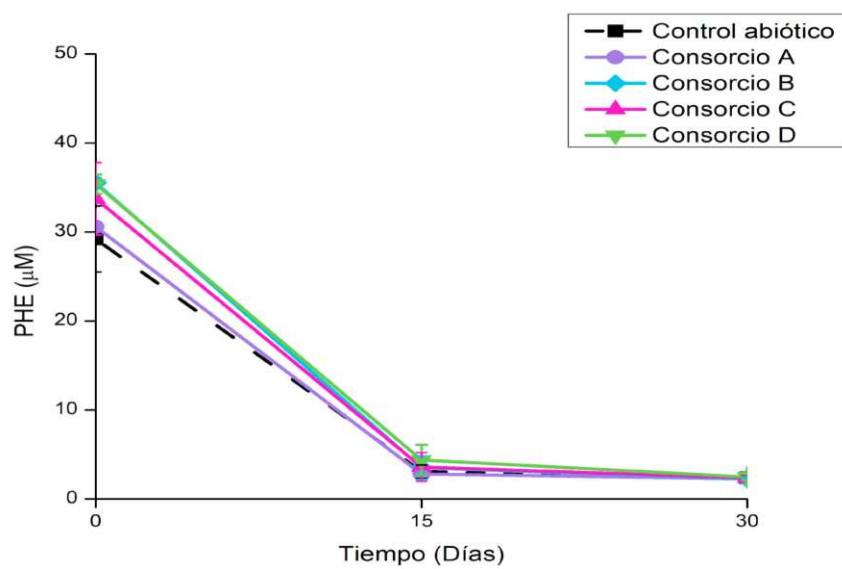


Fig. 19 Degradación de PHE durante 30 días por consorcios sociales (A y B) y consorcios con mejor crecimiento (C y D). Las barras de error representan los valores de desviación estándar.

Para la degradación de PYR (Fig. 20), no se obtuvo una eliminación significativa del contaminante por los consorcios bacterianos sociales (consorcio A y B) y los de mayor crecimiento (consorcio C y D).

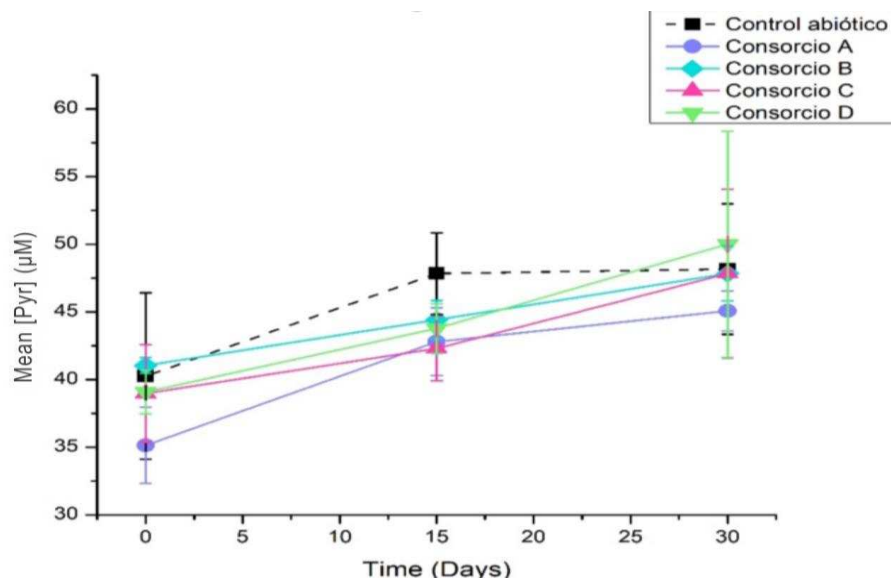


Fig. 20 Degradación de PYR durante 30 días por consorcios sociales (A y B) y consorcios con mejor crecimiento (C y D). La línea punteada corresponde al control abiótico.

9. ANALISIS ESTADÍSTICO

De acuerdo a los resultados obtenidos para la degradación de las cepas individuales así como la degradación de consorcios sociales y de crecimiento durante 12 y 30 días, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) empleando la prueba Fisher de diferencia menos significativa o LSD por sus siglas en inglés (Least Significant Difference, $\alpha = 0.05$), con la finalidad de analizar las diferencias entre las medias de las degradaciones de PHE y PYR empleando distintos consorcios bacterianos y así como las cepas individuales. Se postula como hipótesis nula que todas las medias de las degradaciones son iguales ($H_0 = \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4$) y como hipótesis alterna que al menos alguna de la media es distinta ($H_0 = \mu_i \neq \mu_j$ para algún par de $i \neq j$).

Tabla IX Condiciones de análisis de varianza (ANOVA).

MÉTODO	
Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0.05$

9.1 Análisis estadístico de la degradación por cepas individuales

9.1.1 Fenantreno (PHE)

Se realizó el análisis de varianza para ($\alpha = 0.05$) la degradación de PHE (Fig. 21) empleando distintas cepas bacterianas (A-H) y un control representado por X. La hipótesis nula plantea que todas las medias de degradación del hidrocarburo son iguales, mientras que la hipótesis alterna plantea que al menos una de las medias es distinta. Con un valor de p de 0.345 obtenido a partir del análisis de varianza, no se debe rechazar la hipótesis nula; sin embargo, la prueba de Fisher nos presenta un estudio más exhaustivo,

comparando los resultados obtenidos de las degradaciones empleando distintas cepas bacterianas. Se puede observar que para los intervalos de confianza del 95% la cepa bacteriana B comparándola con el blanco X, es la única que no incluye el 0, por lo que el resto de las medias son estadísticamente iguales, sin embargo, la media de la cepa B es significativamente distinta por lo que al menos una media es diferente al resto, por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

