

EVALUACIÓN DEL POTENCIAL DE BACTERIAS ANTÁRTICAS PARA LA  
BIODEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS DE PETRÓLEO

ANGIE ALEJANDRA CALDERON FAJARDO

UNIVERSIDAD DE PAMPLONA  
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA  
PAMPLONA  
2019

EVALUACIÓN DEL POTENCIAL DE BACTERIAS ANTÁRTICAS PARA LA  
BIODEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS DE PETRÓLEO

ANGIE ALEJANDRA CALDERON FAJARDO

Trabajo de grado presentado como requisito para optar por el título de  
Microbióloga

Orientador: Profa. Dra. Valéria Maia Merzel  
Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP

Tutor académico: Prof. Dr. Ramón Ovidio García Rico  
Universidad de Pamplona

UNIVERSIDAD DE PAMPLONA  
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA  
PAMPLONA

2019

Nota de Aceptación

---

---

---

---

Presidente del Jurado

---

Jurado

---

Jurado

Pamplona, diciembre 1 de 2019

*Dedico este trabajo mi Abuelita Yolanda y  
abuelitos, Padres Bleidy y Carlos,  
hermanitos Santy y Alex, Madres  
adoptivas (buena, mala, loca y lamparin),  
familia y amigos (Babosa). Por la  
enseñanza, cariño, tolerancia, confianza  
brindada a lo largo de la vida.  
Y por permitirme llegar lejos para alcanzar  
mis objetivos...*

*Gracias, los quiero mucho.*

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, doy gracias a Dios por darme la oportunidad de conocer nuevas culturas y lugares; por darme fuerzas, entendimiento y guía en los momentos difíciles afrontados durante el camino.

A la profesora Dra. Valéria Maia Merzel, a mis compañeros y personal técnico del laboratorio de la Dirección de Recursos Microbianos DRM del Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas CPQBA de la Universidad Estatal de Campinas (UNICAMP) por su confianza, apoyo, guía y oportunidad de aprender diariamente durante la ejecución de este proyecto.

A mi familia y amigos, que hicieron parte de éste proceso desde el inicio, ya que sin la ayuda espiritual, económica y emocional brindada por ellos no hubiese llegado tan lejos para alcanzar este sueño.

Finalmente, los docentes y compañeros de la Universidad de Pamplona que han hecho parte de mi formación académica como microbióloga.

## CONTENIDO

1. Introducción.....	16
2. Objetivos .....	18
2.1 Objetivo General.....	18
2.2 Objetivos específicos .....	18
3. Justificación.....	19
4. Marco Conceptual .....	21
4.1 Antártica.....	21
4.1.1 Diversidad biológica en Antártica .....	23
4.2 Hidrocarburos de petróleo.....	23
4.2.1 Diésel .....	25
4.2.2 Queroseno .....	25
4.2.3 Gasolina .....	26
4.2.4 Octano.....	27
4.2.5 Pireno .....	27
4.3 N, N-dimetilformamida (DMF) .....	28
4.4 Bacterias psicrófilas degradadoras de hidrocarburos de petróleo .....	29
4.5 Biorremediación .....	30
4.5.1 Estrategias de Biorremediación: bioestimulación .....	30
4.5.2 Estrategias de Biorremediación: bioaumentación.....	31
4.6 Métodos colorimétricos .....	31
4.6.1 Ensayo con bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio (MTT) ....	31
4.6.2 Ensayo con 2,6-diclorofenolindofenol (DCPIP).....	32
4.7 Cromatografía de gases Espectrometría de masas (GC/MS) .....	32
5. Marco Referencial .....	34
6. Metodología.....	37
6.1 Identificación molecular mediante gen ARN ribosomal 16S .....	37
6.1.1 Reactivación y conservación .....	37
6.1.2 Extracción de ADN y cuantificación .....	40

6.1.3 Identificación bacteriana .....	40
6.2 Evaluación de la capacidad degradadora de hidrocarburos .....	44
6.2.1 Diseño experimental .....	44
6.2.3 Análisis de biodegradación de hidrocarburos por Cromatografía de Gases acoplada a espectrometría de masas GC-MS .....	48
7. Resultados y discusión .....	51
7.1 Identificación molecular mediante gen ARN ribosomal 16S .....	51
7.2 Evaluación de la capacidad degradadora de hidrocarburos .....	56
7.2.1 Ensayo colorimétrico .....	56
7.2.2 Análisis de biodegradación de hidrocarburos por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas GC-MS .....	60
8. Cronograma de actividades .....	77
CONCLUSIONES.....	78
RECOMENDACIONES .....	79
BIBLIOGRAFÍA .....	80

## LISTA DE TABLAS

Pág

Tabla 1: Propiedades químicas de los hidrocarburos de petróleo evaluados en éste trabajo. Fuente: Autor, 2019.....	29
Tabla 2: Localización y muestra ambiental de aislamiento de las cepas, realizado por (Silva et al., 2018) previamente.....	38
Tabla 3: Programa de amplificación para PCR para 10 reacciones.....	42
Tabla 4: Volúmenes y concentraciones usadas en los reactivos para Reacción de olicerasa.....	42
Tabla 5: Evaluación cualitativa de la actividad metabólica de cepas bacterianas usando colorante MTT.....	58
Tabla 6: Evaluación cualitativa de la degradación de hidrocarburos por cepas bacterianas usando DCPIP.....	59
Tabla 7: Tabla de concentraciones de patrones usados en la corrida cromatográfica del analito pireno.....	68
Tabla 8: Concentraciones de patrones usados en la corrida cromatográfica de los analitos dodecano, pentadecano, heptadecano, nonadecano, eicosano.....	71
Tabla 9: Reducción de concentración de los analitos dodecano, pentadecano, heptadecano, nonadecano, eicosano luego de 28 días de evaluación.....	78
Tabla 10: Reducción de concentración de los analitos dodecano, pentadecano, heptadecano, nonadecano, eicosano luego de 28 días de evaluación.....	79



## LISTA DE GRÁFICAS

	Pág
Gráfica 1: Curva de regresión patrón analito pireno.....	71
Gráfica 2: Curva de regresión patrones usados en la corrida cromatográfica de los analitos dodecano, pentadecano, heptadecano, nonadecano, eicosano.....	74
Grafica 3: Evaluación de la concentración del hidrocarburo mix en días del <i>Arthrobacter psychrochitiniphilus</i> linaje 409a.....	75
Grafica 4: Evaluación de la concentración del hidrocarburo diésel en días del <i>Arthrobacter psychrochitiniphilus</i> linaje 409a.....	77

## LISTA DE FIGURAS

Pág

Figura 1: Ubicación geográfica de tres zonas biogeográficas terrestres de la Antártida.....	23
Figura 2: Ejemplos de la composición del petróleo.....	25
Figura 3: Flujograma para la obtención del combustible gasolina. (Bachmann, Johnson, & Edyvean, 2014).....	28
Figura 4. Reactivación de los microorganismos 108, 409a, 642 en medio NA, 264, 382, 595, 92, 99a en medio R2A.....	39
Figura 5: Crecimiento en medio líquido de los microorganismos 108, 409a, 642 en medio NB, 264, 382, 595, 92, 99a en medio R2A.....	40
Figura 6. Crecimiento masivo de los microorganismos 108, 409a, 642 en medio NA, 264, 382, 595, 92, 99a en medio R2A.....	40
Figura 7. A. Grafica ADN extraído por método fenol cloroformo. Carril 1. ADN $\lambda$ , 2. 595, 3. 264, 4. 382, 5. 92, 6. 99a, 7. 409a, 8. 642, 8. 108. B. PCR de ADN con primers 10F y 1525 R Carril 1. 1kb, 2. 595, 3. 264, 4. 382, 5. 92, 6. 99a, 7. 409a, 8. 642, 8. 108. C. Grafica de ADN puro luego de la reacción de secuenciamiento, Carril 1. ADNA, 2. 595, 3. 264, 4. 382, 5. 92, 6. 99a, 7. 409a, 8. 642, 9. 108.....	44
Figura 8. Descripción gráfica del ensayo del método colorimétrico.....	48
Figura 9. Descripción gráfica del ensayo de biodegradación por CG-MS.....	52
Figura 10: Análisis filogenético usando el test Neighbor-Joining de secuencias parciales del gen 16S ARNr (~900 pb) obtenido de aislamientos bacterianos que pertenecen al phylum Actinobacteria y microorganismos relacionados (microorganismos tipo), recuperados de la base de datos Genbank ( <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">http://www.ncbi.nlm.nih.gov</a> ), RDP (Ribosomal Database Project, Wisconsin, EE. UU., <a href="Http://rdp.cme.msu.edu">Http://rdp.cme.msu.edu</a> ), y Ez Biocloud. Los valores de Bootstrap (5,000 ejecuciones repetidas, mostradas como %). Los números de acceso de GenBank	

están indicados después de los nombres de las especies tipo. <i>M. agilis</i> fue utilizado como grupo externo.....	54
Figura 11: Análisis filogenético usando el test Neighbor-Joining de secuencias parciales del gen 16S ARNr (~900 pb) obtenido de aislamientos bacterianos que pertenecen al phylum Proteobacteria y microorganismos relacionados (microorganismos tipo), recuperados de la base de datos Genbank ( <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">http://www.ncbi.nlm.nih.gov</a> ), RDP (Ribosomal Database Project, Wisconsin, EE. UU., <a href="http://rdp.cme.msu.edu">Http://rdp.cme.msu.edu</a> ), y Ez Biocloud. Los valores de Bootstrap (5,000 ejecuciones repetidas, mostradas como %). Los números de acceso de GenBank están indicados después de los nombres de las especies tipo <i>Azotobacter armeniacus</i> fue utilizado como grupo externo.....	55
Figura 12: Análisis filogenético usando el test Neighbor-Joining de secuencias parciales del gen 16S ARNr (~900 pb) obtenido de aislamientos bacterianos que pertenecen al phylum Proteobacteria y microorganismos relacionados (microorganismos tipo), recuperados de la base de datos Genbank ( <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">http://www.ncbi.nlm.nih.gov</a> ), RDP (Ribosomal Database Project, Wisconsin, EE. UU., <a href="http://rdp.cme.msu.edu">Http://rdp.cme.msu.edu</a> ), y Ez Biocloud. Los valores de Bootstrap (5,000 ejecuciones repetidas, mostradas como %). Los números de acceso de GenBank están indicados después de los nombres de las especies tipo. <i>Moraxella boevrei</i> fue utilizado como grupo externo.....	56
Figura 13: Resultado de la evaluación de proliferación celular, citotoxicidad (MTT) y degradación de hidrocarburos (DCPIP).....	61
Figura 14: Cromatograma patrones (menor y mayor concentración) de Mix T-0...	63
Figura 15: Cromatograma patrones (menor y mayor concentración) de Mix T-1...	64
Figura 17: Cromatograma patrones (menor y mayor concentración) de Mix T-3...	65
Figura 16: Cromatograma patrones (menor y mayor concentración) de Mix T-2...	66
Figura 18: Cromatograma patrones (menor y mayor concentración) de Diésel T-0.	67
Figura 19: Cromatograma patrones (menor y mayor concentración) de Diésel T-1.	68
Figura 20: Cromatograma patrones (menor y mayor concentración) de Diésel T-2.	69
Figura 21: Cromatograma patrones (menor y mayor concentración) de Diésel T-3.	70

## LISTA DE ANEXOS

	Pág
Anexo 1. Medio de cultivo R2A.....	96
Anexo 2. Agua de mar artificial (AWS).....	96
Anexo 3. Medio de cultivo BH.....	97
Anexo 4. Purificación ADN ilustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit..	97
Anexo 5. Kit de extracción: DNeasy® PowerSoil® Kit Handbook.....	98
Anexo 6. Cuantificación ADN Qubit invitrogen.....	100
Anexo 7: Análisis filogenético usando el test Máxima Parsimonia de secuencias parciales del gen 16S ARNr (~900 pb) obtenido de aislamientos bacterianos que pertenecen al phylum Actinobacteria y microorganismos relacionados (microorganismos tipo), recuperados de la base de datos Genbank ( <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">http://www.ncbi.nlm.nih.gov</a> ), RDP (Ribosomal Database Project, Wisconsin, EE. UU., <a href="http://rdp.cme.msu.edu">Http: //rdp.cme.msu.edu</a> ), y Ez Biocloud. Los valores de Bootstrap (5,000 ejecuciones repetidas, mostradas como %). Los números de acceso de GenBank están indicados después de los nombres de las especies tipo. M.agilis fue utilizado como grupo externo.....	101
Anexo 8: Análisis filogenético usando el test Máxima Parsimonia de secuencias parciales del gen 16S ARNr (~900 pb) obtenido de aislamientos bacterianos que pertenecen al phylum Proteobacteria y microorganismos relacionados (microorganismos tipo), recuperados de la base de datos Genbank ( <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">http://www.ncbi.nlm.nih.gov</a> ), RDP (Ribosomal Database Project, Wisconsin, EE. UU., <a href="http://rdp.cme.msu.edu">Http: //rdp.cme.msu.edu</a> ), y Ez Biocloud. Los valores de Bootstrap (5,000 ejecuciones repetidas, mostradas como %). Los números de acceso de GenBank están indicados después de los nombres de las especies tipo Azotobacter armeniacus fue utilizado como grupo externo.....	102

Anexo 9: Análisis filogenético usando el test Máxima Parsimonia de secuencias parciales del gen 16S ARNr (~900 pb) obtenido de aislamientos bacterianos que pertenecen al phylum Proteobacteria y microorganismos relacionados (microorganismos tipo), recuperados de la base de datos Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), RDP (Ribosomal Database Project, Wisconsin, EE. UU., <Http://rdp.cme.msu.edu>), y Ez Biocloud. Los valores de Bootstrap (5,000 ejecuciones repetidas, mostradas como %). Los números de acceso de GenBank están indicados después de los nombres de las especies tipo. *Moraxella boevrei* fue utilizado como grupo externo.....103

Anexo 10: Imágenes del proceso para concentrar los analitos y posteriormente correrlos en el Cromatógrafo de Gases aplicado a Espectrometría de Masas.....104

Anexo 11. Cromatograma muestras de T-0 por triplicado de Diesel con células muertas.....105

Anexo 12. Cromatograma muestras de T-0 por triplicado de Diesel sin células...106

Anexo 13. Cromatograma muestras de T-0 por triplicado de Diesel con células...107

Anexo 14. Cromatograma muestras de T-0 por triplicado de Mix con células muertas.....108

Anexo 15. Cromatograma muestras de T-0 por triplicado de Mix sin células.....109

Anexo 16. Cromatograma muestras de T-0 por triplicado de Mix con células.....110

Anexo 17. Cromatograma patrones (menor y mayor concentración) de Diésel T-0.111

Anexo 18. Cromatograma patrones (menor y mayor concentración) de Mix T-0...111

Anexo 19. Cromatograma muestras de T-1 por triplicado de Diesel con células muertas.....	112
Anexo 20. Cromatograma muestras de T-1 por triplicado de Diesel sin células....	113
Anexo 21. Cromatograma muestras de T-1 por triplicado de Diesel con células..	114
Anexo 22. Cromatograma muestras de T-1 por triplicado de Mix con células muertas. ....	115
Anexo 23. Cromatograma muestras de T-1 por triplicado de Mix sin células.....	116
Anexo 24. Cromatograma muestras de T-1 por triplicado de Mix con células.....	117
Anexo 25. Cromatograma patrones (menor y mayor concentración)de Diésel T-1.	118
Anexo 26. Cromatograma patrones (menor y mayor concentración)de Mix T-1...	118
Anexo 27. Cromatograma muestras de T-2 por triplicado de Diesel con células muertas.....	119
Anexo 28. Cromatograma muestras de T-2 por triplicado de Diesel sin células...	120
Anexo 29. Cromatograma muestras de T-2 por triplicado de Diesel con células...	121
Anexo 30. Cromatograma muestras de T-2 por triplicado de Mix con células muertas. .....	122
Anexo 31. Cromatograma muestras de T-2 por triplicado de Mix sin células.....	123
Anexo 32. Cromatograma muestras de T-2 por triplicado de Mix con células.....	124

Anexo 33. Cromatograma patrones (menor y mayor concentración) de Diésel T-2.	125
Anexo 34. Cromatograma patrones (menor y mayor concentración) de Mix T-2.	125
Anexo 35. Cromatograma muestras de T-3 por triplicado de Diesel con células muertas.	126
Anexo 36. Cromatograma muestras de T-3 por triplicado de Diesel sin células.	127
Anexo 37. Cromatograma muestras de T-3 por triplicado de Diesel con células.	128
Anexo 38. Cromatograma muestras de T-3 por triplicado de Mix con células muertas.	129
Anexo 39. Cromatograma muestras de T-3 por triplicado de Mix sin células.	130
Anexo 40. Cromatograma muestras de T-3 por triplicado de Mix con células.	131
Anexo 41. Cromatograma patrones (menor y mayor concentración) de Diésel T-3.	132
Anexo 42. Cromatograma patrones (menor y mayor concentración) de Mix T-3.	132
Anexo 43. Tabla con concentraciones de pireno con células muertas, pireno sin célula y pireno con 409a en los tiempos T-0, T-1, T-2, T-3.	133
Anexo 44. Tabla con concentraciones de los analitos dodecano, pentadecano, heptadecano, nonadecano, eicosano con células muertas, sin célula y con 409a en los tiempos T-0, T-1, T-2, T-3.	133

## 1. Introducción

La Antártica es un continente cubierto por una capa de hielo y contiene aproximadamente el 90 % del agua dulce del mundo. Es considerada un desierto frío y uno de los últimos ambientes vírgenes del planeta abarcando una gran extensión de área; es caracterizado por no tener una historia a largo plazo de ocupación e influencia humana (P. Convey, 2017). Se considera importante para el control y mantenimiento del clima en el planeta, debido a que el hielo antártico, desvía los rayos del sol lejos de la Tierra, manteniendo las temperaturas constantes. A su vez, es una fuente rica de recursos naturales, lo que es un atractivo para investigaciones.

La contaminación del suelo con hidrocarburos es un tema de preocupación en la Antártica, actualmente, se llevan a cabo actividades de investigación en diversas áreas, considerando que es uno de los 'laboratorios naturales' más importantes del mundo. A lo largo del tiempo, la Antártica viene siendo fuente de turismo y de pesca, lo que ha generado, problemas en el aumento de contaminantes antropogénicos, poniendo en peligro el ecosistema antártico nativo, todo esto, al modificar las condiciones fisicoquímicas del lugar, tal como: la flora, fauna y la microbiota autóctona; estos son cambios perjudiciales sumado a las propiedades del suelo, la temperatura de superficie, el pH y los niveles de carbono y nitrógeno del mismo, (J. M. Aislabie, Balks, Foght, & Waterhouse, 2004).

Uno de los principales contaminantes es el petróleo y sus derivados del tipo alcano, alifático, alicíclico y aromáticos policíclicos. El petróleo es una mezcla compleja que consta de los parafínicos, queroseno, nafta, aceites lubricantes de alta viscosidad y los cicloalifáticos. Estos solventes, son producto de la destilación de petróleo crudo (Habib, Ahmad, Johari, Shukor, & Yasid, 2018). La mayoría de estos componentes (entre 60 % y 90 %) son biodegradables, mientras que del 10



al 40 % de estos componentes del petróleo crudo o refinado, son moléculas recalcitrantes (*Fingas et al.*, 2017).

Buscando contrarrestar las contaminaciones presentes en este ecosistema de manera parcial o total se hacen estudios e implementan técnicas como la biorremediación, utilizando principalmente microorganismos nativos; ya que, según el Tratado Antártico (INACH, 1961), los Gobiernos de Argentina, Australia, Bélgica, Chile, la República Francesa, Japón, Nueva Zelandia, Noruega, la Unión del África del Sur, la Unión de Repúblicas Socialistas Soviéticas, el Reino Unido de Gran Bretaña e Irlanda del Norte y los Estados Unidos de América, se prohibió la importación de organismos foráneos al medio ambiente antártico (J. Aislabe, Foght, & Saul, 2000), con el fin de transformar o mineralizar los contaminantes orgánicos en sustancias menos complejas e inofensivas (Gouma, Fragoeiro, Bastos, & Magan, 2014). En este sentido, el presente trabajo, tiene como objetivos identificar y evaluar el potencial de biodegradación de bacterias aisladas de este ambiente antártico, usando los ajenos hidrocarburos basados en petróleo como fuente de carbono.

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo General

Evaluar el potencial de bacterias aisladas de muestras antárticas para la biodegradación de hidrocarburos de petróleo.

### 2.2 Objetivos específicos

- Identificar molecularmente usando el gen ARN ribosomal 16S, ocho linajes bacterianos aislados de la Antártica, conservados y depositados de la *Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Industria (CBMAI)*.
- Evaluar la capacidad degradadora de hidrocarburos (diésel, queroseno, gasolina, octano y pireno) de las cepas Antárticas, mediante métodos colorimétricos y cromatográficos.

### 3. Justificación

El cambio climático ha sido originado por diversos factores, tal como, el uso y quema de combustible originado del petróleo; esto ha originado actualmente pérdida en la capa de ozono de ambos polos, lo que ha dado consigo, la disminución en la capa de hielo polar y de reflectividad de los rayos solares, sobre la superficie de la tierra; lo que hace que, se absorba más radiación solar entrante, provocando un desequilibrio térmico, relacionado con el calentamiento global y el cambio climático actual.

Por otro lado, los hidrocarburos, representan uno de los principales riesgos de contaminación en la Antártica, esto debido a diversas actividades humanas y derrames accidentales, especialmente de diésel y queroseno; lo que ha provocado impactos ambientales localizados, incluyendo cambios en la flora-fauna y comunidades microbianas autóctonas; generando alteración de las propiedades fisicoquímicas del suelo, como la temperatura de superficie, el pH y los niveles de carbono y nitrógeno del mismo, entre otros. (J. M. Aislabie *et al.*, 2004; Habib *et al.*, 2018; Stark, Raymond, Deppeler, & Morrison, 2019).

Estas nuevas condiciones ambientales, conllevan a que los hidrocarburos introducidos como contaminantes, tengan un periodo más largo de mineralización, a causa de las bajas temperaturas a las que se encuentran. Sin embargo, existen estrategias que pueden ayudar a mitigar el impacto de los hidrocarburos, como la adición de nutrientes ricos en nitrógeno, conocida como bioestimulación, y el uso de microorganismos autóctonos, conocida como bioaumentación, que buscan generar la biodegradación del contaminante.

Basados en este principio, el grupo de investigación liderado por la Prof. Dra. Valeria Merzel del DRM-CBMAI de la Universidad Estatal de Campinas Brasil, se encuentra trabajando en hallar bacterias degradadoras de hidrocarburos, como

una opción de aprovechamiento de la biodiversidad en pro del mismo ecosistema, sabiendo que se impide la introducción de microorganismos externos a este sistema ambiental de acuerdo con el Protocolo al Tratado Antártico Sobre Protección del Medio Ambiente (Villarino Marzo, 1992)

De este modo, el siguiente trabajo se enfoca en buscar la capacidad y potencial de degradación de hidrocarburos (diésel, queroseno, gasolina, pireno y octano) usados como fuente de carbono sobre ocho bacterias nativas, analizándose mediante métodos colorimétricos y cromatográficos.

En este contexto, se genera la siguiente pregunta: ¿Pueden las bacterias antárticas aisladas de este ecosistema, poseer biodiversidad y tener la capacidad de degradar hidrocarburos como diésel, queroseno, gasolina, pireno y octano bajo condiciones de laboratorio?

## 4. Marco Conceptual

### 4.1 Antártica

El continente Antártico cubre aproximadamente el 20 % del hemisferio sur con hielo y nieve (aunque solo el 2 % está libre de nieve). Es el quinto continente más grande; se caracteriza por no tener una historia a largo plazo de ocupación e influencia humana (P. Convey, 2017).

La Antártida, está compuesta por rocas antiguas, ígneas, metamórficas, rocas volcánicas y por el " Anillo de Fuego ", el cual es un área tectónicamente activa alrededor del Océano Pacífico (Gonzalez, S, *et al*; 2019). Esta región contiene territorios insulares dentro de la Convergencia Antártica. Las islas de la región antártica son: Islas Orcadas del Sur, Islas Shetland del Sur, Georgia del Sur y las Islas Sandwich del Sur, todas reclamadas por el Reino Unido; Isla Peter I e Isla Bouvet, reclamada por Noruega; Islas Heard y McDonald, reclamadas por Australia; Isla Scott e Isla Balleny, reclamadas por Nueva Zelanda (McDaniel M, *et al*; 2012), la ubicación geográfica es mostrada en la Figura 1 extraída de (Peter Convey, 2013)

El clima de la Antártida en invierno varía de -10 °C a -30 °C, aunque se han registrado temperaturas mínimas de hasta -93.2 °C, tiene un clima extremadamente frío y seco dependiendo de la temporada. Durante el verano, las zonas costeras rondan los 0 °C hasta 20 °C, donde se puede asociar la presencia y crecimiento de microorganismos psicrófilos, (McDaniel M, *et al*; 2012).



**Figura 1:** Ubicación geográfica de tres zonas biogeográficas terrestres de la Antártida.

La región antártica juega un papel importante en los procesos climáticos mundiales, ya que es parte integral del equilibrio térmico de la Tierra, (J. M. Aislabbie *et al.*, 2004). La razón se debe a que el hielo posee mayor capacidad de reflexión que las superficies terrestres o acuáticas, lo que genera una disminución de la temperatura (McDaniel M, *et al.*; 2012). A su vez, las aguas que rodean la Antártida son una parte clave para el sistema global en el que el agua circula alrededor del mundo según la densidad y la corriente; disminuyendo así la temperatura de estas y distribuyéndolas a lo largo del planeta. Por lo tanto sin los océanos alrededor de la Antártida, las aguas de la Tierra no circularían de manera equilibrada y eficiente (Stark *et al.*, 2019).

#### 4.1.1 Diversidad biológica en Antártica

Los suelos en la Antártica poseen conjuntos biológicos simples pero únicos con flora limitada a criptógamas (vegetales que no contienen semillas) y fauna a micro-invertebrados (Peter Convey *et al.*, 2014). La Antártica al ser un ecosistema de bajas temperaturas, posee pocas especies de flora (planta de colchón *Azorella selago* (Apiaceae), pastizales de mata); fauna (foca leopardo, pingüino, Albatros errante (*Diomedea exulans*), especies de peces, nemátodos, rotíferos y tardígrados y ballena jorobada) (P. Convey, 2017); microorganismos (bacterias, hongos, arqueas, microalgas y protozoos) (Adams *et al.*, 2006), los cuales son componentes principales de la biomasa total, que desempeñan papeles clave dentro de la biósfera como colonizadores primarios de nuevos hábitats, contribuyentes de biomasa y energía a las redes alimenticias, agentes de reciclaje de macro y micronutrientes esenciales, (Vincent, 2000).

#### 4.2 Hidrocarburos de petróleo

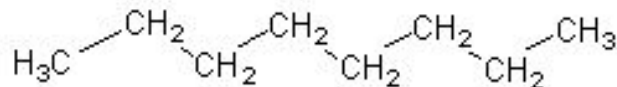
La palabra petróleo, se deriva del latín *petra* (roca) y *oleum* (aceite); es considerada una fuente de energía primaria y necesaria, siendo ampliamente utilizada en diferentes campos, como la industria, el transporte y las actividades humanas diarias, por tanto, es un recurso natural de alto valor a nivel mundial. (Turner & Renegar, 2017).

La composición total del petróleo es una mezcla compleja de compuestos como hidrocarburos alifáticos, alicíclicos y aromáticos, y una variedad de compuestos aromáticos polares, polímeros de alto peso molecular y una composición no hidrocarbonada (nitrógeno, oxígeno, azufre y metales traza) (Wu, Wu, Zhang, & Ye, 2019). Para la obtención de subproductos a partir de petróleo crudo se realiza mediante procesos de refinación (destilación), en donde este es separado generando productos como la gasolina, el queroseno y el *fuel oil* (combustóleo).

Los hidrocarburos de petróleo se encuentran naturalmente en estado gaseoso, líquido o sólido, las propiedades de algunos, se muestran en la Tabla 1, (Fingas *et al.*, 2017).

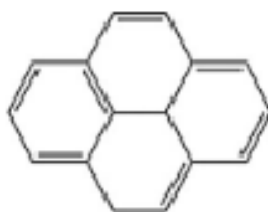
Dentro de la composición del petróleo se tiene una amplia variedad de hidrocarburos e isómeros; generalmente se clasifican en parafinas o alcanos, siendo estos hidrocarburos saturados con cadenas lineales o ramificadas, pero sin ningún anillo bencénico; cicloparafinas o naftenos, que a diferencia de los primeros poseen uno o más anillos; olefinas, muestran un grado de insaturación, debido a que contienen un enlace doble y dos átomos de hidrógeno menos que sus alcanos correspondientes; y los hidrocarburos aromáticos, los cuales contienen uno o más núcleos aromáticos, Figura 2 (Speight & Speight, 2011).

### Alcano



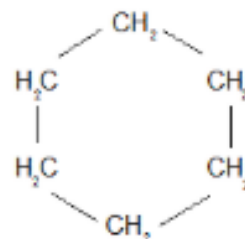
Octano normal o n-octano

### Aromático



pyrene

### Naftenos



Ciclohexano

**Figura 2:** Ejemplos de la composición del petróleo.



#### 4.2.1 Diésel

El diésel es un combustible derivado del petróleo, normalmente obtenido de fracciones de petróleo crudo que son menos volátiles que las fracciones utilizadas en la gasolina; a su vez es de menor costo, por lo que se usa en motores diésel especialmente en aplicaciones militares y marítimas por presentar menor riesgo de explosión (Khan, Biswas, Smith, Naidu, & Megharaj, 2018); se compone principalmente en un 75% por hidrocarburos saturados (isoparafinas y cicloparafinas) octano, nonano, decano, undecano, dodecano, tridecano, tetradecano, pentadecano, hexadecano, heptadecano, octadecano, nonadecano, eicosano, heneicosano, docosano, tricosano, tetraicosano; el resto son hidrocarburos aromáticos (alcalobencenos y naftalenos), (Khan *et al.*, 2018)

Para la producción del combustible diésel se requieren menos pasos de refinación que la gasolina, por lo que se producen mayores cantidades de contaminantes al aire, tales como partículas de azufre y carbono sólido, emitiendo más dióxido de carbono por unidad que la gasolina, siendo uno de las principales fuentes de contaminación responsables de los gases de efecto invernadero. (Augustyn A, *et al.*; 2018)

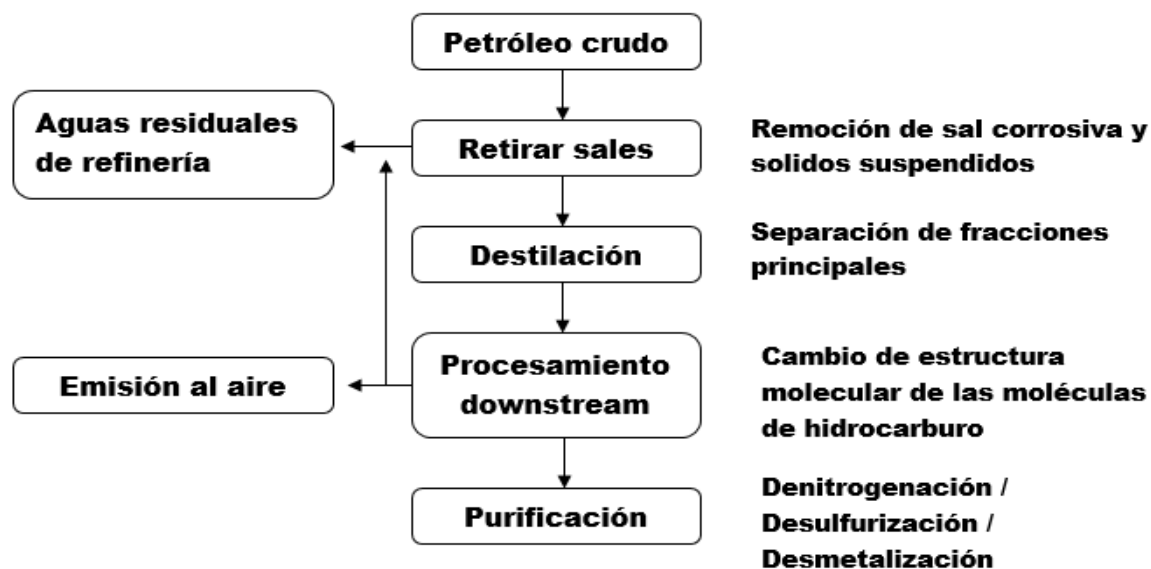
#### 4.2.2 Queroseno

El queroseno proviene de la palabra griega '*keros*', que significa cera, parafina o aceite de parafina, es un líquido de hidrocarburos inflamables comúnmente utilizado como combustible de aeronaves. Es una mezcla líquida de productos químicos producidos a partir de la destilación del petróleo crudo (Augustyn A; 2016). Se compone de compuestos alifáticos y aromáticos que generalmente se clasifican como parafinas, naftenos o aromáticos, y estos últimos constituyen solo una pequeña fracción (3.9 %, p/p), (Maiyoh, Njoroge, & Tuei, 2015) .

Comúnmente es utilizado en conjunto con combustibles sólidos como la biomasa de madera, residuos agrícolas, estiércol animal y carbón, que son utilizados como principal fuente de energía doméstica en zonas rurales. No obstante, representa múltiples efectos negativos sobre la salud, que incluyen cáncer de pulmón, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), bajo peso al nacer, cataratas, neumonía y tuberculosis, entre otras (Lam, Smith, Gauthier, & Bates, 2012).

#### 4.2.3 Gasolina

Es un subproducto del queroseno y de nafta; para su obtención se requieren varias etapas en el proceso de refinación, incluidos los productos de reacciones de isomerización, reformado, craqueo y alquilación, Figura 3. Dentro de la composición de la gasolina se encuentran hidrocarburos líquidos volátiles e inflamables derivados del petróleo, y a su vez posee aditivos que cumplen finalidades específicas como antidetonantes, anticongelante y detergentes. La gasolina se clasifica de acuerdo al número de octano, el cual indica la presión y temperatura a la que puede ser sometido un combustible carburado mezclado con aire antes de auto-detonar al alcanzar su temperatura de ignición. Es por esta razón que es uno de los productos más utilizados a nivel mundial en diferentes aplicaciones. (Augustyn A, *et al*; 2019). En consecuencia es una fuente elevada de contaminación y generación de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), que incide en el calentamiento global (Campbell A, *et al*; 2018).



**Figura 3:** Flujograma para la obtención del combustible gasolina. (Bachmann, Johnson, & Edyvean, 2014)

#### 4.2.4 Octano

El octano es un alcano de cadena lineal compuesto por 8 átomos de carbono; es un compuesto alifático muy volátil e inflamable, por lo que se puede quemar como combustible; es componente principal de la gasolina, lo que depende del rendimiento de acuerdo al índice de octano (Amin S, *et al*; 2019). Datos provenientes de la literatura, evidencian su efecto nocivo sobre el medio ambiente y los seres vivos, esto se debe principalmente a su naturaleza volátil y capacidad tóxica, ya que posee un papel xenobiótico (Pohanish & Pohanish, 2017b).

#### 4.2.5 Pireno

El pireno es un hidrocarburo aromático policíclico (HAP) que consta de cuatro anillos de benceno que origina hidrocarburo aromático plano; es un sólido cristalino incoloro (en estado puro) o de color amarillo pálido (impuro), (Pohanish &

Pohanish, 2017a). En la forma pura, se usa como reactivo en el laboratorio; aunque también se usa para la combustión de sustancias de carbón como alquitrán de hulla (Christie *et al.*, 2012).

Se usa como químico industrial y en investigación bioquímica actualmente; se ha observado que posee efectos adversos para la salud, ya que las fuentes de contaminación se dan por la ingestión de alimentos y agua, los cuales son producidos por industrias o por accidentes de derrames en el medio ambiente (Ramírez Botero, 2013).

**Tabla 1:** Propiedades químicas de los hidrocarburos de petróleo evaluados en éste trabajo. **Fuente:** Autor, 2019.

Compuesto	Formula Química	Peso Molecular	Solubilidad	Punto de fusión	Punto de Ebullición	Estructura tipo	Color	Referencia
Diésel	C12 – C25	178,6	Insoluble en agua	(-8,1°C)	180-360 °C	Hidrocarburos saturados	Incoloro - Ámbar	(Khan et al. 2018) (Augustyn A, et al; 2018)
Kerosene	C9-C17	170	Insoluble en agua	(-34°C)	140-240 °C	Hidrocarburos alifático	Amarillo pálido o incoloro	(Augustyn A, et al; 2016) (Maiyoh, Njoroge, and Twei 2015)
Gasolina	C4 – C12	114,23	Soluble en disolventes de petróleo	(-40 °C)	28-150 °C	Hidrocarburos saturados	Amarillo - Incoloro	(Augustyn A, et al; 2019; Campbell A, et al; 2018) (Brostow et
Octano	C8H18	114,26	Insoluble en agua	(-56,7°C)	126°C	Hidrocarburo alcano	Incoloro	(Pohanish and Pohanish 2017b)
Pireno	C16H10	202,25	Insoluble en agua	(151°C)	404,4 °C	Hidrocarburos aromáticos	Incoloro (puro) - amarillo pálido (impuro)	(Pohanish and Pohanish 2017a; Christie et al. 2012)

#### 4.3 N, N-dimetilformamida (DMF)

Solvente comúnmente empleado para reacciones químicas. Desempeña múltiples funciones en diversas reacciones, tales como solvente, agente deshidratante, agente reductor y catalizador. Es un bloque de construcción multipropósito para la síntesis de compuestos que contienen O, -CO, -NMe<sub>2</sub>, -CONMe<sub>2</sub>, -Me, -CHO

como grupos funcionales. Solvente polar comúnmente usado en síntesis orgánica. También actúa como un precursor multipropósito para las reacciones de formilación, aminación, aminocarbonilación, amidación y cianación (Sigma-aldrich, 2019).

#### 4.4 Bacterias psicrófilas degradadoras de hidrocarburos de petróleo

Las bacterias son procariotas, su material genético no se encuentra rodeado por una membrana nuclear. Se encuentran de diferentes formas como bacilos, cocos, espirilos y algunas bacterias tienen forma de estrella; y a su vez forman pares, cadenas, grupos u otros grupos. Poseen pared celular compuesta por peptidoglicano. Se reproducen por fisión binaria; usan compuestos orgánicos para su nutrición. Algunas bacterias pueden producir su propio alimento mediante la fotosíntesis, y algunas obtienen su alimento de compuestos inorgánicos, (Tortora GJ, Funke BR, 2012).

De acuerdo al rango de temperatura de crecimiento, se dividen en psicrófilos, los cuales crecen a bajas temperaturas capaces de crecer de 0 °C a 20 °C; meso-Psicrófilos, capaces de crecer de 10°C a 30 °C; mesófilos, crecen a temperaturas moderadas 25 °C a 40 °C; y termófilos, crecen a altas temperaturas, por encima de los 45 °C. Las bacterias psicrófilas han colonizado con éxito todos los ambientes permanentemente fríos desde las profundidades del mar hasta las regiones montañosas y polares (D'Amico, Collins, Marx, Feller, & Gerday, 2006).

Actualmente estos ambientes han tenido intervenciones de actividades humanas generándose contaminaciones, siendo los más comunes los contaminantes derivados del petróleo. Esto crea la necesidad de contrarrestar los efectos negativos producidos por contaminantes orgánicos en ambientes fríos con el uso de bacterias psicrófilas autóctonas que poseen capacidad degradatoria a bajas temperaturas (R. Kumar, Kumar, & Giri, 2019). Obteniendo alternativas de

remediación práctica, económica y ecológicamente efectiva, hacia los ecosistemas fríos contaminados con hidrocarburos de petróleo (R. Kumar *et al.*, 2019).

#### 4.5 Biorremediación

Se define como la reducción, degradación, desintoxicación, transformación y mineralización de contaminantes a través de mecanismos biológicos (Olawoyin, 2016). El objetivo, es acelerar el proceso de limpieza natural mediante la introducción de microorganismos que consumen los agentes contaminantes utilizando el potencial metabólico para degradar y transformar los compuestos en menos tóxicos (Agrawal, Verma, & Shahi, 2018; Martinko; & Clark, 2009).

