



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Centro de Investigación en Biotecnología

"Prospección de organismos fúngicos aislados de sitios contaminados
para la remoción de derivados del petróleo"

T E S I S

Que para obtener el grado de
Maestro en Biotecnología.

Presenta:

Biol. Martín Romualdo Ide Pérez.

Director de Tesis:

Dra. María del Rayo Sánchez Carbente.

Junio 2020



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

Maestría en Biotecnología

Cuernavaca, Morelos a 5 de junio 2020.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dra. María del Rayo Sánchez Carbente (CEIB, UAEM)

Dr. Jorge Luis Folch Mallol (CEIB, UAEM)

Dr. José Augusto Ramírez Trujillo (CEIB, UAEM)

Dr. Ramón Alberto Batista García (CIDC, UAEM)

Dra. Liliana Pardo López (IBT, UNAM)

Tesis: **Prospección de organismos fúngicos aislados de sitios contaminados para la remoción de derivados del petróleo.**

Alumno que lo presenta a revisión: **Martín Romualdo Ide Pérez**

Programa: **Maestría en Biotecnología**

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE,

Dra. María del Rayo Sánchez Carbente



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MARIA DEL RAYO SANCHEZ CARBENTE | Fecha:2020-06-08 14:43:39 | Firmante

Vxl/JzK/XjAPYY/HQ0FV0SfBTN3sYQu01ycVlvhwCa8TCAtKWxv+V7U7d1JL7sqGooeC62gTDaCMgR0CiMpVYxcHTKdNI+gbVNvfvHQmbFeRhfarsRuEq1EaOwtVhxhF3UCzjL
D9iHJecsG2jIHp2ndB9lXp+ImtoRLUR/XBDPzprk6M30GQgpFNZEF/pY3A6GQfVSTywKMXGNJINEJEidtqwkUxwYRMj6l+q7pH58sWp3g3TRFX/uAlkGBYjr2mm+DZ/Yq1Biw+k
11Cs9RTehBMY80mZVq3HiSGxK7JID9ghdOZEXBU4cwbdw3ZW8BGpPg86xs302h3VoCaK3BREQ==



Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:

[Wq9G8J](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/ORVn6uKEJPqwjBDhQhX1kUC6OICTYgs4>

UA
EM

Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

Maestría en Biotecnología

Cuernavaca, Morelos a 5 de junio 2020.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dra. María del Rayo Sánchez Carbente (CEIB, UAEM)

Dr. Jorge Luis Folch Mallol (CEIB, UAEM)

Dr. José Augusto Ramírez Trujillo (CEIB, UAEM)

Dr. Ramón Alberto Batista García (CIDC, UAEM)

Dra. Liliana Pardo López (IBT, UNAM)

Tesis: Prospección de organismos fúngicos aislados de sitios contaminados para la remoción de derivados del petróleo.

Alumno que lo presenta a revisión: **Martín Romualdo Ide Pérez**

Programa: **Maestría en Biotecnología**

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE,

Dr. Jorge Luis Folch Mallol



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

JORGE LUIS FOLCH MALLOL | Fecha:2020-06-08 15:37:18 | Firmante

bvmbxBgLqFM+33Nmu8Ioz/Pi4uP9W4MgGT9HqmyDTsXawXbjYAFxa+esq/4+ZGZpDM41BFp6PG9z0yolXeTr1PXXR0p8vfiKIWoXXLQ3jCY+Vn5MfsulfHAI7QgyR KSXgXJDPJ
Foq5G28DQf11hH3WU1DYq96L7t87rllLzEPNC8F8u/n7ikx9EK/xPgsMXrn9IHXEYtbQe0YRVQeizbsZHgVltYfKftE4r8iYnRveWzX+iVnetIHnfeU/MH2Jp8bewM22PvbzUjVEjIXfZ
AimHqTwoFFklcBPSava/Cut7SOfkLn6EIMLwmG6igsTyVCW7m0lfXEmFHBocx44JpQ==



Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:

[gfUpLC](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/RQxOZCewjstEXjYd4GJyxWBULMIXUIEn>





Cuernavaca, Morelos a 5 de junio 2020.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dra. María del Rayo Sánchez Carbente (CEIB, UAEM)

Dr. Jorge Luis Folch Mallol (CEIB, UAEM)

Dr. José Augusto Ramírez Trujillo (CEIB, UAEM)

Dr. Ramón Alberto Batista García (CIDC, UAEM)

Dra. Liliana Pardo López (IBT, UNAM)

Tesis: Prospección de organismos fúngicos aislados de sitios contaminados para la remoción de derivados del petróleo.

Alumno que lo presenta a revisión: **Martín Romualdo Ide Pérez**

Programa: **Maestría en Biotecnología**

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE,

Dr. José Augusto Ramírez Trujillo



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

JOSE AUGUSTO RAMIREZ TRUJILLO | Fecha:2020-06-08 15:13:03 | Firmante

zQbF7qY02NZfAgjsUgu6Oa7AXut63oGtXVQqt2DMIV4b8wuA6mY3idloYyURQdmZx7RhXGUjM0jDR2qpvZzOxydwSVenzREovv6rTLS7rB4cBLF4PowMjTxeIIBTLMu8+hFEt/Fp
yYyqZBLeuFv4zjeSO4A2iB5clwr1mwgmQHgZfdgZVDQnFCd0ZmKh900+8TiMFB2EpQAWvfcI5OPTqkLU0jL5a2QcfDjgN01k8HpK1PMn0UIITQbuwwAJvFjNxEztQr/ugv6C1AXB
TJtxZNzySrjwlthgFcGCjxWI2l+ZssDEg5Knenq1TKY1+ngjrPya/2lzmF/RQR9UXlg2A==



Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:

[ykZXLO](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/EMyi0K7hgYWnBTXNn5HAsZosEsFKjAXR>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

Maestría en Biotecnología

Cuernavaca, Morelos a 5 de junio 2020.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dra. María del Rayo Sánchez Carbente (CEIB, UAEM)

Dr. Jorge Luis Folch Mallol (CEIB, UAEM)

Dr. José Augusto Ramírez Trujillo (CEIB, UAEM)

Dr. Ramón Alberto Batista García (CIDC, UAEM)

Dra. Liliana Pardo López (IBT, UNAM)

Tesis: Prospección de organismos fúngicos aislados de sitios contaminados para la remoción de derivados del petróleo.

Alumno que lo presenta a revisión: **Martín Romualdo Ide Pérez**

Programa: **Maestría en Biotecnología**

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE,

Dr. Ramón Alberto Batista García



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

RAMON ALBERTO BATISTA GARCIA | Fecha:2020-06-08 15:42:20 | Firmante

K/fGwTVIO2ebsWa/cLeHHC+sfUEYyCCdstFeHctXTdKQ4E2deyPUfSAkBPk8ZGRMcf2ogZ178aOso3qjDbcLVerQArhgytD0rKjgl5OYqAcWMoxBhQ35HaVTT1p4vusW7qitjuW8B0s8GYyc9hyB8ZcRuOaYkbrMtijlET+/T4TeYsnZ8scHMuwW1bYnuxxtB0ldq5Lt/MfGPU3jd6iUkUnkSenVhyueFwPjyfuT5xVGVnnOF1UH8bgxufcv0ZA0qJ+ 7xKhZcH6Ww/AgC

/vEMm12tWuvllp+PzV2bSE9sl45REwnW/P7vzjLckMquWfuPs+an1vEFzBOCUU2thS6Q==



Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:

gmDECj

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/i47SqNvogV8vPWT8AJLkD8kPu2nL10gK>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

Maestría en Biotecnología

Cuernavaca, Morelos a 5 de junio 2020.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dra. María del Rayo Sánchez Carbente (CEIB, UAEM)

Dr. Jorge Luis Folch Mallol (CEIB, UAEM)

Dr. José Augusto Ramírez Trujillo (CEIB, UAEM)