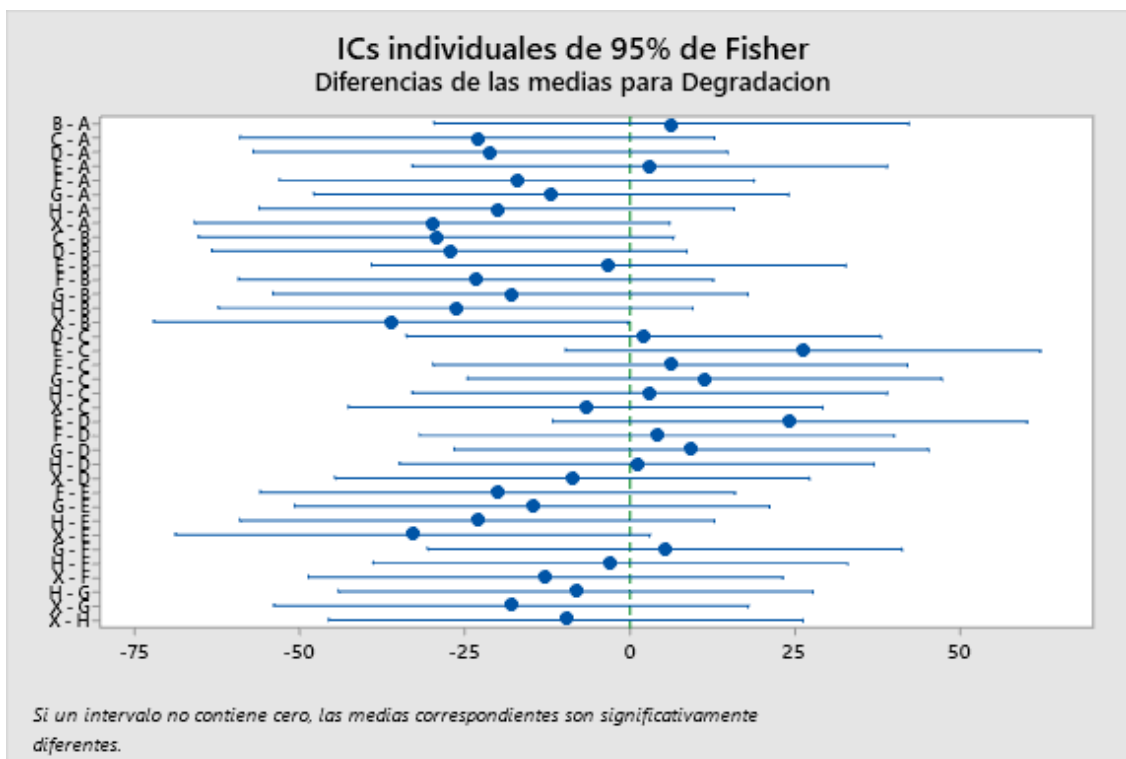


Fig. 21 Comparación de los Intervalos de confianza de las cepas individuales en PHE utilizando Fischer $\alpha=0.05$. Las cepas van en el siguiente orden: A: PA, B: ZE, C:ST, D:CZ, E:CF, F:AI, G: PP y H: RR. X: Control abiótico

9.2 Análisis estadístico de la degradación de PHE y PYR por los consorcios sociales durante 12 días

9.2.1 Fenantreno (PHE)

A continuación, en la Fig. 22 se muestran los resultados de una prueba ANOVA para analizar la degradación de PHE empleando dos consorcios bacterianos, en donde el análisis de varianza muestra un valor de p de 0.674, el cual es mayor que α (0.05) por lo

que el modelo ANOVA indica que la hipótesis nula no se rechaza. Adicionalmente, se realizó la prueba de Fisher para poder comparar cada una de las degradaciones obtenidas empleando distintos consorcios bacterianos, los resultados indican no haber diferencias estadísticas entre los consorcios bacterianos, apoyando los resultados de la prueba ANOVA.

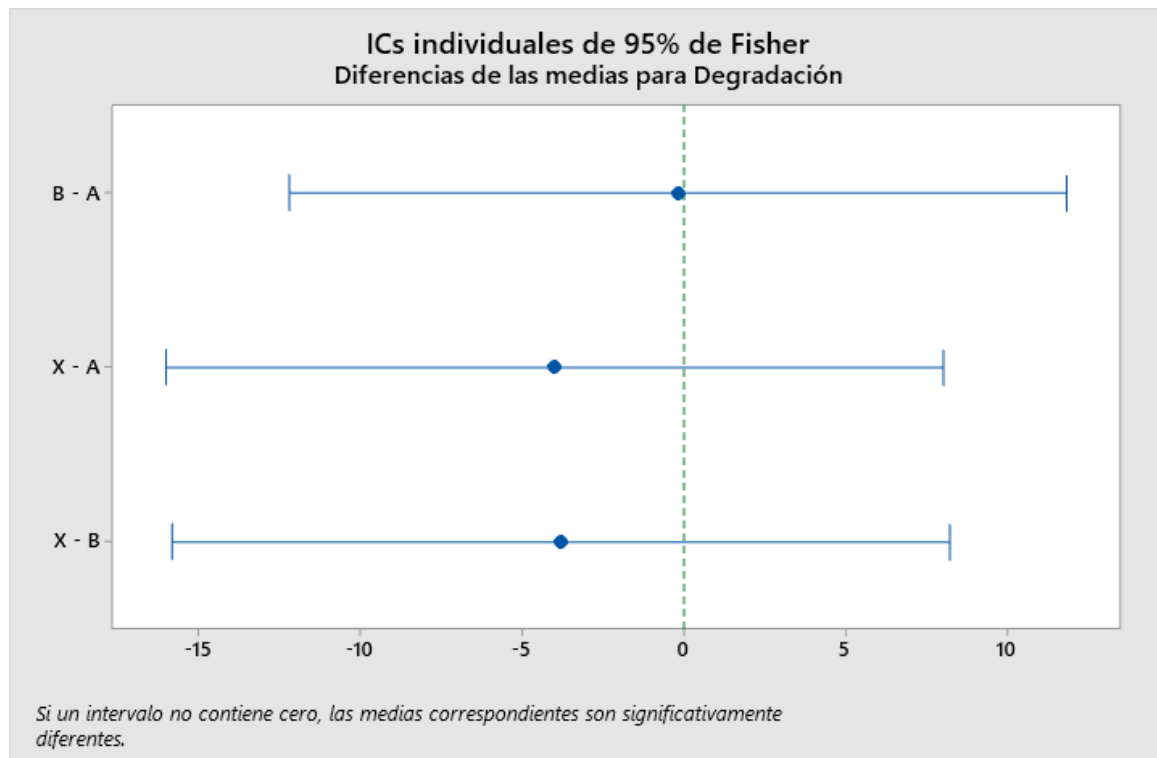


Fig. 22 Comparación de los Intervalos de confianza de los consorcios sociales con PHE utilizando Fisher $\alpha = 0.05$ p. Los consorcios van en el siguiente orden: A: ZE, ST y RR B: PA, ZE, ST, CZ, CF y RR. X: Control abiótico.

9.2.2 Pireno (PYR)

Se realizó un análisis de varianza para la degradación de PYR (Fig. 23) empleando distintos consorcios bacterianos, el valor de 0.115 de p mayor a α indica que las medias son iguales y no hay diferencia entre ellas. Las gráficas de intervalos de confianza de la prueba Fisher indican una posible diferencia entre el consorcio B y el blanco, a pesar de incluir el 0 en el intervalo de confianza, podrían considerarse distintas las medias.