Las tecnologías de biorremediación se clasifican en *in situ* y *ex situ*, dependiendo de varios factores, como la fuente y la concentración de contaminantes, las características y el tipo de sitio y el ahorro de costos, (Sanusi *et al.*, 2016).

Está influenciada por varios factores como pH del medio, temperatura, limitación de oxígeno, velocidad de agitación, contenido de humedad, disponibilidad de donador y/o receptor de electrones, alta concentración de contaminantes y disponibilidad de nutrientes. Se debe realizar una caracterización previa al nicho ecológico el cual se va a biorremediar, (San-Valero, Peña-Roja, Álvarez-Hornos, Marzal, & Gabaldón, 2015).

##### 4.5.1 Estrategias de Biorremediación: bioestimulación

La bioestimulación promueve la aceleración de degradación, detoxificación, transformación y mineralización de contaminantes cuando se introduce nutrientes como fertilizantes orgánicos e inorgánicos en un sistema contaminado, con el fin

de promover el crecimiento y estimular a los microorganismos autóctonos con capacidad de degradar los contaminantes de interés (Vega & Vazquez, 2016).

#### 4.5.2 Estrategias de Biorremediación: bioaumentación

Por su parte, la bioaumentación es la adición de cepas o consorcios de microorganismos nativos y no nativos promoviendo la aceleración de degradación, transformación y mineralización de contaminantes; disminuyendo así el impacto ambiental negativo de los contaminantes en especial de los contaminantes generados por derrames de hidrocarburos de petróleo. (Vega & Vazquez, 2016).

#### 4.6 Métodos colorimétricos

La colorimetría es una técnica científica que se utiliza para determinar la concentración de compuestos coloreados en soluciones mediante la aplicación de la ley de Beer-Lambert, que establece que la concentración de un soluto es proporcional a la absorbancia (Pearce & Pearce, 2014). El análisis colorimétrico es la técnica normalmente utilizada para determinar la interacción por medio de reacciones de óxido reducción mediante la comparación de los cambios de color de la solución (R. Zhang, Song, & Yuan, 2018).

##### 4.6.1 Ensayo con bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio (MTT)

El bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio (MTT) es un compuesto colorante utilizado como ensayo colorimétrico para evaluar las actividades metabólicas celulares, se encuentra relacionado con la actividad mitocondrial (respiratoria) y de supervivencia, la cual se refleja en la conversión de la sal MTT de tetrazolio en cristales de formazán, que pueden solubilizarse para una medición homogénea (Mazloun-ardakani, Barazesh, & Moshtaghioun, 2019),

se puede detectar por absorbancia a una densidad óptica (DO) utilizando un lector de placas a 540 y 720 nm (Küete, Karaosmanoğlu, & Sivas, 2017; Meerloo, Kaspers, & Cloos, 2011).

#### 4.6.2 Ensayo con 2,6-diclorofenolindofenol (DCPIP)

El 2,6-diclorofenolindofenol (DCPIP) es un aceptor de electrones redox; usado para ensayos colorimétricos en la evaluación rápida y la detección del metabolismo microbiano, cuando se encuentra oxidada es de color azul y en su forma reducida es incoloro. La pérdida de color es verificada la longitud de onda máxima (600 nm) según lo informado por (Yoshida *et al.*, 2001). Los procesos oxidativos de hidrocarburos por microorganismos implican reacciones redox, en donde usan el colorante DCPIP como aceptor final de electrones; siendo posible determinar la capacidad de un microorganismo para usar un sustrato de hidrocarburos simplemente observando el cambio de color de azul (oxidado) a incoloro (reducido). (Montagnolli, Lopes, & Bidoia, 2015).

#### 4.7 Cromatografía de gases Espectrometría de masas (GC/MS)

La espectrometría de masas por cromatografía de gases (GC/MS) es una técnica instrumental que comprende un cromatógrafo de gases (GC) acoplado a un espectrómetro de masas (MS), consiste en el análisis y separación de compuestos orgánicos volátiles y semivolátiles pequeños como bencenos, alcoholes, compuestos aromáticos, moléculas simples como esteroides, ácidos grasos y hormonas. También se puede aplicar al estudio de muestras líquidas, gaseosas y sólidas. Las ventajas al usar GC/MS para el análisis de compuestos, se debe a la capacidad para separar mezclas complejas, cuantificar analitos y determinar niveles traza de contaminación orgánica (Gröger, Käfer, & Zimmermann, 2019). Para el caso de los hidrocarburos de petróleo, se puede proporcionar una



cuantificación precisa de compuestos orgánicos volátiles y semivolátiles. Posee una gran biblioteca de espectro de masas, lo que permite la identificación rápida de picos desconocidos.

Para el análisis del petróleo, la ionización por impacto de electrones y fragmentación de los compuestos se usa con mayor frecuencia. Con el fin obtener la mejor sensibilidad para la medición cuantitativa utilizando un espectrómetro de masas, generalmente se aplica el modo de monitoreo de iones seleccionado (SIM) (Fingas *et al.*, 2017).

## 5. Marco Referencial

A lo largo de la historia de la biorremediación de hidrocarburos, se han hecho esfuerzos importantes por encontrar diferentes microorganismos que posean la capacidad de usarlos como fuente de carbono y aún más, aumenta la búsqueda al tratarse de ambientes extremos de baja temperatura como lo es la Antártica (Geyer *et al.*, 2014).

En las últimas décadas, la Antártica ha tenido serios problemas de contaminación por hidrocarburos por derrames accidentales durante el almacenamiento y distribución de éstos en las zonas costeras. En la península Antártica en 1990 se registró la liberación de combustible diesel y kerosene (proveniente de embarcaciones y aviones) al mar (Jl, 1990); es así que a lo largo del tiempo se ha venido observando y registrado diferentes contaminaciones generadas por hidrocarburos con mezcla en su mayoría de hidrocarburos saturados (alcanos) (queroseno) de posos de excavación (Alekhina *et al.*, 2007); en 1996 se presentó contaminación de diesel y queroseno en la Isla Shetland del sur, siete años después, se realizó el estudio de la composición del suelo por (Ruberto, Vazquez, & Mac Cormack, 2003). Por lo tanto en el Tratado de la Antártica (ATCM, 2011) se acordó adoptar pautas en el manejo, control y prevención de derrame de petróleo y sus derivados. Buscando su tratamiento con el uso de bacterias nativas capaces de degradar hidrocarburos; ya que se impide la introducción de microorganismos foráneos a la Antártica (ATCM, 2011).

Las bacterias nativas poseen gran potencial degradadora de los hidrocarburos, en donde los géneros principalmente encontrados que poseen esta capacidad son *Rhodococcus* spp, *Pseudomonas* spp, *Sphingomonas* spp, *Acinetobacter* spp, *Arthrobacter* spp *Pedobacter* spp, *Stenotrophomonas* spp (de Jesus & Peixoto, 2015; Habib *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2016). En estudios previos, se han aislado

tres tipos de bacterias degradantes de hidrocarburos de cadena larga (*Acinetobacter* sp. ODDK71, *Rhodococcus* sp. NDKK48 y *Gordonia* sp. NDKY76A) para la biorremediación de hidrocarburos (Koma *et al.*, 2003, 2004, 2008).

La microbiota autóctona ha sido utilizada en tratamientos de biorremediación (Sarkar *et al.*, 2016) donde se ha observado una disminución del impacto generado con los hidrocarburos al usar bioaumentación y bioestimulación (Drahansky *et al.*, 2016; Simarro, González, Bautista, & Molina, 2013). La bioestimulación *ex situ* ha mostrado ser una óptima estrategia de degradación de hidrocarburos al mejorar los nutrientes de suelos a bajas temperaturas (Yakimov *et al.*, 2004). En 2015 (de Jesus & Peixoto, 2015) aislaron de puntos de contaminación con hidrocarburos de petróleo, secuenciaron y evaluaron microorganismos autóctonos los géneros *Pseudomonas* sp, *Acinetobacter* sp, *Sphingomonas* sp, *Rhodococcus* sp, *Pedobacter* sp, *Stenotrophomonas* sp, donde fueron usados para la biorremediación *ex situ* reduciendo la contaminación del ecosistema.

En la búsqueda de microorganismos con capacidad degradadora de compuestos de hidrocarburos se llevan a cabo estudios de genes asociados a degradación de alcanos (Gomes *et al.*, 2018), uso de enzimas capaces de degradar hidrocarburos de petróleo (Lima *et al.*, 2019; Powell *et al.*, 2010) y técnicas colorimétricas para el seguimiento y control de degradación de los hidrocarburos; una de estas es la técnica colorimétrica 2,6-DCPIP se ha usado con el fin de hacer seguimiento al metabolismo microbiano, con el intercambio de electrones, que da como resultado de la biodegradación de compuestos orgánicos (Kubota, Koma, Matsumiya, Chung, & Kubo, 2008; Mariano, Angelis, Pirôllo, Contiero, & Bonotto, 2009; Régo, Mendes, Bidoia, & Tornisielo, 2018), de igual manera (Montagnolli *et al.*, 2015) usó métodos colorimétricos para cuantificar cinética de toxicidad y biodegradación hidrocarburos de petróleo, dando como resultado ser confiable la técnica; así como el ensayo colorimétrico MTT (Brambilla, Ionescu, Cazzaniga, Edefonti, &

Gagliani, 2014) lo usaron para la evaluación de la viabilidad celular en *Streptococcus* sp, también se relaciona con la actividad mitocondrial que refleja en la conversión de la sal MTT de tetrazolio en cristales de formazán, que pueden solubilizarse para una medición homogénea y detectándose a una densidad óptica (DO) utilizando un lector de placas a 540 y 720 nm. (Benov, 2019; Mazloun-ardakani et al., 2019; Meerloo et al., 2011; Twentyman & Luscombe, 1987).

Para la identificación taxonómica, se usan diferentes características morfológicas, de crecimiento, bioquímicas, susceptibilidad de antígenos y fagos, %G/C, secuenciación completa, secuenciación de regiones conservadas como ARNr 16 S, este último junto con la ayuda de las nuevas tecnologías de secuenciación de ADN han facilitado el uso de datos de secuenciación, identificación y clasificación del genoma de bacterias, proporcionando información precisa de éstos, actualmente la base de datos Ezbiocloud (Yoon *et al.*, 2017), NCBI (Benson *et al.*, 2013) y RPD (Yoneyama *et al.*, 2014), han sido usadas con este fin (de Jesus & Peixoto, 2015; Gomes *et al.*, 2018; Lima *et al.*, 2019) en donde se evidencia su empleo para la secuenciación e identificación de huella dactilar de bacterias Antárticas a su vez del uso de test neighbor-joining con bootstrap de 5000 repeticiones, con el fin de la obtención de las relaciones ancestrales de las cepas.

## 6. Metodología

### 6.1 Identificación molecular mediante gen ARN ribosomal 16S

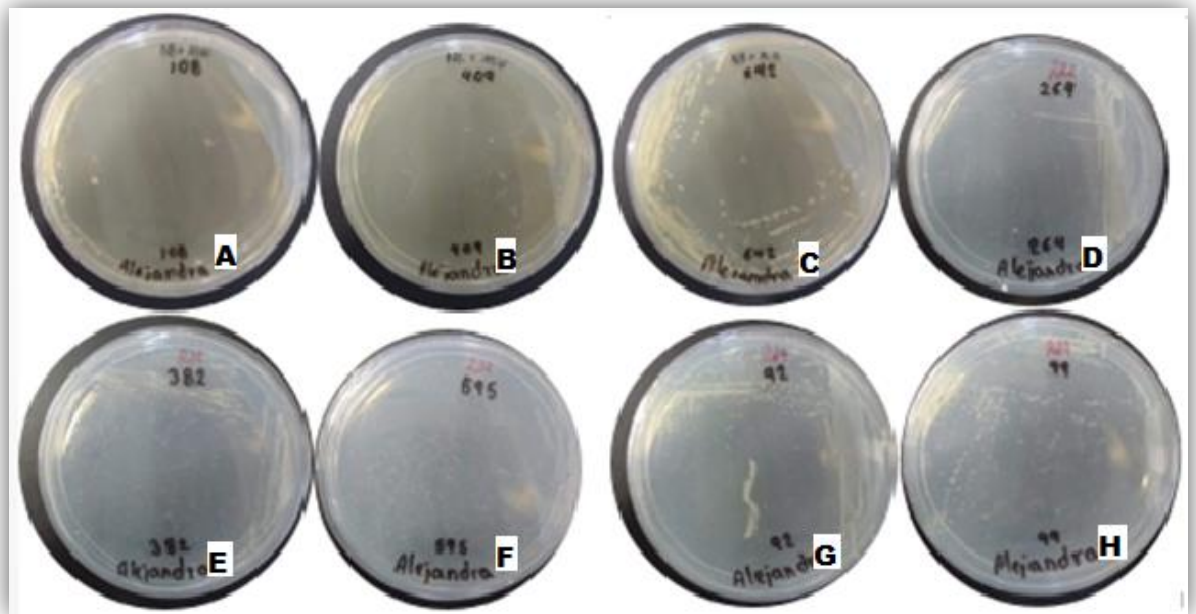
#### 6.1.1 Reactivación y conservación

Se reactivaron e identificaron ocho linajes bacterianos enumerados como: 595, 264, 382, 92, 99a, 108, 642, 409a; las cuales fueron previamente aisladas de la Antártica por (Silva, T.R. *et al.* 2017), Tabla 2; y depositadas en la Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Industria (CBMAI), conservados a -80°C en glicerol al 20 %, Figura 4.

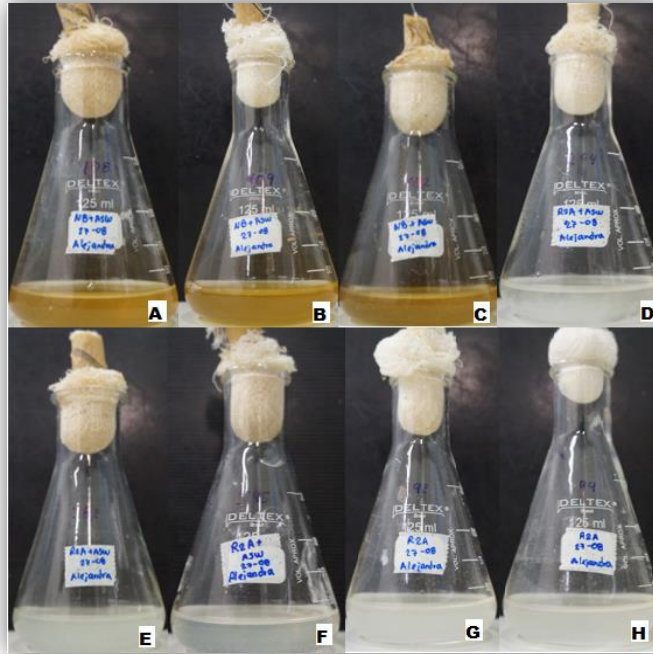
**Tabla 2:** Localización y muestra ambiental de aislamiento de las cepas, realizado por (Silva *et al.*, 2018) previamente.

Lugar	Muestra	Número de Aislamiento
<b>Isla Deception de Whalers Bay (WB)</b>	Biopelículas del suelo	595
<b>Isla Deception de Whalers Bay (WB)</b>	Biopelículas del suelo	264
<b>Isla King George —Punta Turret</b>	Suelo pantanoso	382
<b>Isla Deception</b>	Sedimento	92
<b>Isla Deception</b>	Sedimento	99a
<b>Isla Livingston - Half Moon</b>	Sedimento	108
<b>Isla King George —Punta Turret</b>	Suelo debajo de la capa de hielo	642
<b>Isla Deception</b>	Sedimento	409a

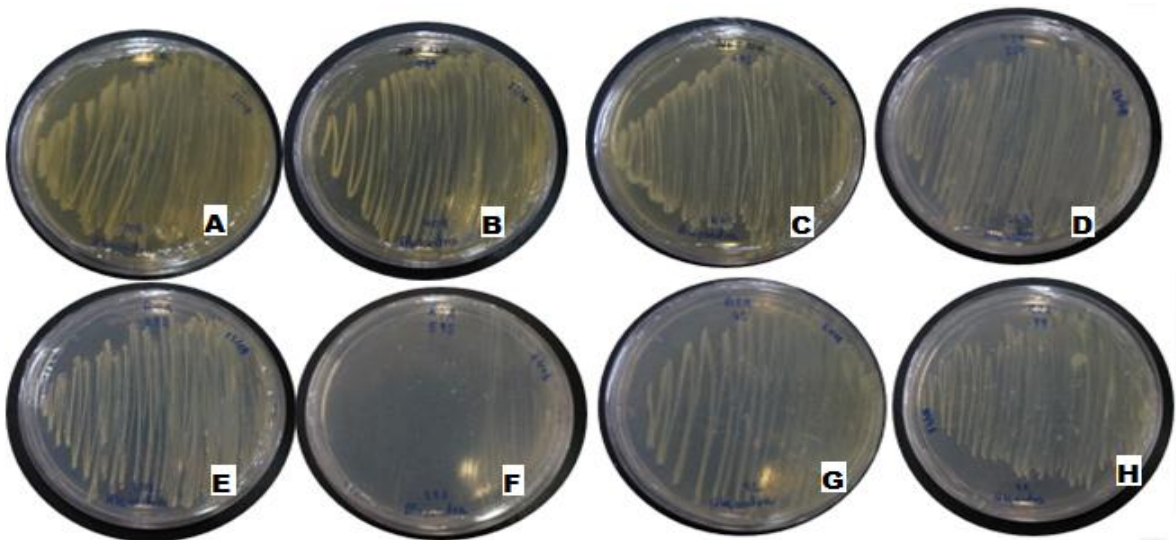
Según lo sugerido por (Silva *et al.*, 2018), se procedió a tomar una azada de las cepas 595, 264, 382, 92, 99a y se sembró por agotamiento en medio R2A + ASW (Artificial Sea Water), y para las cepas 108, 642, 409a en medio agar nutritivo (AN) + ASW, incubando a 15°C por 7 días, Figura 5. Posteriormente, se tomó una colonia aislada de cada linaje y se realizó siembra masiva en medio R2A + ASW y caldo nutritivo (NB) + ASW según corresponde, incubando a 15 °C durante 7 días, Figura 6. Este procedimiento se realizó de igual manera, para la cepa que se usó como control positivo, codificada como Dietrix.



**Figura 4.** Reactivación de los microorganismos 108, 409a, 642 en medio NA, 264, 382, 595, 92, 99a en medio R2A.



**Figura 5:** Crecimiento en medio líquido de los microorganismos 108, 409a, 642 en medio NB, 264, 382, 595, 92, 99a en medio R2A.



**Figura 6.** Crecimiento masivo de los microorganismos 108, 409a, 642 en medio NA, 264, 382, 595, 92, 99a en medio R2A.

### 6.1.2 Extracción de ADN y cuantificación

Para la extracción de ADN se utilizó el protocolo de Fenol/Cloroformo establecido por la División de Recursos Microbianos DRM - CBMAI modificado de (Aamir, 2015), donde no se realizó rompimiento celular con reactivos químicos y se modificaron las revoluciones de centrifugado, a partir de placas de cultivo con 7 días de crecimiento del microorganismo. Las muestras de los linajes bacterianos 595, 264, 382, 92, 99a, 108, 642, 409a fueron almacenadas a 4°C. La cuantificación de las muestras se hizo mediante la comparación del ADN  $\lambda$  (lambda 50 ng/ $\mu$ L) en gel de agarosa a 1% TBE 1X, sometido a 90 voltios por 25 minutos, Figura 6 A. Las muestras de ADN fueron tratadas con ARNsas 10 mg/mL a 37°C/1 hora. Se verificó el contenido de ADN mediante gel de electroforesis en las mismas condiciones anteriormente nombradas. A partir del gel, se realizó cuantificación de las mismas y posteriores diluciones a las muestras, de la siguiente forma: 595 (1:10), 264 (muestra directa), 382 (1:30), 92 (1:50), 99<sup>a</sup> (1:150), 409 (1:20), 642 (1:80), 108 (1:200) por medio de la verificación cualitativa dada por el ADN  $\lambda$  (lambda).

### 6.1.3 Identificación bacteriana

El ADN obtenido se usó en Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la amplificación de 16S ARNr usando los cebadores 10f (5'GAGTTTGATTCAGGCCCTG3') y 1525r (5'AAGGAGGTGWTCCARCC3') acuerdo a (Belgini *et al.*, 2014; De Lillo *et al.*, 2006). El programa de amplificación por PCR se siguió de acuerdo a protocolo establecido por DMR-CBMAI de la metodología de (Belgini *et al.*, 2014), Tabla 3.



**Tabla 3:** Programa de amplificación para PCR para 10 reacciones.

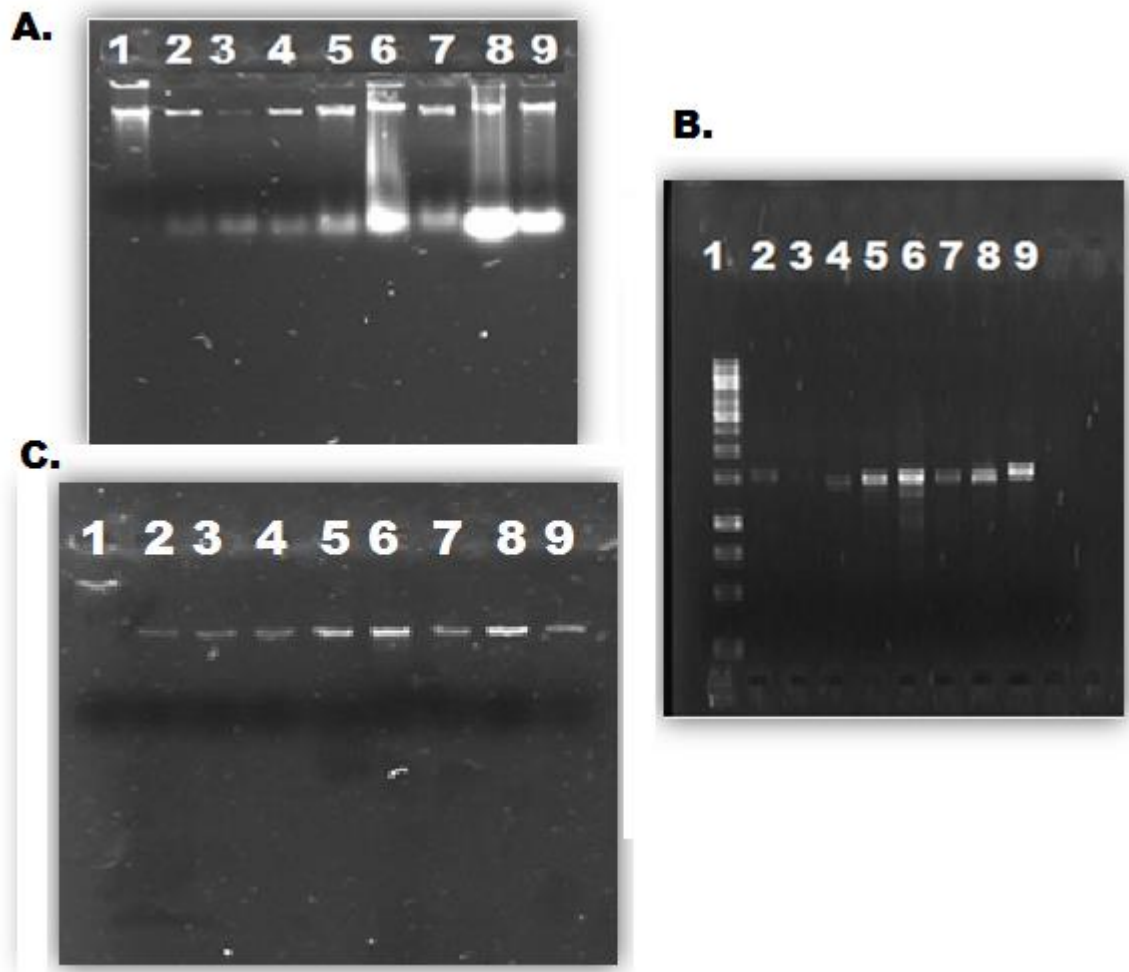
Ciclo de PCR	Etapas	Ciclos	Temperatura	Duración
Desnaturalización inicial		-	94°C	2 min
Desnaturalización		30	94°C	1 min
Hibridación			55°C	1 min
Extensión			72 °C	3 min
Extensión final		-	72 °C	3 min
Enfriamiento		-	4 °C	-

**Tabla 4:** Volúmenes y concentraciones usadas en los reactivos para Reacción de Polimerasa.

Reactivo	Concentración Stock	Concentración final	Volumen final 25 µL
Agua biología molecular	-	-	15,35 µL
Solición tampón Taq	10X	1X	2,5 µL
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	1,5 mM	0,75 µL
Primer forward	20 µM	0,4 µM	0,5µL
Primer reverse	20 µM	0,4 µM	0,5µL
dNTP's	25 mM	200 µM	0,2 µL
Taq Polimerasa	5 U/µL	1 U	0,2 µL
ADN	--	5-25 ng	5 µL

La Tabla 4, muestra las reacciones independientes de PRC para cada de las cepa. Los resultados de la amplificación por PCR se confirmaron usando gel de agarosa al 1%, teñido con 1,5µL SYBR SAFE, Gráfica 7 B.

Los productos de PCR se purificaron usando Illustra PCR DNA y el Kit de purificación de banda de gel (GE Healthcare), siguiendo las instrucciones del fabricante, (véase en anexo). Posteriormente se realizó la confirmación sobre gel con 1% de agarosa teñido con SYBR Safe a condiciones de corrida de 80 voltios durante 25 minutos, Gráfica 6 C. Los productos de PCR purificados, fueron sometidos a secuenciación en un secuenciador automático y se usaron como plantilla para la secuenciación en el secuenciador ABI3500XL (Applied Biosystem) con el analizador ABI Genetic Kit de secuenciación del ciclo BigDye Terminator (Applied Biosystems), buffer BigDye Terminator v1 .1 (Buffer-Life de secuenciación) (Tris-HCl 0.1 M, MgCl<sub>2</sub> 0.5 mM) y 3.2 pmol cada cebador 10f (5´GAGTTTGATTCAGGCCCTG3´), 1100r (´5GTTGTGAGGGTTGGGG3´) y 1525r (5´AAGGAGGTGWTCCARCC3´). Las secuencias de genes de ARNr 16S parciales obtenidas de las cepas se ensamblaron en una secuencia consenso (*contig*) utilizando el software BioEdit v. 7.2; las secuencias se compararon con secuencias de cepas de tipo estrechamente relacionadas recuperadas de la base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (Benson et al., 2013), RDP (Ribosomal Database Project, Wisconsin, EE. UU., <Http://rdp.cme.msu.edu>), y Ez Biocloud (<https://www.ezbiocloud.net/>) utilizando BLASTn. Las secuencias se alinearon utilizando el programa CLUSTAL W (Thompson, Higgins, & Gibson, 1994) y se analizaron con el software MEGA v 7.0 (S. Kumar, Stecher, & Tamura, 2016). La reconstrucción filogenética se realizó con el método Neighbor-Joining, con valores de arranque calculados a partir de 5000 repeticiones.



**Figura 7.** A. Grafica ADN extraído por método fenol cloroformo. Carril 1. ADN  $\lambda$ , 2. 595, 3. 264, 4. 382, 5. 92, 6. 99a, 7. 409a, 8. 642, 8. 108. B. PCR de ADN con primers 10F y 1525 R Carril 1. 1kb, 2. 595, 3. 264, 4. 382, 5. 92, 6. 99a, 7. 409a, 8. 642, 8. 108. C. Grafica de ADN puro luego de la reacción de secuenciamiento, Carril 1. ADN $\lambda$ , 2. 595, 3. 264, 4. 382, 5. 92, 6. 99a, 7. 409a, 8. 642, 9. 108.

## 6.2 Evaluación de la capacidad degradadora de hidrocarburos

### 6.2.1 Diseño experimental

Para el ensayo colorimétrico MTT/DCPIP se realizaron dos replicas evaluando la tolerancia (MTT) y degradación de hidrocarburos (DCPIP); usando 8 cepas microbianas, un control positivo *Dietzia* y un control negativo (agua destilada estéril); dos medios de cultivo Bushnell Haas (BH) y Bushnell Haas con 0,1 % de extracto de levadura (BH+EL) es altamente recomendado para examen microbiológico de combustibles de acuerdo al Comité SIM, ya que se busca la evaluación del microorganismo frente al hidrocarburo, (Kolsal, Akbal, & Liaqat, 2017); cuatro fuentes de hidrocarburo (diésel, queroseno, gasolina y mix (octano + pireno)), estas se trabajaron por triplicado.

En el análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas GC-MS evaluó un microorganismo, con dos fuentes de hidrocarburo por triplicado (diésel, mix) en cuatro tiempos diferentes, usando el medio Bushnell Haas con 0,1 % de extracto de levadura (BH+EL).

Para análisis de datos se usó el paquete de *Excel* 2013.

### 6.2.2 Ensayo colorimétrico

Basado en los trabajos de (Montagnolli, Lopes, and Bidoia 2015; Gabrielson et al. 2002), se procedió a realizar el ensayo colorimétrico con modificaciones.

Para esto, se tomó una asada de cada una de las cepas seleccionadas y se procedió a inocular respectivamente en el medio que contenían 30 mL de

R2A+ASW y NB+ASW incubando en agitación de 150 rpm durante 3 días a 15°C, (Gomes *et al.*, 2018).

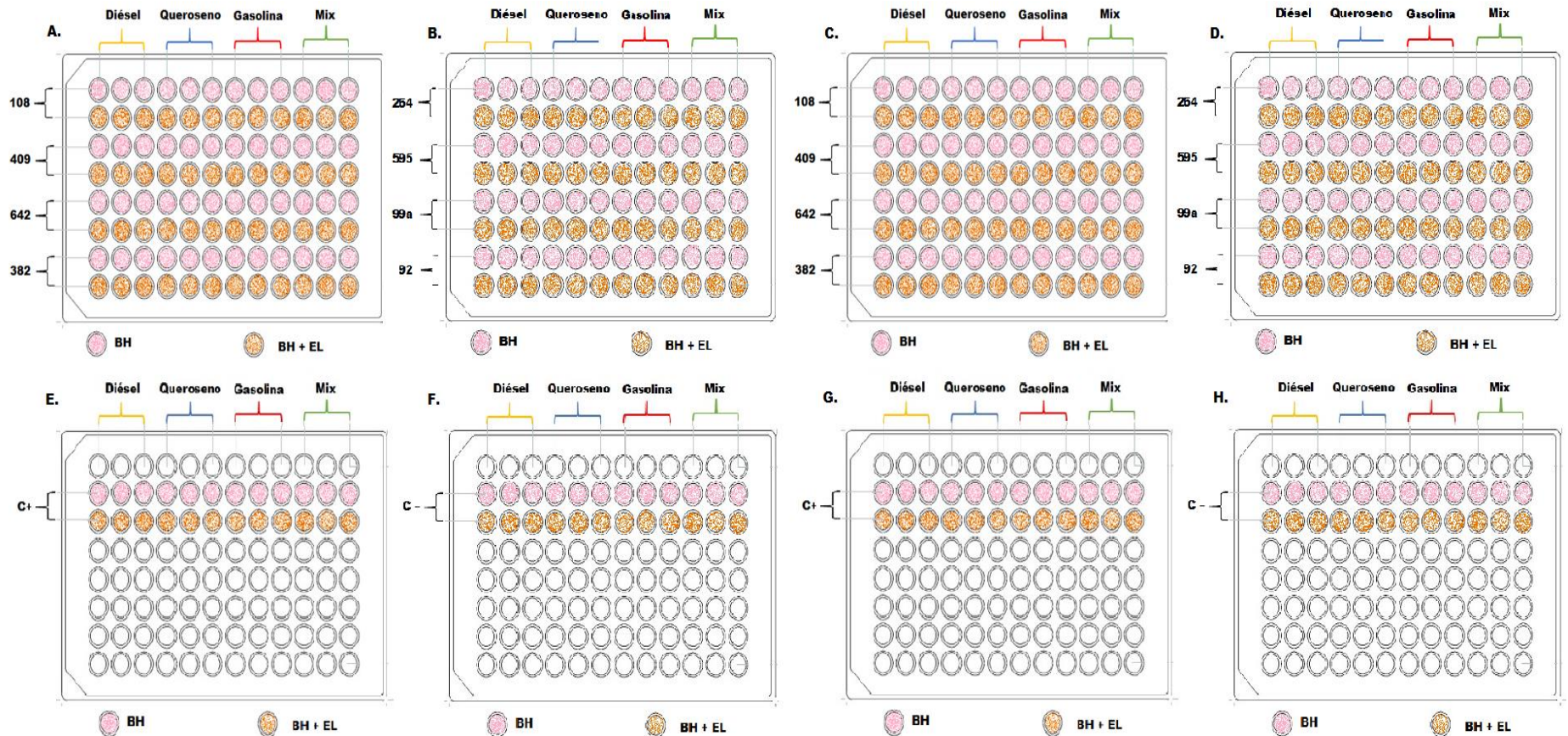
Seguidamente, el contenido se vertió en tubos Falcon de 50 mL y se procedió a centrifugar en la centrífuga 5804 R Eppendorf a 8000 rpm durante 15 minutos, se descartó el sobrenadante y se prosiguió a realizar un lavado de las células, con 30 mL de agua destilada estéril en tubos Falcon realizando agitación vigorosa, seguidamente se centrifugó a 8000 rpm durante 15 minutos (el proceso de lavado se realizó dos veces); el sobrenadante se descartó y se agregó 30 mL de agua destilada estéril en tubos Falcon, realizando nuevamente agitación vigorosa. Seguido a esto, se procedió a establecer D.O. (Densidad Óptica) a 0,5 para cada cepa en el espectrofotómetro SHIMADZU UVmini-1240.

Para realizar la prueba colorimétrica se usaron placas de 96 pozos cada una, donde se evaluaron las ocho cepas previamente aisladas en diferentes locaciones de la Antártica por (Silva *et al.*, 2018); dentro de cada placa, se usó como medio base al caldo Bushnell Haas (BH) con y sin extracto de levadura en volumen de 103,5 µL, a cada tratamiento se le adicionó 15 µL de las cepas a evaluar (D.O: 0,5). De igual manera se agregó para cada microorganismo los hidrocarburos diésel, queroseno, gasolina y un mix (Octano + pireno), en un volumen de 1,5 µL; finalmente, se adicionó 30 µL de indicador de óxido reducción 2,6-diclorofenolindofenol (DCPIP) (concentración de 200 µg/mL partiendo de una solución stock de 5 mg/mL), al inicio del ensayo. Estos análisis se realizaron por triplicado para cada hidrocarburo en la misma placa (Figura 1). Éste procedimiento, se realizó de igual manera en otras dos placas con los mismos microorganismos, agregando 30 µL del indicador bromuro de 3 - (4,5-d imetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio (MTT) (concentración de 1 mg/ml partiendo de una solución stock de 5 mg/mL), 5 días después de incubada la muestra, con un post-tratamiento de una hora a 15°C /150 rpm. Las condiciones iniciales de incubación para éste ensayo fueron de 15°C /5 días /150 rpm.

Como control positivo se utilizó 15  $\mu$ L de la cepa *Dietzia maris* del (CBMAI) tanto en DCPIP, como para MTT y un parámetro de incubación de 28°C /5 días /150 rpm. Como control negativo para DCPIP y MTT, se usó 15  $\mu$ L de agua a un periodo de incubación de 15°C /5 días /150 rpm, ver Figura 8.

Finalmente, se realizaron dos réplicas del ensayo, con el fin de obtener las cepas con mejor capacidad de degradación y supervivencia a los hidrocarburos. La evaluación y elección se realizó de manera cualitativa visual arbitraria: DCPIP: Transparente +++, Azul claro +, Azul oscuro -; MTT: Azul oscuro +++, Transparente +, Amarillo claro -. +++, + y - indicando excelente, bueno y ausencia de la capacidad degradadora y de tolerancia al hidrocarburo (toxicidad).

**Figura 8.** Descripción gráfica del ensayo del método colorimétrico.



**Figura 8:** Se presenta el diseño experimental de evaluación empleado para determinar la tolerancia o la capacidad de degradación de hidrocarburos por 8 cepas bacterianas aisladas de la Antártica. (A). Posición de las cepas 108, 409, 642, 382 sobre la placa de 96 pozos con colorante DCPIP. (B). Posición de las cepas 264, 595, 99a, 92 sobre la placa de 96 pozos con colorante DCPIP. (C). Posición de las cepas 108, 409, 642, 382 sobre la placa de 96 pozos con colorante MTT. D). Posición de las cepas 264, 595, 99a, 92 sobre la placa de 96 pozos con colorante MTT. (E). Posición del control positivo *Dietzia maris* sobre la placa de 96 pozos con colorante DCPIP. (F). Posición del control negativo sobre la placa de 96 pozos con colorante DCPIP. (G). Posición del control positivo *Dietzia maris* sobre la placa de 96 pozos con colorante MTT. (H). Posición del control negativo sobre la placa de 96 pozos con colorante MTT. **Fuente. (Autor. 2019)**

### 6.2.3 Análisis de biodegradación de hidrocarburos por Cromatografía de Gases acoplada a espectrometría de masas GC-MS

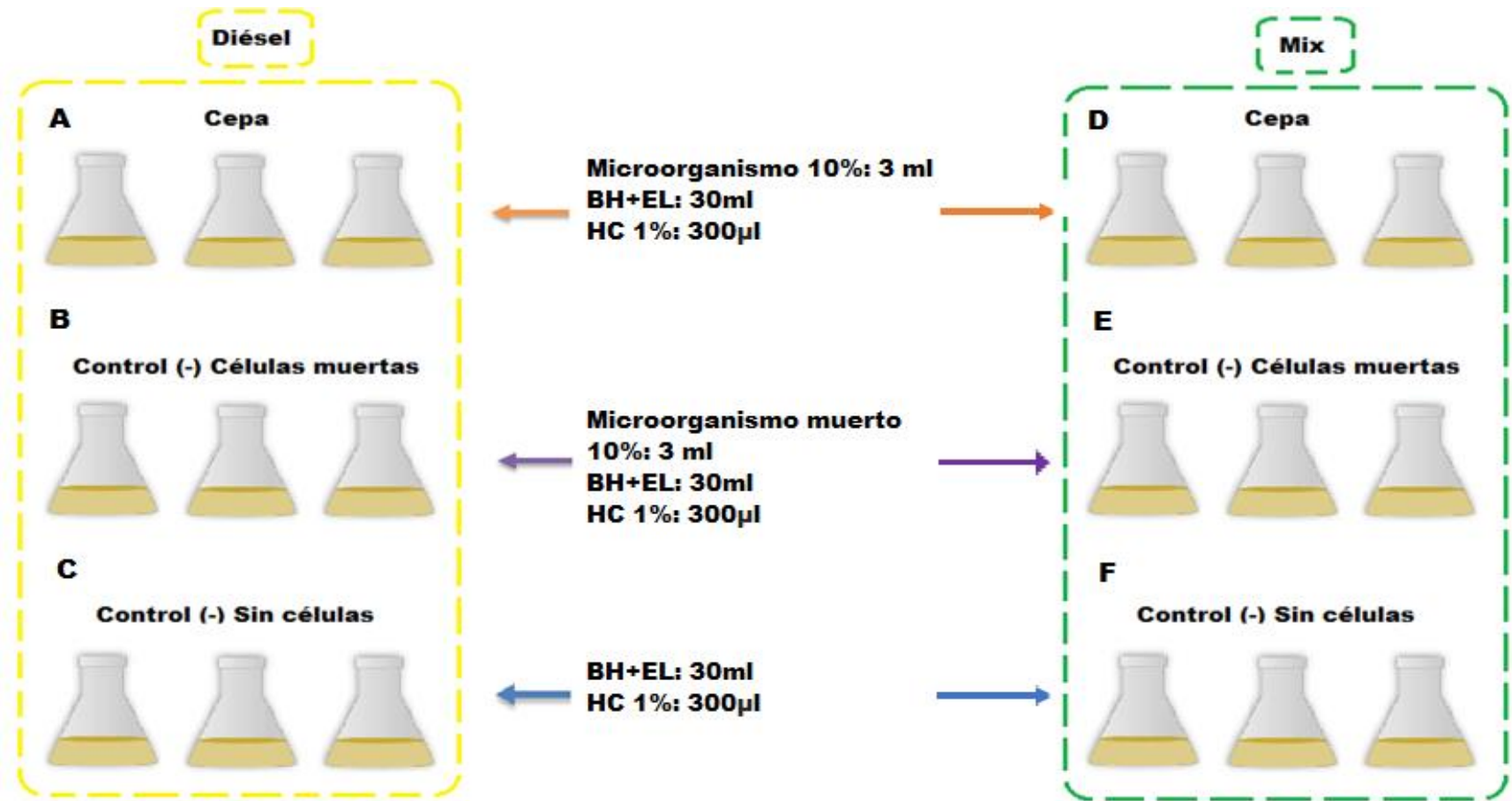
Para el análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas GC-MS se estudió la cepa que mostro excelentes resultados de tolerancia y degradación sobre los hidrocarburos diésel y Mix (octano + pireno), de acuerdo al Test colorimétrico. Para la estandarización de la cepa, se realizó crecimiento usando un Erlenmeyer que contenían 300 mL de medio NB a 150 rpm /5 días /15°C; posterior a esto, el contenido se vertió en tubos Falcon de 50 mL y se procedió a centrifugar en el equipo 5804 R Eppendorf a 8000 rpm durante 15 minutos, se descartó el sobrenadante y se prosiguió a realizar un lavado de las células, con 30 mL de agua destilada estéril en tubos Falcon realizando agitación vigorosa, seguidamente se centrifugó a 8000 rpm durante 15 minutos (el proceso de lavado se realizó dos veces); el sobrenadante se descartó y se agregó 30 mL de agua destilada estéril en tubos Falcon, realizando nuevamente agitación vigorosa. Seguido a esto, se procedió a establecer D.O. (Densidad Óptica) a 0,5 de la cepa en el espectrofotometría (SHIMADZU UVmini-1240)

Para el ensayo de biodegradación, se inocularon alícuotas de 3 mL del crecimiento bacteriano con D.O. a 0,5 (anteriormente establecido) en frasco Erlenmeyer de 150 mL que contenían 30 mL de medio BH+EL como fuente de carbono y 300 µL de hidrocarburos diésel y mix (octano + pireno), respectivamente. Se trabajó con dos controles negativos diferentes, el primero contenía células que previamente fueron autoclavadas (muertas), con una alícuota 3 mL de crecimiento microbiano con DO de 0,5 en frasco Erlenmeyer de 150 mL que contenían 30 mL de medio BH + EL, que posteriormente fueron autoclavados a 121°C por 15 minutos, seguido a esto, dejó enfriar completamente y se adicionó 300 µL de hidrocarburos diésel y mix (octano + pireno) respectivamente; para el segundo control negativo, se trabajó con 30 mL de medio BH+EL más 300 µL de



hidrocarburos diésel y mix (octano + pireno) respectivamente ver la Figura 9. Los ensayos se realizaron por triplicado y se monitorearon durante 30 días usando GC-MS. Se tomaron muestras (por triplicado) totalizando 4 tiempos de muestreo (tiempo cero (día 0), 1 (día 7), 2 (día 14), 3 (día 28)). Como patrón se usó el hidrocarburo aromático pireno y los hidrocarburos alifáticos dodecano, pentadecano, heptadecano, nonadecano y eicosano. Las muestras, fueron concentradas y recogidas con diclorometano en balones separados, la temperatura usada fue a 30°C/50 rpm usando el equipo Rotavapor R-215 (Büchi, Suiza); para el análisis GC-MS se siguieron las condiciones descritas por (Passarini, Sette, & Rodrigues, 2011).