Dr. Ramón Alberto Batista García (CIDC, UAEM)

Dra. Liliana Pardo López (IBT, UNAM)

Tesis: **Prospección de organismos fúngicos aislados de sitios contaminados para la remoción de derivados del petróleo.**

Alumno que lo presenta a revisión: **Martín Romualdo Ide Pérez**

Programa: **Maestría en Biotecnología**

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE,

Dra. Liliana Pardo López



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

LILIANA PARDO LÓPEZ | Fecha:2020-06-08 18:40:42 | Firmante

nlvblZeVMNWUTb2qe/mTGSZHNJNRCS/IS8TyDbw5J5itMyaA5NyMiZrSJs2CdcLawsRoX7UgBCI0xnVKxVVoHJkivcFXILXk78knkk2pUf5yYbLIWwd59yPc2ffMBJlyMMHPRngvy
En4K2SYKPkFE/lamnpJ2V4ick5SDNS2iEFyg/IY0aYJf5R1abWN4Dv/rezPm/LSA0AcQxwo1n4Giv/9+MACYcl07pT5n1npFc3GA0d17IGI/YUvg3560ODy8bZCZ/9OCeXQ5lc8HV
QSIXfWoQRffuQr5A7S0S04kZ4uBnjOudCvvNmdLUOmYM21DYr7kSBbSpo4o1NbZiYO2Q==



Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:

[DAdiyX](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/3fcpYddITKTAy7IB2Po3OONSId0U1K6J>



Dedicatoria:

A mi amada madre y a mí querido padre...
Al amor de mi vida Ana Gabriela Estrada Almeida...
A mi tíos ...
A mi hermanita Guadalupe Sinaí Ide Pérez...
A mi segunda madre Leónides Pérez Alvarado...
A mis abuelos...
A la Dra. María del Rayo y al LBMH CEIB...

Agradecimientos:

Este trabajo surgió gracias al apoyo que me han brindado muchas personas que son importantes en mi vida y que al día de hoy estimo muchísimo. Agradezco a todos quienes me prestaron su apoyo y atención, principalmente al Dr. Ayixon (IBT), Dr. Alfonso (CCG) y al Dr. Maikel (CEIB) que me brindaron apoyo moral y me compartieron de sus conocimientos para poder resolver muchos problemas que se me presentaron en la tesis. Agradezco al apoyo y amistad brindada por mis compañeros agradezco principalmente a Eya, Giovanni, Ricardo, Jasiel y Laura. También agradezco mucho a la maestra y técnico del laboratorio Roció por brindarme su apoyo y material del laboratorio aun en sus días de descanso.

Una de las personas por la cual estaré infinitamente agradecido es la Dra. María del Rayo Sánchez Carbente directora de este proyecto y que aprecio mucho, por todo el apoyo que me brindo y la paciencia que tuvo para encaminarme y darme las herramientas para mi formación como futuro investigador, de la misma manera agradezco al Dr. Folch por su toda su ayuda brindada.

Agradezco a mi comité evaluador por brindarme de sus conocimientos y siempre estar pendientes de mis avances.

Agradezco a mi familia, principalmente a mi tía-madrina y segunda madre Leónides Pérez a mis tíos José y Gelly por todo el apoyo personal que me brindaron, agradezco también a mis primitos joselin, Aylin, y a saulito que aun siendo niños siempre se interesaban por lo que hago, le agradezco a mi padre y mi hermana por estar pendientes de mí en varios aspectos. Agradezco mucho a la niña de mis ojos, mi amada esposa Ana Gabriela, por su amor apoyo y comprensión dados sobre todo en momentos difíciles. Y sobre de todo agradezco que a mi madre, la persona que me ha enseñado a ser un hombre de bien y de nunca rendirse por más difíciles que sean las cosas.

Agradezco a CONACYT por la beca otorgada.

Índice

1. Marco teórico.....	1
1.1. Contaminación por hidrocarburos.....	1
1.1.2. Composición de la gasolina y el diésel.....	2
1.2. Contaminación por hidrocarburos en México.....	5
1.3. Legislación ambiental de suelos contaminados con hidrocarburos.....	7
1.4. Biorremediación.....	9
1.4.1. Factores que influyen a la biorremediación.....	10
1.5. Microorganismos que degradan hidrocarburos.....	13
1.5.1. Captura y transporte a través de la membrana de hidrocarburos del petróleo por microorganismos.....	16
2. Antecedentes.....	17
3. Justificación.....	20
4. Hipótesis.....	21
5. Objetivos.....	21
5.1. Objetivo general.....	21
5.2. Objetivos específicos.....	21
6. Material y Métodos.....	22
6.1. Colecta de muestra.....	22
6.2. Aislamiento de los microorganismos.....	23
6.3. Identificación de las cepas aisladas.....	23
6.4. Evaluación de hidrocarburos.....	24
6.5. Evaluación de la toxicidad en semillas de pepino.....	25
7. Resultados y discusión.....	26
7.1. Aislamiento de cepas fúngicas a partir de sitios contaminados con derivados del petróleo.....	26
7.2. Pruebas de pH, temperatura y halotolerancia.....	31
7.3. Identificación de las cepas aisladas.....	37
7.4. Remoción de hidrocarburos aromáticos.....	42
7.5. Ensayos toxicológicos.....	48
8. Conclusiones.....	51
9. Perspectivas.....	52
Anexos.....	53
Bibliografía.....	55

Índice de figuras:

Figura 1: Estructura de los hidrocarburos presentes en el petróleo y sus derivados.....	4
Figura 2: Representación de los procesos de bioestimulación y bioaumentación.	11
Figura 3: Interrelación de componentes que determinan la eficiencia de la biorremediación.	12
Figura 4: Principales rutas de los hongos y bacterias para la degradación de hidrocarburos alifáticos y HPA's.	15
Figura 5: Polímeros que conforman la lignina.	18
Figura 6: Toma clandestina de gasolina en Cuernavaca Morelos (Diario de Morelos 2018).	20
Figura 7: Sitios de toma de colectas.	22
Figura 8: Vista satelital de las zonas de toma de muestras (Google maps). 1= Quemador de refinería, 2= Derrame de diésel.	26
Figura 9: Morfología macroscópica y microscópica (microscopio de contraste de fases 1000x) de las cepas aisladas.	30
Figura 10: A) Determinación del pH óptimo de las distintas cepas (72 horas de crecimiento a 32 °C Two-way ANOVA p<0,05). B) Determinación del pH óptimo de la cepa CR (72 horas de crecimiento a 32 °C One-way ANOVA p<0,05).....	31
Figura 11: Cinética de crecimiento de la cepa L3' a pH distintos.	32
Figura 12: A) Determinación de la temperatura óptima de crecimiento de las distintas cepas (72 horas de crecimiento Two-way ANOVA p<0,05). B) Determinación de la temperatura óptima de crecimiento de la cepa CR (72 horas de crecimiento One-way ANOVA p<0,005).	33
Figura 13: Morfología macroscópica y microscópica de la cepa CR crecida PDA sin NaCl (1) y PDA con 1M de NaCl (2).....	35
Figura 14: DNA genómico obtenido de las cepas aisladas. Título figura: A) gDNA de las distintas cepas. Título figura B) gDNA de la cepa CR. Se corrió un gel de agarosa al 1%, y se utilizó el marcador de peso molecular de 1 kb (ThermoScientific).....	37
Figura 15: Amplificación del marcadores ITS para eucariontes Productos de PCR de la región its 2 usando los primer its 3 y 4. Carriles 2-5 gDNA de las cepas L2, L3. L3'y L6, carriles 6-10 producto de PCR de la región ITS de las cepas L3'y CR.....	38
Figura 16: Filograma de la familia Herpotrichiellaceae BioNJ modelo K2P 1000 bootstrap Seaview versión 3,2.	40
Figura 17: Filogenia de la cepa L3' BioNJ modelo K2P 1000 bootstrap Seaview versión 3,2.	41
Figura 18: Remoción de hidrocarburos por <i>Rhodotorula sp.</i>	43
Figura 19: Remoción de BTXs y PHAs por <i>Exophiala sp.</i>	45
Figura 20: Grafica del tamaño de radícula de los germinados de semillas de <i>C. sativus</i> inoculadas en Agar agua con los sobrenadantes tratados (6, 15 Y 21 días) por <i>Exophiala</i> sp (AG-D6, AG-D16, AG-D21) y <i>Rhodotorula sp.</i> (AG-D6, AG-D15, AG-D21).-= Agar agua, AG= Agar agua + BTXs y HPAs, Hexano= Agar agua + Hexano).....	50