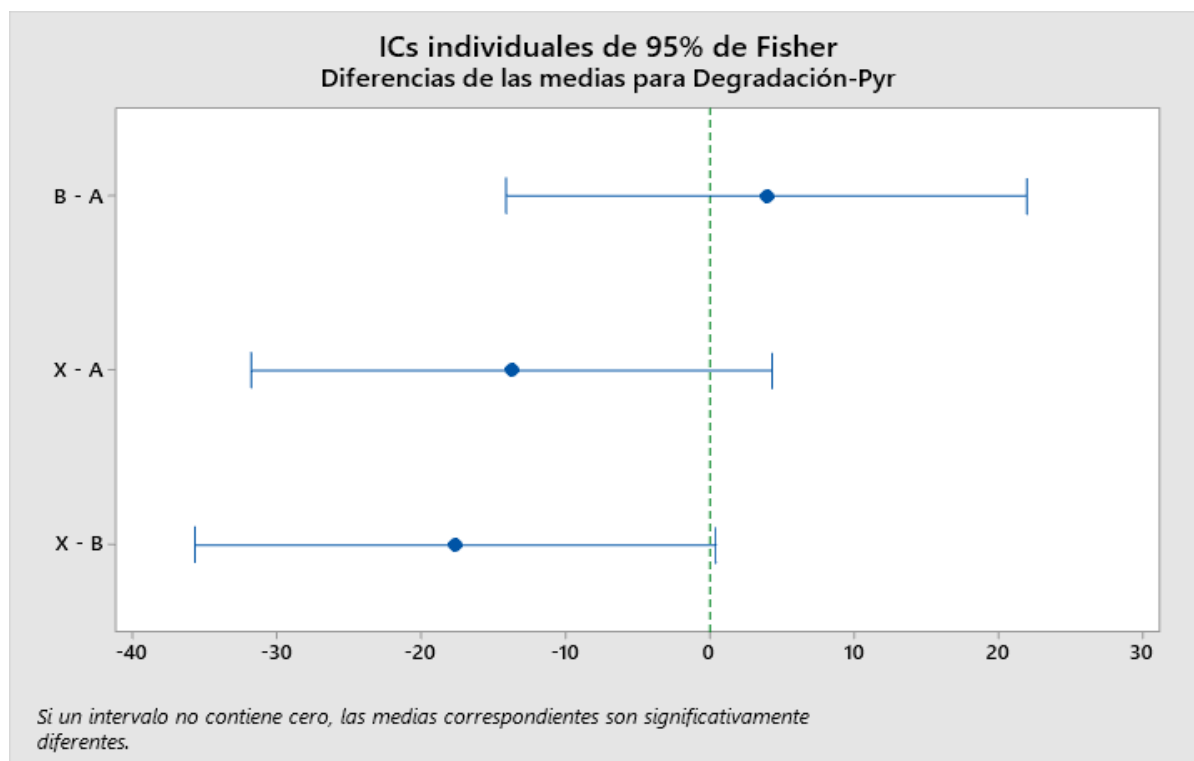


Fig. 23 Comparación de los Intervalos de confianza de los consorcios sociales con PYR utilizando Fisher $\alpha = 0.05$ p con la prueba de LSD. Los consorcios van en el siguiente orden: A: ZE, ST y RR B: PA, ZE, ST, CZ, CF y RR. X: Control abiótico.

9.3 Degradación de PHE y PYR por los consorcios sociales y de crecimiento a los 30 días

9.3.1 Fenantreno (PHE)

El análisis de varianza muestra un valor de p de 0.068, el cual es mayor a α con un valor de 0.05 por lo que en primera instancia la hipótesis nula no se rechaza. Sin embargo, el análisis por la prueba de Tukey nos da una mayor comprensión acerca de las diferencias en las medias comparando cada una de los consorcios y el control denotado por X. La información obtenida empleando el método LSD con una confianza de 95% nos indica que las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes, el consorcio B y el blanco X al no compartir una letra nos indica que son estadísticamente distintos, esto se ve reforzado en las pruebas individuales de Fisher para la diferencia de las medias ya que es la única comparación que no contiene cero. Los resultados obtenidos (Fig. 24) mediante la prueba de Fisher nos indica la diferencia estadística entre la media

del consorcio B y el blanco sin consorcio, por lo que se puede rechazar la hipótesis nula al no ser todas las medias iguales.

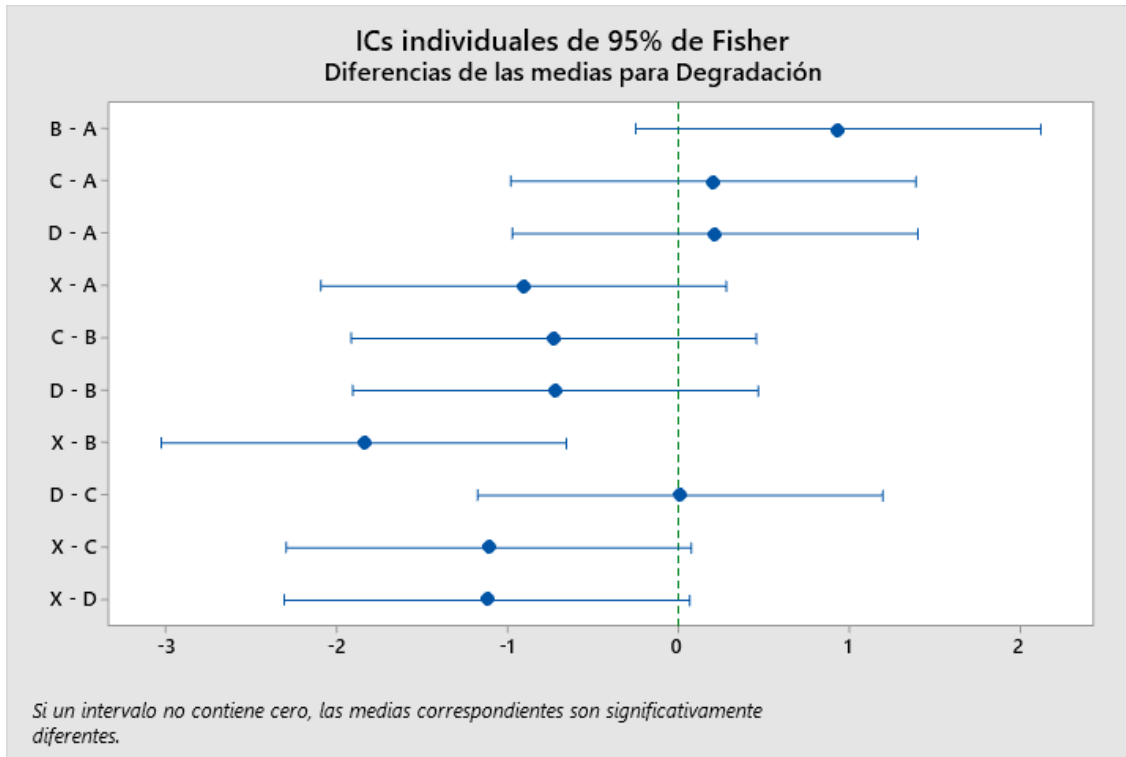


Fig. 24 Comparación de los Intervalos de confianza de los consorcios sociales con PHE utilizando Fisher $\alpha = 0.05$ p. Los consorcios van en el siguiente orden: A: ZE, ST y RR B: PA, ZE, ST, CZ, CF y RR., C: PA, ZE, CZ y RR. D: PA, ZE, CZ, CF, AI y RR). X: Control abiótico