**Figura 9.** Descripción gráfica del ensayo de biodegradación por CG-MS.



**Figura 9:** Se presenta el diseño experimental empleado para determinar la capacidad de degradación de hidrocarburos (diésel y mix) por 1 cepa bacteriana aislada de la Antártica para análisis CG-MS para cada uno de los cuatro tiempos evaluados. (A). Cepa evaluada con hidrocarburo diésel más BH + EL. (B). Control (-) Células muertas: microorganismo inoculado y autoclavado previamente con diésel más BH + EL. (C). Control (-) Sin células: erlenmeyer con diésel más BH + EL. (D) Cepa evaluada con hidrocarburo mix más BH + EL. (E). Control (-) Células muertas: microorganismo inoculado y autoclavado previamente con mix más BH + EL. (F). Control (-) Sin células: erlenmeyer con mix más BH + EL. Fuente. (Autor. 2019)

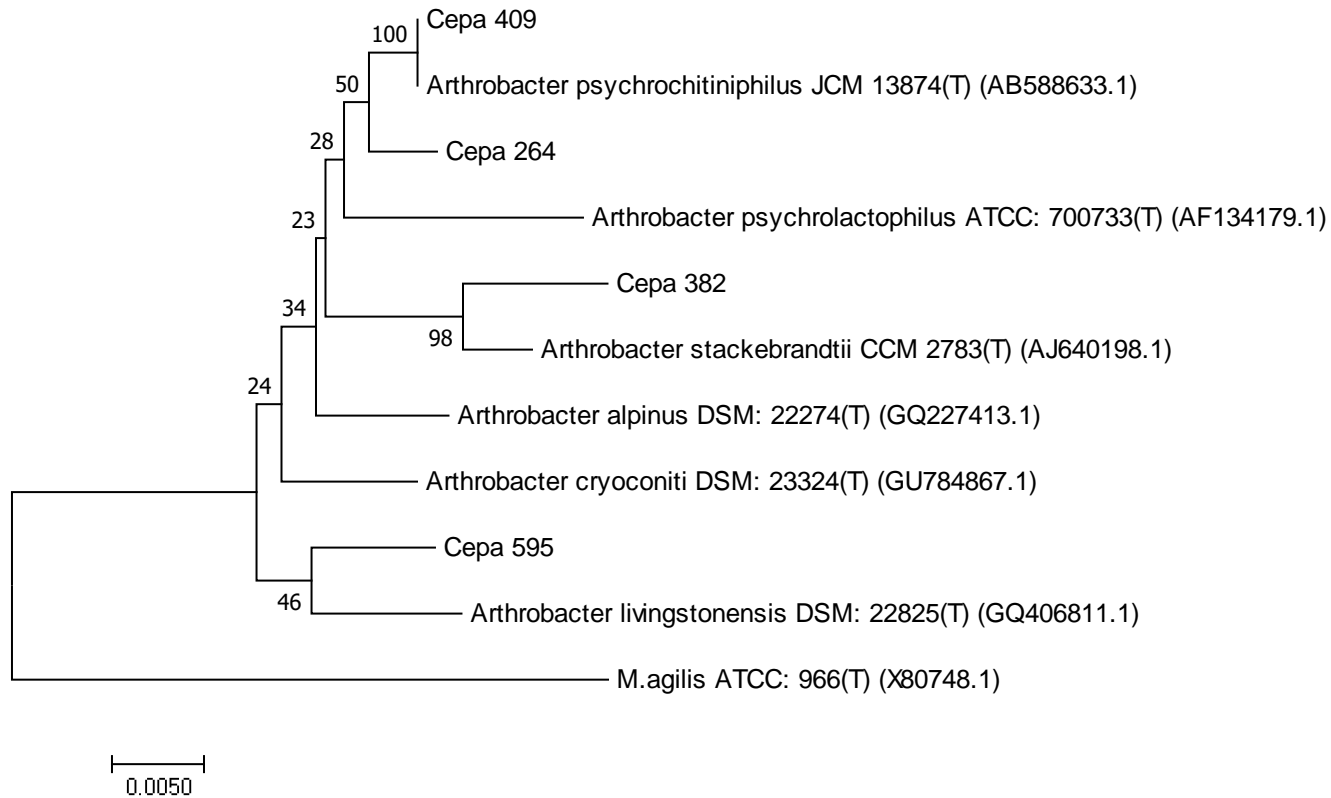
## 7. Resultados y discusión

### 7.1 Identificación molecular mediante gen ARN ribosomal 16S

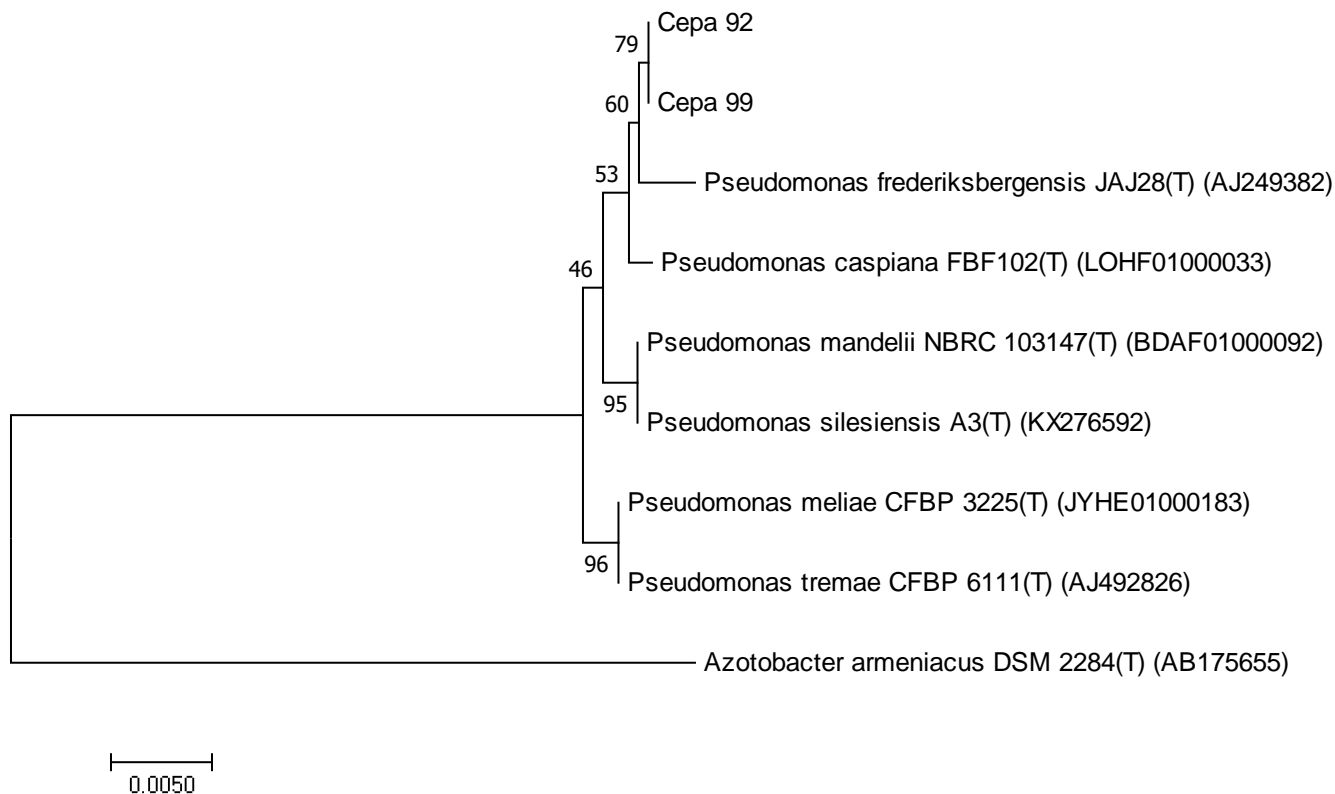
La elección de los ocho linajes bacterianos evaluados, se basó en un estudio previo metagenómico de genes potenciales para la degradación de hidrocarburos a partir muestras ambientales de la Antártica realizado por un estudiante de maestría del Instituto de Biología de la Universidad Estatal de Campinas, a su vez, de evidencia en la literatura por géneros aislados e identificados en la Antártica que muestran ésta capacidad (Abbasian et al., 2016).

Se realizó análisis filogenético (mostrado en dendograma, Figura 10, 11, 12) a ocho linajes bacterianos, usando el test *Neighbor-Joining* de secuencias parciales del gen 16S ARNr (~900 pb). Los valores de Bootstrap (5.000 ejecuciones repetidas, mostradas como %). Los números de acceso de GenBank están indicados después de los nombres de las especies tipo y se usó un género diferente de la misma familia como grupo externo.

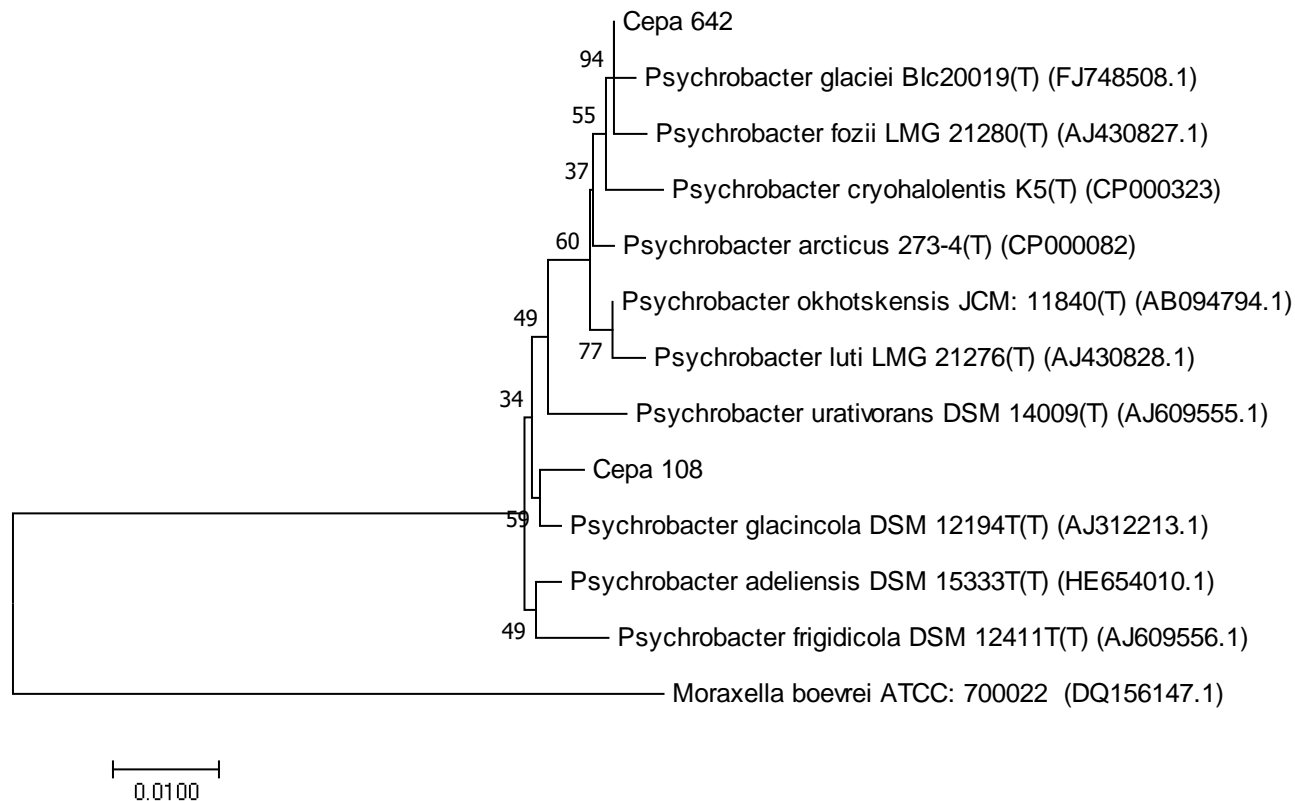
El test *Neighbour-Joining*, fue usado para la búsqueda y establecimiento de linajes con evolución mínima con respecto los ocho linajes evaluados. A su vez, del uso de un grupo externo, donde se demuestra que hace parte del género ya establecido a pesar de que el grupo externo hace parte de la misma familia.



**Figura 10:** Análisis filogenético usando el test Neighbor-Joining de secuencias parciales del gen 16S ARNr (~900 pb) obtenido de aislamientos bacterianos que pertenecen al phylum Actinobacteria y microorganismos relacionados (microorganismos tipo), recuperados de la base de datos Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), RDP (Ribosomal Database Project, Wisconsin, EE. UU., [Http://rdp.cme.msu.edu](http://rdp.cme.msu.edu)), y Ez Biocloud. Los valores de Bootstrap (5,000 ejecuciones repetidas, mostradas como %). Los números de acceso de GenBank están indicados después de los nombres de las especies tipo. *M. agilis* fue utilizado como grupo externo.



**Figura 11:** Análisis filogenético usando el test Neighbor-Joining de secuencias parciales del gen 16S ARNr (~900 pb) obtenido de aislamientos bacterianos que pertenecen al phylum Proteobacteria y microorganismos relacionados (microorganismos tipo), recuperados de la base de datos Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), RDP (Ribosomal Database Project, Wisconsin, EE. UU., [Http://rdp.cme.msu.edu](http://rdp.cme.msu.edu)), y Ez Biocloud. Los valores de Bootstrap (5,000 ejecuciones repetidas, mostradas como %). Los números de acceso de GenBank están indicados después de los nombres de las especies tipo *Azotobacter armeniacus* fue utilizado como grupo externo.



**Figura 12:** Análisis filogenético usando el test Neighbor-Joining de secuencias parciales del gen 16S ARNr (~900 pb) obtenido de aislamientos bacterianos que pertenecen al phylum Proteobacteria y microorganismos relacionados (microorganismos tipo), recuperados de la base de datos Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), RDP (Ribosomal Database Project, Wisconsin, EE. UU., [Http://rdp.cme.msu.edu](http://rdp.cme.msu.edu)), y Ez Biocloud. Los valores de Bootstrap (5,000 ejecuciones repetidas, mostradas como %). Los números de acceso de GenBank están indicados después de los nombres de las especies tipo. *Moraxella boevrei* fue utilizado como grupo externo.

En las Figuras 10, 11, 12, se muestra la clasificación filogenética realizada a los ocho linajes bacterianos, mostrando que pertenecen a los géneros *Arthrobacter* spp, *Pseudomonas* sp y *Psychrobacter* spp. De acuerdo a los estudios realizados en la Antártica por (de Jesus & Peixoto, 2015; Habib *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2016), los géneros principalmente encontrados han sido *Rhodococcus* spp, *Pseudomonas* spp, *Sphingomonas* spp, *Acinetobacter* spp, *Arthrobacter* spp *Pedobacter* spp, *Stenotrophomonas* spp.

Esto demuestra que los ocho linajes aislados hacen parte de la microbiota nativa de la Antártica; a su vez los resultados de la cepa 409a muestran que ésta pertenece a la especie *Arthrobacter psychrochitiniphilus*, la cual en 2009 fue aislada e identificada del pingüino Adélie por (Wang, Gai, Chen, & Xiao, 2009) como microbiota de la Antártica.

Los linajes trabajados restantes 595, 264 pertenecen al género *Psychrobacter* sp, 92, 99a pertenecen al género *Pseudomonas* sp, 108, 382, 642 pertenecen al género *Arthrobacter* sp, esta clasificación es dada por el ARNr 16S, por lo que se hace necesario continuar con la clasificación a especie de los linajes trabajados; por consiguiente se puede continuar con test bioquímicos, morfológicos y genómicos para su correcta identificación taxonómica a nivel de especie.

## 7.2 Evaluación de la capacidad degradadora de hidrocarburos

### 7.2.1 Ensayo colorimétrico

El ensayo colorimétrico MTT/DCPIP se correlacionó con el fin de obtener una evaluación cualitativa (realizada visualmente por cambio de color en los pozos) de la viabilidad celular bacteriana (actividad respiratoria) en la presencia de hidrocarburos (tolerancia) (datos mostrados en la tabla 5), y de la capacidad degradadora y oxidativa (datos mostrados en la tabla 6) de los hidrocarburos de petróleo.

**Tabla 5:** Evaluación cualitativa de la actividad metabólica de cepas bacterianas usando colorante MTT.

Cepa	MTT				
	Medio	Diésel	Queroseno	Gasolina	Mix
108	BH	++	++	++	++
	BH+EL	++	+	+	+
409	BH	+	+	+	+
	BH+EL	++	++	++	++
642	BH	-	-	-	-
	BH+EL	++	++	++	++
382	BH	-	-	-	-
	BH+EL	+	+	-	+
264	BH	+	-	-	-
	BH+EL	+	-	-	-
595	BH	++	+	++	-
	BH+EL	++	-	++	++
99	BH	++	+	++	-
	BH+EL	++	+	+	-
92	BH	+	+	+	+
	BH+EL	+	+	+	+
C+	BH	++	+	+	+
	BH+EL	++	-	++	+
C-	BH	-	-	-	-
	BH+EL	-	-	-	-

++, + y - indican la coloración obtenida equivalente a excelente, buena, mala capacidad reductora respectivamente.



**Tabla 6:** Evaluación cualitativa de la degradación de hidrocarburos por cepas bacterianas usando DCPIP.

DCPIP					
Cepa	Medio	Diésel	Queroseno	Gasolina	Mix
108	BH	-	-	-	+
	BH+EL	++	+	++	+
409	BH	+	+	+	+
	BH+EL	++	++	++	++
642	BH	+	+	+	+
	BH+EL	++	++	++	++
382	BH	++	+	+	+
	BH+EL	++	++	++	++
264	BH	++	++	++	+
	BH+EL	++	+	+	-
595	BH	+	+	+	-
	BH+EL	++	++	+	-
99	BH	+	++	++	+
	BH+EL	++	+	-	-
92	BH	-	+	+	-
	BH+EL	+	-	-	-
C+	BH	++	++	++	+
	BH+EL	++	++	++	++
C-	BH	-	-	-	-
	BH+EL	-	-	-	-

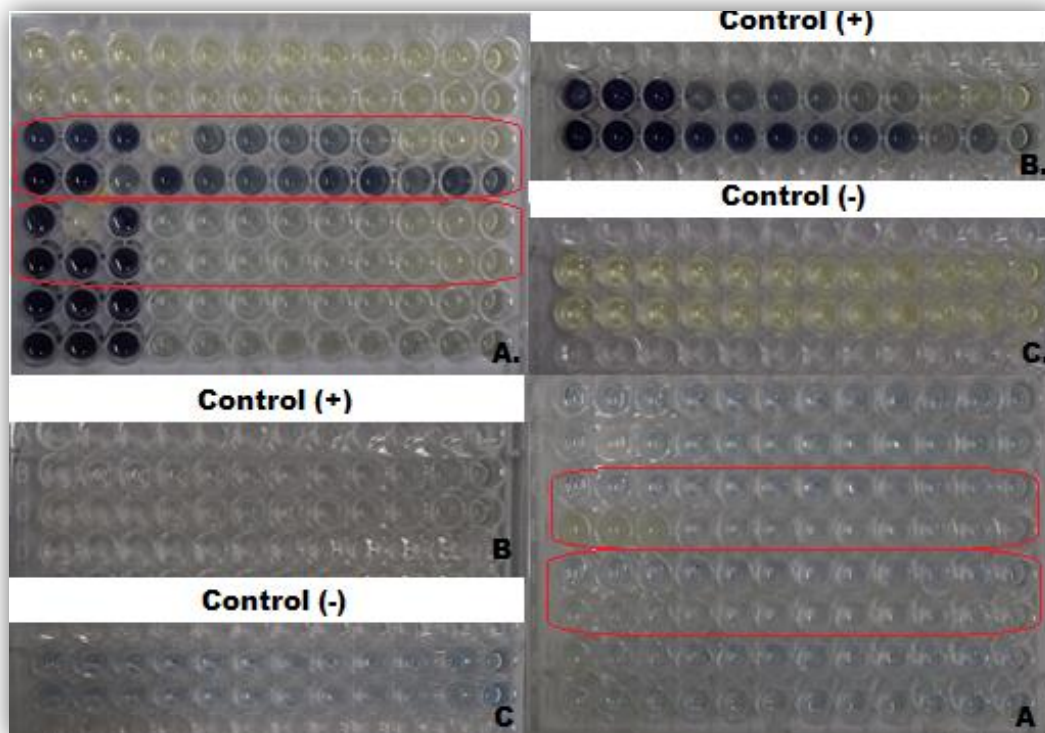
++, ++ y + indican la coloración obtenida, equivalente a una excelente, buena y mala de degradación de hidrocarburos respectivamente.

El colorante MTT se basa en la reducción enzimática de sales de tetrazolio (posee coloración amarilla), el producto de la reacción es un formazán (color azul oscuro), el método es utilizado para evaluar el estado fisiológico microbiano, incluyendo la evaluación de la viabilidad y el crecimiento celular (Benov, 2019).

El colorante DCPIP es un aceptor de electrones redox catalizado por enzimas que detectan el metabolismo microbiano especialmente para la degradación de hidrocarburos por bacterias. En el proceso de oxidación de hidrocarburos por los microorganismos, los electrones se transfieren a aceptores de electrones tales

como el sulfato, nitrato, O<sub>2</sub>. En su estado oxidado es de color azul y en su estado reducido es incoloro, por lo que evidencia la actividad oxido reductora por el cambio de coloración (Habib et al., 2017).

Se observa en las Tablas 5 y 6 que la mayoría de los linajes trabajados produjeron una excelente respuesta de tolerancia y capacidad degradadora (percibiéndose por el cambio de color) cuando se encontraban en un medio bioestimulado y en medio no bioestimulado junto con el hidrocarburo diésel. Esto se debe, al producto de contaminaciones que se han presentado a lo largo del tiempo en la Antártica, ya que generalmente continúan impactando el ecosistema a causa de residuos (Brown, King, Kotzakoulakis, George, & Harrison, 2016); siendo así que se genera respuesta de tolerancia y/o supervivencia de los microorganismos nativos de la Antártica por medio de diferentes mecanismos adquiridos al expulsar el compuesto de la célula a través de una bomba de eflujo, con mecanismos que eviten que el hidrocarburo ingrese a la célula, por cambios evolutivos o por transferencia de genes, con el fin de la asimilación de este hidrocarburo.



**Figura 13: Resultado de la evaluación de proliferación celular, citotoxicidad (MTT) y degradación de hidrocarburos (DCPIP).** A. Resultado evaluación linajes bacterianos para el ensayo MTT. B. Resultado control (+) ensayo MTT. C. Resultado control (-) ensayo MTT. A Resultado evaluación linajes bacterianos para el ensayo DCPIP. B Resultado control (+) ensayo DCPIP. C Resultado control (-) ensayo DCPIP. **Nota:** Encerrado con color rojo se muestran los linajes 409a y 642 respectivamente para los ensayos MTT/DCPIP.

Para la evaluación de proliferación celular, citotoxicidad y degradación de hidrocarburos en prueba in vitro ideal se tiene en cuenta que sea simple, rápida, eficiente, económica, reproducible, sensible, segura y efectiva; mostrando así, que los mejores ensayos colorimétricos se pueden dar con DCPIP y MTT.

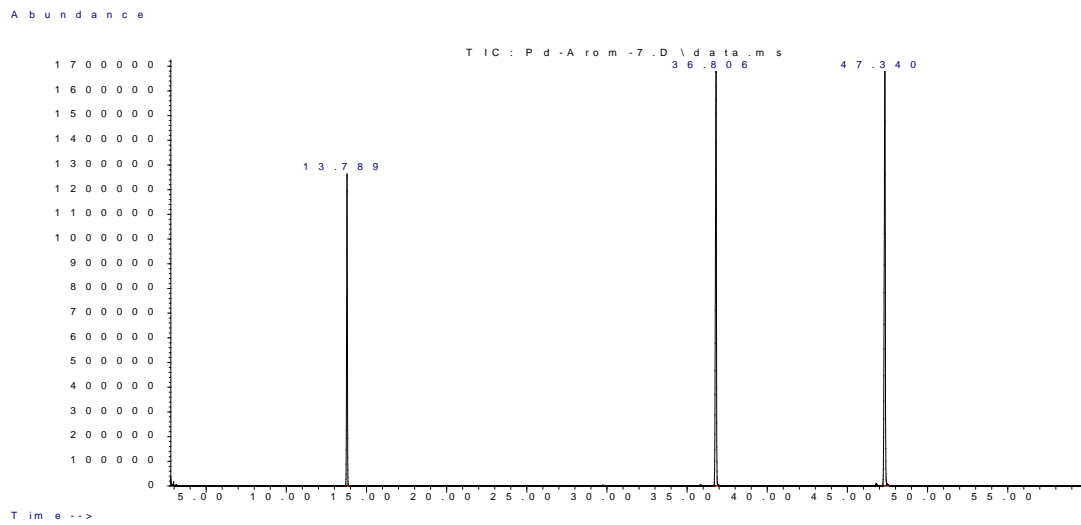
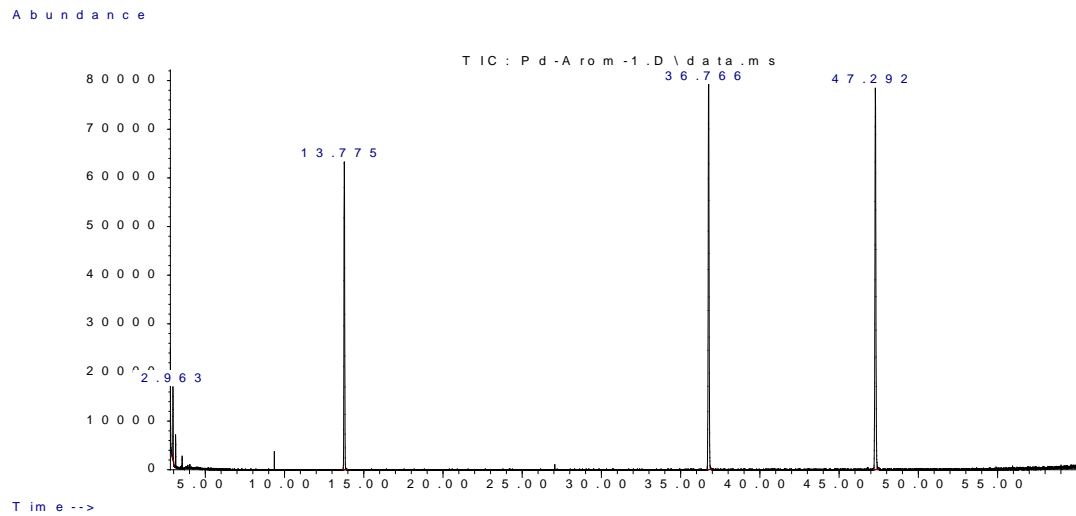
Los resultados obtenidos del test MTT/DCPIP, figura 13, indican que los linajes de *Arthrobacter psychrochitiniphilus* (cepa 409a) y *Psychrobacter* sp. (cepa 642)

crecidas en medio BH bioestimulada con extracto de levadura, muestran excelente tolerancia y capacidad degradadora de los hidrocarburos diésel, queroseno, gasolina y mix. Asumiendo así, que la bioestimulación con extracto de levadura potencializa fuertemente el crecimiento, asimilación y utilización de compuestos complejos como los hidrocarburos ya que las células bacterianas catalizan la reducción del mediador con facilidad cuando se encuentran en un ambiente favorable.

### 7.2.2 Análisis de biodegradación de hidrocarburos por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas GC-MS

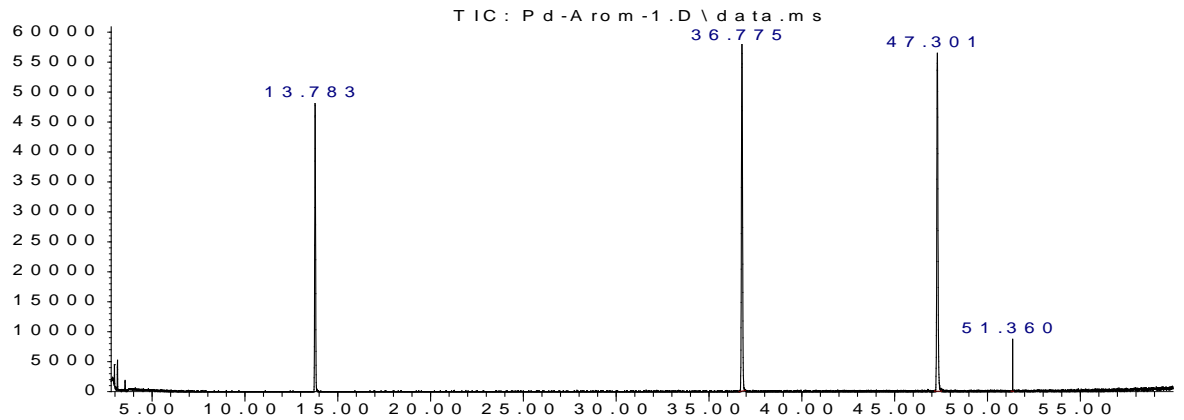
Para el estudio de biodegradación de los hidrocarburos diésel y mix por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas GC-MS, se usó *Arthrobacter psychrochitiniphilus* linaje 409a en medio BH+EL durante un periodo de 28 días; el cual fue elegido por mostrar los mejores resultados en el ensayo MTT/DCPIP, además por disposición de tiempo y materiales se procedió a trabajar con un microorganismo. Se obtuvo cromatogramas de los patrones de analitos pireno, octano usando menor y mayor concentración para el tiempo 0, 1, 2 y 3 mostrados en las (Figura 14, 15, 16, 17), de igual manera los cromatogramas de los patrones de analitos octano, dodecano, pentadecano, heptadecano, nonadecano y eicosano, usando menor y mayor concentración para el tiempo 0, 1, 2 y 3 (Figura 18, 19, 20, 21). A partir de concentraciones de patrones de analitos del hidrocarburo aromático; pireno (Tabla 7) y de analitos de los hidrocarburos alifáticos (Tabla 8): octano, dodecano, pentadecano, heptadecano, nonadecano y eicosano obtenidas del cromatograma se estableció una curva de regresión (para hidrocarburo aromático Grafica 1 y para hidrocarburos alifáticos Gráfica 2) para la obtención de las concentraciones ( $\mu\text{g/mL}$ ) de las muestras evaluadas en los diferentes tiempos.

**Figura 14:** Cromatograma patrones (menor y mayor concentración) de Mix T-0.



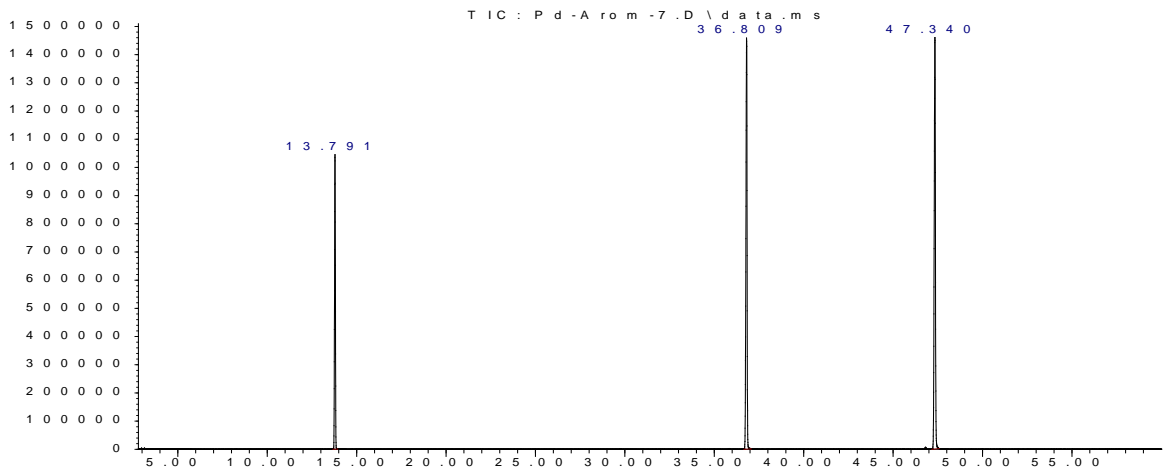
**Figura 15:** Cromatograma patrones (menor y mayor concentración) de Mix T-1.