Índice de Tablas:

Tabla 1: Efectos a la salud y al medio ambiente provocados por derrames de hidrocarburos (Cavazos et al., 2014).....	2
Tabla 2: Derrames reportados de petróleo entre los años 2000-2014.	6
Tabla 3: Límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelo (SEMARNAT 2012).....	8
Tabla 4: Costos estimados de las distintas estrategias de remediación.	10
Tabla 5: Clasificación de las enzimas oxidativas para degradar alcanos. El rango de los sustratos es aproximado (Rojo 2010).	14
Tabla 6: Descripción de enzimas ligninolíticas.	19
Tabla 7: Cepas aisladas de distintas muestras de sitios contaminados con derivados de petróleo crecidas con 3% diésel en PDA.	27
Tabla 8: Cepas crecidas por 7 días en presencia de distintos porcentajes de diésel (1= crecimiento, 0= sin crecimiento visible).	29
Tabla 9: Determinación del diámetro de la colonia (en cm) de las cepas L3 y CR (inóculo de 10 mil células) en caja de Petri con agar PDA y distintas concentraciones de NaCl (5 días de crecimiento).	34
Tabla 10: Reportes del aislamiento de levaduras del género <i>Exophiala</i> y <i>Rhodotorula</i>	47
Tabla 11: Porcentaje de germinación de las semillas de <i>C. sativus</i>	49

Resumen.

En la actualidad el petróleo sigue siendo la fuente principal de energía y de materiales a escala mundial. Entre los derivados del petróleo más utilizados se encuentran la gasolina, el diésel y el queroseno. Los ecosistemas terrestres y marinos a escala mundial han sido afectados por la contaminación causada por derrames accidentales o provocados de estos hidrocarburos. Por lo tanto, se han convertido en un tema preocupante debido a los daños que causan tanto en humanos como en el medio ambiente.

Desde el año 2000 a la fecha se han derramado alrededor de 4 mil millones 457 mil litros de petróleo crudo y refinado (diésel, gasolina, queroseno), teniendo como principales causas las fallas en la operación, accidentes, infraestructura deficiente o por sustracciones ilícitas (Velázquez 2017). Por estas razones, es que, en las últimas décadas, se han desarrollado estrategias para la remoción de estos compuestos. Entre las estrategias se encuentra la biorremediación, en la cual se emplean a los microorganismos o bien sus productos, esta puede implementarse en conjunto con otras estrategias como son: la dispersión, adsorción y volatilización de los contaminantes, además de ser de bajo costo y amigable con el ambiente.

En estados del sureste de México, un problema preocupante es la alta cantidad de derrames de gasolina tanto accidentales como causados (Comisión Nacional de Hidrocarburos 2014), por lo cual el presente proyecto tuvo como objetivo aislar microorganismos capaces de crecer en presencia de derivados del petróleo y de identificar a las cepas las cuales tengan la capacidad de remover a los hidrocarburos y de esta forma poder contender de manera eficaz con las contaminaciones por estos xenobióticos.

1. Marco teórico.

1.1. Contaminación por hidrocarburos.

Una de las principales fuentes de contaminación ambiental es el uso del petróleo y sus derivados. El petróleo es una mezcla compleja de hidrocarburos, los cuales son: hidrocarburos mono y poliaromáticos, hidrocarburos alifáticos y cíclicos.

Cuando ocurre un derrame de petróleo o alguno de sus derivados, la mayoría de los hidrocarburos alifáticos lineales se pierden en un periodo corto de tiempo por volatilización, mientras que los policíclicos y los cíclicos persisten en la superficie, generando un gran impacto en la biota (Jiménez *et al.*, 2010).

El derrame de hidrocarburos del petróleo tiene efectos tanto en la microbiota como en la flora y fauna que habitan el sitio contaminado (Zamora *et al.*, 2012). Además, los hidrocarburos presentes en los derivados del petróleo afectan severamente al sector agrícola, debido a que al derramarse disminuyen la permeabilidad del suelo volviéndolo infértil. Por otro lado, también existen riesgos para la salud humana debido a los efectos mutagénicos y/o carcinogénicos de los componentes del petróleo (ver tabla 1; Cavazos *et al.*, 2014). Se han observado efectos nocivos en humanos que fueron expuestos a la gasolina, los que se atribuyen a componentes individuales, tales como el benceno, que tiene un gran potencial carcinogénico (García *et al.*, 2012). Otros estudios han reportado que la inhalación de gasolina en periodos cortos causa alteraciones del sistema nervioso, provocando síntomas como mareos, dolor de cabeza, y dificultad para respirar (Aleemuddin *et al.*, 2015).

Tabla 1: Efectos a la salud y al medio ambiente provocados por derrames de hidrocarburos (Cavazos et al., 2014).

Afecciones	Descripción del daño
Daños al medio ambiente.	Los hidrocarburos de mediano y alto peso molecular, tienen naturaleza hidrofóbica, y son adsorbidos en el suelo y sedimentos, lo que asegura su permanencia en estos sitios.
Daños a la salud.	Los compuestos poliaromáticos presentes en el petróleo y sus derivados se consideran potencialmente carcinogénicos para un amplia variedad de organismo, entre los que se encuentran los mamíferos.
Daños a suelos agrícolas por hidrocarburos.	Los hidrocarburos presentes en el petróleo y sus derivados, limitan la permeabilidad del suelo, volviéndolo un suelo infértil.
Resistencia a la degradación	Las características fisicoquímicas de los HPAs (BaP, benzo(a)antraceno, etc.), los hace recalcitrantes.

1.1.2. Composición de la gasolina y el diésel.

El petróleo es un producto de la degradación anaeróbica de la materia orgánica a lo largo de millones de años, y que bajo condiciones de alta temperatura y presión puede convertirse en gas natural. El petróleo crudo es una mezcla compleja de múltiples compuestos orgánicos, principalmente hidrocarburos, los cuales presentan un amplio rango de estructuras tales como cadenas lineales y ramificadas (alcanos, alquenos y alquinos), así como anillos sencillos, condensados o aromáticos (Figura 1) (Torres 2009).

La gasolina es un compuesto derivado del petróleo y es uno de los primeros combustibles líquidos que se obtienen en una refinería, ésta se compone de una mezcla de hidrocarburos de bajo peso molecular (de C4 a C10) y aditivos químicos, con una coloración rosada, pardo pálido o incolora; posee una temperatura de

destilación entre 30 a 300°C (API, 2004) y es sumamente inflamable, por su parte la temperatura de destilación del diésel es entre los 200-350 °C y su composición es de hidrocarburos que poseen entre 13 a 25 moléculas de carbono (API, 2004). Alrededor del 70% de la composición de la gasolina es de n-alcenos tales como: butano, pentano, iso-alcenos como lo son el iso-octano y las iso-parafinas, el resto de hidrocarburos presentes lo conforman los ciclo-alcenos (ciclo-butano, ciclo-pentano, etc.), y los compuestos aromáticos. Entre estos últimos están presentes el benceno, el tolueno y los xilenos (BTX's), los que pueden representar hasta el 24% en peso de la gasolina. Dentro de estos compuestos se encuentra el benceno el que causa diversos efectos nocivos para la salud humana, tales como cancerígenos, mutagénicos y se les ha identificado también como disruptores endócrinos (García *et al.*, 2015). Así mismo el diésel está compuesto principalmente por alcanos (parafinas ≈30% y naftenos ≈45%), el 25% restante es conformado por hidrocarburos aromáticos (Viñas 2005).