9.3.2 Pireno (PYR)

Se presenta un análisis ANOVA para la degradación de PYR (Fig. 25) empleando 2 consorcios sociales (A y B) y los dos mejores consorcios por crecimiento (C y D). Se obtuvo un valor p de 0.782 el cual es mayor al valor de α por lo que entra en zona de no rechazo de la hipótesis nula. Para corroborar el análisis de varianza se realizó una prueba por el método de Fisher con un índice de confianza del 95%. Al analizar las comparaciones de las medias de los consorcios bacterianos y el blanco se puede observar que no hay diferencia significativa en las medias de degradación de pireno para los consorcios bacterianos.

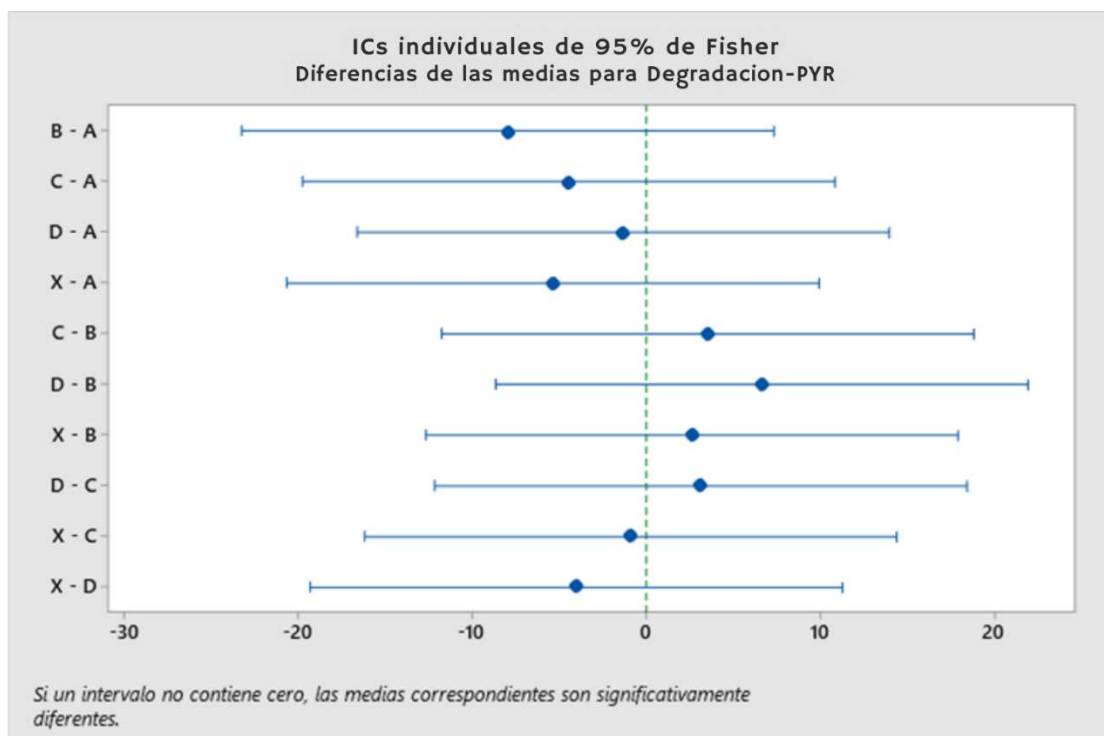


Fig. 25 Comparación de los Intervalos de confianza de los consorcios sociales con PYR utilizando Fischer $\alpha = 0.05$ p. Los consorcios van en el siguiente orden: A: ZE, ST y RR B: PA, ZE, ST, CZ, CF y RR., C: PA, ZE, CZ y RR. D: PA, ZE, CZ, CF, AI y RR). X: Control abiótico.

10. DISCUSIÓN

10.1 Comportamientos sociales de las especies bacterianas

En el diseño de los consorcios bacterianos sintéticos, uno de los principales retos radica en la determinación de las especies que pueden coexistir eficientemente dentro de una población (Freilich *et al.*, 2011). En este trabajo, se buscó descifrar el comportamiento social de los individuos seleccionados mediante diferentes estrategias cualitativas y cuantitativas orientadas a la degradación de HAP con el objetivo de diseñar un consorcio bacteriano social idóneo para dar una mejora en la eficiencia de la degradación de estos contaminantes.

De acuerdo con la literatura, la eficiencia de degradación de HAP por una cepa bacteriana individual será menor a la degradación de compuestos mucho más complejos a diferencia

de los consorcios bacterianos, esto debido a su gran capacidad en la división de trabajo metabólico (Cao et al.,2022).

En el trabajo de Kumari *et al.* (2018) compararon la tasa de degradación de HAP utilizando biosurfactantes y con 5 cepas de manera individual, así como la construcción del consorcio. Este último fue el que mayor potencial de degradación (superior al 85%) mostró comparado con la degradación de las cepas individuales. Es por ello, que en otros estudios se ha propuesto la aplicación de consorcios microbianos para una mayor eficiencia de degradación aprovechando la división de trabajo y la capacidad metabólica de cada especie presente en la población (Paniagua & Fathepure, 2018).

Una de las condiciones que se debe evaluar al diseñar un CBS son las interacciones sinérgicas (positivas) y las interacciones netamente negativas que pudieran tener un efecto en la división de labor durante el proceso de degradación de contaminantes (competencia, inhibición de crecimiento por síntesis de toxinas, entre otros) (Becker et al. 2012).

Un caso en particular es el reportado por Rojas-Vargas *et al.* (2022), en el cual se diseñó un consorcio por un método factorial para la degradación de petróleo a partir de una preselección de 16 cepas aisladas del Golfo de México y 3 cepas aisladas de la región Noroeste del Océano Pacífico, incluyendo la bacteria marina hidrocarbonoclasta *Rhodococcus ruber* MSA14. En el análisis de la tasa de degradación de los consorcios durante 75 días, se observó que aquellos donde la cepa MSA14 se encontraba presente, fueron los que tuvieron una tasa de eliminación (%) menores a las esperadas, siendo que, según un reporte reciente de Embarcadero-Jiménez *et al.* (2024) la cepa MSA14 demostró capacidad de degradación del 30% de PYR a los 27 días.

Es por eso, que el estudio de las interacciones sociales entre especies puede ser un factor importante para el diseño del consorcio sintético y, por ende, para la degradación de HAP.