Abundance



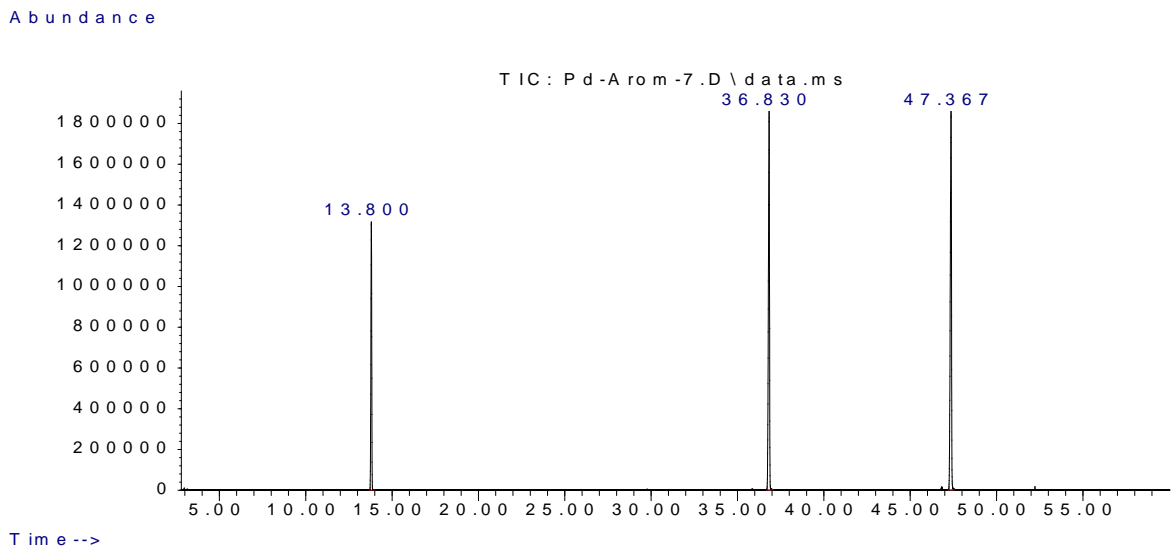
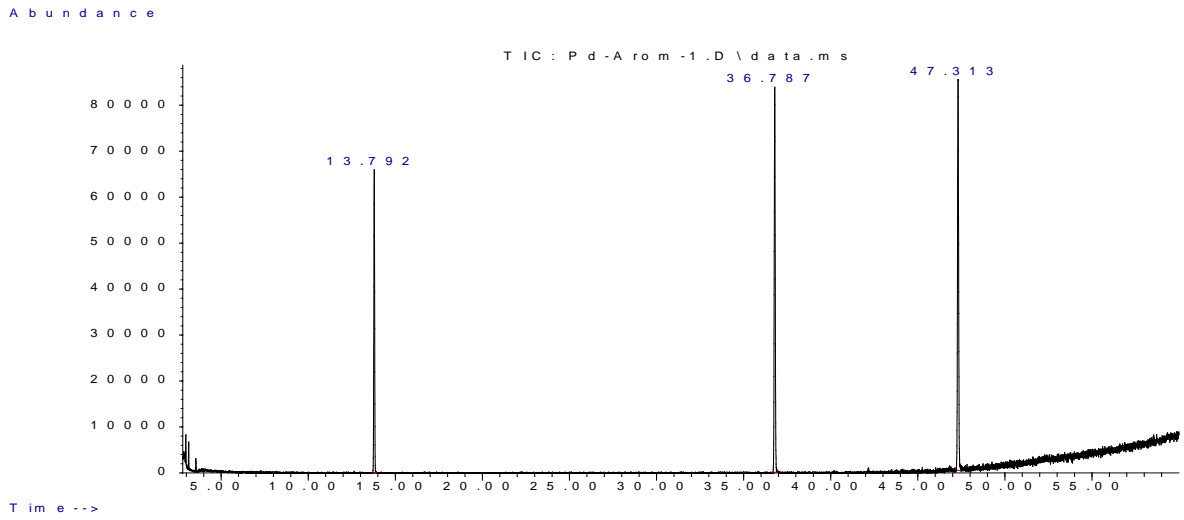
Time-->

Abundance

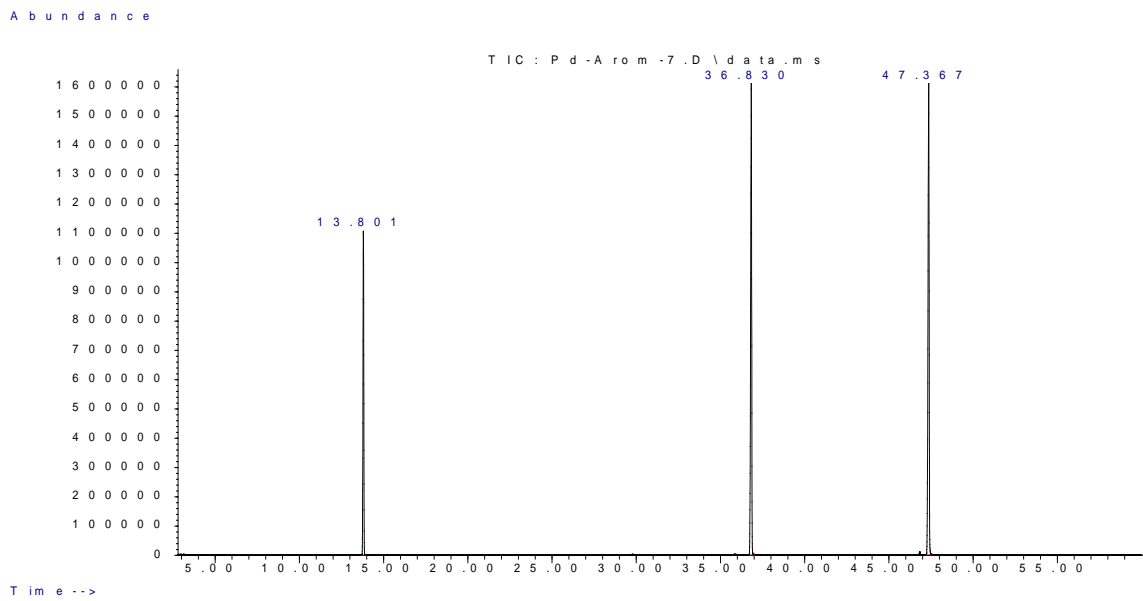
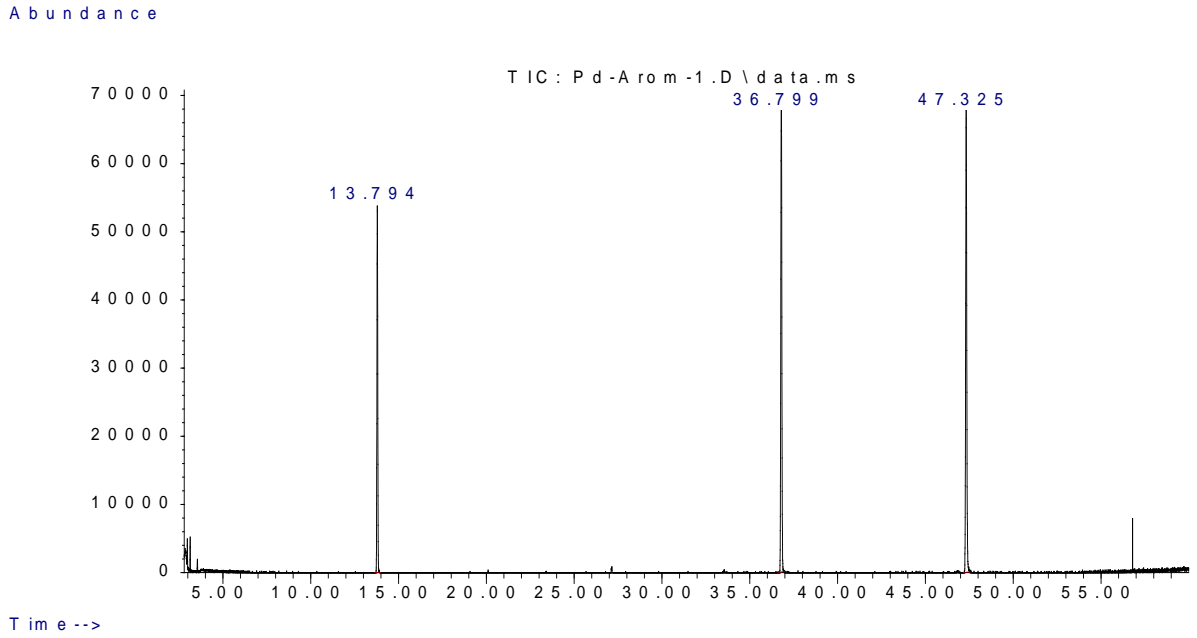


Time-->

**Figura 16:** Cromatograma patrones (menor y mayor concentración) de Mix T-2

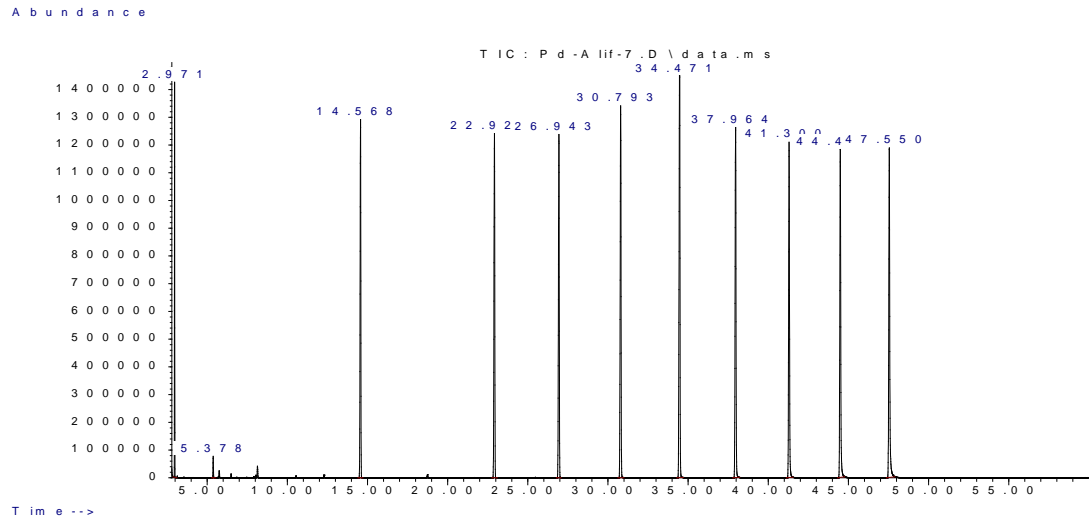
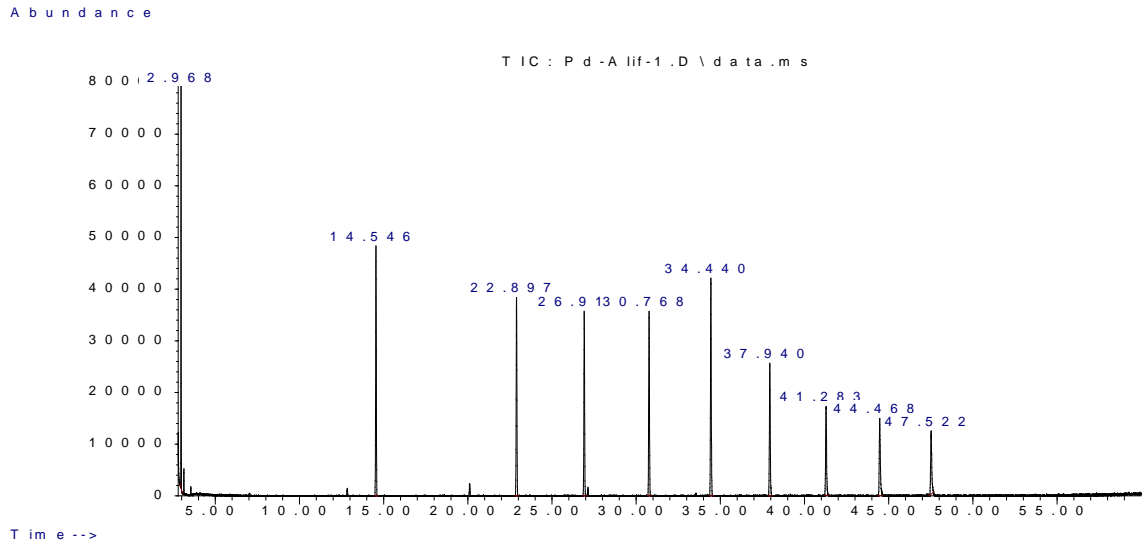


**Figura 17:** Cromatograma patrones (menor y mayor concentración) de Mix T-3.

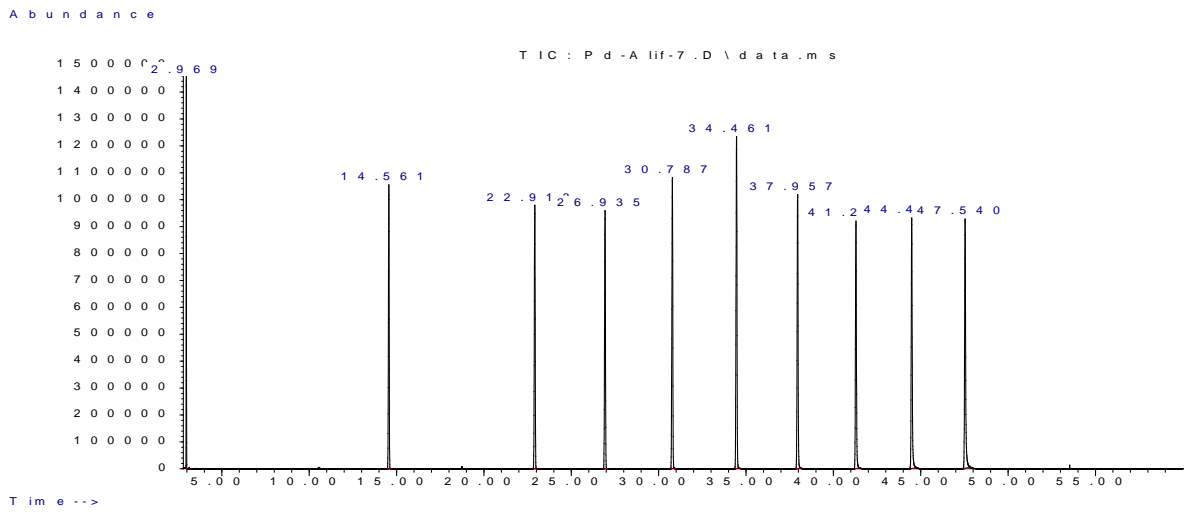
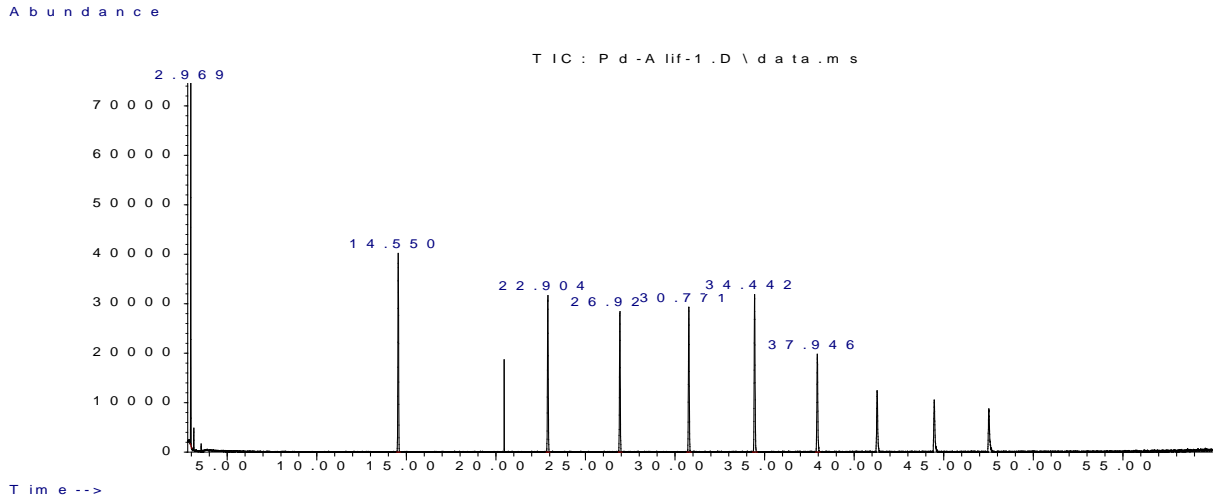




**Figura 18:** Cromatograma patrones (menor y mayor concentración) de Diésel T-0.

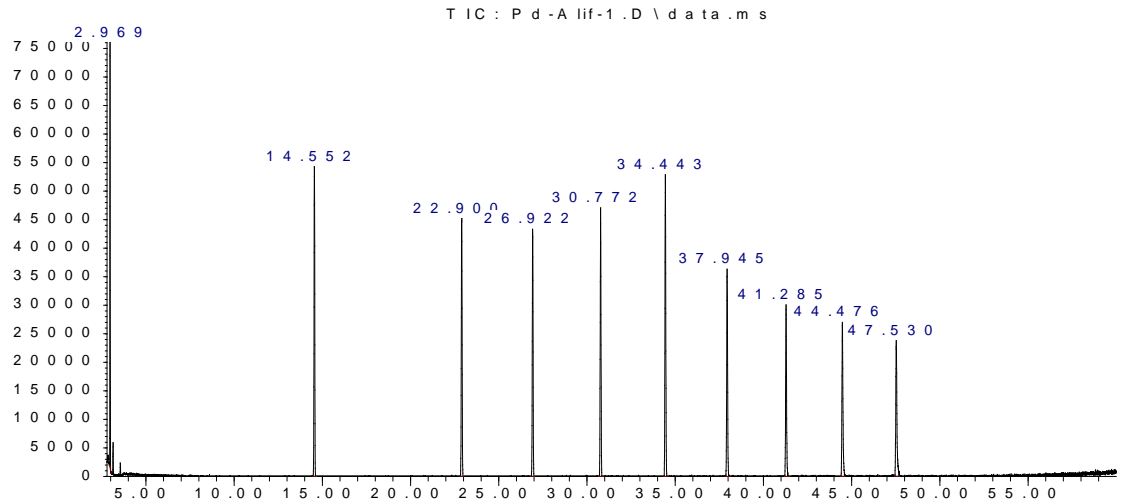


**Figura 19:** Cromatograma patrones (menor y mayor concentración) de Diésel T-1.

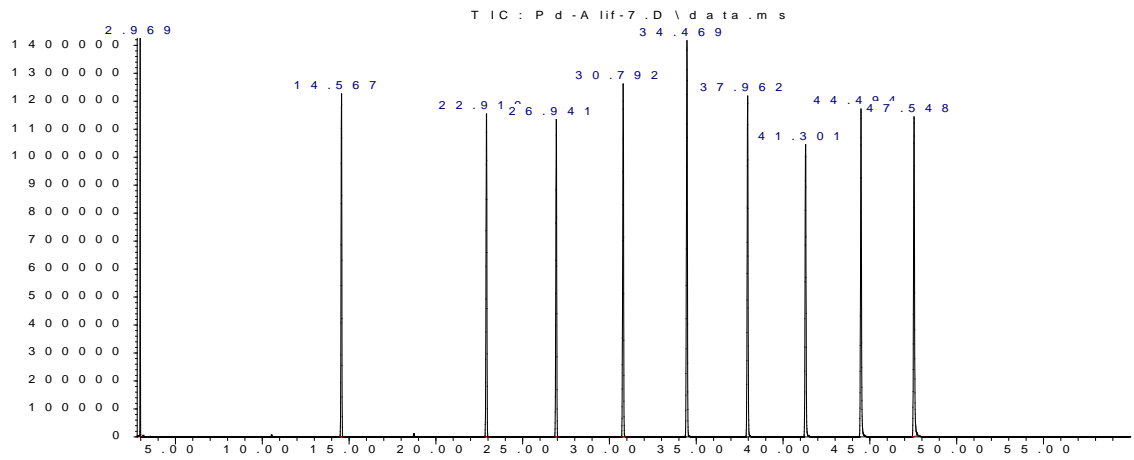


**Figura 20:** Cromatograma patrones (menor y mayor concentración) de Diésel T-2.

Abundance

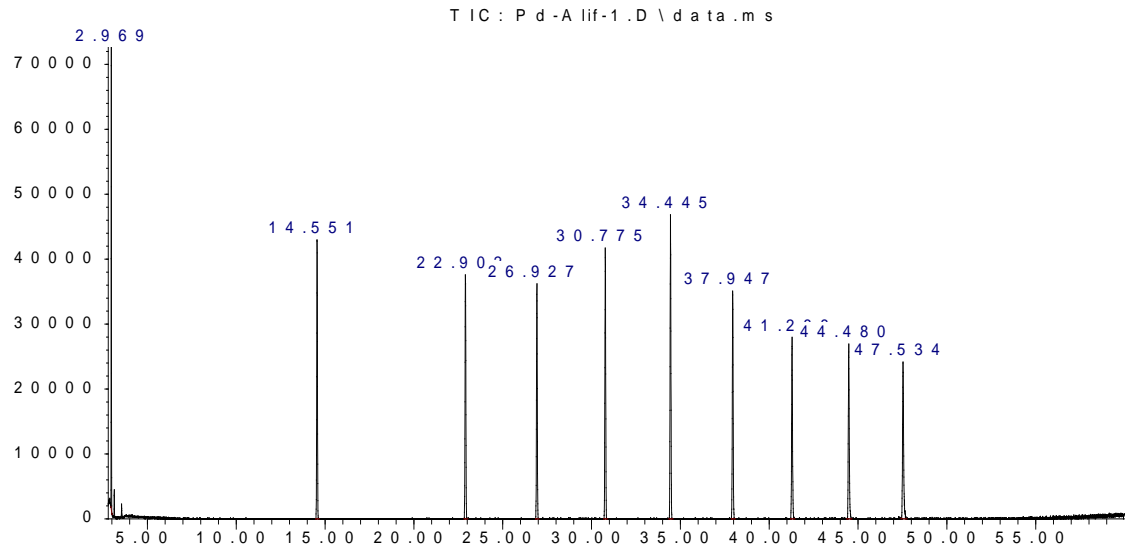


Abundance



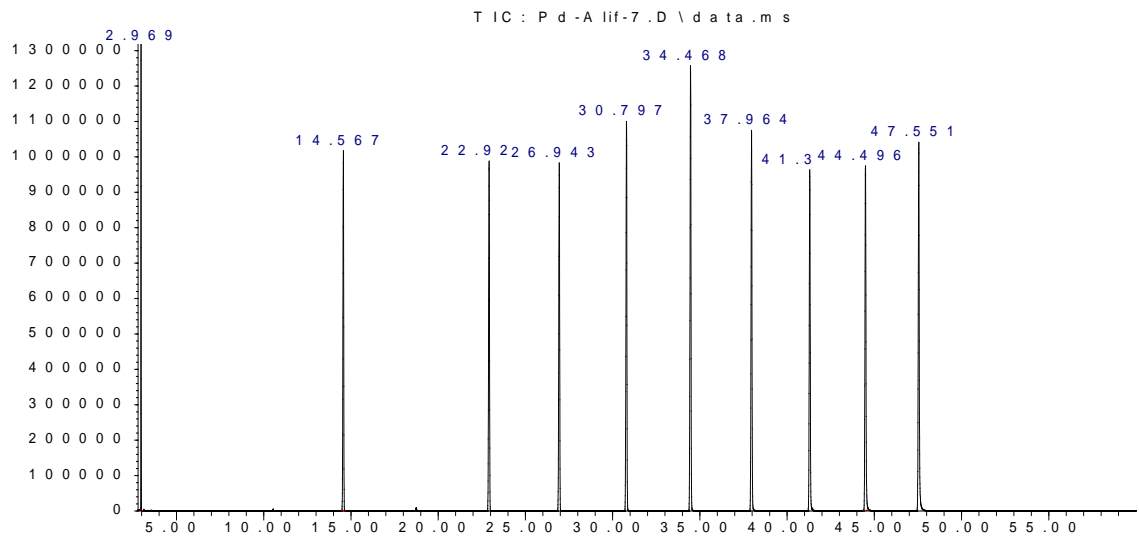
**Figura 21:** Cromatograma patrones (menor y mayor concentración) de Diésel T-3.

Abundance



Time -->

Abundance

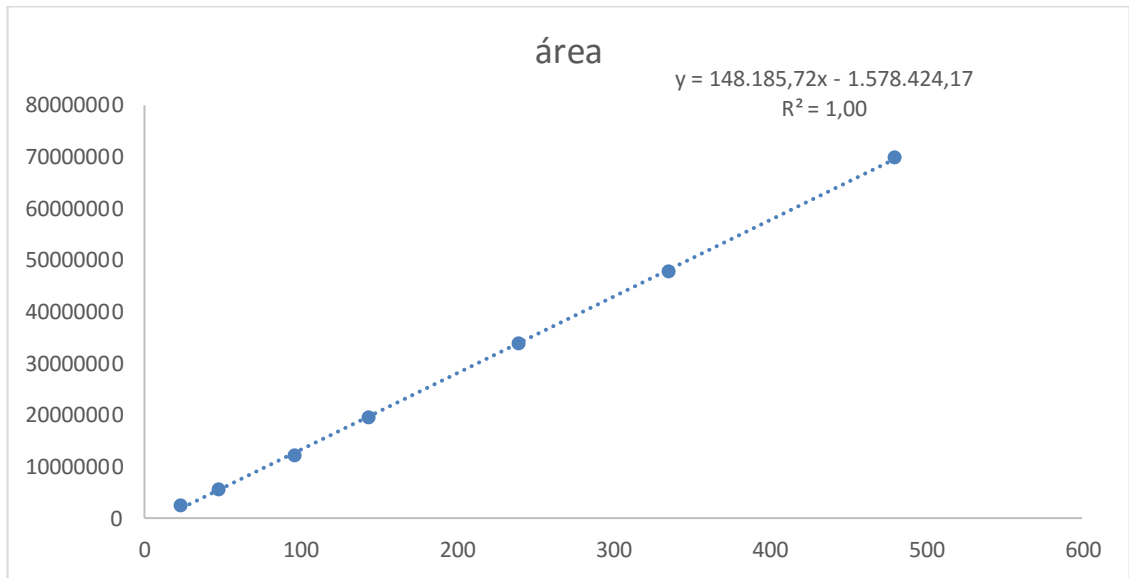


Time -->

**Tabla 7:** Tabla de concentraciones de patrones usados en la corrida cromatográfica del analito pireno.

**Pireno**

<b>Pd (µg/ml)</b>	<b>área</b>
24	2548646
48	5567360
96	12377113
144	19500553
240	33812876
336	47922121
480	69940431

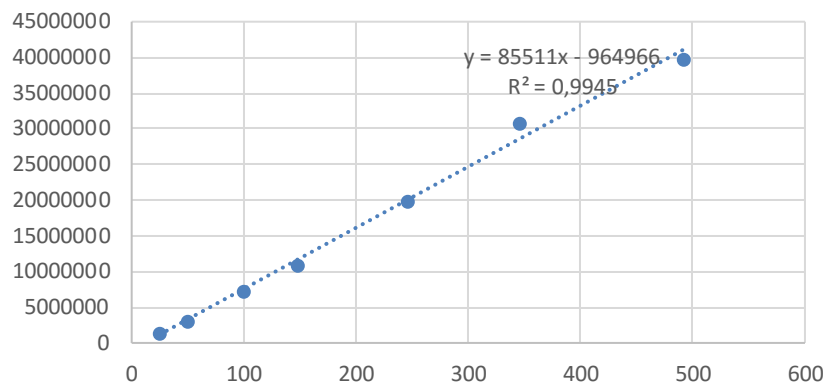


**Gráfica 1:** Curva de regresión patrón analito pireno.

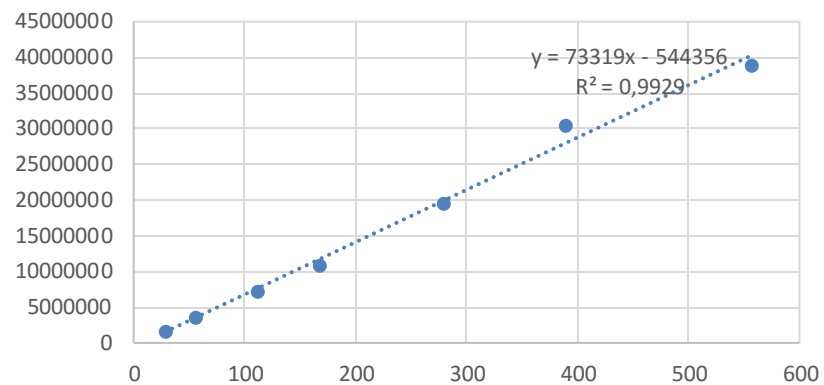
**Tabla 9:** Concentraciones de patrones usados en la corrida cromatográfica de los analitos dodecano, pentadecano, heptadecano, nonadecano, eicosano.

<b>Dodecano</b>		<b>Pentadecano</b>		<b>Heptadecano</b>		<b>Nonadecano</b>		<b>Eicosano</b>	
<b>Pd (µg/ml)</b>	<b>área</b>	<b>Pd (µg/ml)</b>	<b>área</b>	<b>Pd (µg/ml)</b>	<b>área</b>	<b>Pd (µg/ml)</b>	<b>área</b>	<b>Pd (µg/ml)</b>	<b>área</b>
<b>27,8</b>	1570637	<b>24,6</b>	1286361	<b>30</b>	1614512	<b>21,8</b>	984085	<b>23,8</b>	1016928
<b>55,6</b>	3519312	<b>49,2</b>	3175380	<b>60</b>	4101739	<b>43,6</b>	2700856	<b>47,6</b>	2818456
<b>111,2</b>	7397659	<b>98,4</b>	7168412	<b>120</b>	9575255	<b>87,2</b>	6712163	<b>95,2</b>	6987551
<b>166,8</b>	10871156	<b>147,6</b>	10995982	<b>180</b>	14844031	<b>130,8</b>	10830895	<b>142,8</b>	11418579
<b>278</b>	19727222	<b>246</b>	19942287	<b>300</b>	26242099	<b>218</b>	19360984	<b>238</b>	20338826
<b>389,2</b>	30433989	<b>344,4</b>	30721157	<b>420</b>	40208121	<b>305,2</b>	30092554	<b>333,2</b>	31753425
<b>556</b>	38850286	<b>492</b>	39858622	<b>600</b>	52233069	<b>436</b>	40142724	<b>476</b>	43034551

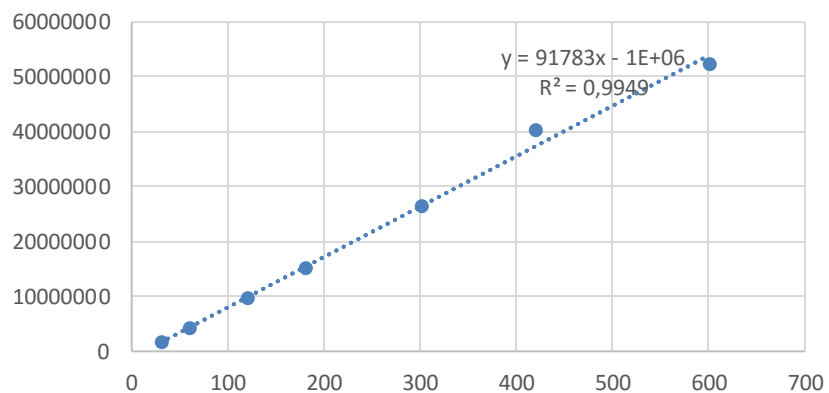
### Área Pentadecano



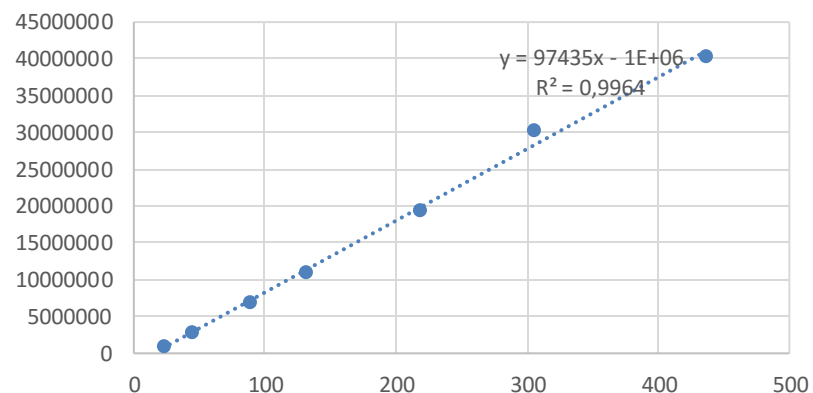
### Área Dodeceno

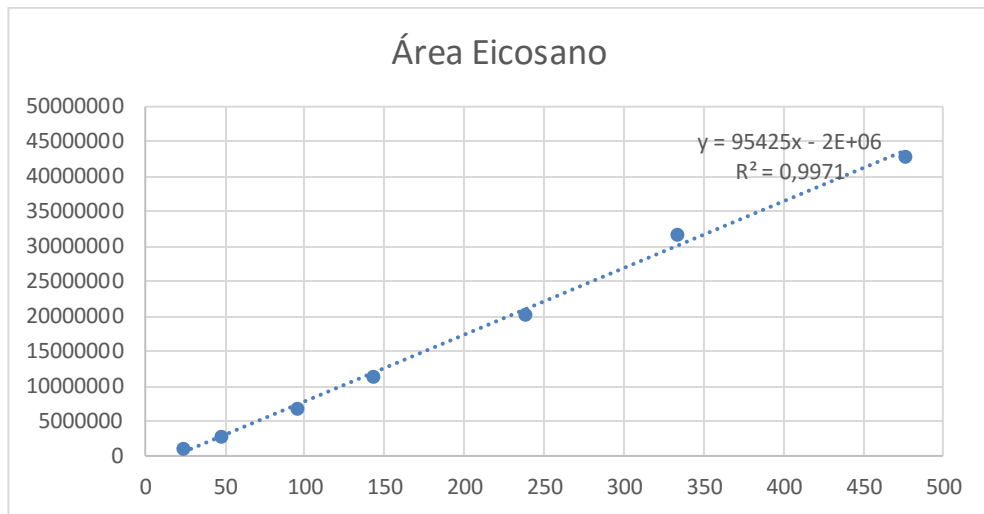


### Área Heptadecano

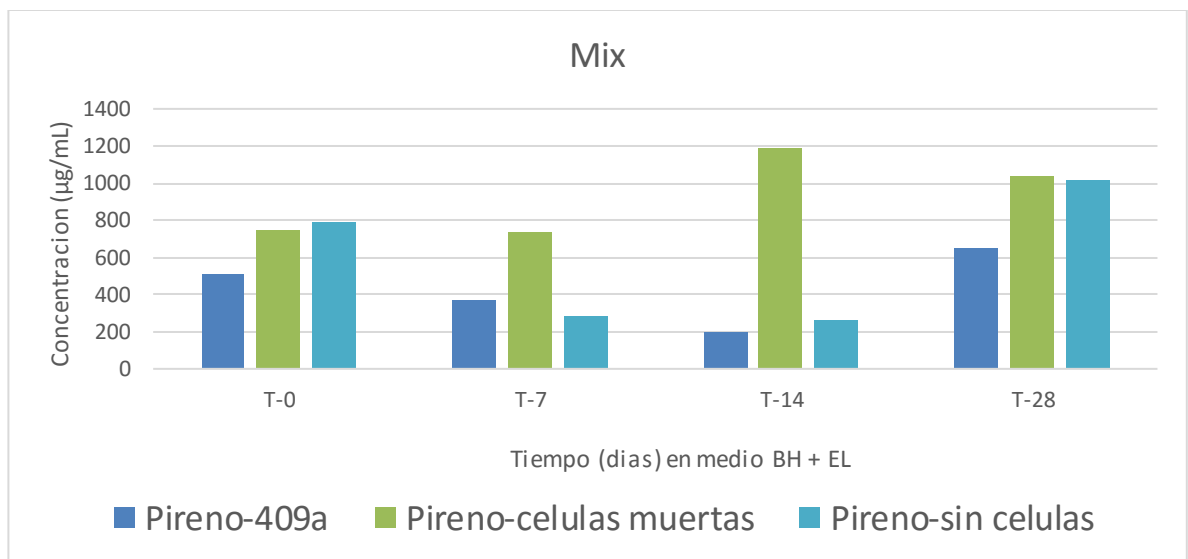


### Área Nonadecano





**Gráfica 2:** Curva de regresión patrones usados en la corrida cromatográfica de los analitos dodecano, pentadecano, heptadecano, nonadecano, eicosano.



**Gráfica 3:** Evaluación de la concentración del hidrocarburo mix en días del *Arthrobacter psychrochitiniphilus* linaje 409a.

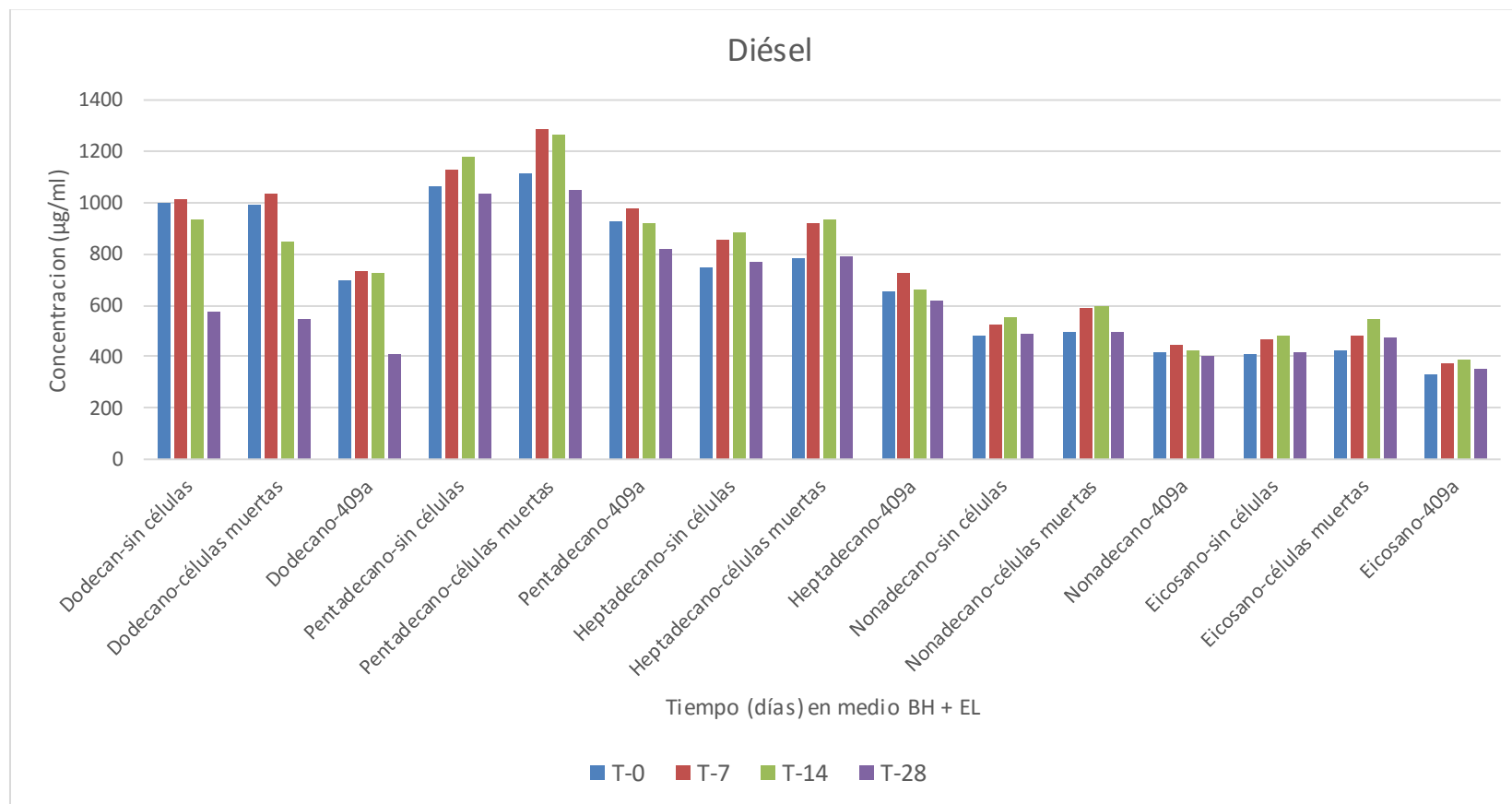
La evaluación del hidrocarburo mix, Gráfica 1, se da por los analitos aromático pireno y alifático octano; puesto que se buscaba observar la interacción de



compuestos alifáticos junto con aromáticos, ya que se sabe que estos últimos son más resistentes a la biodegradación por poseer anillos bencénicos estables generando problemas a la hora de utilizarse procesos de biorremediación. El mix generado por los compuestos pireno y octano (1:1) formaron una solución heterogénea, ya que poseen polaridades diferentes, lo que generó problemas a la hora de la distribución equitativa del mix sobre los controles y muestra a evaluar.

De acuerdo a los cromatogramas obtenidos durante el estudio de las muestras con hidrocarburo mix a lo largo de los 28 días (ver anexos) y concentración Grafica 1, el analito pireno muestra disminución de la concentración desde T-0 hasta T-14, mientras que para T-28 se produjo un aumento de concentración pudiéndose dar errores de manipulación en el transcurso de la metodología realizada. Los controles negativos no mostraron concordancia de los datos, por lo que no se puede asumir si se generó degradación por parte de la cepa 409a al estar junto con el analito pireno. La lectura del analito octano fue inhibida por el compuesto N,N-dimetilformamida, el cual fue usado como disolvente para la preparación en líquido el hidrocarburo pireno, ya que se encontraba en su forma natural (estado sólido); esa inhibición se generó porque los compuestos poseen el mismo tiempo de retención. Por tal motivo, en el hidrocarburo mix no se puede realizar una estimación confiable de degradación por parte del microorganismo *Arthrobacter psychrochitiniphilus* linaje 409a.

El diésel, posee hidrocarburos alifáticos de 8 a 24 carbonos; se eligió trabajar con los analitos de los hidrocarburos dodecano (C-12), pentadecano (C-15), heptadecano (C-17), nonadecano (C-19) y eicosano (C-20) (grafica 2) para tener un amplio espectro de evaluación de alifáticos de ramificación corta como de ramificación larga de acuerdo a la composición del diésel y a su vez porque no se ha establecido el uso exacto de degradación de éstos (Brito *et al.*, 2008).



**Grafica 4:** Evaluación de la concentración del hidrocarburo diésel en días del *Arthrobacter psychrochitiniphilus* linaje 409a.

Los analitos octano (C-8), nonano (C-9) y decano (C-10) que componen el diésel, mostraron a lo largo del tiempo pérdida mediante evaporación sobre las muestras estudiadas, esto se debió porque son compuestos muy volátiles y durante el ensayo los recipientes no se encontraban en condición anaeróbica. Caso visto en el estudio de (Villa, Trovó, & Nogueira, 2010) donde comparan y confirman que existe volatilización de la fracción ligera del diésel a enfrentarlo en un ambiente totalmente abierto junto con uno que está cerrado.

Los controles negativos, analito sin célula y analito con células muertas, muestran datos cercanos no lejanos de concentración a lo largo del tiempo, observando que la presencia de células muertas evita la pérdida por evaporación de los compuestos del diésel a diferencia de los datos de los analitos sin células (Benov, 2019) (Kolsal *et al.*, 2017).

Para estimar la disminución de la concentración en porcentaje del analito por la linaje 409a en T-28, se usó la siguiente fórmula:

$$\% = 100 - \left( \frac{\text{analito 409 a}}{(\text{analito sin células} + \text{analito células muertas})/2} \right) * 100$$

**Tabla 10:** Reducción de concentración de los analitos dodecano, pentadecano, heptadecano, nonadecano, eicosano luego de 28 días de evaluación.