Dentro de los hidrocarburos aromáticos presentes en la gasolina y diésel se encuentran los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs), los cuales están presentes en cantidades menores con excepción del naftaleno que constituye hasta un 0,5% en ambos combustibles (Salazar, 2015). Existen dos clases de HPAs los de bajo peso molecular que son aquellos que tienen 2 o 3 anillos de benceno (ejemplo: fenantreno y antraceno) y los de alto peso molecular lo cuales poseen 4 o más anillos de benceno (ejemplo: benzo(a)pireno y criseno) (Cerniglia *et al.*, 2010).

Por otro lado, entre los aditivos que podemos encontrar en este combustible son el éter metil-terbutílico (MTBE), el éter etil-terbutílico (ETBE), el éter metil-teramílico (TAME), el éter di-isopropil (DIPE), los alcoholes (etanol, terbutílico, metanol, butano.) y los metales tales como el plomo (Salazar 2015).

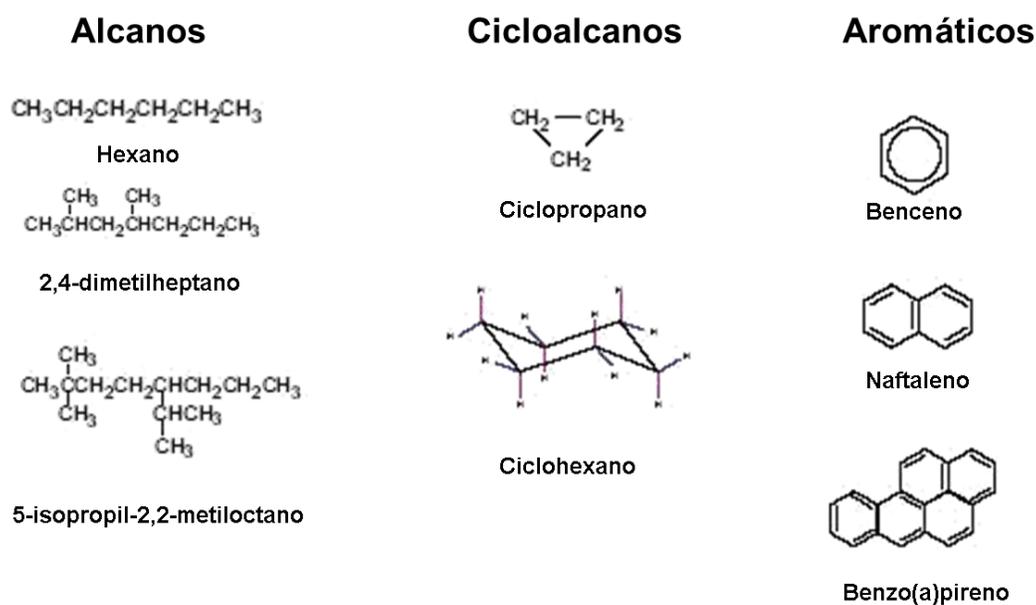


Figura 1: Estructura de los hidrocarburos presentes en el petróleo y sus derivados.

1.2. Contaminación por hidrocarburos en México

Debido a que México es un país petrolero, frecuentemente ocurren derrames. La contaminación del suelo y el agua por derrames del petróleo o de sus derivados, ha aumentado como resultado de las malas prácticas en la exploración, refinación, distribución, mantenimiento, almacenamiento y transporte (Das y Chandran 2011; Velásquez 2017). Se estima que en los últimos 20 años estos derrames han provocado pérdidas por más de 50 mil millones de dólares, además de los daños ambientales y agrícolas (Navarro y Machado, 2009). Estos compuestos resultan tóxicos porque influyen en el desarrollo de plantas y animales de interés agrícola, además de tener efectos tóxicos en los microorganismos y animales que habitan la zona dañada (Piñón *et al.*, 2018). Adicionalmente, la salud humana se afecta por los efectos tóxicos provocados por una exposición prolongada tanto a los gases como al contacto directo con los derivados del petróleo, o bien por el consumo de la bioabsorción por parte de plantas y hongos de interés comercial que bioabsorben a estos compuestos. (Piñón *et al.*, 2018).

Los estados en México que han sido afectados por derrames de petróleo crudo fueron: Veracruz (29,9 miles de barriles (mbls), Tabasco (37,5 mbls), Chiapas (17,1 mbls) y Puebla (6,9 mbls) (CNH 2014) (Tabla 2).

Tabla 2: Derrames reportados de petróleo entre los años 2000-2014.

Estado o Ciudad Derramado*	2000-2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	Total (mbls)
Zona Norte	21.39	1.37	0.72	0.56	7.90	2.67	1.88	0.77	0.19	37.46
Nuevo León	0.06	0	0	0	0	0	0	0	0	0.06
En tierra	0.06	0	0	0	0	0	0	0	0	0.06
En mar	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00
Puebla	0.1	0	0.002	0.02	6.33	0.44	0.02	0.007	0.023	6.93
En tierra	0.1	0	0.002	0.02	6.33	0.44	0.02	0.007	0.023	6.93
En mar	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00
Tamaulipas	0.5	0.02	0.0001	0	0	0	0	0	0	0.54
En tierra	0.48	0.02	0.0001	0	0	0	0	0	0	0.51
En mar	0.04	0	0	0	0	0	0	0	0	0.04
Veracruz	20.71	1.34	0.72	0.54	1.57	2.24	1.87	0.76	0.17	29.92
En tierra	20.70	1.34	0.72	0.54	1.57	2.24	1.87	0.64	0.17	29.79
En mar	0.002	0	0	0	0	0	0	0.13	0	0.13
Zona Sur	12.14	13.74	0.27	18.06	0.13	0.02	1.84	9.394	0.252	55.86
Campeche	1.22	0.002	0	0.003	0	0	0.002	0	0	1.22
En tierra	0.02	0	0	0	0	0	0	0	0	0.02
En mar	1.20	0.002	0	0.003	0	0	0.002	0	0	1.20
Chiapas	1.77	0.20	0.13	15.01	0.01	0	0	0	0	17.12
En tierra	1.77	0.20	0.13	15.01	0.01	0	0	0	0	17.12
En mar	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00
Tabasco	9.15	13.55	0.14	3.05	0.12	0.02	1.84	9.394	0.252	37.52
En tierra	9.14	0.84	0.14	3.03	0.12	0.02	1.84	9.394	0.252	24.78
En mar	0.01	12.71	0	0.01	0	0	0	0	0	12.74
Total Nacional (mbls)	33.53	15.11	0.99	18.62	8.03	2.69	3.73	10.17	0.45	93.32

No solo el centro y sur de México han sido afectados por estos contaminantes. En el año 2010, en Chihuahua se reportó un derrame de combustible No. 6 (FO6) en una toma clandestina (PROFEPA 2010). Este es uno de los compuestos finales obtenidos de la destilación del petróleo, el cual contiene alrededor de 25% de hidrocarburos saturados, 35% de hidrocarburos aromático, 20% de resinas y 20% de asfaltenos (Piñón *et al.*, 2018).

1.3.- Legislación ambiental de suelos contaminados con hidrocarburos.

La ley general del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente (LGEEPA) dicta ciertas normas para garantizar a toda persona, vivir en un entorno ambiental adecuado para su desarrollo, salud y bienestar; y otras para la preservación, restauración y mejoramiento del ambiente teniendo como principal objetivo la prevención y el control de la contaminación de aire, suelo y agua. Algunos de los artículos más importantes de esta ley son los siguientes (Tomados de LGEEPA, 2012):

Art 134: Este artículo establece que los suelos contaminados por la presencia de materiales o residuos peligrosos deben ser recuperados o reestablecer sus condiciones, de tal manera que puedan ser utilizados en cualquier tipo de actividad.