La aplicación de la herramienta de BSocial para la selección de las poblaciones construidas determina el efecto de la comunidad bacteriana cuando una cepa se encuentra presente o no presente, obteniendo todas las interacciones posibles entre las especies seleccionadas y evaluar las combinaciones más productivas (Purswani et al., 2017).

En este trabajo, se obtuvieron dos consorcios sociales (A y B) con las 8 cepas utilizadas de un total de 255 combinaciones y se probaron dos consorcios con el mejor crecimiento en presencia de HAP (C y D), siendo un total de 4 consorcios. Para la formación de estos 4 consorcios, se seleccionaron las cepas en función de las interacciones positivas y neutras. Las interacciones positivas son fundamentales ya que permiten formar una comunidad estable. Un ejemplo de una interacción positiva es una relación de comensalismo, como la que existe con la cepa *Pseudomonas sp. AS1* y *Acinetobacter oleivorans DR1*. *Pseudomonas sp. AS1* tiene la capacidad de degradar NAPH y producir salicilato como metabolito secundario, el cual *Acinetobacter oleivorans DR1* utiliza para crecer y sobrevivir a la intoxicación de NAPH (Seo et al. 2012). Mientras que un comportamiento neutral nos indica que esos microorganismos no son beneficiosos ni perjudiciales para la comunidad, pero pueden ser buenos candidatos para la formación del consorcio que sea potencialmente degradador.

10.2 La estabilidad de los consorcios está relacionada con el aumento de la diversidad

Las comunidades microbianas son fuertemente influenciadas por las interacciones sociales entre las especies involucradas, lo que genera un efecto en la composición y la función de las poblaciones (Madsen et al., 2017), y, por consiguiente, un impacto en la estabilidad de la comunidad. En ecología, este fenómeno se conoce como la hipótesis de diversidad-estabilidad (McCann, 2000), el cual establece que, a mayor riqueza de especies, mayor es la estabilidad. En el contexto de la degradación de contaminantes, se ha reportado en estudios previos que una mayor estabilidad del consorcio o población bacteriana requiere menor gasto energético para las especies, dando como resultado la

eliminación más eficiente de un contaminante a comparación de la degradación por cepas individuales (Lesnik, *et al.* 2019).

Esta tendencia se puede observar en la Fig. 14 a partir de los análisis de coeficiente de variación (CV) en la degradación de HAP. Los datos obtenidos mostraron que, en el caso de tasa de crecimiento y número de generaciones, se observa una ligera disminución del CV al aumentar el número de especies, complementándose con los resultados obtenidos con los consorcios formados por Purswani *et al.* (2017, 2019), con la diferencia que el coeficiente de variación obtenido fue mucho más bajo, tanto para el número de generaciones como la tasa de crecimiento ($R^2=0.16$; $R^2=0.10$ respectivamente) con lo obtenido por el autor mencionado en número de generaciones ($R^2=0.5$).

De las 8 cepas, solo *Zobellella endophytica* HC28 presentó una interacción positiva en el estudio, y el resto de las cepas tienen interacciones neutras, Aunque en el diseño de CBS se consideró tanto la cepa positiva como las cepas neutras, no se observó una degradación de PHE y PYR significativa. Esto puede deberse a lo reportado por Becker *et al.* (2012), donde, en el caso que una de las especies que conforman una comunidad bacteriana compita por recursos limitados (en este caso, una fuente de carbono), pueden dominar la competencia y afectar el funcionamiento de la comunidad. Además, las interacciones consideradas neutras, no necesariamente significan que no tenga efecto alguno en los CBS ya que podría afectar, la estabilidad del mismo, sino que, en este caso, hay un efecto negativo en la estabilidad del mismo.

10.3 Cuantificación de la degradación de HAP

Se evaluó la capacidad de degradación de las 8 cepas hidrocarbonoclastas potenciales de manera individual, la degradación de dos consorcios sociales, ambos experimentos analizados durante 12 días, y por último la tasa de eliminación de HAP de dos consorcios sociales y dos con el mejor crecimiento durante un periodo mayor (30 días).

Para la extracción y cuantificación de PYR y PHE, se aplicó el método de Aranda *et al.*, (2009) con el equipo de HPLC acoplado a DAD, en el cual, permite determinar la

concentración de los HAP calculando el área del pico de su cromatograma, utilizando una curva de calibración para cada compuesto.

Para el caso de los experimentos de degradación de las cepas individuales en PHE y PYR, PA, ZE y RR tuvieron una ligera disminución después de 12 días en ambos compuestos, mientras que las demás cepas tuvieron resultados poco significativos. Las bacterias PA y ZE pertenecientes al género *Paracoccus* y *Zobellella* ya han sido reportadas por su capacidad de degradación (Gupta *et al.*, 2016; D.W. Lee *et al.*, 2018), así como la capacidad de degradación de PYR por el género de *Rhodococcus* (RR) (Embarcadero-Jiménez *et al.*, 2024)

Para el caso de PHE en los consorcios sociales, se tuvo la problemática con el control abiótico, el cual, tuvo un mismo comportamiento que en presencia de cepas bacterianas, por lo que pudiera deberse a la naturaleza de los compuestos HAP de bajo peso molecular al verse afectados por procesos físicos y químicos como la fotooxidación (Sabaté *et al.*, 2000). Caso contrario con PYR, donde se observó degradación poco significativa en los consorcios A y B, pudiendo verse afectado por la dificultad de degradación y el tiempo determinado para su degradación.

Normalmente, los tiempos utilizados para la medición de biodegradación varían de entre 14 a hasta 75 días (Gallego *et al.*, 2013; Shahriari Moghadam *et al.*, 2014; Marzuki *et al.*, 2022) por lo que se propuso el aumento del tiempo para ver si la capacidad de las cepas individuales y/o consorcios se vio limitada por dicho parámetro. A pesar de ello, el rendimiento de la biodegradación de las cepas individuales y consorcios tuvo resultados distintos a los esperados.

Al aumentar a 30 días el ensayo de degradación de los dos consorcios sociales y dos consorcios por mejor crecimiento, se observa en el caso de PHE (Fig. 21) mismo comportamiento que en el ensayo de doce días (Fig. 19), lo cual puede tratarse de un factor físico como la fotodegradación del compuesto.

Low *et al.* (1987) reportaron que la pérdida de HAP puede deberse a una eficiencia baja en la extracción del compuesto, por procesos de volatilización durante la remoción del solvente después de la extracción o por almacenamiento. En el caso de solventes polares, como el acetonitrilo o metanol, no son recomendables a menos que la presencia de luz sea excluida.

En otro estudio más reciente, probaron la tasa de degradación de PHE en distintos solventes polares y no polares, concluyendo que la fotooxidación se ve afectada por diversos factores como polaridad, el oxígeno disuelto y la electronegatividad (Shankar, *et al.*, 2018).