<b>Analito</b>	<b>Número de Carbono</b>	<b>Concentración inicial en %</b>	<b>Reducción de la Concentración en %</b>
<b>Dodecano</b>	C-12	100	27,3%
<b>Pentadecano</b>	C-15	100	21,2%
<b>Heptadecano</b>	C-17	100	21,1%
<b>Nonadecano</b>	C-19	100	19%
<b>Eicosano</b>	C-20	100	20,5%

Se muestra en la Tabla 10 que a lo largo de 28 días muestra reducción en la concentración de dodecano en un 27,3%, de pentadecano en un 21,2%, de heptadecano en un 21,1%, de nonacano en un 19% y de eicosano en un 20,5%.. *Arthrobacter psychrochitiniphilus* linaje 409a muestra predilección de degradación sobre el dodecano (C-12), pentadecano (C-15), heptadecano (C-17), nonadecano (C-19) y eicosano (C-20) ya que genera disminución de la concentración (degradación) luego de 28 días de exposición al diésel. Según (Gargouri, Mhiri, Karray, Aloui, & Sayadi, 2015) los n- alcanos son los hidrocarburos de petróleo más biodegradables y son atacados por más especies microbianas dándose una oxidación más profunda a diferencia de los hidrocarburos aromáticos.



## CONCLUSIONES

- De acuerdo al análisis del gen ARNr 16S realizado se asume la identidad de las cepas estudiadas por medio de la secuenciación del gen 16S para los géneros *Pseudomonas*, *Psychrobacter*, *Arthrobacter*, y la especie de *Arthrobacter psychrochitiniphilus*.
- Los métodos colorimétricos cualitativos MTT/DCPIP empleados en éste estudio, muestran de manera rápida la evaluación preliminar de microorganismos con capacidad degradadora y de tolerancia de hidrocarburos de petróleo.
- Los linajes *Arthrobacter psychrochitiniphilus* 409a *Psychrobacter* sp. 642 fueron las mejores con capacidad degradadora y de tolerancia de hidrocarburos de petróleo; lo que permite que sean usados para evaluaciones futuras de degradación de hidrocarburos.
- *Arthrobacter psychrochitiniphilus* (cepa 409a) mostró disminución de concentración del hidrocarburo diésel luego de 28 días de estudio y del hidrocarburo mix luego de 14 días de estudio.
- *Arthrobacter psychrochitiniphilus* 409a mostró predilección del analito dodecano al ser comparado junto con los controles negativos; se observa disminución de un 27,3% de la concentración del analito dodecano junto con el linaje 409a luego de 28 días de exposición.

## RECOMENDACIONES

Para los linajes bacterianos evaluados 264, 382, 595, 92, 99a, 642, 108, se hace necesario la utilización de más métodos de identificación taxonómicas para el establecimiento de la especie en concreto de cada linaje.

La metodología de evaluación de la degradación de hidrocarburos por CG-MS se debe llevar a cabo por un periodo de tiempo mayor, puesto que los microorganismos trabajados son psicrófilos; a su vez, se necesita llevar a cabo réplicas de la metodología para evitar errores de pérdida de concentración del hidrocarburo durante el proceso, con el fin de obtener resultados más confiables.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aamir, S. (2015). A rapid and efficient method of fungal genomic DNA extraction, suitable for PCR based molecular methods. *Plant Pathology & Quarantine*, 5(2), 74–81. <https://doi.org/10.5943/ppq/5/2/6>
- Abbasian, F., Palanisami, T., Megharaj, M., Naidu, R., Lockington, R., & Ramadass, K. (2016). Microbial diversity and hydrocarbon degrading gene capacity of a crude oil field soil as determined by metagenomics analysis. *Biotechnology Progress*, 32(3), 638–648. <https://doi.org/10.1002/btpr.2249>
- Adams, B. J., Bardgett, R. D., Ayres, E., Wall, D. H., Aislabie, J., Bamforth, S., ... Stevens, M. I. (2006). Diversity and distribution of Victoria Land biota. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(10), 3003–3018. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2006.04.030>
- Agrawal, N., Verma, P., & Shahi, S. K. (2018). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (phenanthrene and pyrene) by the ligninolytic fungi *Ganoderma lucidum* isolated from the hardwood stump. *Bioresources and Bioprocessing*, 5(1). <https://doi.org/10.1186/s40643-018-0197-5>
- Aislabie, J., Foght, J., & Saul, D. (2000). Aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from soil near Scott Base, Antarctica. *Polar Biology*, 23(3), 183–188. <https://doi.org/10.1007/s003000050025>
- Aislabie, J. M., Balks, M. R., Foght, J. M., & Waterhouse, E. J. (2004). Hydrocarbon Spills on Antarctic Soils: Effects and Management. *Environmental Science and Technology*, 38(5), 1265–1274. <https://doi.org/10.1021/es0305149>
- Alekhina, I. A., Marie, D., Petit, J. R., Lukin, V. V., Zubkov, V. M., & Bulat, S. A. (2007). Molecular analysis of bacterial diversity in kerosene-based drilling fluid from the deep ice borehole at Vostok, East Antarctica. *FEMS Microbiology Ecology*, 59(2), 289–299. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00271.x>
- ATCM. (2011). *Informe Final de la XXV Reunión Consultiva del Tratado Antártico*.
- Bachmann, R. T., Johnson, A. C., & Edyvean, R. G. J. (2014). Biotechnology in the petroleum industry: An overview. *International Biodeterioration and*



- Biodegradation*, 86, 225–237. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.09.011>
- Benov, L. (2019). Effect of growth media on the MTT colorimetric assay in bacteria. *Plos One*, 14(8), e0219713. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219713>
- Benson, D. A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., & Sayers, E. W. (2013). GenBank. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), 36–42. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1195>
- Brambilla, E., Ionescu, A., Cazzaniga, G., Edefonti, V., & Gagliani, M. (2014). The influence of antibacterial toothpastes on in vitro *Streptococcus mutans* biofilm formation: a continuous culture study. *American Journal of Dentistry*, 27(3), 160–166.
- Brown, K. E., King, C. K., Kotzakoulakis, K., George, S. C., & Harrison, P. L. (2016). Assessing fuel spill risks in polar waters: Temporal dynamics and behaviour of hydrocarbons from Antarctic diesel, marine gas oil and residual fuel oil. *Marine Pollution Bulletin*, 110(1), 343–353. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.06.042>
- Burgess, K. S., Morgan, M., Deverno, L., & Husband, B. C. (2005). Asymmetrical introgression between two *Morus* species (*M. alba*, *M. rubra*) that differ in abundance. *Molecular Ecology*, 14(11), 3471–3483. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02670.x>
- Chatterjee, S., & Raval, I. H. (2019). Pathogenic Microbial Genetic Diversity with Reference to Health. *Microbial Diversity in the Genomic Era*, 559–577. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814849-5.00032-0>
- Chaudhary, D. K., Kim, D. U., Kim, D., & Kim, J. (2019). *Flavobacterium petrolei* sp. nov., a novel psychrophilic, diesel-degrading bacterium isolated from oil-contaminated Arctic soil. *Scientific Reports*, 9(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40667-7>
- Christie, S., Raper, D., Lee, D. S., Williams, P. I., Rye, L., Blakey, S., ... Whitefield, P. D. (2012). Polycyclic aromatic hydrocarbon emissions from the combustion of alternative fuels in a gas turbine engine. *Environmental Science and Technology*, 46(11), 6393–6400. <https://doi.org/10.1021/es300301k>
- Conceição, L. D. H. C. S., Belo, G. O., Souza, M. M., Santos, S. F., Cerqueira-

- Silva, C. B. M., & Corrêa, R. X. (2011). Confirmation of cross-fertilization using molecular markers in ornamental passion flower hybrids. *Genetics and Molecular Research*, 10(1), 47–52. <https://doi.org/10.4238/vol10-1gmr894>
- Convey, P. (2017). Antarctic Ecosystems. *Reference Module in Life Sciences*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.02182-8>
- Convey, Peter. (2013). Antarctic Ecosystems. *Encyclopedia of Biodiversity: Second Edition*, 1, 179–188. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384719-5.00264-1>
- Convey, Peter, Chown, S. L., Clarke, A., Barnes, D. K. A., Bokhorst, S., Cummings, V., ... Wall, D. H. (2014). The spatial structure of antarctic biodiversity. *Ecological Monographs*, 84(2), 203–244. <https://doi.org/10.1890/12-2216.1>
- D'Amico, S., Collins, T., Marx, J. C., Feller, G., & Gerday, C. (2006). Psychrophilic microorganisms: Challenges for life. *EMBO Reports*, 7(4), 385–389. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400662>
- de Jesus, H. E., & Peixoto, R. S. (2015). Bioremediation in Antarctic Soils. *Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology*, 06(06). <https://doi.org/10.4172/2157-7463.1000248>
- Drahansky, M., Paridah, M. ., Moradbak, A., Mohamed, A. ., Owolabi, F. abdulwahab taiwo, Asniza, M., & Abdul Khalid, S. H. . (2016). We are IntechOpen , the world ' s leading publisher of Open Access books Built by scientists , for scientists TOP 1 %. *Intech, i(tourism)*, 13. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/57353>
- Fingas, M., Yang, C., Brown, C. E., Hollebene, B., Yang, Z., Lambert, P., ... Wang, Z. (2017). Chemical Fingerprints of Crude Oils and Petroleum Products. *Oil Spill Science and Technology*, 209–304. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809413-6.00004-7>
- Gabrielson, J., Hart, M., Jarelöv, A., Kühn, I., McKenzie, D., & Möllby, R. (2002). Evaluation of redox indicators and the use of digital scanners and spectrophotometer for quantification of microbial growth in microplates. *Journal of Microbiological Methods*, 50(1), 63–73.

[https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(02\)00011-8](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(02)00011-8)

- Gargouri, B., Mhiri, N., Karray, F., Aloui, F., & Sayadi, S. (2015). Isolation and Characterization of Hydrocarbon-Degrading Yeast Strains from Petroleum Contaminated Industrial Wastewater. *BioMed Research International*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/929424>
- Geyer, K. M., Altrichter, A. E., Takacs-Vesbach, C. D., Van Horn, D. J., Gooseff, M. N., & Barrett, J. E. (2014). Bacterial community composition of divergent soil habitats in a polar desert. *FEMS Microbiology Ecology*, 89(2), 490–494. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12306>
- Gomes, M. B., Gonzales-Limache, E. E., Sousa, S. T. P., Dellagnezze, B. M., Sartoratto, A., Silva, L. C. F., ... Oliveira, V. M. (2018). Exploring the potential of halophilic bacteria from oil terminal environments for biosurfactant production and hydrocarbon degradation under high-salinity conditions. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 126, 231–242. <https://doi.org/10.1016/J.IBIOD.2016.08.014>
- Gouma, S., Fragoeiro, S., Bastos, A. C., & Magan, N. (2014). Bacterial and Fungal Bioremediation Strategies. In *Microbial Biodegradation and Bioremediation*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800021-2.00013-3>
- Gröger, T. M., Käfer, U., & Zimmermann, R. (2019). Gas chromatography in combination with fast high-resolution time-of-flight mass spectrometry: Technical overview and perspectives for data visualization. *Trends in Analytical Chemistry*, 115677. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115677>
- Habib, S., Ahmad, S. A., Johari, W. L. W., Shukor, M. Y. A., & Yasid, N. A. (2018). Bioremediation of petroleum hydrocarbon in antarctica by microbial species: An overview. *Pertanika Journal of Science and Technology*, 26(1), 1–20.
- Habib, S., Lutfi, W., Johari, W., Yunus, M., Shukor, A., & Yasid, N. A. (2017). *BIOREMEDIATION SCIENCE AND TECHNOLOGY Short communication Screening of Hydrocarbon-degrading Bacterial Isolates Using the Redox Application of 2 , 6-DCPIP*. 5(2), 13–16.
- Hashemzadeh, H., Cheghamirza, K., & Saeidi, M. (2012). *investigation of genetic diversity of Iranian wheat cultivars and line using RAPD markers*

- RAPD.(September 2016).
- INACH. (1961). *Tratado Antartico*. 1–8.
- Jl, M. C. K. (1990). Oil spillage in Antarctica. *Environ. Sci.Technol*, 24(5).
- Khan, M. A. I., Biswas, B., Smith, E., Naidu, R., & Megharaj, M. (2018). Toxicity assessment of fresh and weathered petroleum hydrocarbons in contaminated soil- a review. *Chemosphere*, 212, 755–767.  
<https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2018.08.094>
- Kolsal, F., Akbal, Z., & Liaqat, F. (2017). Hydrocarbon degradation abilities of psychrotolerant *Bacillus* strains. *AIMS Microbiology*, 3(3), 467–482.  
<https://doi.org/10.3934/microbiol.2017.3.467>
- Koma, D., Sakashita, Y., Kubota, K., Fujii, Y., Hasumi, F., Chung, S. Y., & Kubo, M. (2003). Degradation of Car Engine Base Oil by *Rhodococcus* sp. NDKK48 and *Gordonia* sp. NDKY76A. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 67(7), 1590–1593. <https://doi.org/10.1271/bbb.67.1590>
- Kubota, K., Koma, D., Matsumiya, Y., Chung, S. Y., & Kubo, M. (2008). Phylogenetic analysis of long-chain hydrocarbon-degrading bacteria and evaluation of their hydrocarbon-degradation by the 2,6-DCPIP assay. *Biodegradation*, 19(5), 749–757. <https://doi.org/10.1007/s10532-008-9179-1>
- Kuete, V., Karaosmanoğlu, O., & Sivas, H. (2017). Anticancer Activities of African Medicinal Spices and Vegetables. *Medicinal Spices and Vegetables from Africa*, 271–297. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809286-6.00010-8>
- Kumar, R., Kumar, P., & Giri, A. (2019). Regional impact of psychrophilic bacteria on bioremediation. In *Smart Bioremediation Technologies*.  
<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-818307-6.00007-x>
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Lam, N. L., Smith, K. R., Gauthier, A., & Bates, M. N. (2012). Kerosene: A review of household uses and their hazards in low-and middle-income countries. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews*, 15(6), 396–432. <https://doi.org/10.1080/10937404.2012.710134>

- Lima, S. D., Oliveira, A. F., Golin, R., Lopes, V. C. P., Caixeta, D. S., Lima, Z. M., & Morais, E. B. (2019). Isolation and characterization of hydrocarbon-degrading bacteria from gas station leaking-contaminated groundwater in the Southern Amazon, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 6984. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.208611>
- Maiyoh, G. K., Njoroge, R. W., & Tueli, V. C. (2015). Effects and mechanisms of kerosene use-related toxicity. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 40(1), 57–70. <https://doi.org/10.1016/J.ETAP.2015.05.010>
- Mariano, A. P., Angelis, D. de F. de, Pirôllo, M. P. S., Contiero, J., & Bonotto, D. M. (2009). Investigation about the efficiency of the bioaugmentation technique when applied to diesel oil contaminated soils. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52(5), 1297–1312. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132009000500030>
- Martinko, M. T. M. J. M., & Clark, P. V. D. D. P. (2009). *Broch Biología de Los microorganismos* (Duodécima; S. A. PEARSON EDUCACIÓN, ed.). Madrid España.
- Mazloun-ardakani, M., Barazesh, B., & Moshtaghioun, S. M. (2019). Designing and optimization of an electrochemical substitute for the cell viability assay. *Scientific Reports*, 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51241-6>
- Meerloo, J. Van, Kaspers, G. J. L., & Cloos, J. (2011). *Cancer Cell Culture: Cell sensitivity assays: The MTT assay*. 731, 237–245. <https://doi.org/10.1007/978-1-61779-080-5>
- Montagnolli, R. N., Lopes, P. R. M., & Bidoia, E. D. (2015). Screening the Toxicity and Biodegradability of Petroleum Hydrocarbons by a Rapid Colorimetric Method. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 68(2), 342–353. <https://doi.org/10.1007/s00244-014-0112-9>
- Olawoyin, R. (2016). Application of backpropagation artificial neural network prediction model for the PAH bioremediation of polluted soil. *Chemosphere*, 161, 145–150. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2016.07.003>
- Passarini, M. R. Z., Sette, L. D., & Rodrigues, M. V. N. (2011). Improved extraction method to evaluate the degradation of selected PAHs by marine fungi grown

- in fermentative medium. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 22(3), 564–570. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532011000300022>
- Pearce, J. M., & Pearce, J. M. (2014). Digital Designs and Scientific Hardware. *Open-Source Lab*, 165–252. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-410462-4.00006-8>
- Pohanish, R. P., & Pohanish, R. P. (2017a). O. *Sittig's Handbook of Toxic and Hazardous Chemicals and Carcinogens*, 2439–2482. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-38968-6.00014-4>
- Pohanish, R. P., & Pohanish, R. P. (2017b). P. *Sittig's Handbook of Toxic and Hazardous Chemicals and Carcinogens*, 2483–2786. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-38968-6.00015-6>
- Powell, S. M., Stark, J. S., Snape, I., Woolfenden, E. N. M., Bowman, J. P., & Riddle, M. J. (2010). Effects of diesel and lubricant oils on Antarctic benthic microbial communities over five years. *Aquatic Microbial Ecology*, 61(2), 119–127. <https://doi.org/10.3354/ame01441>
- Ramírez Botero, C. M. (2013). Perspectivas en nutrición humana. In *Perspectivas en Nutrición Humana* (Vol. 15). Retrieved from [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0124-41082013000100007&lng=en&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0124-41082013000100007&lng=en&nrm=iso&tlng=es)
- Régo, A. P. J., Mendes, K. F., Bidoia, E. D., & Tornisielo, V. L. (2018). DCPIP and Respirometry Used in the Understanding of Ametryn Biodegradation. *Journal of Environment and Ecology*, 9(1), 27. <https://doi.org/10.5296/jee.v9i1.13962>
- Ruberto, L., Vazquez, S. C., & Mac Cormack, W. P. (2003). Effectiveness of the natural bacterial flora, biostimulation and bioaugmentation on the bioremediation of a hydrocarbon contaminated Antarctic soil. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 52(2), 115–125. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(03\)00048-9](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(03)00048-9)
- San-Valero, P., Peña-Roja, J. M., Álvarez-Hornos, F. J., Marzal, P., & Gabaldón, C. (2015). Dynamic mathematical modelling of the removal of hydrophilic VOCs by biotrickling filters. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12(1), 746–766. <https://doi.org/10.3390/ijerph120100746>

- Sanusi, S. N. A., Halmi, M. I. E., Abdullah, S. R. S., Hassan, H. A., Hamzah, F. M., & Idris, M. (2016). Comparative process optimization of pilot-scale total petroleum hydrocarbon (TPH) degradation by *Paspalum scrobiculatum* L. Hack using response surface methodology (RSM) and artificial neural networks (ANNs). *Ecological Engineering*, *97*, 524–534. <https://doi.org/10.1016/J.ECOLENG.2016.10.044>
- Sarkar, J., Kazy, S. K., Gupta, A., Dutta, A., Mohapatra, B., Roy, A., ... Sar, P. (2016). Biostimulation of indigenous microbial community for bioremediation of petroleum refinery sludge. *Frontiers in Microbiology*, *7*(SEP), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01407>
- Sigma-aldrich, H. C. H. (2019). *31/12/2019*. 1–5.
- Silva, T. R., Duarte, A. W. F., Passarini, M. R. Z., Ruiz, A. L. T. G., Franco, C. H., Moraes, C. B., ... Oliveira, V. M. (2018). Bacteria from Antarctic environments: diversity and detection of antimicrobial, antiproliferative, and antiparasitic activities. *Polar Biology*, *41*(7), 1505–1519. <https://doi.org/10.1007/s00300-018-2300-y>
- Simarro, R., González, N., Bautista, L. F., & Molina, M. C. (2013). Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by a wood-degrading consortium at low temperatures. *FEMS Microbiology Ecology*, *83*(2), 438–449. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12006>
- Speight, J. G., & Speight, J. G. (2011). Hydrocarbons from Petroleum. *Handbook of Industrial Hydrocarbon Processes*, 85–126. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7506-8632-7.10003-9>
- Stark, J. S., Raymond, T., Deppeler, S. L., & Morrison, A. K. (2019). Antarctic Seas. In *World Seas: An Environmental Evaluation* (Second Edi). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805068-2.00002-4>
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, *22*(22), 4673–4680. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>
- Tortora GJ, Funke BR, C. C. (2012). *Tortora funke*.

- Turner, N. R., & Renegar, D. A. (2017). Petroleum hydrocarbon toxicity to corals: A review. *Marine Pollution Bulletin*, 119(2), 1–16.  
<https://doi.org/10.1016/J.MARPOLBUL.2017.04.050>
- Twentyman, P. R., & Luscombe, M. (1987). A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. *British Journal of Cancer*, 56(3), 279–285. <https://doi.org/10.1038/bjc.1987.190>
- Vega, L., & Vazquez, R. R. (2016). Biorremediación por bioestimulación y bioaumentación con microorganismos nativos de un suelo agrícola contaminado con hidrocarburos. *Centro de Investigación y de Estudios Avanzados*, (August), 82–85.
- Villa, R. D., Trovó, A. G., & Nogueira, R. F. P. (2010). Diesel degradation in soil by fenton process. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 21(6), 1089–1095.  
<https://doi.org/10.1590/S0103-50532010000600019>
- Villarino Marzo, C. (1992). El Protocolo de 1991 al Tratado Antártico sobre protección del medio ambiente. *Revista Española de Derecho Internacional*, 44(1), 259–261.
- Vincent, W. F. (2000). Evolutionary origins of Antarctic microbiota: invasion, selection and endemism. *Antarctic Science*, 12(3), 374–385.  
<https://doi.org/10.1017/s0954102000000420>
- Wang, F., Gai, Y., Chen, M., & Xiao, X. (2009). *Arthrobacter psychrochitiniphilus* sp. nov., a psychrotrophic bacterium isolated from Antarctica. 2759–2762.  
<https://doi.org/10.1099/ijs.0.008912-0>
- Wu, M., Wu, J., Zhang, X., & Ye, X. (2019). Effect of bioaugmentation and biostimulation on hydrocarbon degradation and microbial community composition in petroleum-contaminated loessal soil. *Chemosphere*, 237, 124456. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124456>
- Yakimov, M. M., Gentile, G., Bruni, V., Cappello, S., D'Auria, G., Golyshin, P. N., & Giuliano, L. (2004). Crude oil-induced structural shift of coastal bacterial communities of rod bay (Terra Nova Bay, Ross Sea, Antarctica) and characterization of cultured cold-adapted hydrocarbonoclastic bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 49(3), 419–432.



<https://doi.org/10.1016/j.femsec.2004.04.018>

- Yang, S., Wen, X., Shi, Y., Liebner, S., Jin, H., & Perfumo, A. (2016). Hydrocarbon degraders establish at the costs of microbial richness, abundance and keystone taxa after crude oil contamination in permafrost environments. *Scientific Reports*, 6(October). <https://doi.org/10.1038/srep37473>
- Yoneyama, S., Sakurada, Y., Mabuchi, F., Imasawa, M., Sugiyama, A., Kubota, T., & Iijima, H. (2014). Genetic and clinical factors associated with reticular pseudodrusen in exudative age-related macular degeneration. *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 252(9), 1435–1441. <https://doi.org/10.1007/s00417-014-2601-y>
- Yoon, S. H., Ha, S. M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H., & Chun, J. (2017). Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(5), 1613–1617. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001755>
- Yoshida, N., Hoashi, J., Morita, T., McNiven, S. J., Nakamura, H., & Karube, I. (2001). Improvement of a mediator-type biochemical oxygen demand sensor for on-site measurement. *Journal of Biotechnology*, 88(3), 269–275. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00282-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00282-6)
- Zhang, P., Wu, W. M., Van Nostrand, J. D., Deng, Y., He, Z., Gihring, T., ... Zhou, J. (2015). Dynamic succession of groundwater functional microbial communities in response to emulsified vegetable oil amendment during sustained in situ U(VI) reduction. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(12), 4164–4172. <https://doi.org/10.1128/AEM.00043-15>
- Zhang, R., Song, B., & Yuan, J. (2018). Bioanalytical methods for hypochlorous acid detection: Recent advances and challenges. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 99, 1–33. <https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2017.11.015>

## Anexos

### Anexo 1. Medio de cultivo R2A

Composición: gramos usados en litro de solución.

- Extracto de levadura: 0,5
- Proteosa peptona: 0,5
- Peptona ácida de caseína: 0,5
- Glucosa: 0,5
- Almidón soluble: 0,5
- Piruvato de sodio: 0,3
- Fosfato dipotásico: 0,3
- Sulfato de magnesio: 0,05
- Agar: 15,0
- pH final:  $7,2 \pm 0,2$

Preparación: Suspender 18,2 g en 1 litro de agua purificada. Mezclar bien y dejar reposar 5 minutos. Calentar con agitación frecuente y llevar a ebullición para disolución total. Distribuir en recipientes apropiados y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

### Anexo 2. Agua de mar artificial (AWS)

Composición: gramos usados en litro de agua destilada.

- Bromuro de potasio: 0,1
- Clorato de potasio: 23,48
- Clorato de magnesio: 10,61
- Clorato de potasio: 0,66
- Clorato de estroncio: 0,04
- Sulfato de sodio: 3,92
- Bicarbonato de sodio: 0,19
- Ácido Bórico: 0,03
- Clorato de calcio: 1,47

### Anexo 3. Medio de cultivo BH

Composición: gramos usados en litro de solución.

- Sulfato de magnesio: 0,200
- Cloruro de calcio: 0,020
- Fosfato monopotásico: 1,0
- Fosfato dipotásico: 1,0
- Nitrato de amonio: 1,0
- Cloruro férrico: 0,050
- Agar 20,0
- pH ( at 25°C)  $7.0\pm 0.2$

Preparación: Suspended 23,27 gramos en 1000 ml de agua destilada. Calentar a ebullición para disolver el medio por completo. Esterilice en autoclave a 15 libras de presión (121 ° C) durante 15 minutos. Un precipitado blanco antes de la esterilización se vuelve amarillo a naranja después de que la esterilización es normal.

### Anexo 4. Purificación ADN illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit

- El tampón de captura tipo 3 contiene un indicador de pH que cambia de color a varios niveles de pH para indicar visualmente si el tampón de captura más la mezcla de muestra está en el pH óptimo para que el ADN se una a la membrana de sílice. Consulte la sección 4.1 para más información.
- Tampón de lavado tipo 1: antes del primer uso, agregue etanol absoluto a la botella que contiene el tampón de lavado tipo 1. Agregue 100 ml de etanol absoluto al tampón de lavado tipo 1 en el kit 28-9034-70 o agregue 250 ml de etanol al lavado. buffer tipo 1 en el kit 28-9034-71.
- Tampones de elución tipo 4 y 6: este kit proporciona dos tampones de elución para permitir un rendimiento óptimo de la muestra purificada en el mayor rango posible de aplicaciones posteriores.

## Anexo 5. Kit de extracción: Manual del kit DNeasy® PowerSoil®

### Procedimiento

- Agregue 0.25 g de muestra de suelo al tubo PowerBead provisto. Agite suavemente para mezclar.

- Agregue 60 µl de Solución C1 e invierta varias veces o agite brevemente.

Nota: La solución C1 se puede agregar al tubo PowerBead antes de agregar una muestra de suelo

- Asegure los tubos PowerBead horizontalmente usando un adaptador Vortex para 24 tubos (1.5–2.0 ml) (cat. No. 13000-V1-24).

- Vórtice a velocidad máxima durante 10 min.

Nota: Si usa el adaptador de vórtice de 24 lugares para más de 12 preparaciones, aumente el tiempo de vórtice en 5–10 min.

- Centrifugar los tubos a 10.000 x g durante 30 s.

- Transfiera el sobrenadante a un tubo de recogida limpio de 2 ml.

Nota: Espere entre 400–500 µl de sobrenadante. El sobrenadante aún puede contener algunas partículas de tierra.

- Agregue 250 µl de Solución C2 y agite en vórtice durante 5 s. Incubar a 2–8 ° C durante 5 min.

Nota: Puede omitir la incubación de 5 minutos. Sin embargo, si ya ha validado las extracciones DNeasy PowerSoil con esta incubación, le recomendamos que mantenga el paso.

- Centrifugue los tubos durante 1 minuto a 10,000 x g.

- Para evitar el granulado, transfiera hasta 600 µl de sobrenadante a un tubo de recolección limpio de 2 ml.

- Agregue 200 µl de Solución C3 y agite brevemente. Incubar a 2–8 ° C durante 5 min.

Nota: Puede omitir la incubación de 5 minutos. Sin embargo, si ya ha validado las extracciones de PowerSoil con esta incubación, le recomendamos que mantenga el paso.

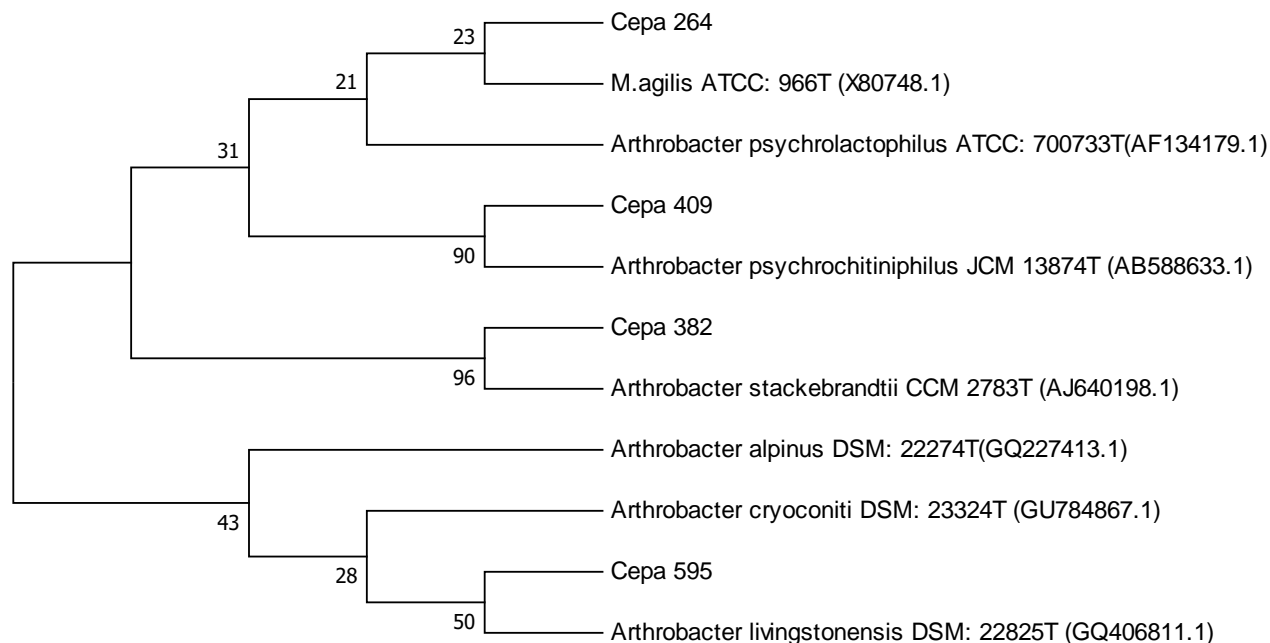
- Centrifugue los tubos durante 1 minuto a 10,000 x g.
- Para evitar el granulado, transfiera hasta 750 µl de sobrenadante a un tubo de recolección limpio de 2 ml.
- Agite para mezclar la Solución C4 y agregue 1200 µl al sobrenadante. Vórtice durante 5 s.
- Cargue 675 µl en una columna de centrifugado MB y centrifugue a 10,000 x g durante 1 min. Deseche el flujo continuo.
- Repita el paso 14 dos veces, hasta que toda la muestra haya sido procesada.
- Agregue 500 µl de Solución C5. Centrifugar durante 30 s a 10,000 x g.
- Deseche el flujo continuo. Centrifugar nuevamente durante 1 minuto a 10,000 x g.
- Coloque con cuidado la columna de centrifugado MB en un tubo de recogida limpio de 2 ml. Evite salpicar cualquier Solución C5 sobre la columna.
- Agregue 100 µl de Solución C6 al centro de la membrana del filtro blanco. Alternativamente, puede usar agua estéril de grado PCR sin ADN para este paso (cat. No. 17000-10).
- Centrifugar a temperatura ambiente durante 30 s a 10,000 x g. Deseche la columna MB Spin.

El ADN ahora está listo para aplicaciones posteriores.

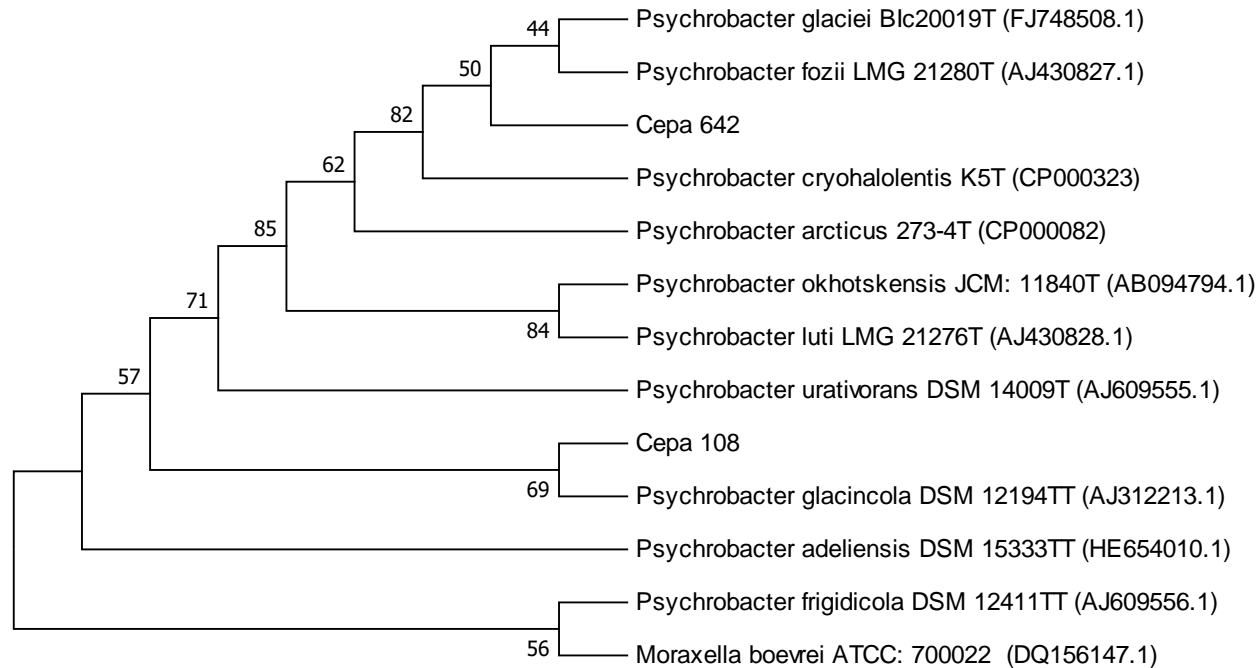
Nota: Recomendamos almacenar ADN congelado ( $-20^{\circ}\text{C}$  a  $-80^{\circ}\text{C}$ ) ya que la Solución C6 no contiene EDTA. Para concentrar el ADN, consulte la Guía de solución de problemas.

#### Anexo 6. Cuantificación ADN Qubit invitrogen

- Configure dos tubos de ensayo para los estándares (tres para el ensayo de proteínas) y uno. Tubo de ensayo para cada muestra de usuario.
- Prepare la solución de trabajo Qubit® diluyendo el reactivo Qubit® 1: 200 en tampón Qubit®. Preparar 200  $\mu\text{L}$  de trabajo. Solución para cada estándar y muestra.
- Prepare los tubos de ensayo \* según la tabla a continuación.
- Agite todos los tubos por 2–3 segundos.
- Incubar los tubos durante 2 minutos a temperatura ambiente (15 minutos para el análisis de proteínas Qubit®).
- Inserte los tubos en el fluorómetro Qubit® y tome las lecturas. Para obtener instrucciones detalladas, consulte el manual del fluorómetro Qubit®

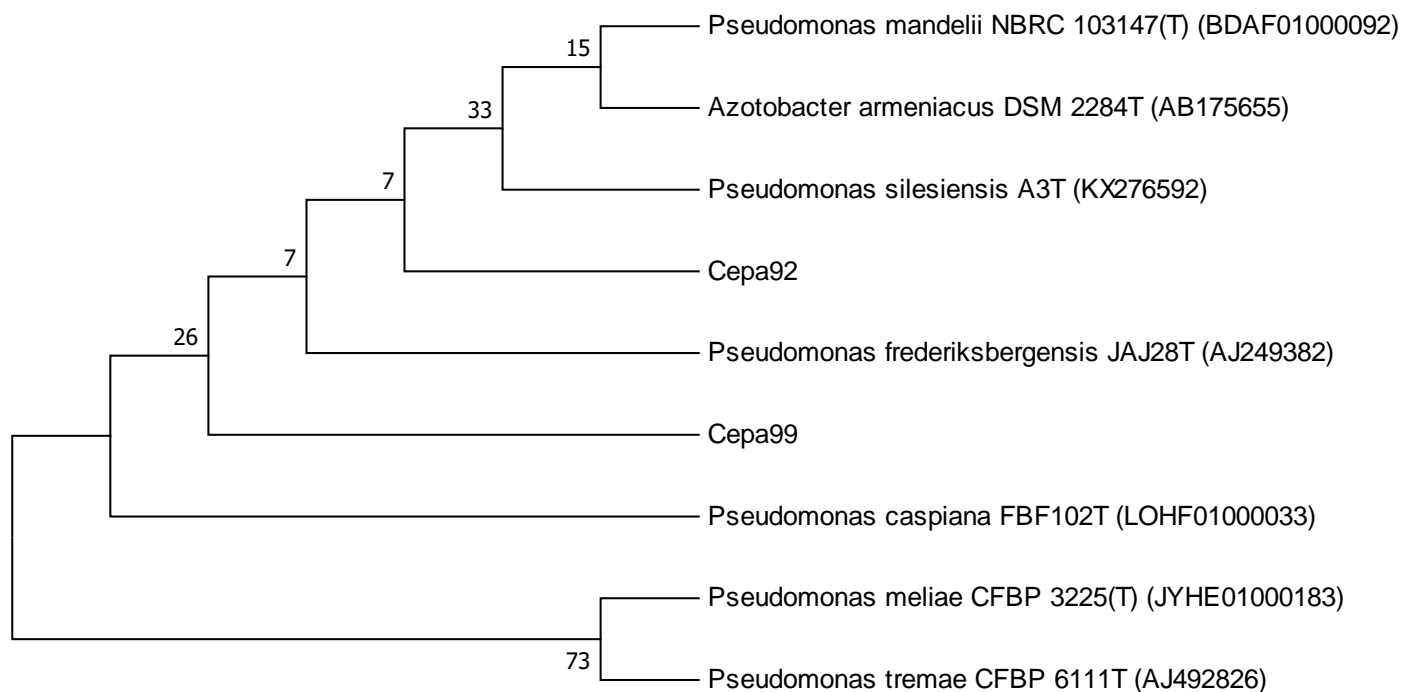


Anexo 7: Análisis filogenético usando el test Máxima Parsimonia de secuencias parciales del gen 16S ARNr (~900 pb) obtenido de aislamientos bacterianos que pertenecen al phylum Actinobacteria y microorganismos relacionados (microorganismos tipo), recuperados de la base de datos Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), RDP (Ribosomal Database Project, Wisconsin, EE. UU., [Http://rdp.cme.msu.edu](http://rdp.cme.msu.edu)), y Ez Biocloud. Los valores de Bootstrap (5,000 ejecuciones repetidas, mostradas como %). Los números de acceso de GenBank están indicados después de los nombres de las especies tipo. M.agilis fue utilizado como grupo externo.



Anexo 8: Análisis filogenético usando el test Máxima Parsimonia de secuencias parciales del gen 16S ARNr (~900 pb) obtenido de aislamientos bacterianos que pertenecen al phylum Proteobacteria y microorganismos relacionados (microorganismos tipo), recuperados de la base de datos Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), RDP (Ribosomal Database Project, Wisconsin, EE. UU., [Http://rdp.cme.msu.edu](http://rdp.cme.msu.edu)), y Ez Biocloud. Los valores de Bootstrap (5,000 ejecuciones repetidas, mostradas como %). Los números de acceso de GenBank están indicados después de los nombres de las especies tipo *Azotobacter armeniacus* fue utilizado como grupo externo.