Art 136: Los residuos que se acumulen y se depositen o infiltren en los suelos deberán reunir las condiciones necesarias para prevenir o evitar:

- I. La contaminación del suelo;
- II. Las alteraciones nocivas en el proceso biológico de los suelos;
- III. Las alteraciones en el suelo que perjudiquen su aprovechamiento, uso o explotación,
- IV. Riesgos y problemas de salud.

Art 140: La generación, manejo y disposición final de los residuos de lenta degradación deberá sujetarse a lo que se establezca en las normas oficiales mexicanas, que al respecto expida la Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) en coordinación con la Secretaría de Economía.

Por otro lado, en México la SEMARNAT ha establecido ciertos criterios de limpieza para la restauración de suelos contaminados. Estos criterios se encuentran descritos en la norma NOM-138-SEMARNAT/SS-2012, en esta se establecen los límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos (Tabla 3), y ciertas especificaciones para su remediación.

Tabla 3: Límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelo (SEMARNAT 2012).

HIDROCARBUROS ESPECÍFICOS	USO DE SUELO PREDOMINANTE (mg/kg BASE SECA)			MÉTODO ANALÍTICO
	Agrícola, forestal, pecuario y de conservación	Residencial y recreativo	Industrial y comercial	
Benceno	6	6	15	NMX-AA-141-SCFI-2007
Tolueno	40	40	100	NMX-AA-141-SCFI-2007
Etilbenceno	10	10	25	NMX-AA-141-SCFI-2007
Xilenos (suma de isómeros)	40	40	100	NMX-AA-141-SCFI-2007
Benzo[a]pireno	2	2	10	NMX-AA-146-SCFI-2008
Dibenzo[a,h]antraceno	2	2	10	NMX-AA-146-SCFI-2008
Benzo[a]antraceno	2	2	10	NMX-AA-146-SCFI-2008
Benzo[b]fluoranteno	2	2	10	NMX-AA-146-SCFI-2008
Benzo[k]fluoranteno	8	8	80	NMX-AA-146-SCFI-2008
Indeno (1,2,3-cd)pireno	2	2	10	NMX-AA-146-SCFI-2008

1.4. Biorremediación.

Una vez que ha ocurrido el derrame de hidrocarburos, estos comienzan a cambiar sus características fisicoquímicas, los hidrocarburos sufren diversos procesos de modificación y dispersión tales como la disolución, la oxidación fotoquímica, la adsorción y la sedimentación (Wasmund *et al.*, 2009). Sin embargo, no todos los hidrocarburos se eliminan fácilmente, muchos de ellos principalmente los hidrocarburos aromáticos persisten por tiempos prolongados en el medio ambiente (Cerniglia *et al.*, 2010), por lo que es necesario contar con estrategias viables para disminuir la presencia de estos en el medio ambiente. Los tres principales métodos de saneamiento son: los métodos físicos, los químicos, y los biológicos. Entre los procesos físicos se encuentran: la extracción de aire del suelo, la remoción del contaminante mediante la volatilización o evaporación y su costo aproximado de 10 a 150 Dólares/m³. Entre los tratamientos térmicos, el más utilizado es la incineración, donde se usan temperaturas entre los 750 a los 1000°C para volatilizar y oxidar los compuestos, dicho proceso conlleva un costo aproximado de 150 a 1 800 Dólares/m³ (Hurtado 2009). El método químico utilizado frecuentemente es el uso de solventes orgánicos como el hexano, la acetona y el metanol para la extracción del hidrocarburo. Sin embargo, en este método suelen quedar trazas del disolvente utilizado. Éste tiene un costo aproximado de 120 a 450 Dólares/tonelada de hidrocarburos (Hurtado 2009). En las últimas décadas se han buscado otras alternativas para la recuperación de suelos y cuerpos de agua contaminados que sean menos costosas y amigables con el ambiente.

Una alternativa es la biorremediación, la cual utiliza microorganismos, hongos, plantas y/o bien las enzimas que estos producen para restaurar el sitio contaminado de acuerdo con las necesidades y las dimensiones del problema. Este tipo de remediación generalmente es menos costoso (Tabla 4) (Garzón *et al.*, 2017)

Tabla 4: Costos estimados de las distintas estrategias de remediación.

Estrategia de remediación	Sitio de tratamiento	Costo (US/m ³)
Bioestimulación	<i>In situ</i>	30-100
Bioaumentación	<i>In situ</i>	30-100
Bioventeo	<i>In situ</i>	79-970
Biopilas	<i>Ex situ</i>	130-260
Lanfarming	<i>Ex situ</i>	30-70
Extracción por vapor	<i>In situ</i>	405-1485
Desorción temica	<i>Ex situ</i>	44-252

1.4.1. Factores que influyen a la biorremediación.

Para que la biorremediación sea eficiente se requiere conocer la movilidad y biodisponibilidad del contaminante, además de controlar los siguientes parámetros (Figura 3): A) la temperatura, ya que las reacciones enzimáticas de cada organismo requieren una temperatura óptima; donde el intervalo para el caso de los organismos mesófilos se encuentra entre los 20-35°C; B) la concentración de oxígeno, del que se requiere al menos el 1% en el suelo, para favorecer la proliferación de organismos aerobios; C) el contenido de agua es un factor limitante, debido a que el porcentaje de peso de agua en la célula oscila entre el 80-90%, ya

que la disponibilidad de ésta favorece para el crecimiento celular. D) el pH, es decir mantener un pH cercano al óptimo de las cepas o de las enzimas aplicadas en el tratamiento. E) la concentración de nutrientes, se requiere mantener una concentración constante de macroelementos y de microelementos para asegurar la proliferación de los microorganismos (Argüelles 2010).

Una vez que se conocen las propiedades del sitio donde se llevará a cabo la biorremediación, se procede a elegir si la biorremediación será *in situ* o *ex situ*. En la biorremediación *in situ* existen principalmente dos estrategias, la bioestimulación y la bioaumentación (Figura 2); La primera se refiere a la adición de nutrientes, principalmente fuentes de nitrógeno y fósforo, para favorecer el crecimiento y desarrollo microbiano. Por otra parte, la bioaumentación se entiende como la adición de microorganismos endógenos o exógenos a un lugar específico (para este caso, degradadores de hidrocarburos), con el fin de fomentar la degradación y disminuir el tiempo de reducción del contaminante (Argüelles 2010).

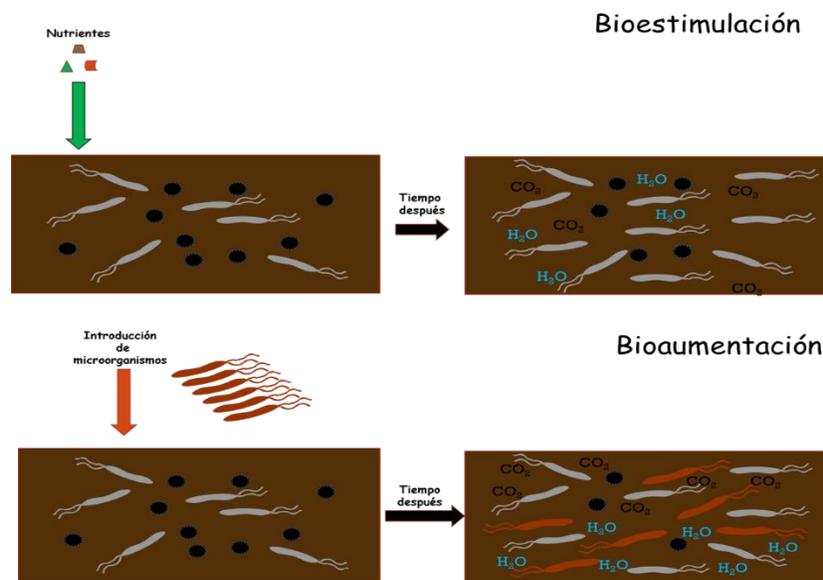


Figura 2: Representación de los procesos de bioestimulación y bioaumentación.