En el caso de PYR con los consorcios, no se puede concluir de manera significativa debido a la desviación estándar entre muestras y consorcios.

Aunque las poblaciones bacterianas ofrecen una gran variedad de componentes biológicos para la degradación de HAP, como enzimas y biosurfactantes, no todas las combinaciones bacterianas son capaces de biodegradar eficientemente, lo cual sugiere el impacto de las interacciones competitivas entre diferentes especies (Freilich *et al.*, 2011), además de considerar los factores físicos y químicos que puedan influir en los resultados de biodegradación debido a la falta de certidumbre a la hora del desarrollo de la extracción controlada al manejar HAP. El desarrollo de CBS a partir de sus relaciones de cooperación es aún escaso, por lo que la búsqueda de cepas compatibles sigue siendo un reto (Purswani *et al.*, 2017; Ángeles de Paz *et al.*, 2023).

11. CONCLUSIONES

En el desarrollo de este trabajo, los resultados obtenidos cumplieron con los objetivos planteados, concluyendo con lo siguiente:

De acuerdo con el análisis de las interacciones sociales de los CBS, se logró determinar el número de especies óptimo para una estabilidad y fitness ideal.

La herramienta web BSocial dio buenos resultados en la evaluación de las interacciones sociales y el diseño de CBS, por lo que la implementación de esta técnica será primordial

en la búsqueda y construcción de comunidades microbianas involucrados en la degradación de contaminantes.

Se diseñaron 2 consorcios sociales **X58** (*Zobellella endophytica* ZE, *Salinicola tamaricis* ST y *Rhodoccus ruber* RR) y **X221** (*Paracoccus alcaliphilus* PA, *Salinicola tamaricis* ST, *Citrococcus zhacaiensis* CZ, *Cellulosimicrobium funkei* CF y *Rhodoccus ruber* RR) y las 10 mejores combinaciones de acuerdo con su crecimiento, se evaluó su capacidad hidrocarbonoclasta hacia PYR y PHE.

En los ensayos de degradación de PYR y PHE, al aumentar el número de cepas neutras en los consorcios A y B, disminuyeron su capacidad de degradación. Por otro lado, los ensayos de degradación para los consorcios C y D no fueron concluyentes. Estos resultados sugieren que las interacciones sociales son complejas y están sujetas a diversos factores ambientales y sociales.

En las interacciones sociales están implicados diversos factores que afectan la división de trabajo entre las especies dentro de las comunidades microbianas, lo que supone un gran reto para descifrar los mecanismos de cooperación y/o competencia que pueden ser aplicados para el desarrollo de consorcios microbianos sintéticos con sinergia catabólica.

12. PERSPECTIVAS

Para complementar el trabajo realizado en esta tesis, se propone lo siguiente:

- 1) Evaluar el porcentaje de recuperación de PYR y PHE del método de extracción utilizado.
- 2) Realizar ensayos de degradación con las 8 cepas individuales aumentando el tiempo de evaluación a 30 días.
- 3) Determinar los metabolitos generados en el proceso de biodegradación de las cepas individuales y los consorcios utilizando cromatografía de gases-masas (GC-MS) para ver los metabolitos involucrados en la biodegradación de PYR y PHE.
- 4) Realizar ensayos de cometabolismo con otra fuente de carbono más lábil, como la glucosa en un periodo superior a los 30 días.

- 5) Evaluar la capacidad de degradación de las 10 mejores combinaciones de acuerdo con el crecimiento.
- 6) Buscar otras cepas individuales para llevar a cabo los ensayos de BSocial para la construcción de otros CBS.

13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahmed, F., Fakhruddin, A. N. M., & Fakhruddin, A. (2018). *A Review on Environmental Contamination of Petroleum Hydrocarbons and its Biodegradation*. <https://doi.org/10.19080/IJESNR.2018.11.555811>

Angeles-de Paz, G., Ledezma-Villanueva, A., Robledo-Mahón, T., Pozo, C., Calvo, C., Aranda, E., & Purswani, J. (2023). Assembled mixed co-cultures for emerging pollutant removal using native microorganisms from sewage sludge. *Chemosphere*, 313. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.137472>

Aranda, E., Kinne, M., Kluge, M., Ullrich, R., & Hofrichter, M. (2009). Conversion of dibenzothiophene by the mushrooms *Agrocybe aegerita* and *Coprinellus radians* and their extracellular peroxygenases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82(6), 1057–1066. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1778-6>

Atlas, R. M. (1995). Petroleum Biodegradation and Oil Spill Bioremediation. *Marine Pollution Bulletin* (Vol. 31).

Becker, J., Eisenhauer, N., Scheu, S., & Jousset, A. (2012). Increasing antagonistic interactions cause bacterial communities to collapse at high diversity. *Ecology Letters*, 15(5), 468–474. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2012.01759.x>

Cao, Y., Zhang, B., Dong, G., & Chen, B. (2024). Blue economy: A new era of petroleum microbiology in a changing climate. *National Science Open*, 3(1), 20230024. <https://doi.org/10.1360/nso/20230024>

Cerniglia, C. E. (1993). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Current opinion in biotechnology*, 4(3), 331-338.

Chauhan, A., Fazlurrahman, Oakeshott, J. G., & Jain, R. K. (2008). Bacterial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: strategies for bioremediation. *Indian Journal of Microbiology*, 48, 95-113.

Daher Hazaimah, M., & Ahmed, E. S. (n.d.). *Bioremediation perspectives and progress in petroleum pollution in the marine environment: a review*. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-15598-4>/Published

Desai, C., Pathak, H., & Madamwar, D. (2010). Advances in molecular and “-omics” technologies to gauge microbial communities and bioremediation at xenobiotic/anthropogen contaminated sites. *Bioresource Technology*, 101(6), 1558–1569. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.10.080>

D’Souza, G., Shitut, S., Preussger, D., Yousif, G., Waschina, S., & Kost, C. (2018). Ecology and evolution of metabolic cross-feeding interactions in bacteria. *Natural Product Reports*, 35(5), 455–488. <https://doi.org/10.1039/c8np00009c>

Duan, L., Naidu, R., Thavamani, P., Meaklim, J., & Megharaj, M. (2015). Managing long-term polycyclic aromatic hydrocarbon contaminated soils: a risk-based approach. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(12), 8927–8941. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-2270-0>

Edwards, S. J., & Kjellerup, B. V. (2013). Applications of biofilms in bioremediation and biotransformation of persistent organic pollutants, pharmaceuticals/personal care products, and heavy metals. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(23), 9909–9921. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5216-z>

Elumalai, P., Kumar, A. S., Dhandapani, P., Cui, J., Gao, X., Prakash, A. A., Rajamohan, R., AlSalhi, M. S., Devanesan, S., Rajasekar, A., & Parthipan, P. (2024). Biodegradation of pyrene by bacterial consortia: Impact of natural surfactants and iron oxide nanoparticles. *Environmental Research*, 242, 117753. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.117753>

Embarcadero-Jiménez, S., Araujo-Palomares, C. L., Moreno-Perlín, T., Ramírez-Álvarez, N., Quezada-Hernández, C., Batista-García, R. A., Sanchez-Flores, A., Calcáneo-Hernández, G., & Silva-Jiménez, H. (2024). Physiology and comparative genomics of the

haloalkalitolerant and hydrocarbonoclastic marine strain *Rhodococcus ruber* MSA14. *Archives of Microbiology*, 206(7), 328. <https://doi.org/10.1007/s00203-024-04050-z>

Fingas, M. (2014). Introduction to oil chemistry and properties. *Handbook of Oil Spill Science and Technology*, 51–77.