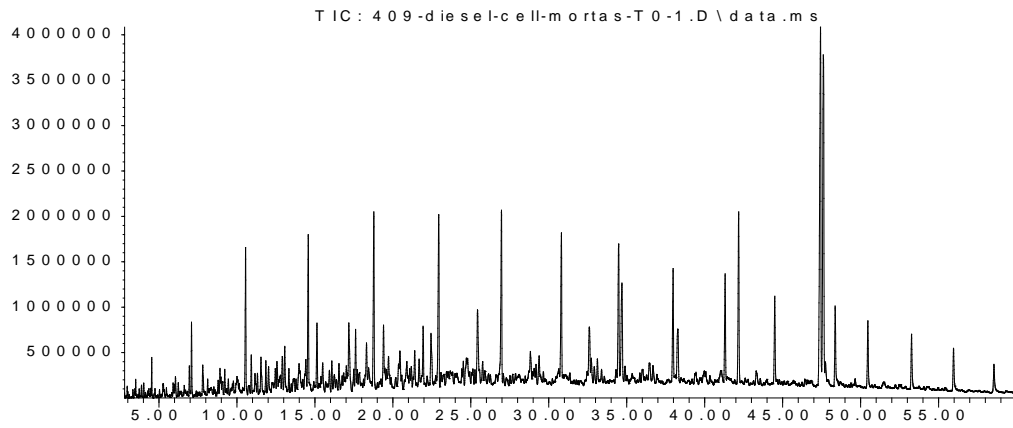
Anexo 9: Análisis filogenético usando el test Máxima Parsimonia de secuencias parciales del gen 16S ARNr (~900 pb) obtenido de aislamientos bacterianos que pertenecen al phylum Proteobacteria y microorganismos relacionados (microorganismos tipo), recuperados de la base de datos Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), RDP (Ribosomal Database Project, Wisconsin, EE. UU., [Http://rdp.cme.msu.edu](http://rdp.cme.msu.edu)), y Ez Biocloud. Los valores de Bootstrap (5,000 ejecuciones repetidas, mostradas como %). Los números de acceso de GenBank están indicados después de los nombres de las especies tipo. *Moraxella boevrei* fue utilizado como grupo externo.

Anexo 10: Imágenes del proceso para concentrar los analitos y posteriormente correrlos en el Cromatógrafo de Gases aplicado a Espectrometría de Masas.

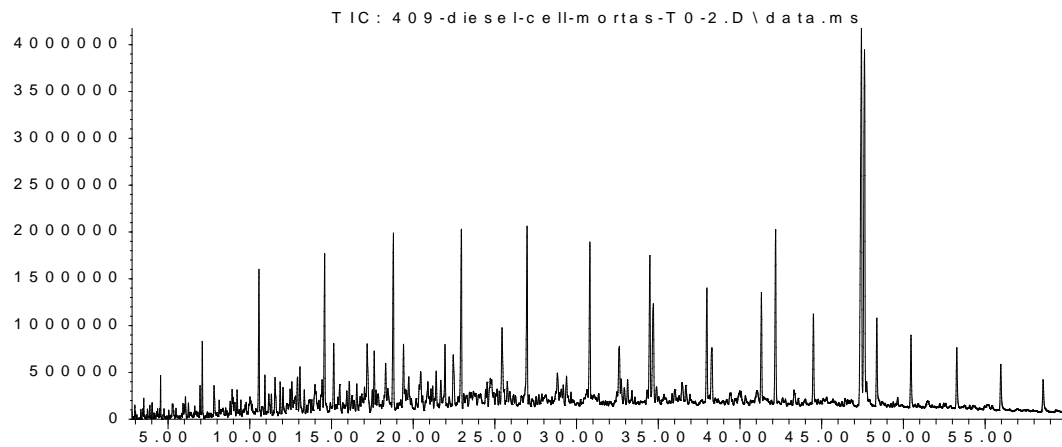


# Anexo 11. Cromatograma muestras de T-0 por triplicado de Diesel con células muertas.

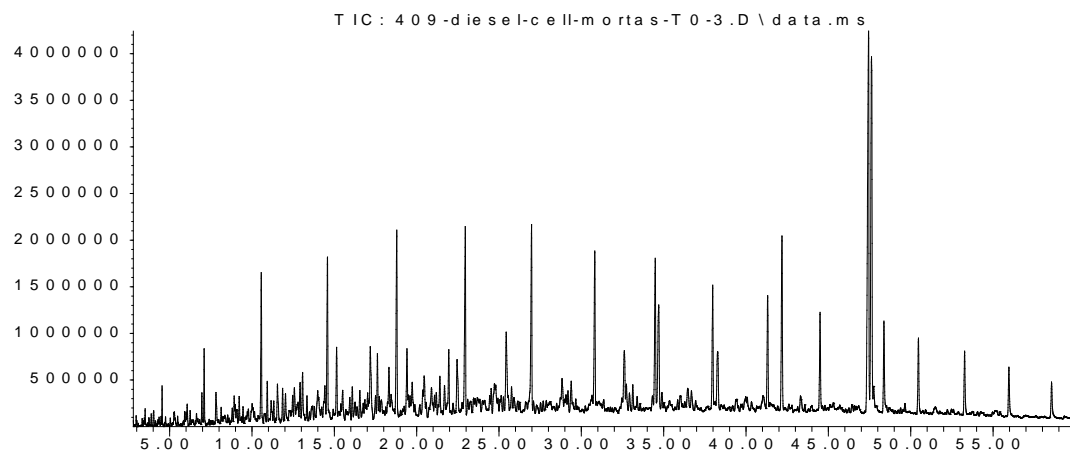
Abundance



Time-->  
Abundance



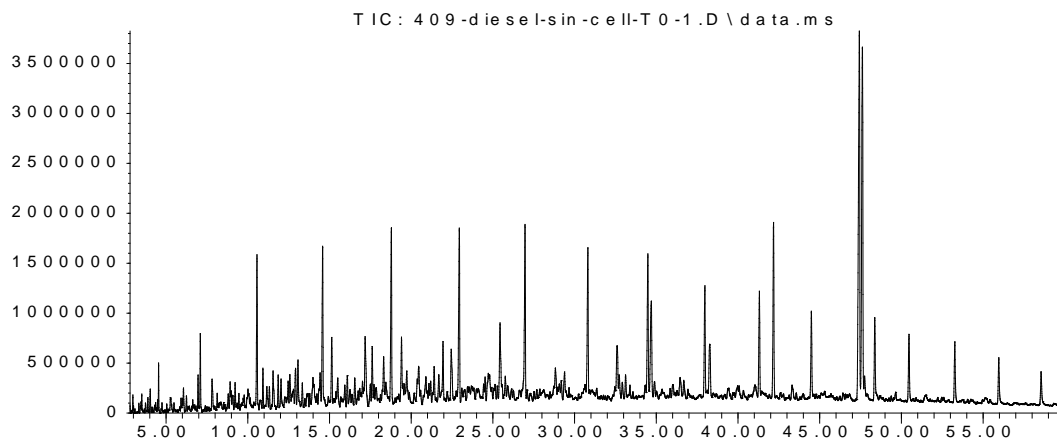
Time-->  
Abundance



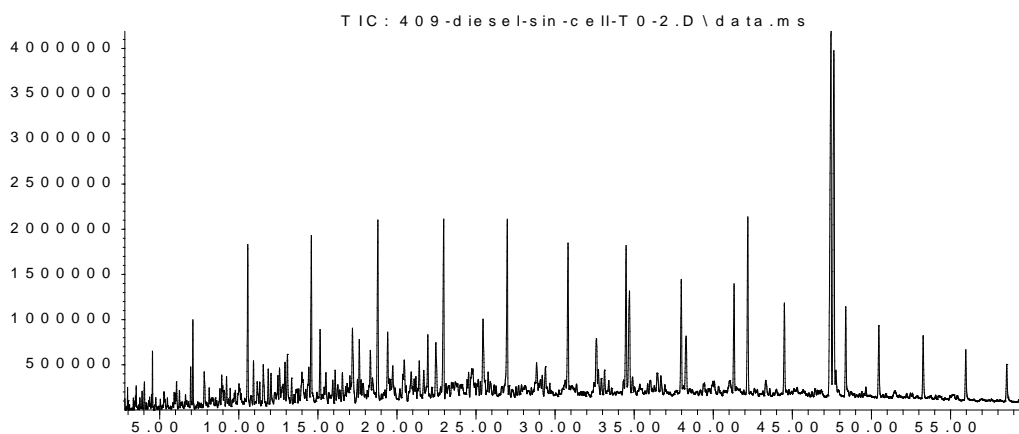
Time-->

## Anexo 12. Cromatograma muestras de T-0 por triplicado de Diesel sin células.

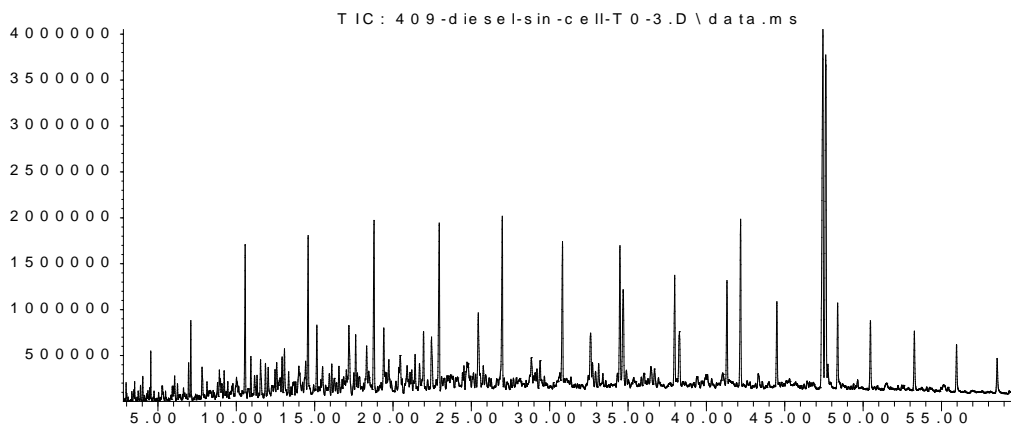
Abundance



Abundance

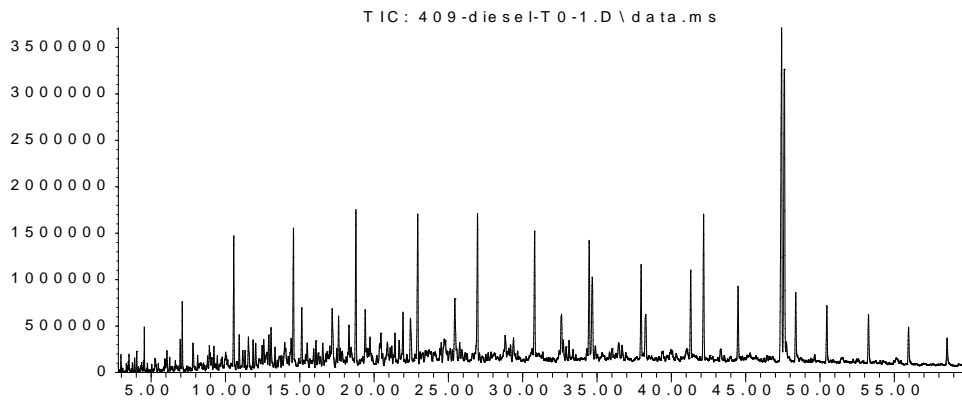


Abundance

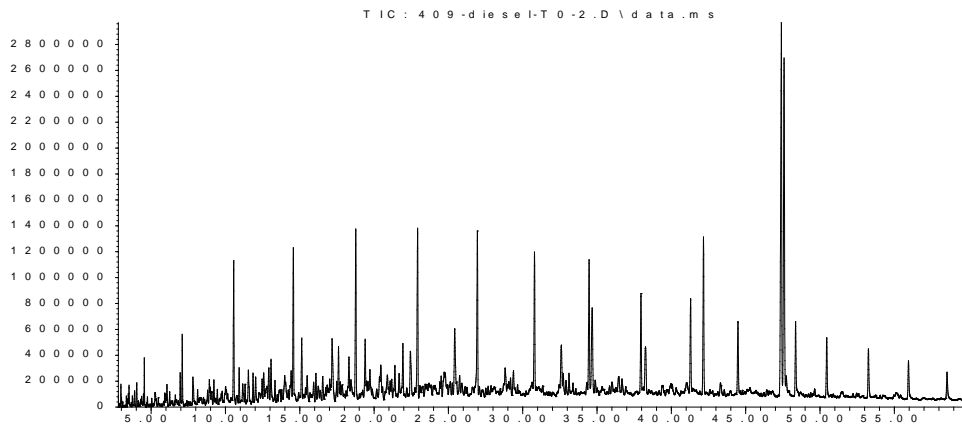


# Anexo 13. Cromatograma muestras de T-0 por triplicado de Diesel con células 409a.

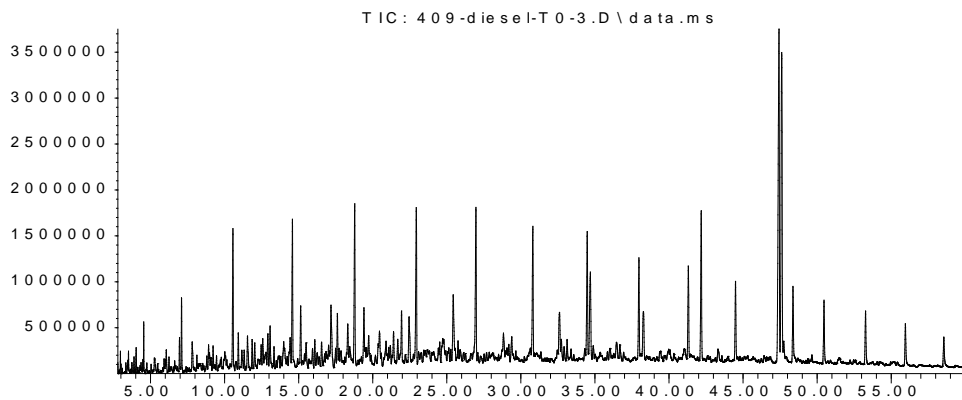
Abundance



Time-->  
Abundance

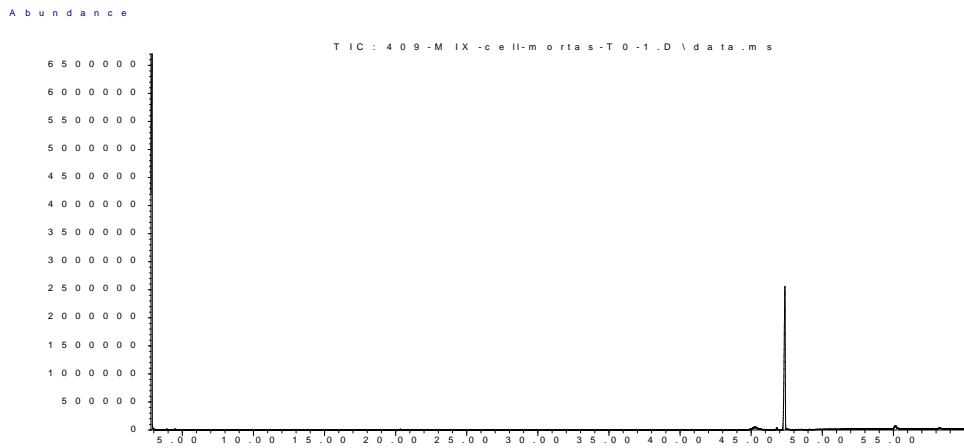


Time-->  
Abundance

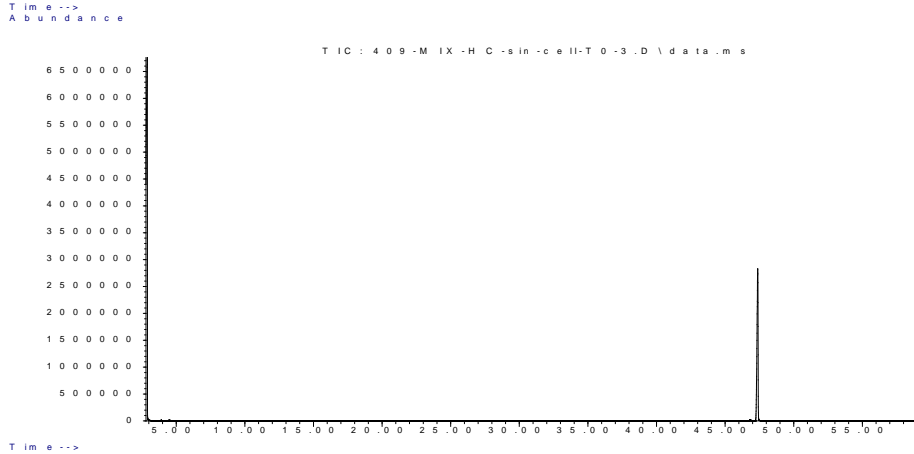
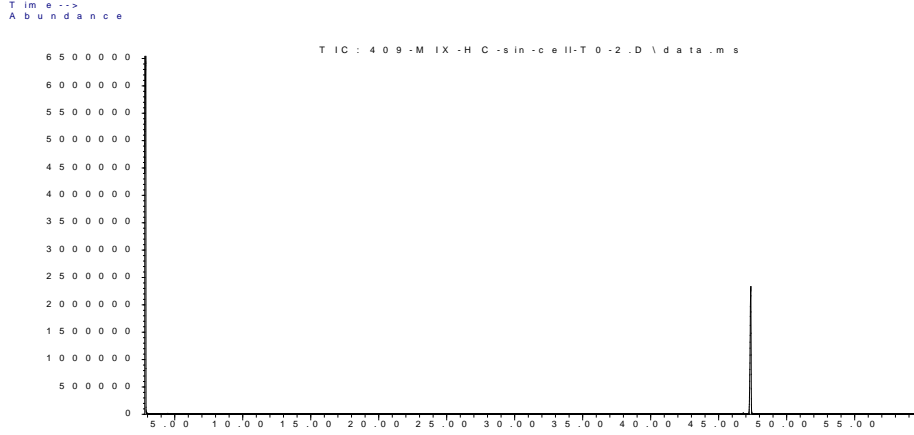
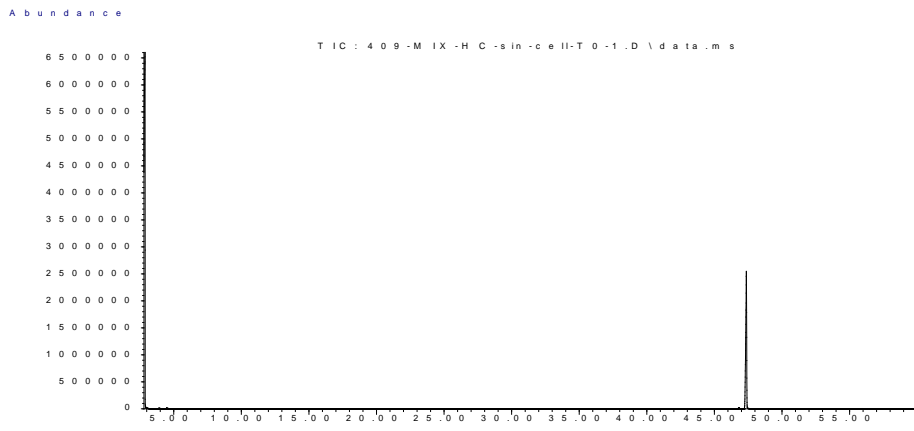


Time-->

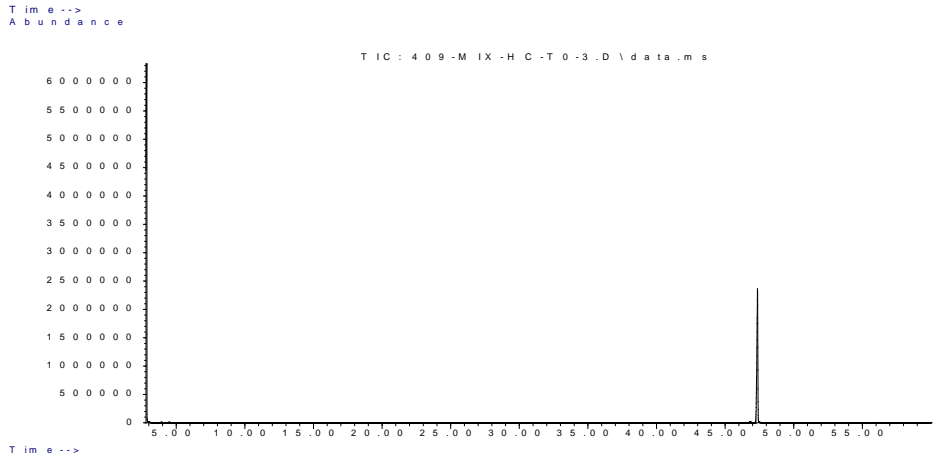
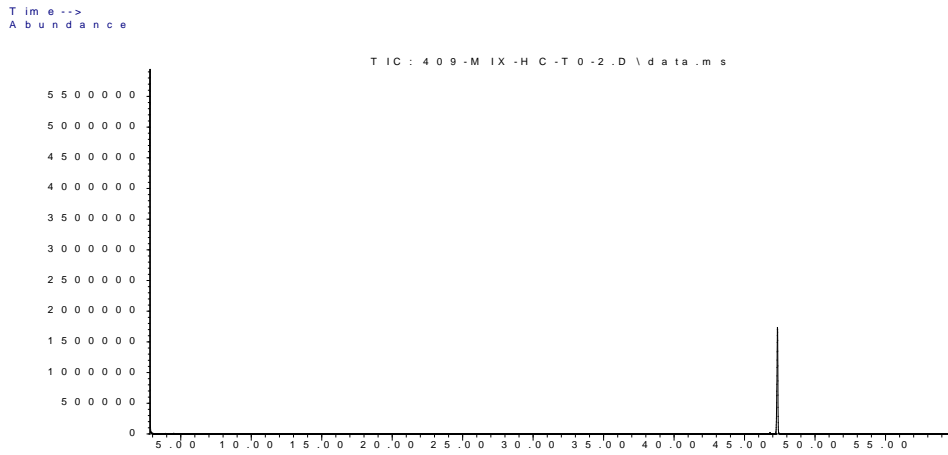
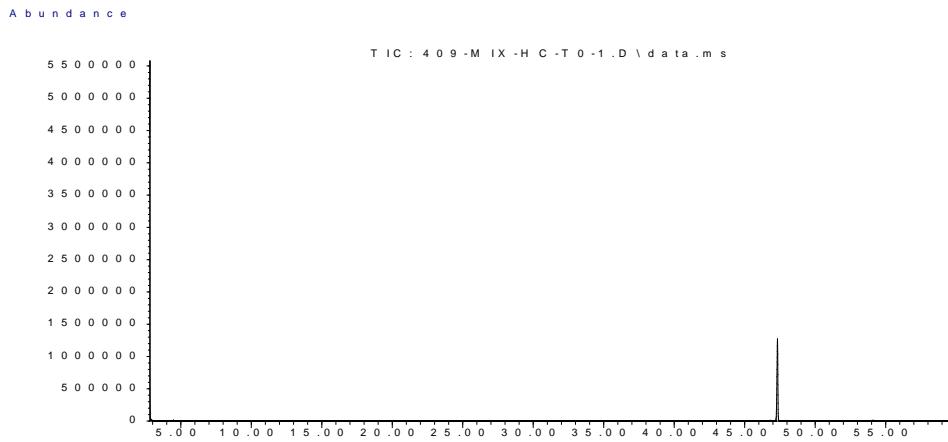
# Anexo 14. Cromatograma muestras de T-0 por triplicado de Mix con células muertas.



# Anexo 15. Cromatograma muestras de T-0 por triplicado de Mix sin células.

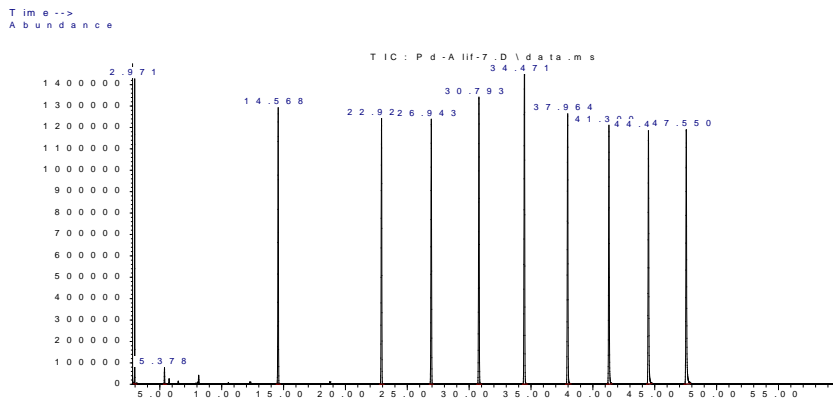
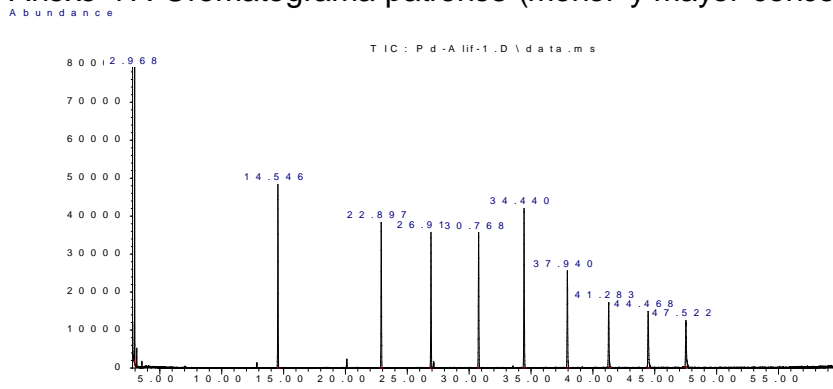


# Anexo 16. Cromatograma muestras de T-0 por triplicado de Mix con células 409a.

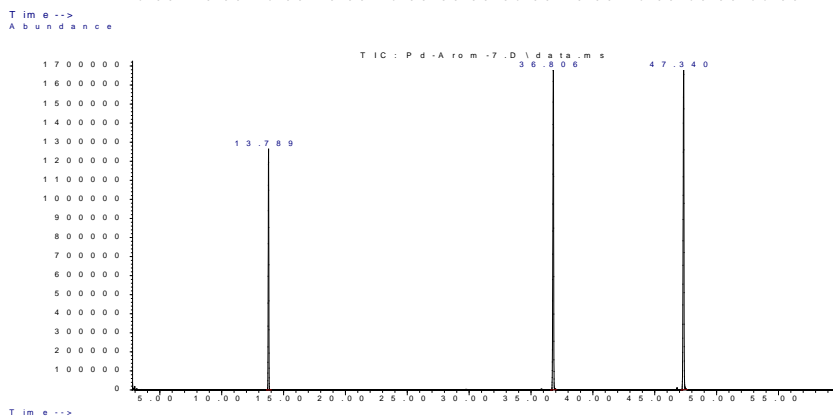
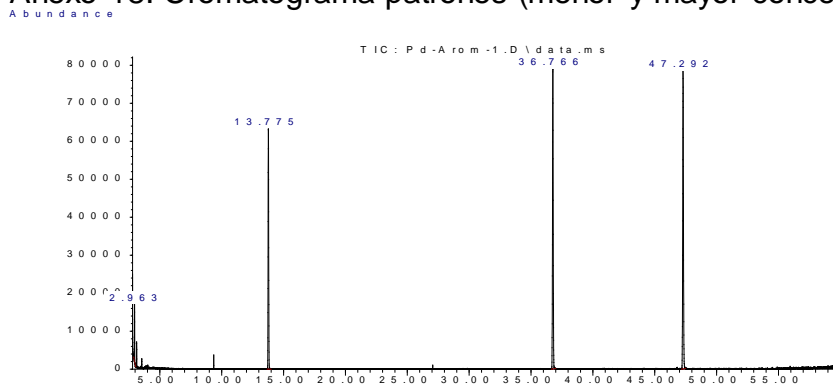




## Anexo 17. Cromatograma patrones (menor y mayor concentración) de Diésel T-0.

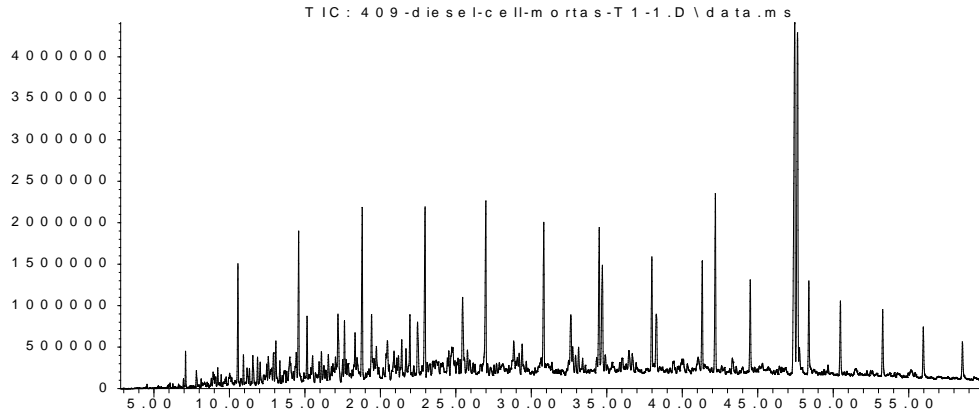


## Anexo 18. Cromatograma patrones (menor y mayor concentración) de Mix T-0.



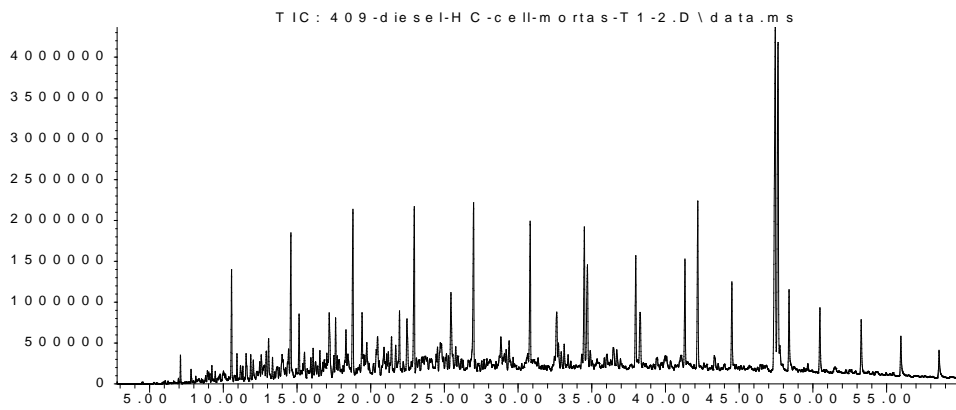
Anexo 19. Cromatograma muestras de T-1 por triplicado de Diesel con células muertas.

Abundance



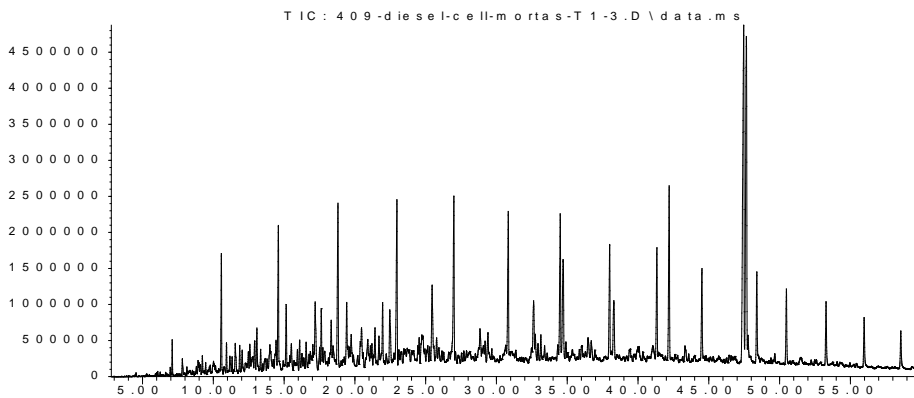
Time-->

Abundance



Time-->

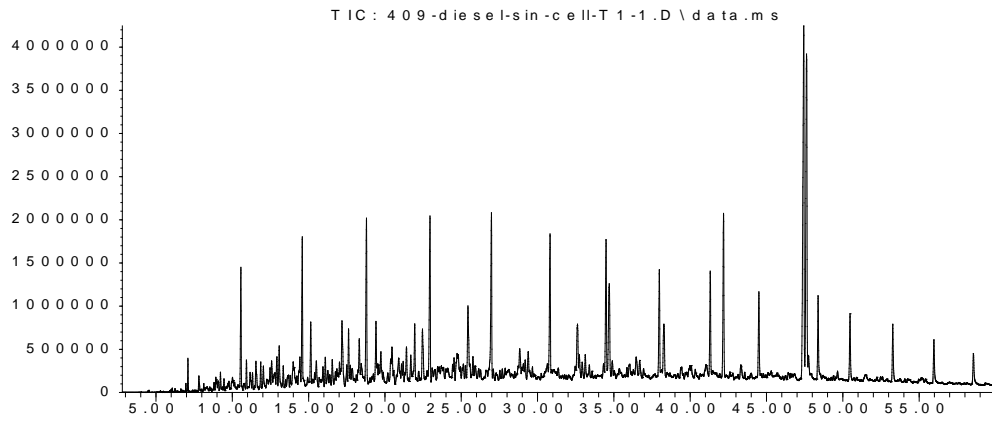
Abundance



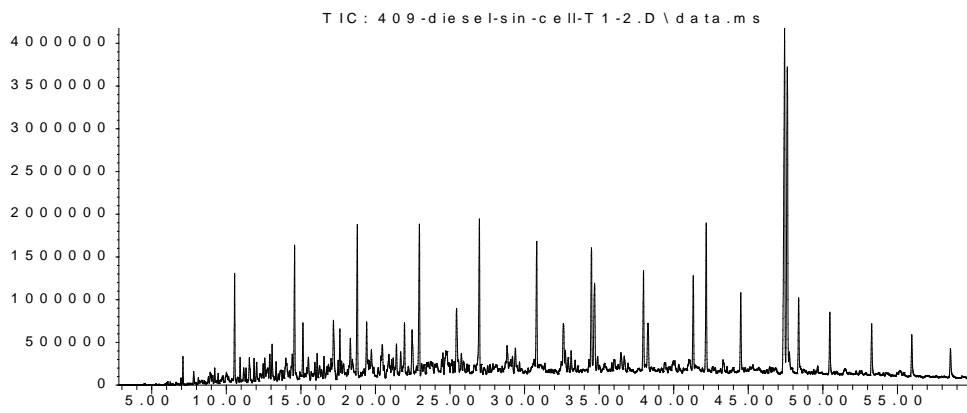
Time-->

# Anexo 20. Cromatograma muestras de T-1 por triplicado de Diesel sin células.

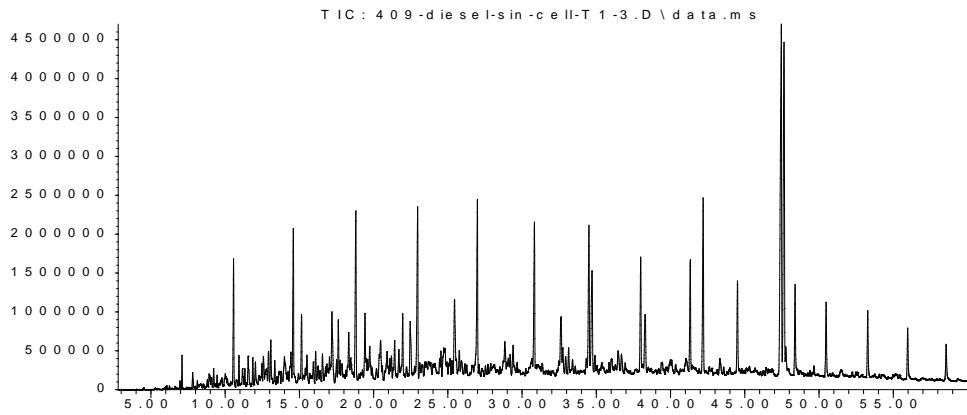
Abundance



Time-->  
Abundance



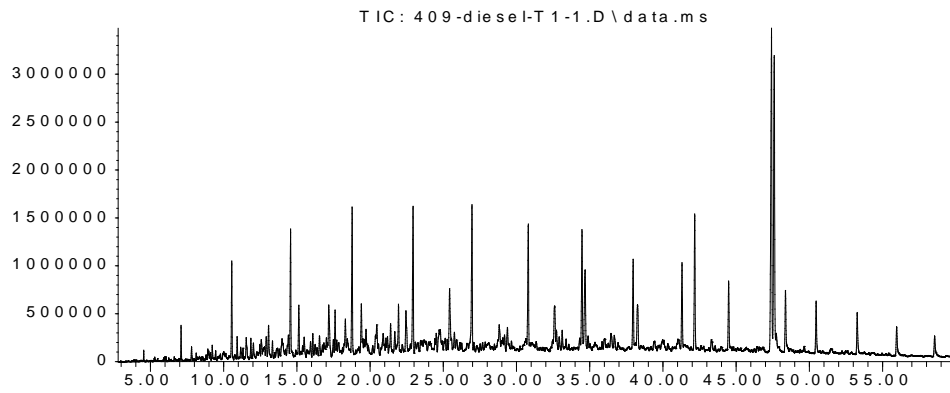
Time-->  
Abundance



Time-->

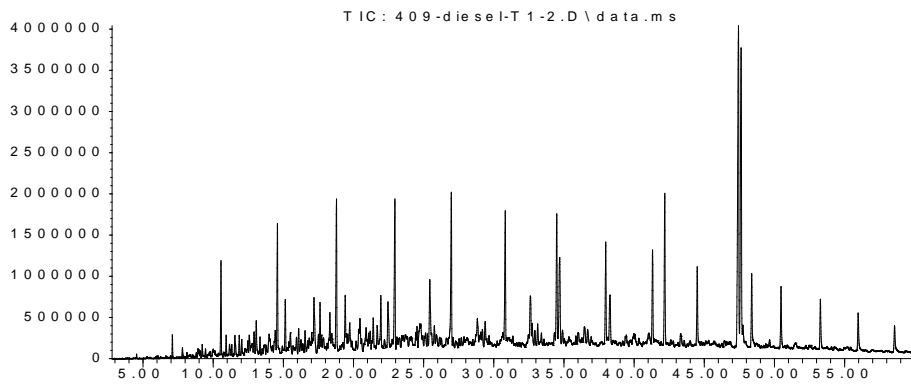
# Anexo 21. Cromatograma muestras de T-1 por triplicado de Diesel con células 409a.