Dentro de las principales técnicas de biorremediación *ex situ* resalta el uso de biopilas, este método consiste en formar pilas con el suelo contaminado y estimular la actividad microbiana, agregando aire, agua y fertilizantes que contengan nitrógeno y fósforo, en un ambiente con temperaturas mayores a 15 °C (Argüelles 2010).

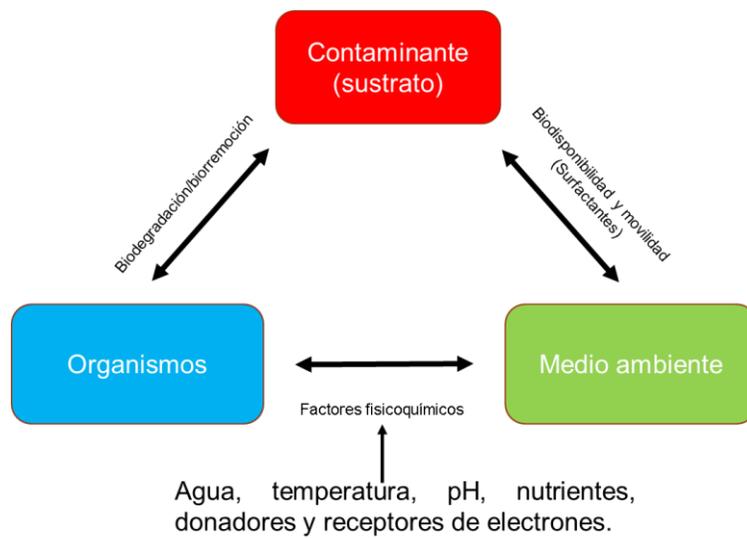


Figura 3: Interrelación de componentes que determinan la eficiencia de la biorremediación.

1.5. Microorganismos que degradan hidrocarburos.

La degradación de hidrocarburos por los microorganismos es un proceso de descontaminación natural (Torres 2009). Existen microorganismos (bacterias, levaduras y hongos) conocidos como hidrocarbonoclastas, estos son capaces de degradar diferentes hidrocarburos, ya que los utilizan como fuente de carbono (Cerniglia *et al.*, 2010; Hua y Wang 2013). Generalmente los microorganismos que participan en la degradación de estos compuestos forman parte de la biota nativa de los sustratos orgánicos o del suelo. Estos pueden usarlos como fuente de carbono, debido a que poseen la maquinaria enzimática necesaria, por ejemplo las oxigenasas (oxidando alcanos principalmente) (Tabla 5) (Stefani *et al.*, 2015). Para la degradación de alcanos, primero se debe de oxidar al alcano en un alcohol, dicho alcohol (alcohol primario) es convertido en un aldehído y subsecuentemente via oxidación es transformado en un ácido graso el cual será mineralizado por β -oxidación (Figura 4) (Fuentes *et al.*, 2014).

Se ha reportado que bacterias Gram negativas son eficientes en la degradación de estos compuestos, entre ellas: *Flavobacteriumdevorans*, y *Pseudomona* sp, entre otras. Estas han sido aplicadas en sitios contaminados con befinil-polilorinato y otros hidrocarburos dónde se determinó que fueron capaces de degradar el hidrocarburo (Stefani *et al.*, 2015).

Tabla 5: Clasificación de las enzimas oxidativas para degradar alcanos. El rango de los sustratos es aproximado (Rojo 2010).

Enzima	Características	Sustrato
PRM, propano monooxigenasa	Monooxigenasa de hierro no hémico similar a sMMO	C ₃
sBMO, butano monooxigenasa	Monooxigenasa de hierro no hémico similar a sMMO	C ₂ -C ₉
pBMO, butano monooxigenasa	Monooxigenasa que contiene cobre similar a pMMO	C ₂ -C ₉
CYP153	Citocromo P450 soluble	C ₅ -C ₁₂
Tipo AlkB	Monooxigenasa de hierro no hémico	C ₃ -C ₁₃ o C ₁₀ -C ₂₀
AlmA	Monooxigenasa unida a flavina	C ₂₀ -C ₃₆
LadA	Monooxigenasa termófila dependiente de flavina	C ₁₀ -C ₃₀
Dioxigenasa	Dioxigenasa de cobre dependiente de flavina	C ₁₀ -C ₃₀

También se ha reportado que una gran cantidad de hongos y algunas levaduras, pueden degradar distintos hidrocarburos. Existen dos vías principales por la cuales los hongos pueden degradar estos compuestos (principalmente a los HPAs). La primera es a través de las mono-oxigenasas citocromo p-450, mientras que la segunda consiste en el uso de enzimas ligninolíticas entre las que se encuentran las lacasas y las peroxidasas. Estas dos clases de enzimas pueden actuar separadas o en sinergia, dependiendo de si el hongo es capaz de producir una o ambas (Aranda *et al.*, 2015). Los HPAs son oxidados por estas enzimas para formar quinonas, las cuáles son compuestos menos estables y susceptibles al ataque de otras enzimas; sin embargo, aún se desconoce a las enzimas posteriores que logran la mineralización del HPA (Ver figura 4). Por otro lado, aquellos microorganismos sin enzimas ligninolíticas, metabolizan a los HPAs por una reacción inicial de dioxigenación (por una dioxigenasa) formando un *cis*-diol, en contraste la vía de

degradación de compuestos como el xileno y tolueno comienza con una monooxigenación en el grupo metilo. El *cis*-diol es rearomatizado por una dihidriol deshidrogenasa. Después del rompimiento de un anillo, los hidrocarburos aromáticos con al menos dos anillos dan lugar a distintos intermediarios metabólicos, los cuales posteriormente serán transformados en intermediarios que entran al metabolismo central del organismo, entre los cuales podemos encontrar al catecol, protocatehuete y salicilato. Por otro lado, la activación del sustrato original puede originar moléculas con alta toxicidad conduciendo a la muerte del microorganismo (Fuentes *et al.*, 2014).

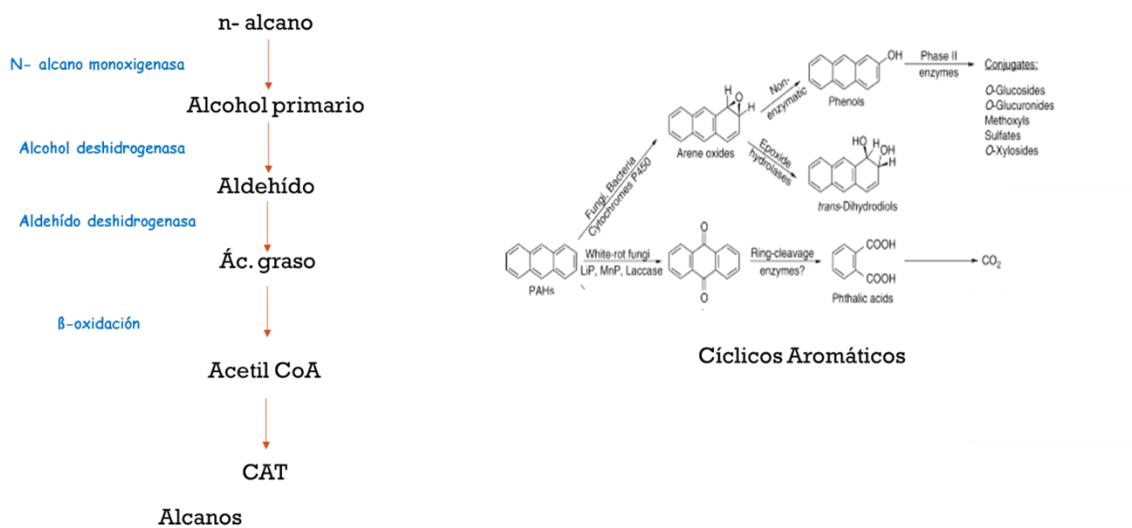


Figura 4: Principales rutas de los hongos y bacterias para la degradación de hidrocarburos alifáticos y HPA's.