Freilich, S., Zarecki, R., Eilam, O., Segal, E. S., Henry, C. S., Kupiec, M., Gophna, U., Sharan, R., & Rupp, E. (2011). Competitive and cooperative metabolic interactions in bacterial communities. *Nature Communications*, 2(1), 589. <https://doi.org/10.1038/ncomms1597>

Gilmore, S. P., Lankiewicz, T. S., Wilken, St. E., Brown, J. L., Sexton, J. A., Henske, J. K., Theodorou, M. K., Valentine, D. L., & O'Malley, M. A. (2019). Top-Down Enrichment Guides in Formation of Synthetic Microbial Consortia for Biomass Degradation. *ACS Synthetic Biology*, 8(9), 2174–2185. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.9b00271>

Goveas, L., Nayak, S., & Selvaraj, R. (2022). Concise review on bacterial degradation of petroleum hydrocarbons: Emphasis on Indian marine environment. *Bioresource Technology Reports*, 19, 101136. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2022.101136>

Großkopf, T., & Soyer, O. S. (2014). Synthetic microbial communities. *Current Opinion in Microbiology*, 18(1), 72–77. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.02.002>

Gupte, A., Tripathi, A., Patel, H., Rudakiya, D., & Gupte, S. (2016). Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAHs): A Perspective. *The Open Biotechnology Journal*, 10(1), 363–378. <https://doi.org/10.2174/1874070701610010363>

Hays, S. G., Patrick, W. G., Ziesack, M., Oxman, N., & Silver, P. A. (2015). Better together: engineering and application of microbial symbioses. *Current Opinion in Biotechnology*, 36, 40–49. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.08.008>

Honda, M., & Suzuki, N. (2020). Toxicities of polycyclic aromatic hydrocarbons for aquatic animals. *International Journal of Environmental Research and Public Health* (Vol. 17, Issue 4). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijerph17041363>

- Huang, H., & Ye, L. (2020). Biological technologies for cHRPs and risk control. *High-Risk Pollutants in Wastewater* (pp. 209–236). Elsevier. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128164488000095>
- Kirchman, D. L. (2016). Growth Rates of Microbes in the Oceans. *Annual Review of Marine Science*, 8(1), 285–309. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-122414-033938>
- Kong, W., Meldgin, D. R., Collins, J. J., & Lu, T. (2018). Designing microbial consortia with defined social interactions. *Nature Chemical Biology*, 14(8), 821–829. <https://doi.org/10.1038/s41589-018-0091-7>
- Kumari, S., Regar, R. K., & Manickam, N. (2018). Improved polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in a crude oil by individual and a consortium of bacteria. *Bioresource Technology*, 254, 174–179. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.075>
- 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>
- Lindemann, S. R., Bernstein, H. C., Song, H. S., Fredrickson, J. K., Fields, M. W., Shou, W., Johnson, D. R., & Beliaev, A. S. (2016). Engineering microbial consortia for controllable outputs. *ISME Journal*, 10(9), 2077–2084. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.26>
- Lu, Y., Yuan, J., Lu, X., Su, C., Zhang, Y., Wang, C., Cao, X., Li, Q., Su, J., Ittekkot, V., Garbutt, R. A., Bush, S., Fletcher, S., Wagey, T., Kachur, A., & Sweijid, N. (2018). Major threats of pollution and climate change to global coastal ecosystems and enhanced management for sustainability. *Environmental Pollution*, 239, 670–680. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.04.016>
- Machín-Ramírez, C., Morales, D., Martínez-Morales, F., Okoh, A. I., & Trejo-Hernández, M. R. (2010). Benzo[a]pyrene removal by axenic- and co-cultures of some bacterial and

fungal strains. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 64(7), 538–544.
<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2010.05.006>

Macías-Zamora, J.V., (1996). Distribution of hydrocarbons in recent marine sediments off the coast of Baja California. *Environmental Pollution*, 92(1), 45–53.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0269-7491\(95\)00086-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0269-7491(95)00086-0)

Macías-Zamora, J. V., Meléndez-Sánchez, A. L., Ramírez-Álvarez, N., Gutiérrez-Galindo, E. A., & Orozco-Borbón, M. V. (2014). On the effects of the dispersant Corexit 9500© during the degradation process of n-alkanes and PAHs in marine sediments. *Environmental Monitoring and Assessment*, 186(2), 1051–1061.
<https://doi.org/10.1007/s10661-013-3438-2>

Macías-Zamora, J. V, Mendoza-Vega, E., & Villaescusa-Celaya, J. A. (2002). PAHs composition of surface marine sediments: a comparison to potential local sources in Todos Santos Bay, B.C., Mexico. *Chemosphere*, 46(3), 459–468.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(01\)00069-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0045-6535(01)00069-8)

Madsen, J. S., Sørensen, S. J., & Burmølle, M. (2018). Bacterial social interactions and the emergence of community-intrinsic properties. *Current Opinion in Microbiology*, 42, 104–109. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.11.018>

Mahjoubi, M., Cappello, S., Souissi, Y., Jaouani, A., & Cherif, A. (2018). Microbial bioremediation of petroleum hydrocarbon–contaminated marine environments. *Recent insights in petroleum science and engineering*, 325, 325–350.