Abundance



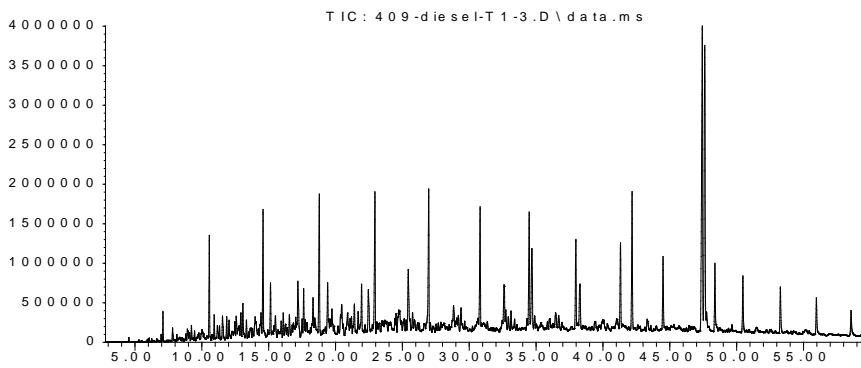
Time-->

Abundance



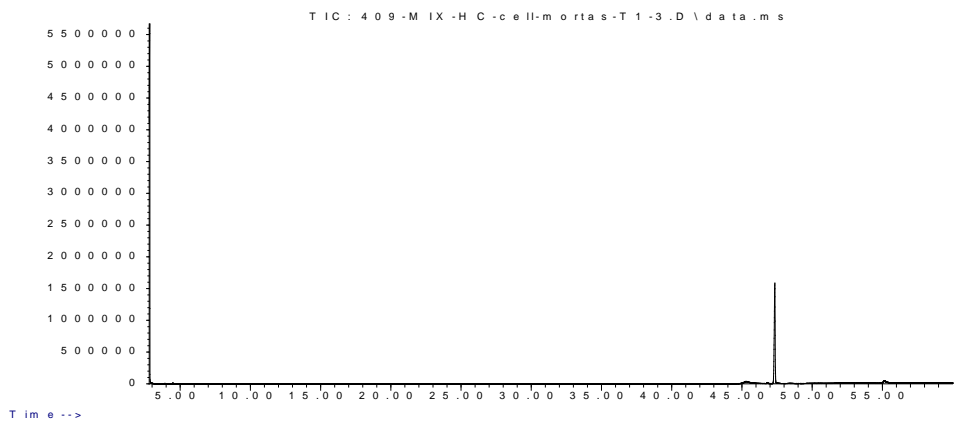
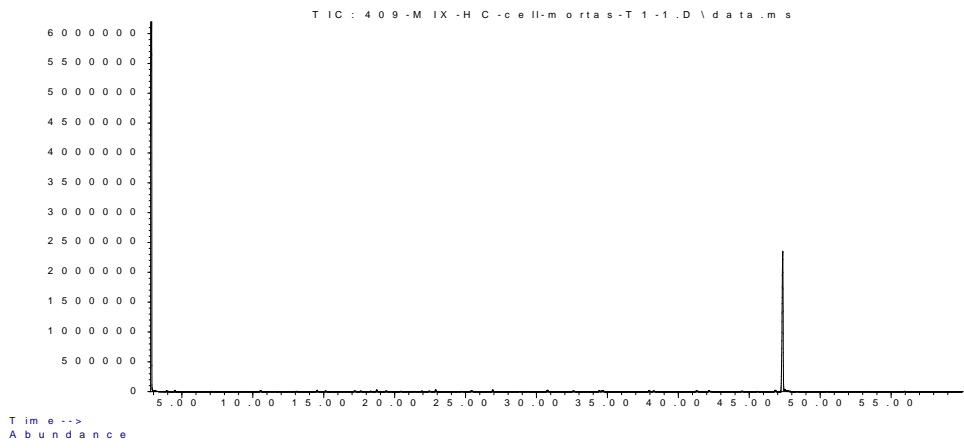
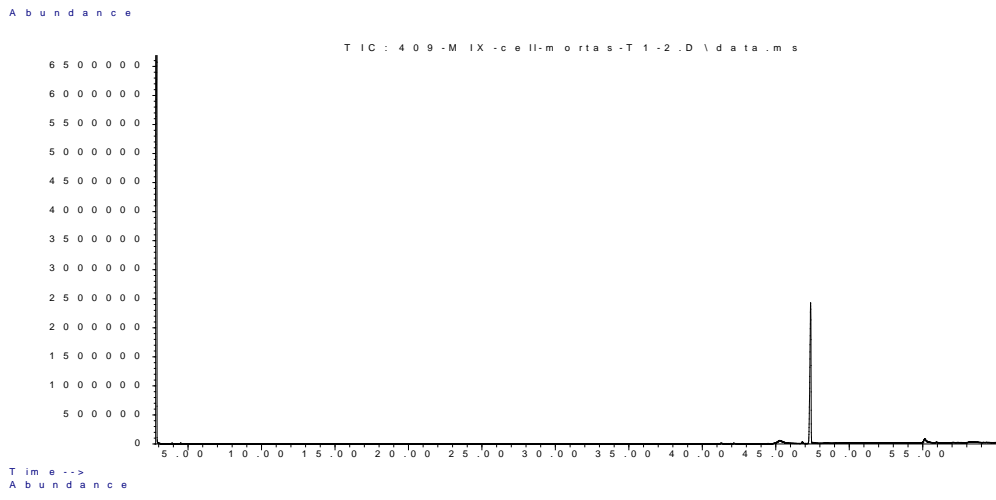
Time-->

Abundance



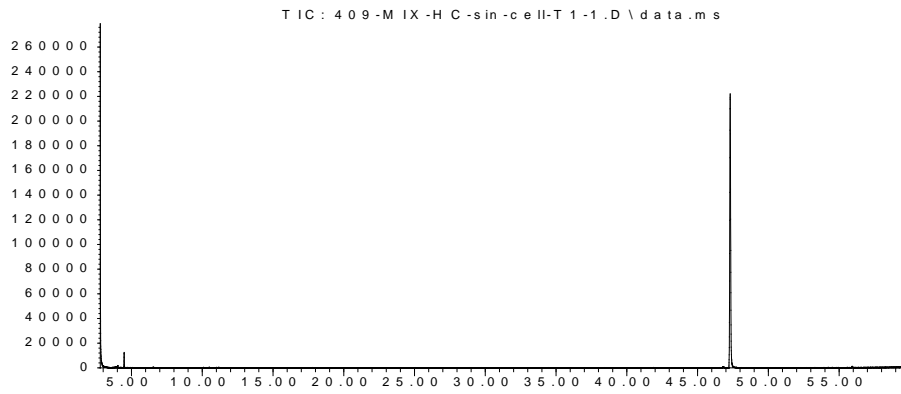
Time-->

Anexo 22. Cromatograma muestras de T-1 por triplicado de Mix con células muertas.

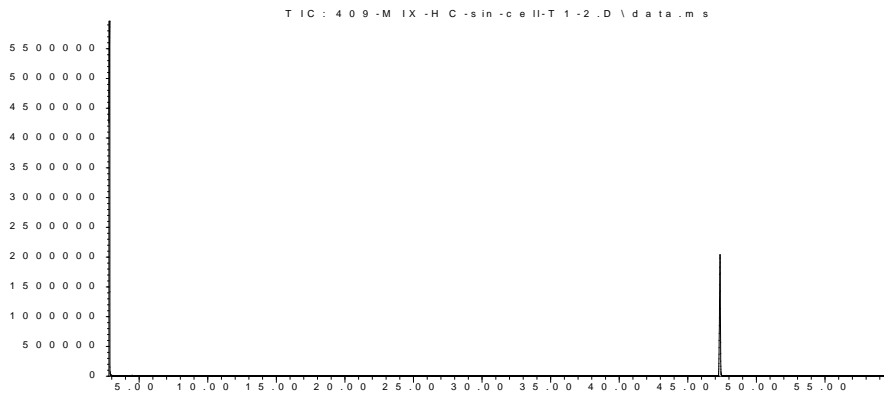


## Anexo 23. Cromatograma muestras de T-1 por triplicado de Mix sin células.

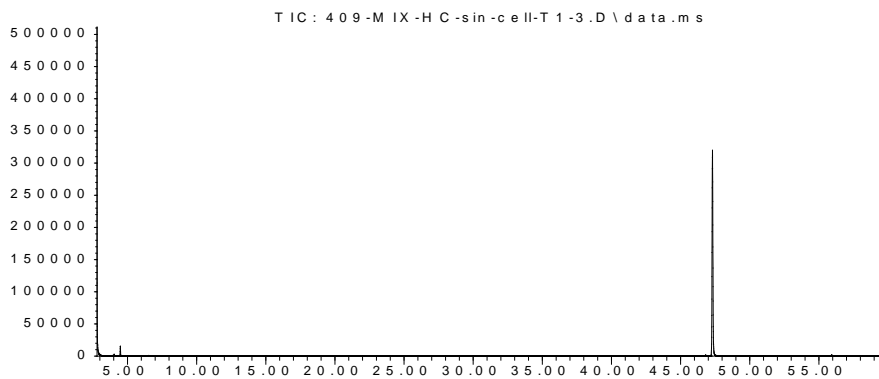
Abundance



Abundance

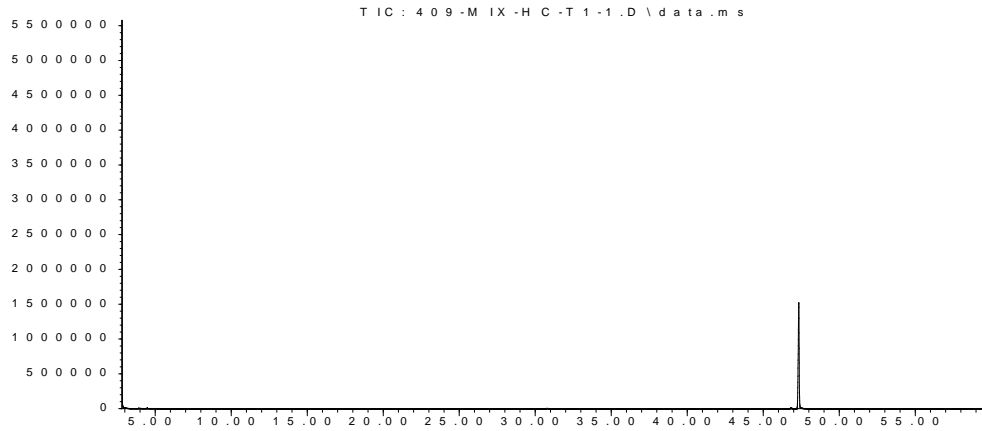


Abundance

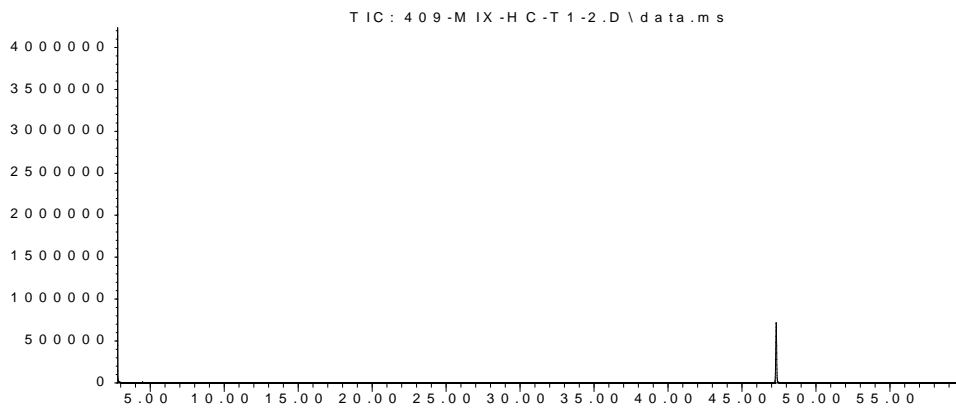


## Anexo 24. Cromatograma muestras de T-1 por triplicado de Mix con células 409a.

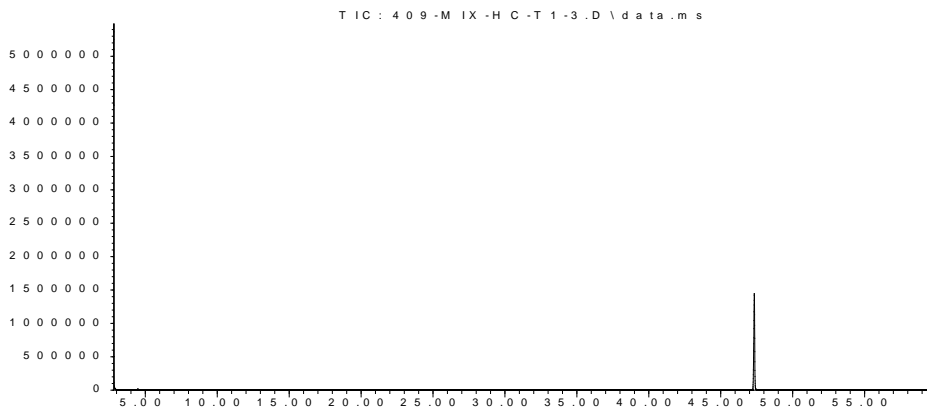
Abundance



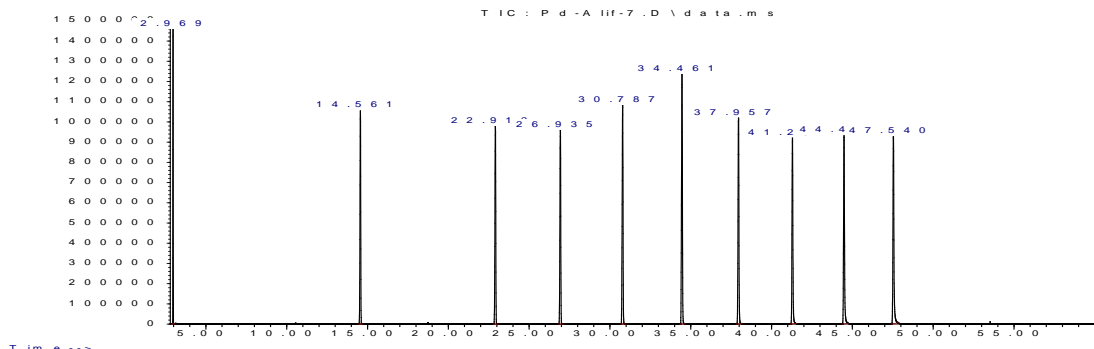
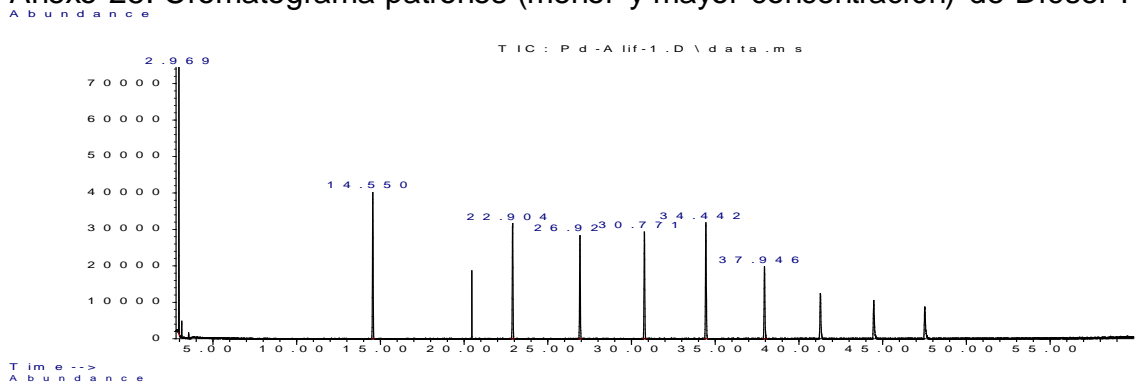
Abundance



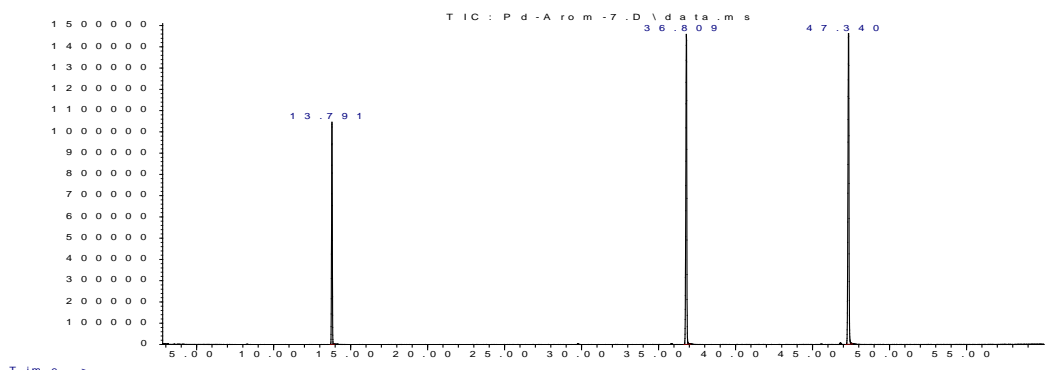
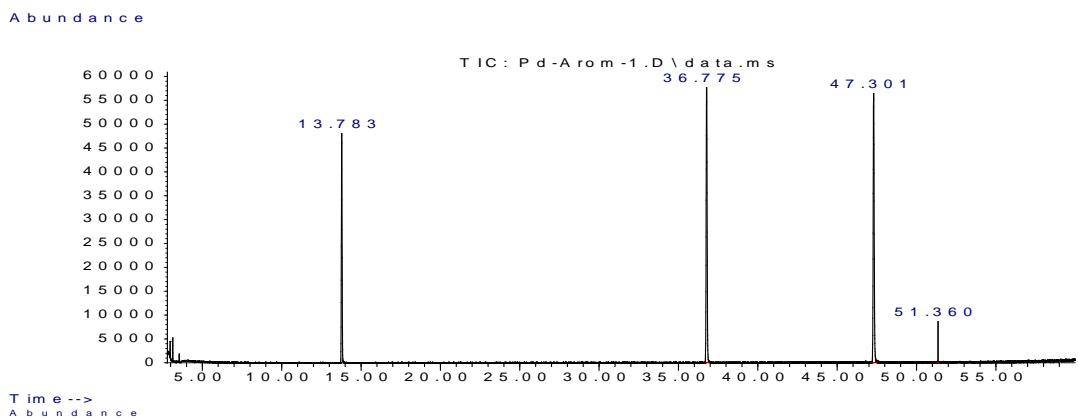
Abundance



### Anexo 25. Cromatograma patrones (menor y mayor concentración) de Diésel T-1.



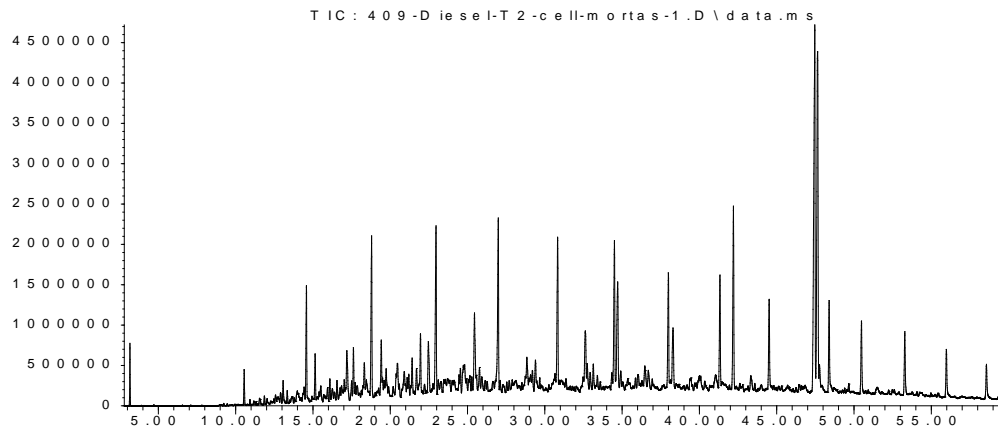
### Anexo 26. Cromatograma patrones (menor y mayor concentración) de Mix T-1.





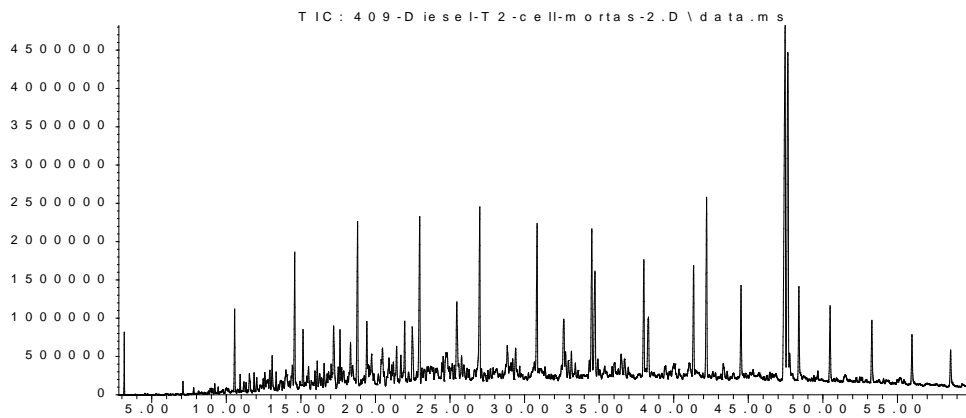
## Anexo 27. Cromatograma muestras de T-2 por triplicado de Diesel con células muertas.

Abundance



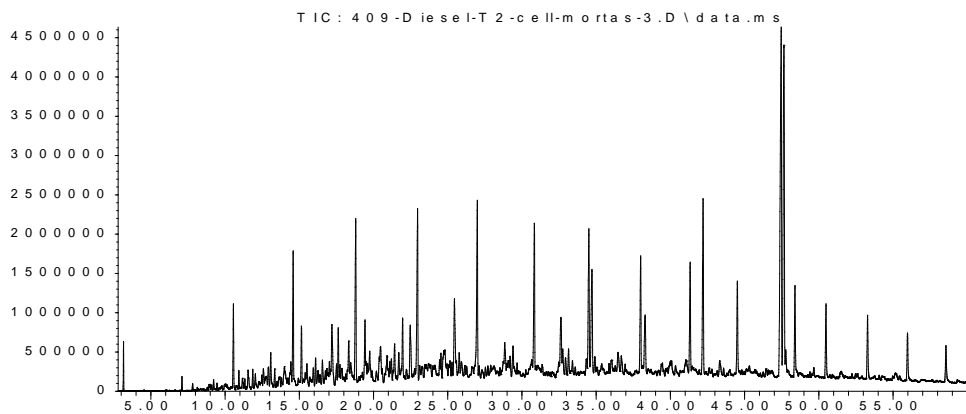
Time-->

Abundance



Time-->

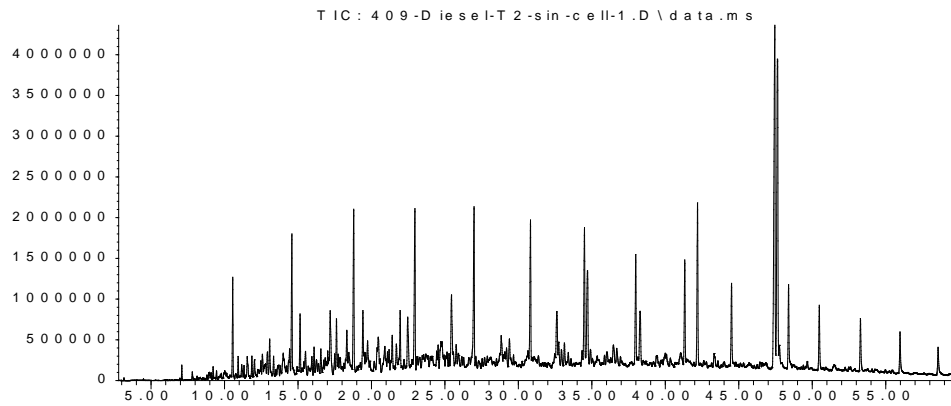
Abundance



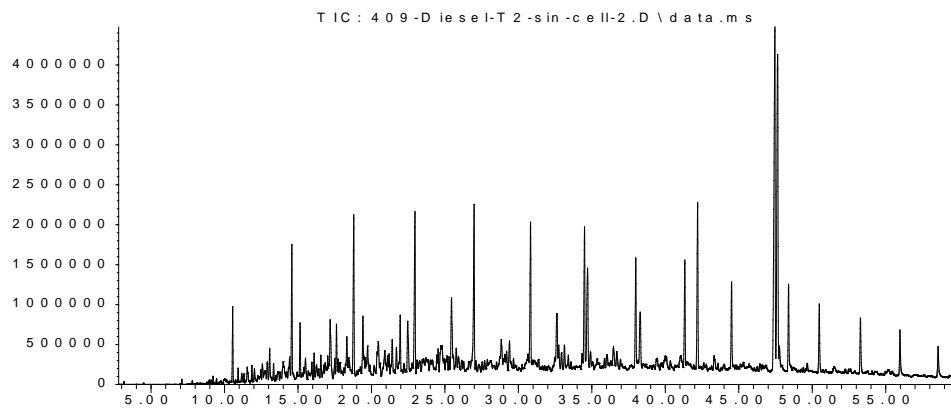
Time-->

## Anexo 28. Cromatograma muestras de T-2 por triplicado de Diesel sin células.

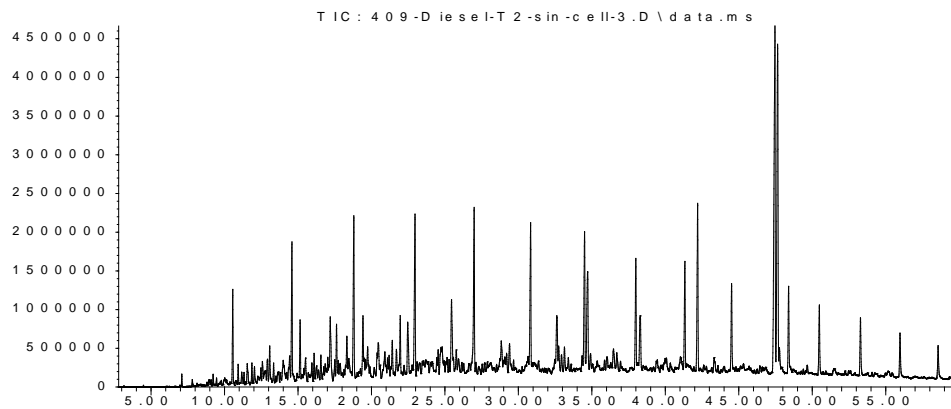
Abundance



Time-->  
Abundance



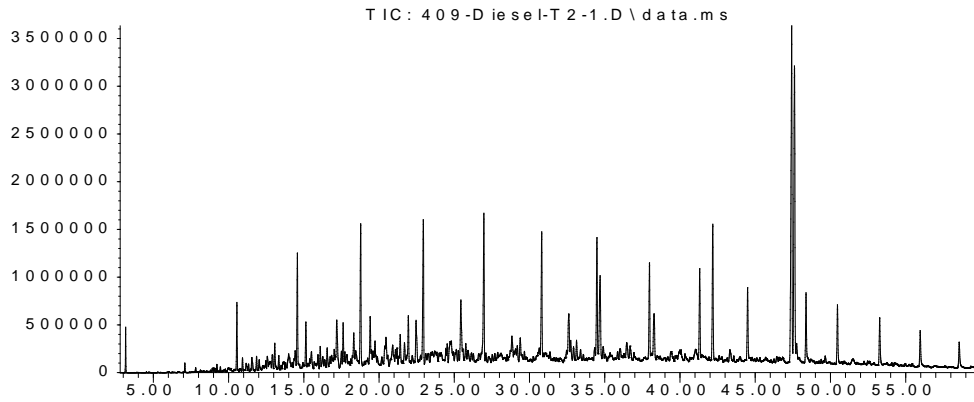
Time-->  
Abundance



Time-->

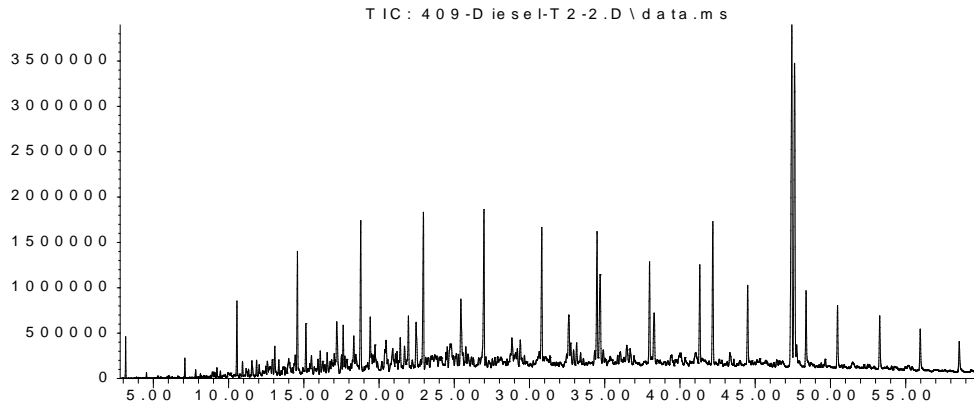
# Anexo 29. Cromatograma muestras de T-2 por triplicado de Diesel con células 409a.

Abundance



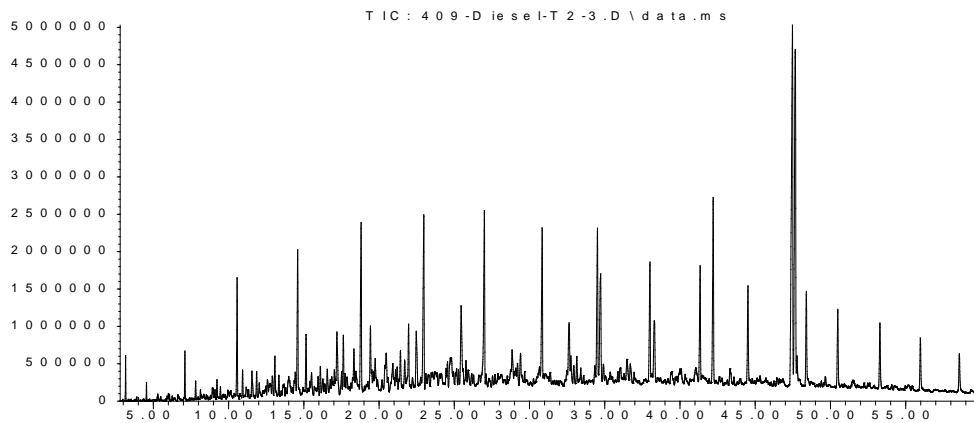
Time-->

Abundance



Time-->

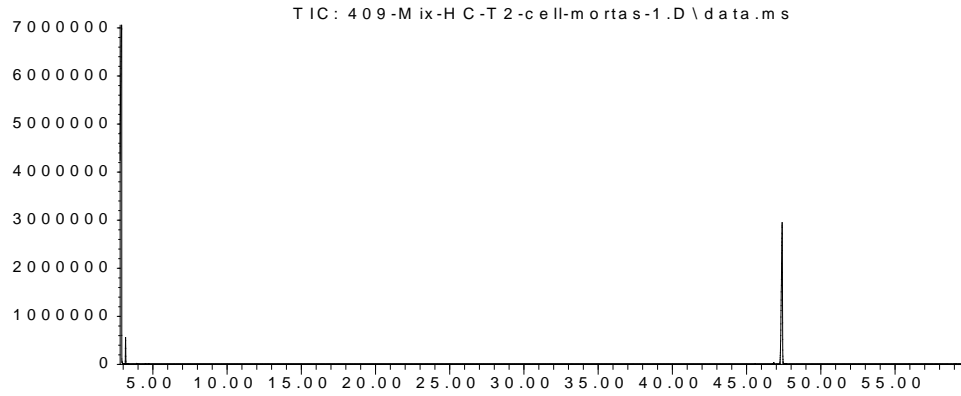
Abundance



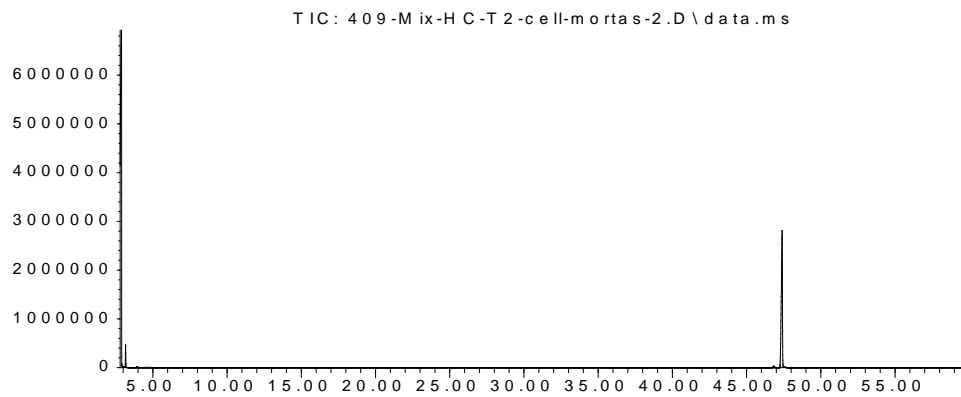
Time-->

Anexo 30. Cromatograma muestras de T-2 por triplicado de Mix con células muertas.

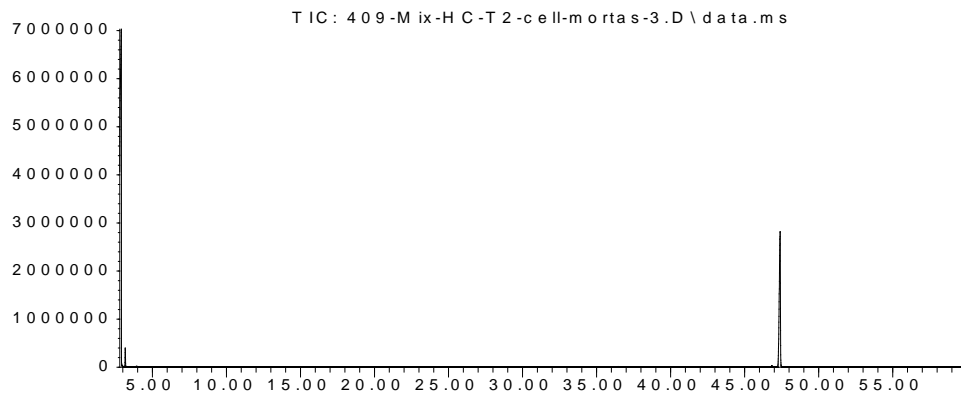
Abundance



Time-->  
Abundance

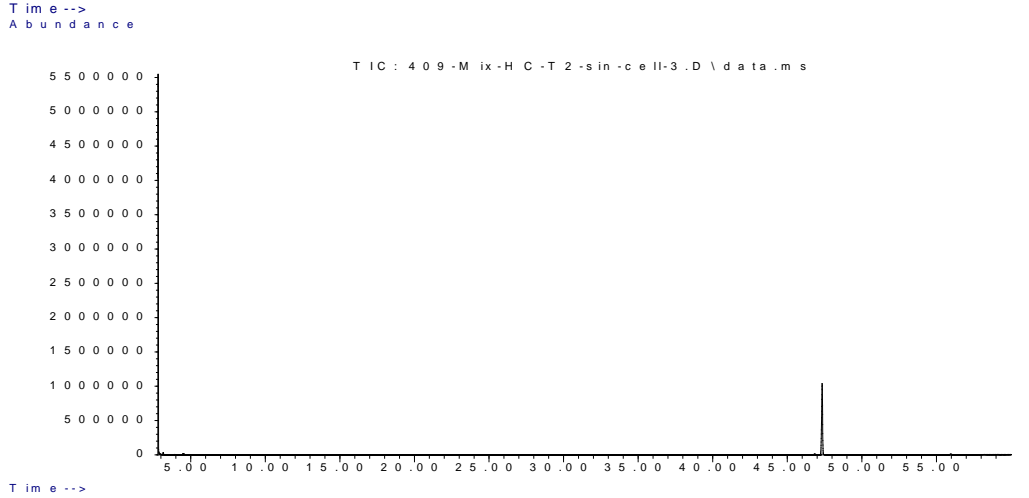
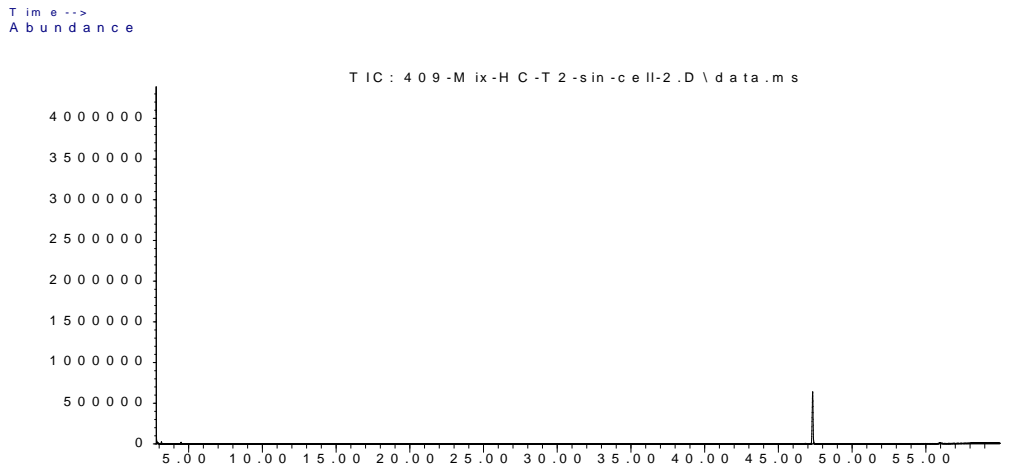
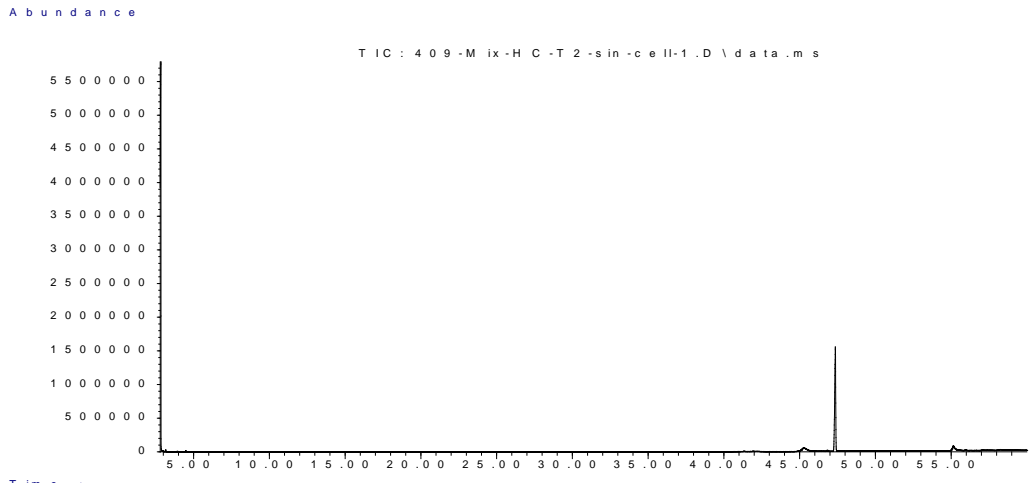


Time-->  
Abundance

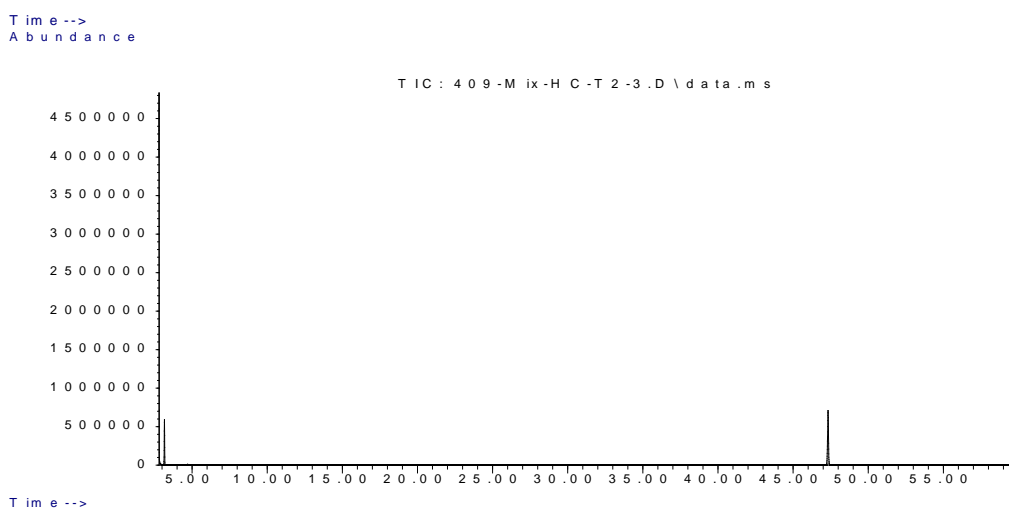
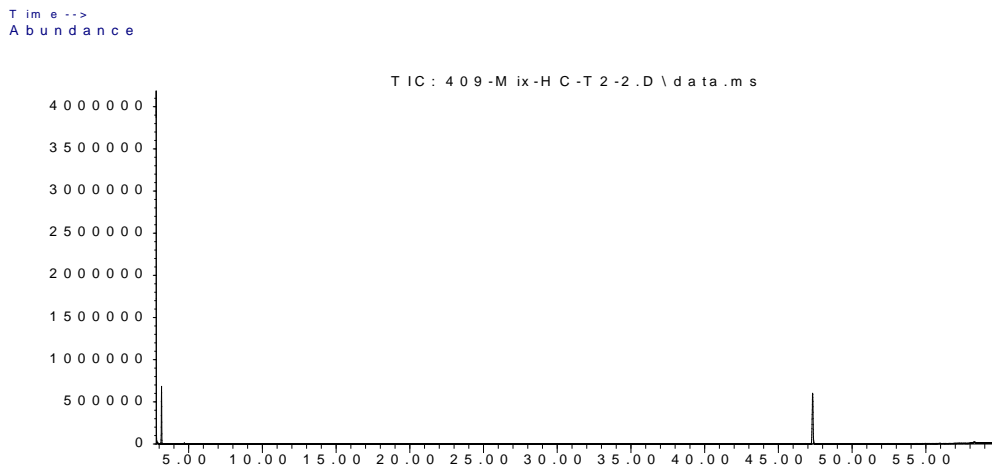
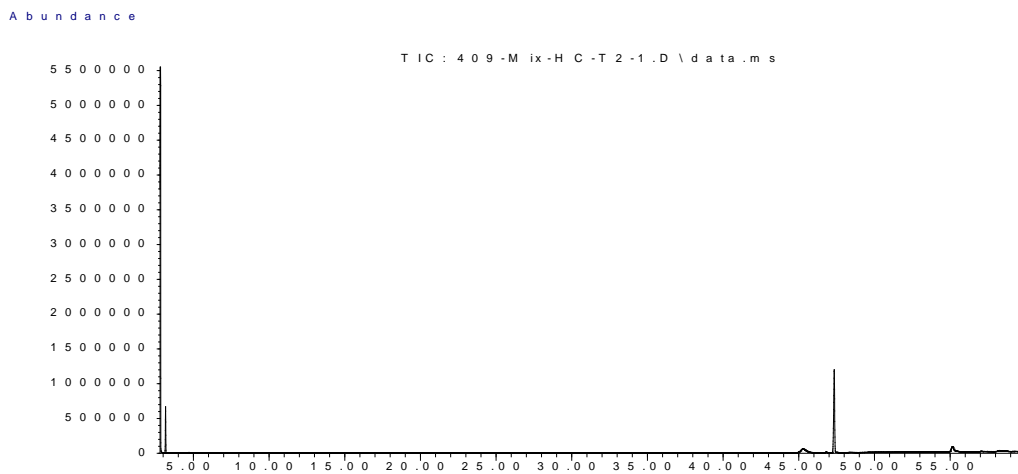