Dentro de este tipo de hongos se encuentran varios pertenecientes al género *Aspergillus*, *Cunninghamella*, *Pycnoporus*, *Trametes* entre otros. Dichos organismos utilizan enzimas poco específicas tales como peroxidasa (Manganeso peroxidasa, versátil peroxidasa y ligninoperoxidasas) y lacasas (Tabla 6) (Cerniglia *et al.*, 2010).

1.5.1. Captura y transporte a través de la membrana de hidrocarburos del petróleo por microorganismos.

Este fenómeno ha sido ampliamente estudiado en células bacterianas y poco se ha explorado en organismos eucariontes. Las membranas celulares son hidrofóbicas lo cual hace a las células resistentes a la degradación, por otro lado debido a esta característica, la absorción de hidrocarburos de bajo peso molecular por las células es por difusión simple a través de la membrana, sin embargo no es el único método por el cual los microorganismos pueden adsorber hidrocarburos, estudios previos realizados con fenantreno, naftaleno y n-hexadecano han demostrado que estos atraviesan la membrana por difusión facilitada y transporte dependiente de energía (Hua y Wang 2013).

Para que el hidrocarburo pueda ser tomado por las células, éste debe solubilizarse, para ello los microorganismos producen metabolitos los cuales solubilizan al hidrocarburo en la fase acuosa, dichos compuestos son llamados biosurfactantes, ellos se adhieren al hidrocarburo formando micelas que además de solubilizarlo participan en su adsorción por las células (Hua y Wang 2013). Otros estudios han demostrado que la absorción de HPA's e hidrocarburos alifáticos de cadena larga, es mediada por transportadores dependientes de ATP y se sugiere que puede ser a través de las porinas, proteínas transmembranales que permiten la difusión de moléculas de hasta 600 Da (Lepore *et al.*, 2011). De manera relevante, el estudio de las proteínas de membrana TodX y TubX provenientes de *P. putida* y *Ralstonia pickertii* mostró que están implicadas en la importación de hidrocarburos aromáticos

dentro de las células, ya que ambas forman un canal hidrofóbico que permite su entrada (Hearn *et al.*, 2007).

2. Antecedentes.

La contaminación por hidrocarburos derivados del petróleo se ha convertido en un problema constante a nivel mundial tanto en ambientes marinos como terrestres. Como se ha mencionado anteriormente, la remoción de los componentes xenobióticos de este combustible fósil por métodos tradicionales resulta costoso. Desde hace algunos años, se ha considerado el uso de microorganismos para la remoción de estos contaminantes, a lo que se le ha denominado, biorremediación. Esta última puede utilizarse para la rehabilitación de cuerpos de agua y suelos (Ukpaka 2016), ya que distintos microorganismos son capaces de adaptarse a diversas condiciones fisicoquímicas (pH, humedad, temperatura, salinidad, etc.), así como a distintos xenobióticos (Grey 2017).

Se ha documentado que bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas*, degradan hidrocarburos alifáticos y aromáticos policíclicos de bajo peso molecular. Estas pueden crecer en concentraciones de hasta 100 ppm de naftaleno, como única fuente de carbono (Grey 2017). Por otro lado, la utilización de microorganismos fúngicos en la biorremediación particularmente de estos contaminantes es escasa (Ghanem *et al.*, 2016). Sin embargo, los estudios reconocen las ventajas del uso de estos, debido a su rápida adaptación en ambientes contaminados tanto con hidrocarburos como con metales pesados (Cerniglia *et al.*, 2010).

Se ha demostrado que muchos hongos degradan estos compuestos porque producen enzimas extracelulares tales como lacasas y peroxidasas (Tabla 5), las cuales tienen una baja especificidad por su sustrato. De manera natural, estas enzimas les permiten a los hongos degradar a la lignina, la cual es un polímero fenólico (Figura 5), con estructura y características fisicoquímicas similares a una amplia variedad de xenobióticos (Balcazar *et al.*, 2016).



Figura 5: Polímeros que conforman la lignina.

Dentro del grupo de los organismos fúngicos destacan los géneros *Pleurotus*, *Aspergillus*, *Penicillium* y *Trichoderma*. Dichos hongos son capaces de crecer en concentraciones de hasta 16% v/v (4ml de combustible/25ml de medio) de hidrocarburos, llegando a degradar hasta un 90 a 94% de combustibles tales como el diésel (Ghanem *et al.*, 2016)

Tabla 6: Descripción de enzimas ligninolíticas.

Lignino-peroxidasas (LP)	Proteínas que pertenecen a la categoría de las oxidorreductasas. Catalizan reacciones redox en sustratos como la lignina y los HPAs como el BaP, utilizando al peróxido como agente oxidante. Fueron descritas por primera vez en <i>Phanaerochaete chrysosporium</i> (Tien y Kira, 1983)
Manganeso-peroxidasa (MnP)	Es una hemoproteína identificada en <i>P. chrysosporium</i> (Gleen y Gold, 1985). Además de peróxido de hidrógeno, requieren Mn^{2+} para generar iones Mn^{3+} ; estos iones son capaces de oxidar fenoles y otros compuestos.
Peroxidasa-versátil	Se le denomina peroxidasa versátil (VP). Debido a que es capaz de oxidar MnP^{2+} a MnP^{3+} , y catalizar reacciones sobre sustratos aromáticos en ausencia de MnP^{2+}
Lacasas	También conocidas como fenol oxidasas, son multicobre-oxidasas que catalizan la oxidación de compuestos fenólicos y aminas aromáticas; para ello emplean al oxígeno molecular como aceptor de electrones reduciéndolo a H_2O .

No solo los hongos filamentosos han demostrado utilizar hidrocarburos del petróleo como única fuente de carbono, una amplia variedad de levaduras también son capaces de utilizar estos compuestos como única fuente de carbono. Algunas de las levaduras reportadas han sido del género *Yarrowia*, *Candida*, *Debaryomyces* y *Rhodotorulla* (Gargouri *et al.*, 2014). Por ejemplo, la especie *Y. lipolytica* ha demostrado degradar eficientemente sustratos hidrofóbicos tales como; triglicéridos, ácidos grasos y alcanos, durante el mismo se observó que esta levadura produce emulsificantes durante la degradación de estos compuestos (Hassanshahian *et al.*, 2012).

3. Justificación.

En México se ha reportado el derrame de 100 mbls de petróleo y sus derivados. Particularmente en Morelos, durante los últimos años se han presentado un gran número de derrames de gasolina, causados principalmente por el robo de los nombrados “Huachicoleros” (Figura 6). Tan solo en el año 2018 se han reportado dos derrames de tomas clandestinas en el municipio de Cuernavaca (Diario el Debate 2018). Debido a que los hidrocarburos presentes en la gasolina son contaminantes con alto grado tóxico-oncológico, es necesario removerlos del sitio (Usemann *et al.*, 2018). La restauración de estos sitios exige el uso de alternativas amigables con el medio ambiente.



Figura 6: Toma clandestina de gasolina en Cuernavaca Morelos (Diario de Morelos 2018).

La prospección de microorganismos, aislados a partir de lugares contaminados con hidrocarburos, para su uso en la biorremediación resulta relevante, debido a que estos se encuentran adaptados a las condiciones del sitio (Pernia *et al.*, 2012). La biorremediación, se caracteriza por ser efectiva y de bajo costo en comparación con las técnicas físicas o químicas. Por otro lado, poco se ha explorado el uso de consorcios para la degradación de estos compuestos (Stefani *et al.*, 2015). A pesar de conocerse un gran número de bacterias que pueden degradar hidrocarburos presentes en los derivados del petróleo, poco se ha hecho con microorganismos como las levaduras y hongos filamentosos.