McCann, K. S. (2000). The diversity–stability debate. *Nature*, 405(6783), 228–233.
<https://doi.org/10.1038/35012234>

Mojiri, A., Zhou, J. L., Ohashi, A., Ozaki, N., & Kindaichi, T. (2019). Comprehensive review of polycyclic aromatic hydrocarbons in water sources, their effects and treatments. *Science of the Total Environment* (Vol. 696). Elsevier B.V.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.133971>

- Nikolopoulou, M., & Kalogerakis, N. (2009). Biostimulation strategies for fresh and chronically polluted marine environments with petroleum hydrocarbons. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 84(6), 802–807. <https://doi.org/10.1002/jctb.2182>
- Pandey, A. K., Chaudhary, P., Singh, S. B., Arora, A., Kumar, K., Chaudhry, S., & Nain, L. (2012). Deciphering the traits associated with PAH degradation by a novel *Serratia marcescens* L-11 strain. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 47(5), 755–765. <https://doi.org/10.1080/10934529.2012.660108>
- Paniagua-Michel, J., & Fathepure, B. (2018). Microbial Consortia and Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons in Marine Environments. *Microbial Action on Hydrocarbons* (pp. 1–20). https://doi.org/10.1007/978-981-13-1840-5_1
- Peng, T., Luo, A., Kan, J., Liang, L., Huang, T., & Hu, Z. (2019). Identification of a ring-hydroxylating dioxygenases capable of anthracene and Benzo[a]anthracene oxidization from *Rhodococcus* sp. P14. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 183–189. <https://doi.org/10.1159/000494384>
- Peng, X., Xu, P. F., Du, H., Tang, Y., Meng, Y., Yuan, L., & Sheng, L. P. (2018). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons: A review. *Applied Ecology and Environmental Research*, 16(5), 6419–6440. https://doi.org/10.15666/aeer/1605_64196440
- Premnath, N., Mohanrasu, K., Guru Raj Rao, R., Dinesh, G. H., Prakash, G. S., Ananthi, V., Ponnuchamy, K., Muthusamy, G., & Arun, A. (2021). A crucial review on polycyclic aromatic Hydrocarbons - Environmental occurrence and strategies for microbial degradation. *Chemosphere*, 280. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130608>
- Purswani, J., Romero-Zaliz, R. C., Martín-Platero, A. M., Guisado, I. M., González-López, J., & Pozo, C. (2017). BSocial: deciphering social behaviors within mixed microbial populations. *Frontiers in Microbiology*, 8, 919.

Ram, R. M., Debnath, A., Negi, S., & Singh, H. B. (2022). Chapter 22 - Use of microbial consortia for broad spectrum protection of plant pathogens: regulatory hurdles, present status and future prospects. In A. Rakshit, V. S. Meena, P. C. Abhilash, B. K. Sarma, H. B. Singh, L. Fraceto, M. Parihar, & A. K. Singh (Eds.), *Biopesticides* (pp. 319–335). Woodhead Publishing. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823355-9.00017-1>

Ramos-Mendoza, I. S., Embarcadero-Jiménez, S., Barrios-Navarro, A. F., Ledezma-González, D. C., Lago-Lestón, A., Valenzuela-Suárez, B. J., Ramírez-Álvarez, N., & Silva-Jiménez, H. (2024). Prokaryotic community structure and predicted metabolism associated with hydrocarbon degradation in marine sediments from the Northwest Coast of Baja California, Mexico. *Journal of Soils and Sediments*. <https://doi.org/10.1007/s11368-024-03822-w>

Santos, J. V. de O., Ferreira, Y. L. A., Silva, L. L. de S., Lyra, I. M. de L. B. de, Palácio, S. B., & Cavalcanti, I. M. F. (2018). Use of bioremediation for the removal of petroleum hydrocarbons from the soil: an overview. *International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology*, 3(5), 1831–1838. <https://doi.org/10.22161/ijeab/3.5.35>

Seo, H., Kim, J., Jung, J., Jin, H. M., Jeon, C. O., & Park, W. (2012). Complexity of cell–cell interactions between *Pseudomonas* sp. AS1 and *Acinetobacter oleivorans* DR1: metabolic commensalism, biofilm formation and quorum quenching. *Research in Microbiology*, 163(3), 173–181. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.resmic.2011.12.003>

Shankar, R., An, J. G., Loh, A., & Yim, U. H. (2019). A systematic study of the effects of solvents on phenanthrene photooxidation. *Chemosphere*, 220, 900–909. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.12.206>

Silva-Jiménez, H., Araujo-Palomares, C. L., Macías-Zamora, J. V., Ramírez-álvarez, N., García-Lara, B., & Corrales-Escobosa, A. R. (2018). Identification by MALDI-TOF MS of

environmental bacteria with high potential to degrade pyrene. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 62(2 Special Issue). <https://doi.org/10.29356/jmcs.v62i2.411>

Song, M., Yang, Y., Jiang, L., Hong, Q., Zhang, D., Shen, Z., Yin, H., & Luo, C. (2017). Characterisation of the phenanthrene degradation-related genes and degrading ability of a newly isolated copper-tolerant bacterium. *Environmental Pollution*, 220, 1059–1067. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.11.037>

Srivastava, A. K., Singh, R. K., & Singh, D. (2021). Chapter 20 - Microbe-based bioreactor system for bioremediation of organic contaminants: present and future perspective. In A. Kumar, V. K. Singh, P. Singh, & V. K. Mishra (Eds.), *Microbe Mediated Remediation of Environmental Contaminants* (pp. 241–253). Woodhead Publishing. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821199-1.00020-1>

Sun, G.-D., Jin, J.-H., Xu, Y., Zhong, Z.-P., Liu, Y., & Liu, Z.-P. (2014). Isolation of a high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading strain and its enhancing the removal of HMW-PAHs from heavily contaminated soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 90, 23–28. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.01.020>

Truskewycz, A., Gundry, T. D., Khudur, L. S., Kolobaric, A., Taha, M., Aburto-Medina, A., Ball, A. S., & Shahsavari, E. (2019). Petroleum hydrocarbon contamination in terrestrial ecosystems—fate and microbial responses. *Molecules*, 24(18). <https://doi.org/10.3390/molecules24183400>

Wang, J., Xu, H., & Guo, S. (2007). Isolation and characteristics of a microbial consortium for effectively degrading phenanthrene. *Petroleum Science*, 4(3), 68–75. <https://doi.org/10.1007/s12182-007-0012-y>

Wang, W., Wang, L., & Shao, Z. (2018). Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Degradation Pathways of the Obligate Marine PAH Degradar *Cycloclasticus* sp. Strain P1. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(21), e01261-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.01261-18>

Xue, J., Yu, Y., Bai, Y., Wang, L., & Wu, Y. (2015). Marine Oil-Degrading Microorganisms and Biodegradation Process of Petroleum Hydrocarbon in Marine Environments: A Review. *Current Microbiology*, 71(2), 220–228. <https://doi.org/10.1007/s00284-015-0825-7>

Zafra, G., Absalón, Á. E., Anducho-Reyes, M. Á., Fernandez, F. J., & Cortés-Espinosa, D. V. (2017). Construction of PAH-degrading mixed microbial consortia by induced selection in soil. *Chemosphere*, 172, 120–126. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.038>

Zhou, H., Zhang, S., Xie, J., Wei, H., Hu, Z., & Wang, H. (2020). Pyrene biodegradation and its potential pathway involving *Roseobacter* clade bacteria. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 150. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2020.104961>