Time-->

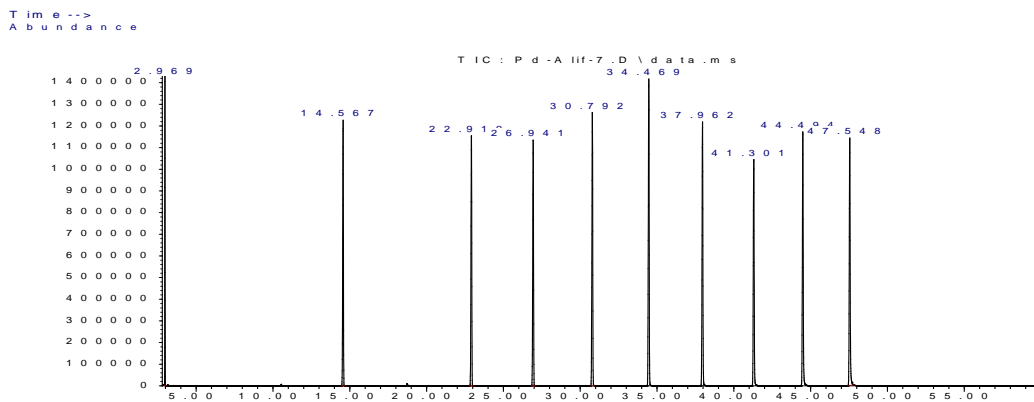
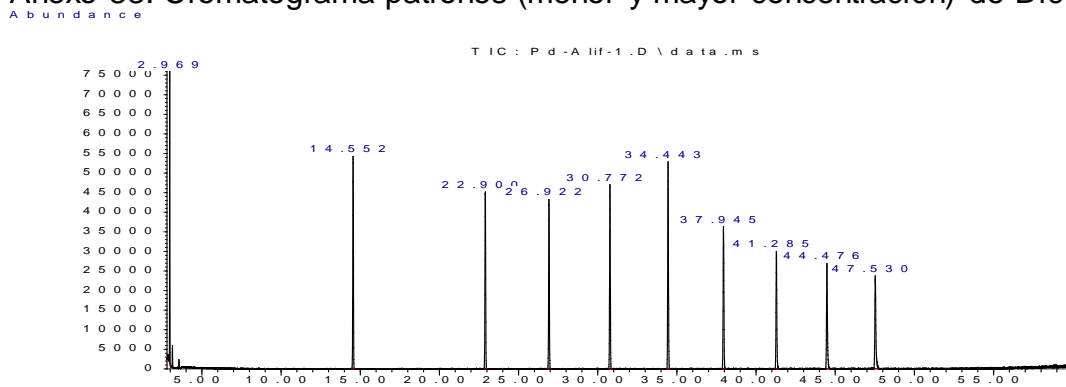
# Anexo 31. Cromatograma muestras de T-2 por triplicado de Mix sin células



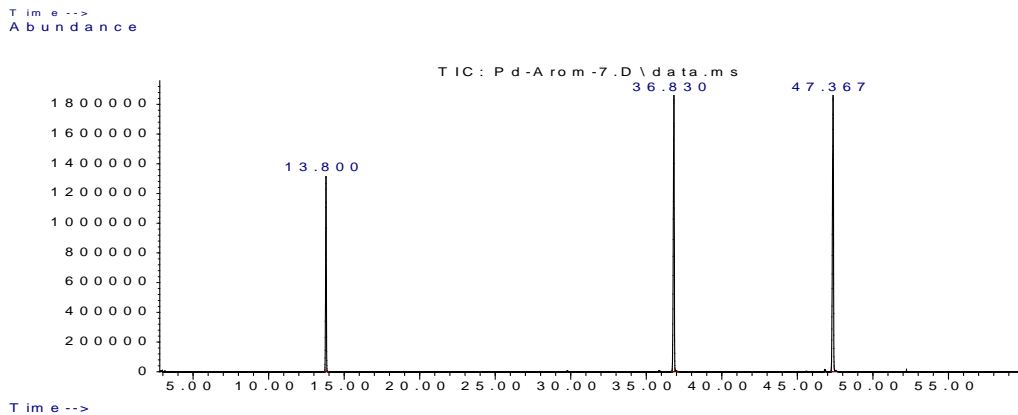
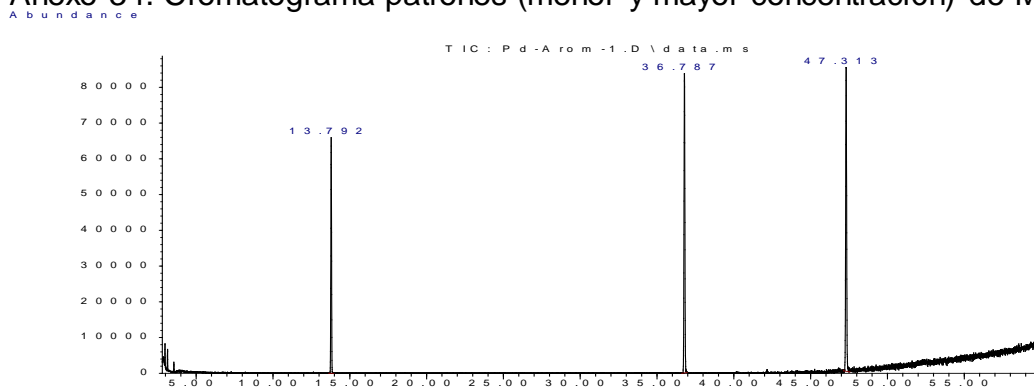
Anexo 32. Cromatograma muestras de T-2 por triplicado de Mix con células 409a.



### Anexo 33. Cromatograma patrones (menor y mayor concentración) de Diésel T-2.

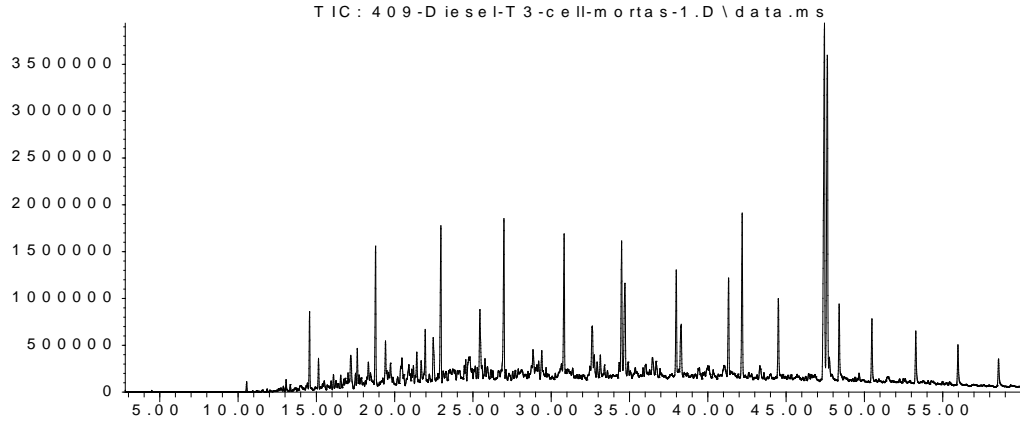


### Anexo 34. Cromatograma patrones (menor y mayor concentración) de Mix T-2



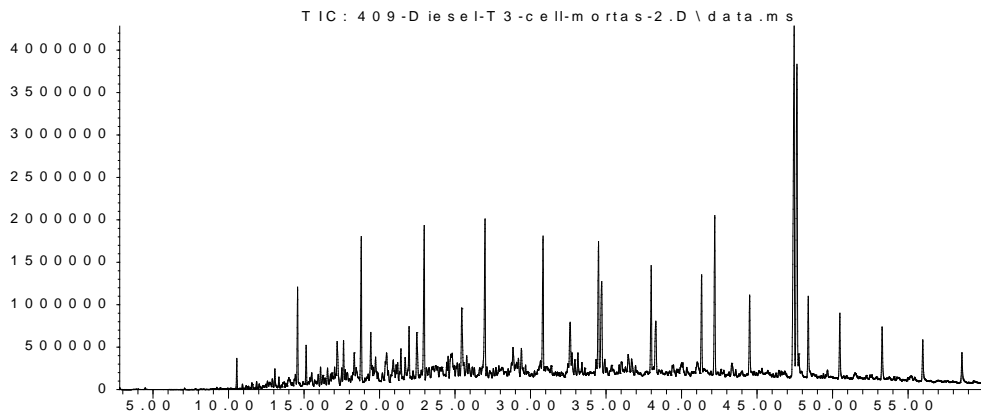
Anexo 35. Cromatograma muestras de T-3 por triplicado de Diesel con células muertas.

Abundance



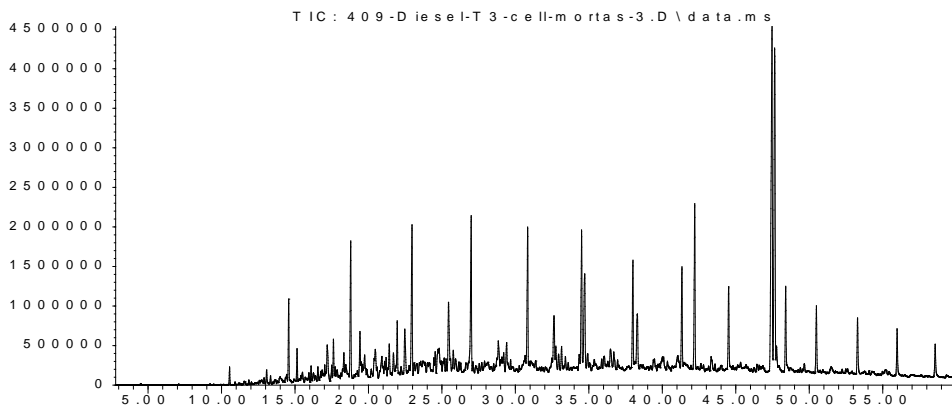
Time-->

Abundance



Time-->

Abundance

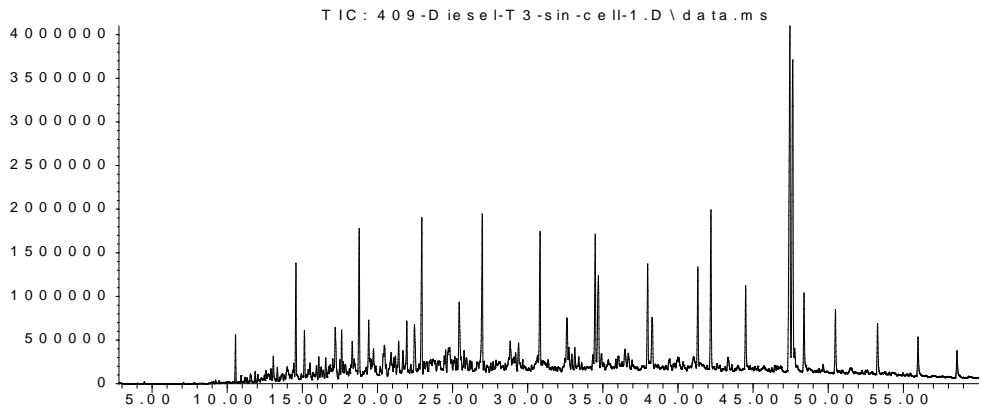


Time-->

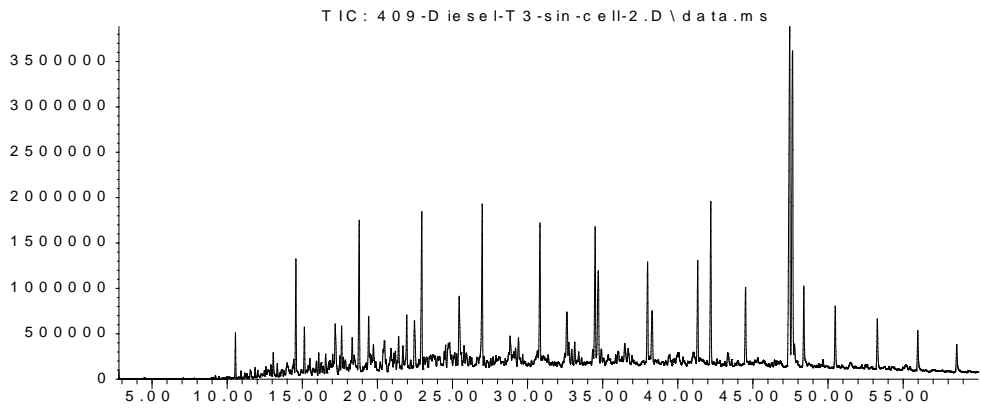


# Anexo 36. Cromatograma muestras de T-3 por triplicado de Diesel sin células.

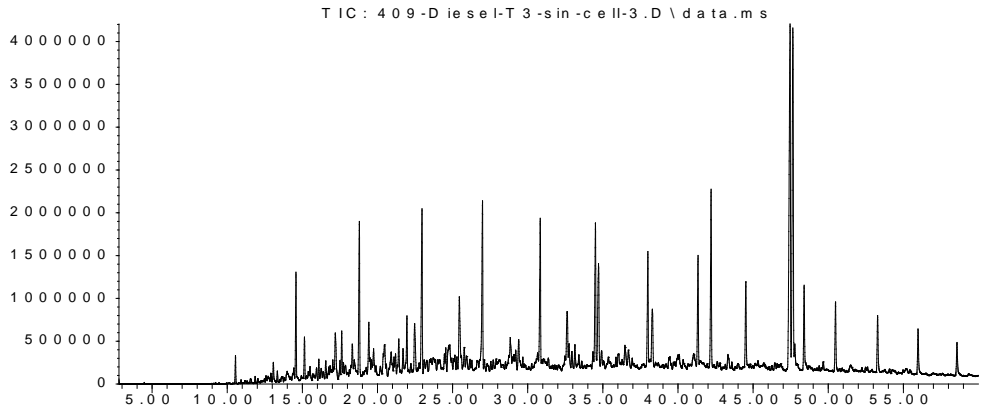
Abundance



Time-->  
Abundance



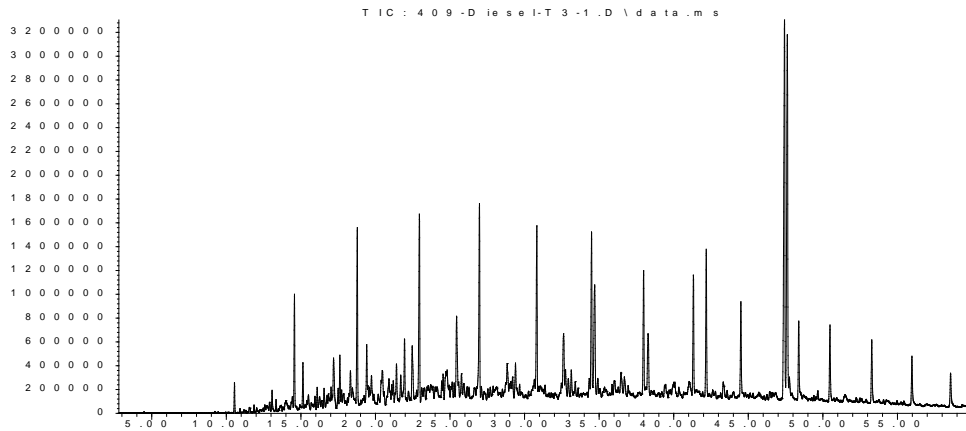
Time-->  
Abundance



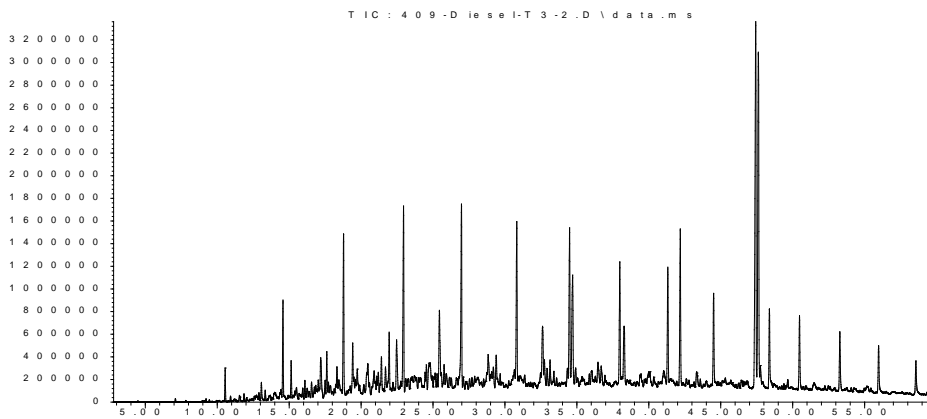
Time-->

# Anexo 37. Cromatograma muestras de T-3 por triplicado de Diesel con células 409a.

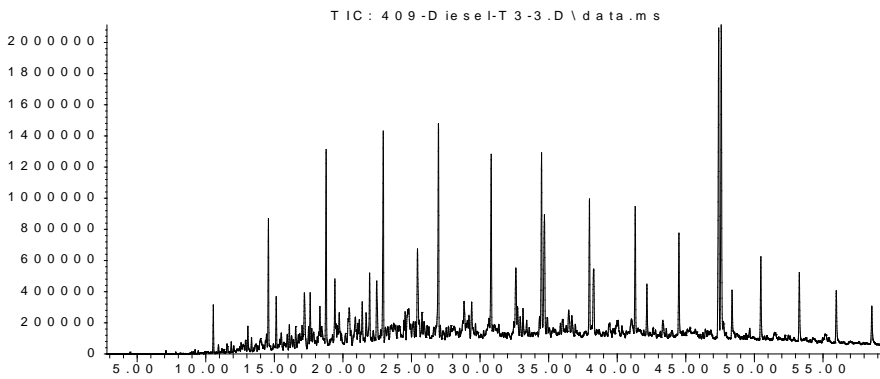
Abundance



Time -->  
Abundance

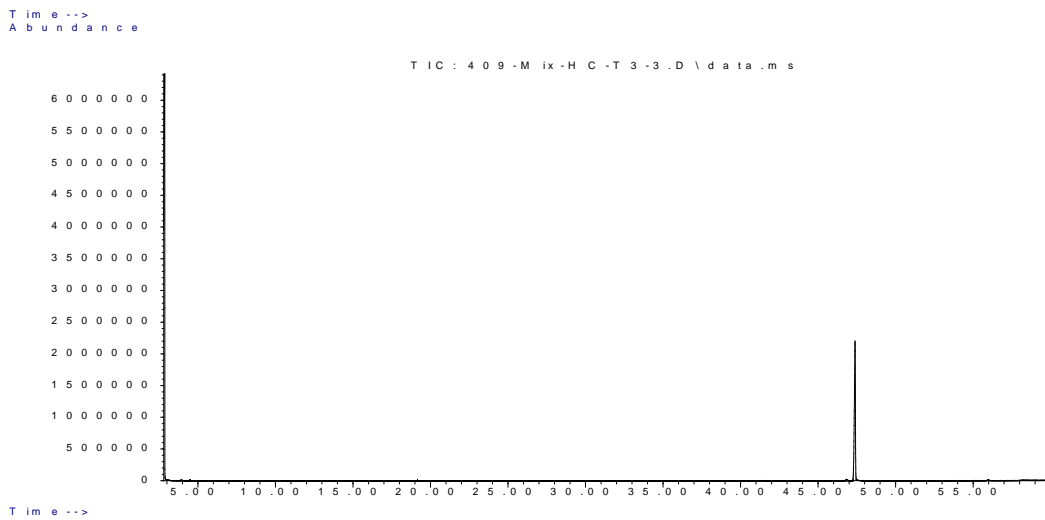
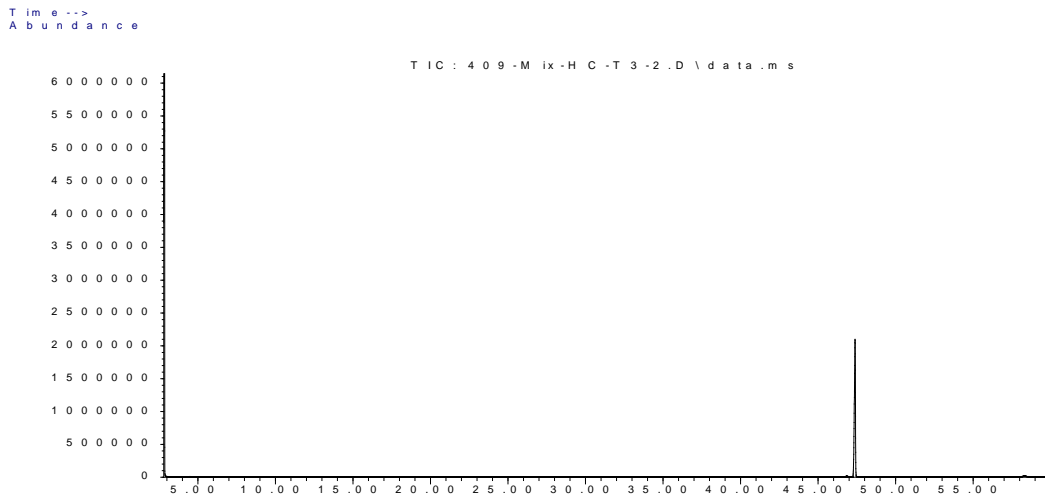
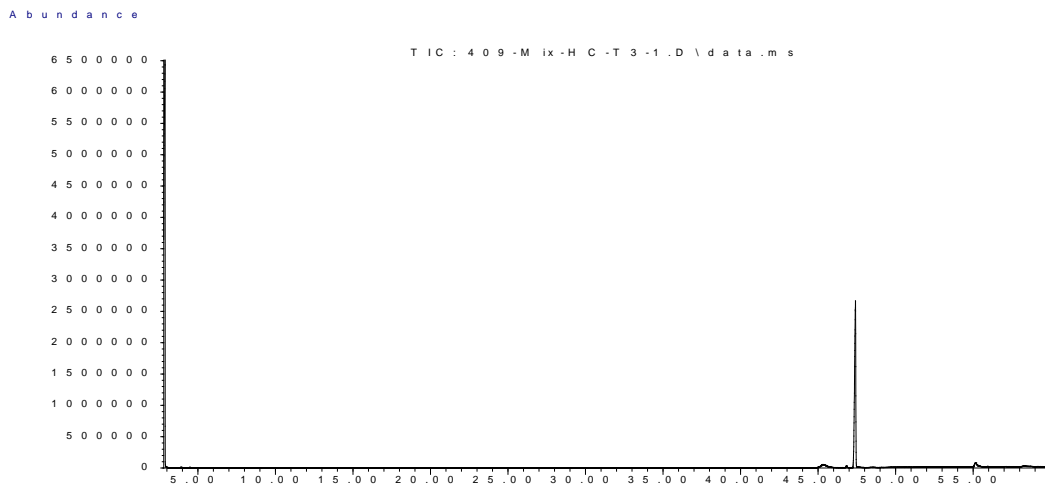


Time -->  
Abundance



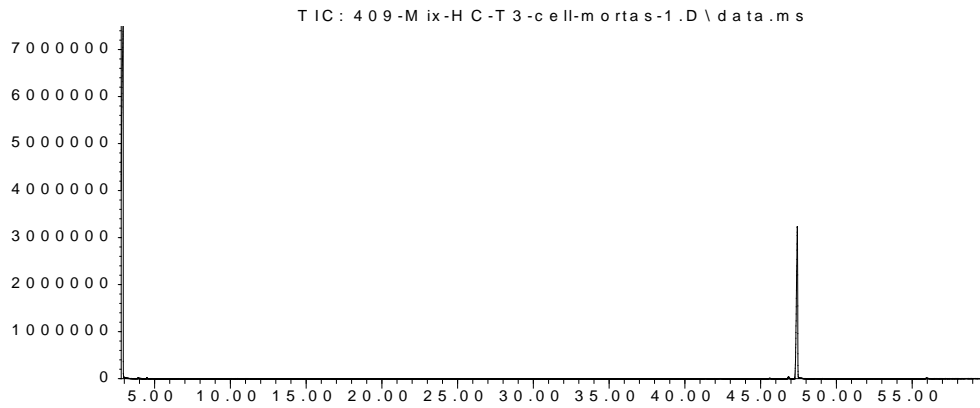
Time -->

Anexo 38. Cromatograma muestras de T-3 por triplicado de Mix con células muertas.

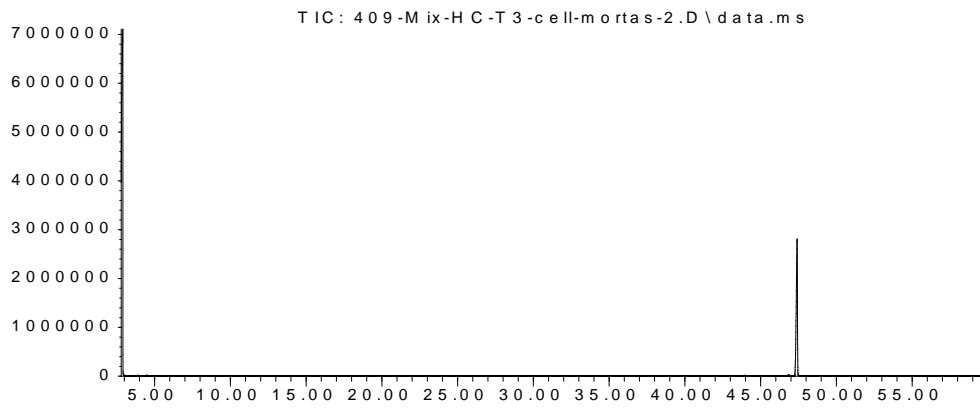


### Anexo 39. Cromatograma muestras de T-3 por triplicado de Mix sin células.

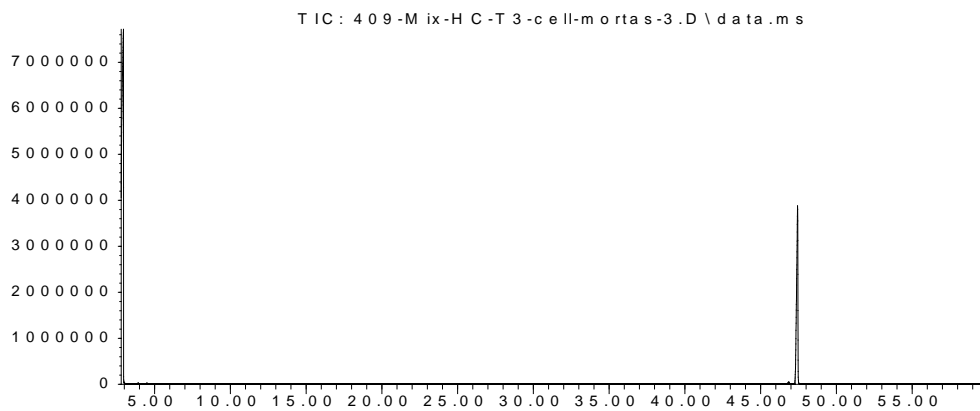
Abundance



Abundance

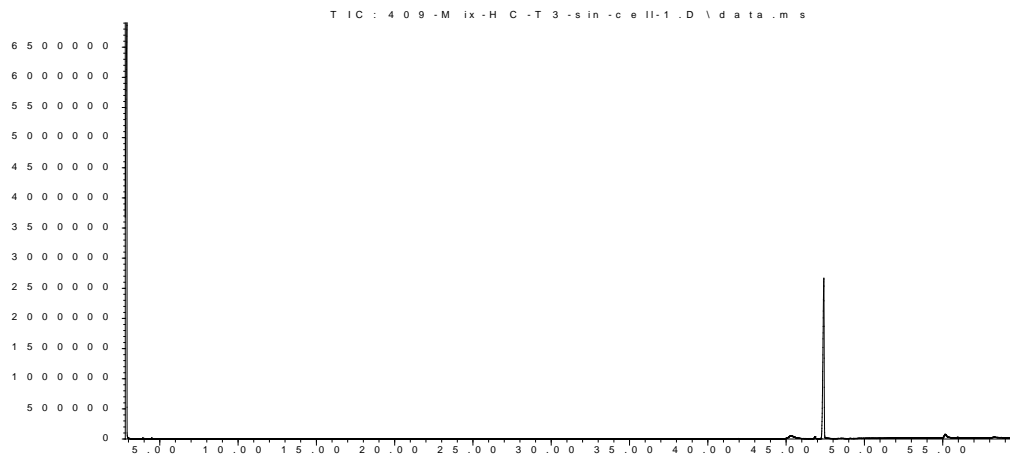


Abundance



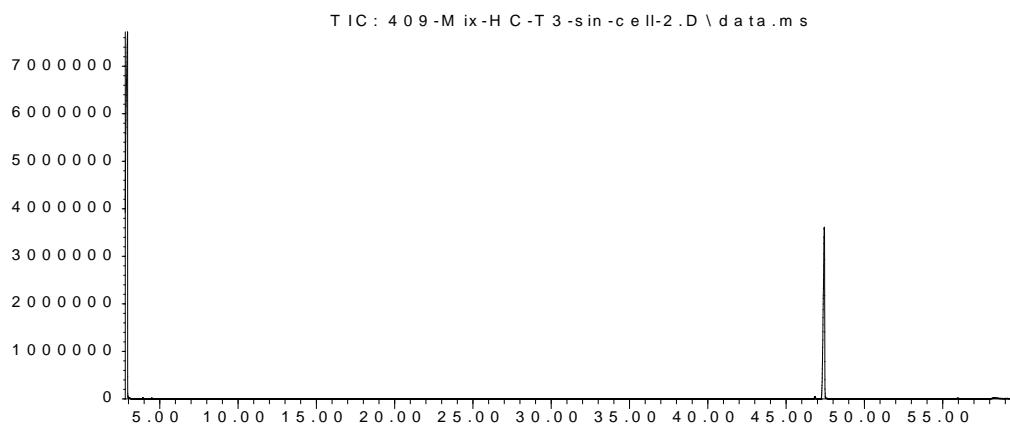
# Anexo 40 Cromatograma muestras de T-3 por triplicado de Mix con células 409a.

Abundance



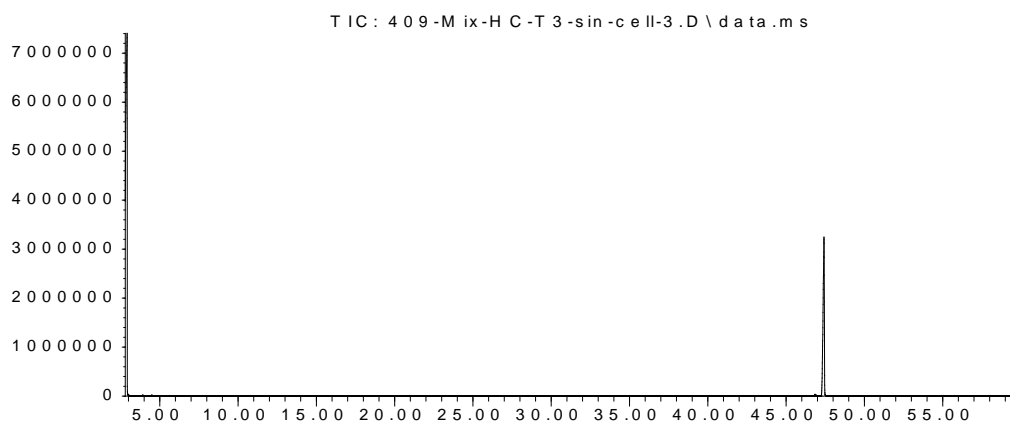
Time -->

Abundance



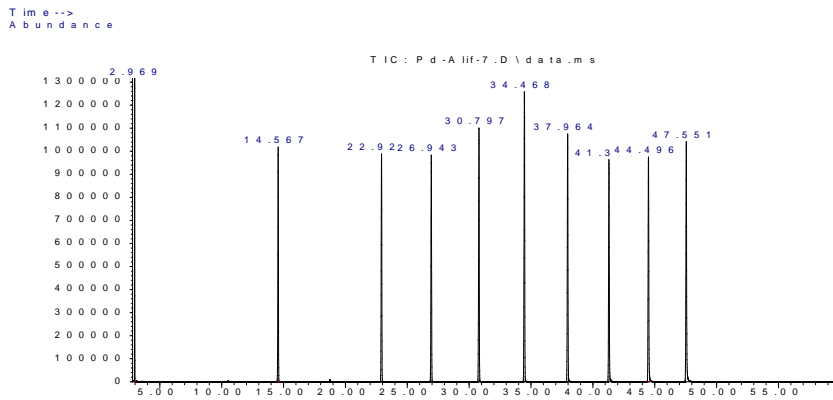
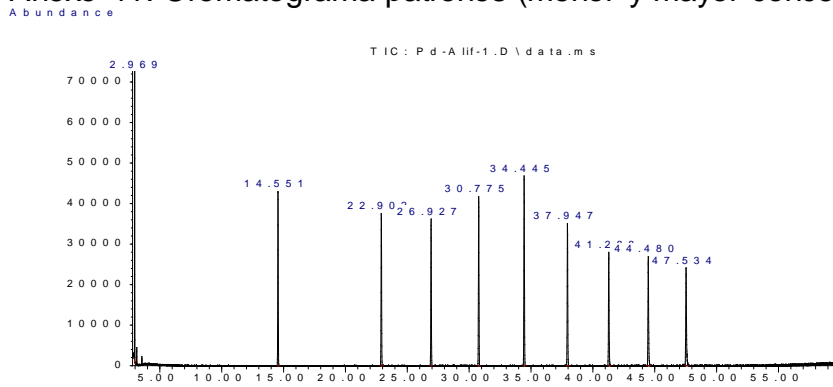
Time -->

Abundance

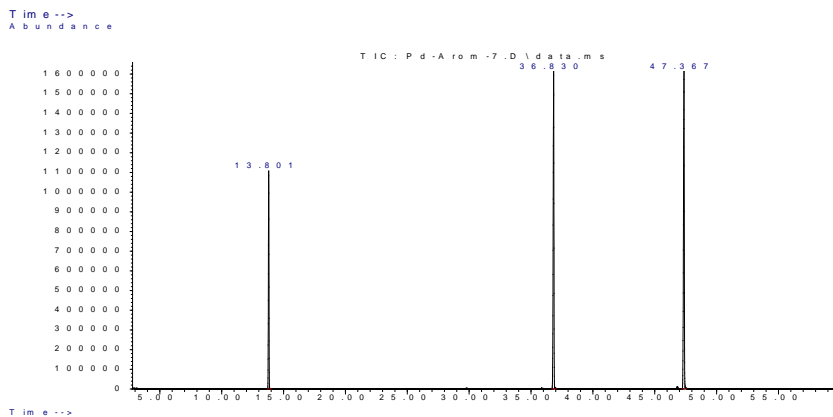
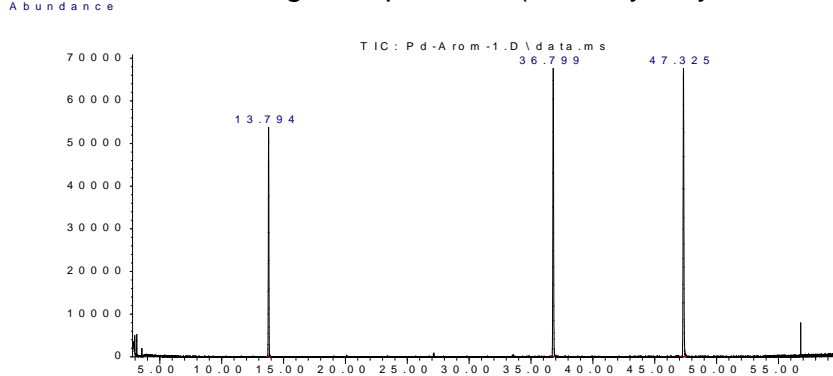


Time -->

### Anexo 41. Cromatograma patrones (menor y mayor concentración) de Diésel T-3.



### Anexo 42. Cromatograma patrones (menor y mayor concentración) de Mix T-3.



Anexo 43. Tabla con concentraciones de pireno con células muertas, pireno sin célula y pireno con 409a en los tiempos T-0, T-1 T-2, T-3.

	<b>T-0</b>	<b>T-7</b>	<b>T-14</b>	<b>T-28</b>
<i>Pireno-409a</i>	505,77005	375,8601448	199,6172572	647,184848
<i>Pireno-células muertas</i>	748,3232112	741,3209125	1185,55755	1034,801094
<i>Pireno-sin células</i>	790,9139105	285,5855488	267,6274009	1015,044404

Anexo 41. Tabla con concentraciones de los analitos dodecano, pentadecano, heptadecano, nonadecano, eicosano con células muertas, sin célula y con 409a en los tiempos T-0, T-1 T-2, T-3.

	<b>T-0</b>	<b>T-7</b>	<b>T-14</b>	<b>T-28</b>
<i>Dodecano-sin células</i>	1001,780248	1015,141778	937,4350578	574,7818392
<i>Dodecano-células muertas</i>	990,4791391	1034,428579	849,8431239	548,4853517
<i>Dodecano-409a</i>	695,3883304	732,5806271	722,9568825	408,435667
<i>Pentadecano-sin células</i>	1062,332339	1131,131804	1176,126857	1032,555601
<i>Pentadecano-células muertas</i>	1112,572242	1289,149903	1265,611787	1052,273821
<i>Pentadecano-409a</i>	926,4259101	978,9290423	921,3739928	821,4129605
<i>Heptadecano-sin células</i>	747,8995202	854,7577057	883,351434	771,6543151
<i>Heptadecano-células muertas</i>	784,1007122	922,0905978	933,8185575	792,1440644
<i>Heptadecano-409a</i>	653,8973012	725,5434612	659,4217992	616,5632924
<i>Nonadecano-sin células</i>	479,6261439	525,1968013	556,2876824	488,5416603
<i>Nonadecano-células muertas</i>	499,2973127	592,1472674	595,5934059	499,1487248
<i>Nonadecano-409a</i>	417,9059014	443,8217034	422,6308257	399,7018765
<i>Eicosano-sin células</i>	410,5976771	470,6030286	479,7854161	414,8563374
<i>Eicosano-células muertas</i>	426,333777	485,1505318	546,6079783	478,3331866
<i>Eicosano-409a</i>	328,8732967	376,3379338	390,3519256	355,1115152