4. Hipótesis.

Las levaduras y los hongos filamentosos aislados de sitios contaminados removerán derivados del petróleo y disminuirán su toxicidad, por lo que serán organismos potenciales para bioaumentación.

5. Objetivos.

5.1. Objetivo general.

Determinar la capacidad de remoción de hidrocarburos de levaduras y hongos de sitios contaminados de derivados del petróleo.

5.2. Objetivos específicos.

- Aislar e identificar levaduras y hongos de sitios contaminados con derivados del petróleo.
- Evaluar la remoción de hidrocarburos en cultivo líquido por las levaduras y los hongos aislados.
- Evaluar la toxicidad de los medios tratados con los hongos y levaduras en plántulas de pepino.

6. Material y Métodos.

6.1. Colecta de muestra.

El sitio de muestreo fue el ejido de Gregorio Méndez del municipio de Cunduacán Tabasco ($18^{\circ}02'37.2''N$ $93^{\circ}04'18.1''W$).

Se tomaron muestras de suelos en regiones expuestas a derrames de derivados del petróleo (gasolina, aceite y diésel (75% de hidrocarburos saturados y 25% de hidrocarburos cíclicos) en el estado de Tabasco, se seleccionaron aquellos sitios con mayor tiempo de exposición a tales contaminantes.

Los sitios fueron nombrados como se muestra a continuación: M1 Quemador zona 1 (Muestra colectada del suelo), M2 Quemador zona 1 (Muestra colectada en la plataforma), M3 Quemador horizontal, M4 Derrame de diésel expuesto por 6 meses. (Figura 7).



Figura 7: Sitios de toma de colectas.

Posteriormente se procedió a aislar a los microorganismos fúngicos que se encuentren en las muestras recolectadas.

6.2. Aislamiento de los microorganismos.

1. Se colocó 1g de suelo recolectado en 10 ml de solución isotónica.
2. Se realizaron diluciones seriadas 1:10, 1:100, 1:1000.
3. Se inocularon 100 µl de cada una de las diluciones en agar papa dextrosa (PDA, Bioxon) suplementados con 3% de diésel, y se adicionaron 100 µg/ml de kanamicina y 100 µg/ml de ampicilina para evitar el crecimiento bacteriano (Gómez *et al.*, 2009).
4. Se incubaron por 20 días a 28°C, revisando diario cada cultivo (Nota: cuando el cultivo se saturó de microorganismos, se tomaron azadas en distintas zonas del cultivo, posteriormente se suspendieron en solución osmótica estéril, y se realizaron las diluciones seriadas como en el paso 2).
5. Se aislaron las colonias en PDA y posteriormente se analizó el crecimiento de las cepas en medio mínimo (Formula para 1L: CuSO₄*5H₂O 7.8mg; FeSO₄*7H₂O 18mg; MgSO₄*7H₂O 500mg; ZnSO₄ 10mg; KCl 50mg; K₂HPO₄ 1g; NH₄NO₃ 2g) con 3, 4, 5 y 6% de diésel.
Se seleccionaron las cepas que crecieron usando únicamente diésel como fuente de carbono.

Posteriormente para evaluar las mejores condiciones de crecimiento de las cepas se realizó el ensayo de goteo en placa, con las siguientes condiciones de cultivo distinto pH (5, 6, 7, 8, 10 y 12), temperatura (25, 32 y 40 °C) y salinidad (1, 2 y 3M de NaCl).

6.3. Identificación de las cepas aisladas.

1. Se extrajo el DNA de las cepas seleccionadas usando purificación con fase orgánica (Sambrook 2012). Para evaluar la integridad del ADN, se realizó una electroforesis usando un gel de agarosa al 1%.
2. Se realizaron amplificaciones de la región ITS 2 usando los oligonucleótidos ITS3 (5' GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC 3') e ITS4 (5' TCC TCC GCT

TAT TGA TAT GC 3'). El programa para llevar a cabo el PCR fue el siguiente: un ciclo de desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min, seguida de 35 ciclos a 95 °C por 45 s, 55 °C por 30 s, 72 °C por 1 min y una extensión final a 72 °C por 7 min.

3. Se evaluó el producto del PCR usando una electroforesis en gel de agarosa al 1%.
4. Los amplicones obtenidos se mandaron a secuenciar.
5. Con las secuencias obtenidas, se realizó un Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Para obtener las secuencias que son similares a las obtenidas en el trabajo.
6. Se realizaron árboles filogenéticos para poder determinar la identidad a nivel de género.

6.4. Evaluación de hidrocarburos.

Para determinar la degradación de los compuestos presentes en los derivados del petróleo, se realizó una mezcla de hidrocarburos con las siguientes proporciones: 0.1% de benceno, 0.8% de tolueno, 0.22% de xilenos (meta, orto y paraxilenos), y 0.1% de una mezcla de HPAs (Fenantreno y BaP) (la selección de estos compuestos fue tomando en cuenta su recalcitrancia) (Salazar 2015). Se tomó como 100% las mediciones del día 0. El procedimiento para obtener la muestra que se inyectó al HPLC se llevó a cabo como se explica a continuación: se realizó una extracción líquido:líquido de la muestra con hexano (Hexano 70:30 medio de cultivo), se recolectó el hexano a través de una bureta, separando ambas fases y se tomó la fase orgánica; este paso se llevó a cabo dos veces por matraz para extraer la mayor cantidad de hidrocarburos. Posteriormente, el hexano colectado se evaporó en una campana de extracción de gases hasta obtener un volumen aproximado de 3 ml, y se añadió un mililitro de metanol:agua, la fase móvil que se utilizó en la columna. La separación se realizó usando una columna C-18 (0,25 mm de diámetro por 30 m de longitud, 0,25 µm de espesor de película) utilizando una

fase móvil Metanol:H₂O (70:30) con un bombeo de 0,8 ml/minuto, con temperatura de 40 °C (Zhu et al., 2016; Bahrami et al., 2011).

6.5. Evaluación de la toxicidad en semillas de pepino.

Para determinar si las cepas fueron capaces de remover de manera eficiente y determinar la toxicidad los hidrocarburos se realizaron ensayos de toxicidad. En nuestro estudio se utilizó el ensayo de germinación de semillas de pepino (*Cucumis sativus*), el cual se ha utilizado para evaluar la toxicidad de distintos compuestos y se ha reportado en distintos laboratorios y en nuestro grupo de trabajo (Critto et al., 2007; Roig et al., 2005). Los ensayos de germinación se realizaron en agar agua, en dicho agar se colocaron los sobrenadantes extraídos en cada uno de los experimentos realizados.

A partir de los sobrenadantes obtenidos en los días 0, 6, 15 y 21, se les realizó una extracción líquido:líquido como se explicó en el ensayo para HPLC para verificar la remoción de los contaminantes. Los hidrocarburos recuperados, se resuspendieron en 6 ml de hexano 100%. 2 ml de la solución de hexano con los hidrocarburos recuperados se mezcló con 10 ml de agar agua para alcanzar un volumen final de 12 ml. Se depositaron 7 semillas de pepino cada caja de Petri y se incubaron en oscuridad por 7 días a 25 °C. Posteriormente se contaron las semillas germinadas y se obtuvo el promedio. Los controles utilizados en este experimento fueron los siguientes: como control negativo (agua destilada) y como control positivo (sobrenadantes con la mezcla de hidrocarburos sin inocular).

7. Resultados y discusión.

7.1. Aislamiento de cepas fúngicas a partir de sitios contaminados con derivados del petróleo.

Con el objetivo de aislar cepas fúngicas con capacidad de remoción de hidrocarburos, se obtuvieron muestras de sitios cercanos a una tubería que transporta distintos productos derivados del petróleo en la comunidad de Gregorio Méndez, Cunduacán, Tabasco (Figura 8).

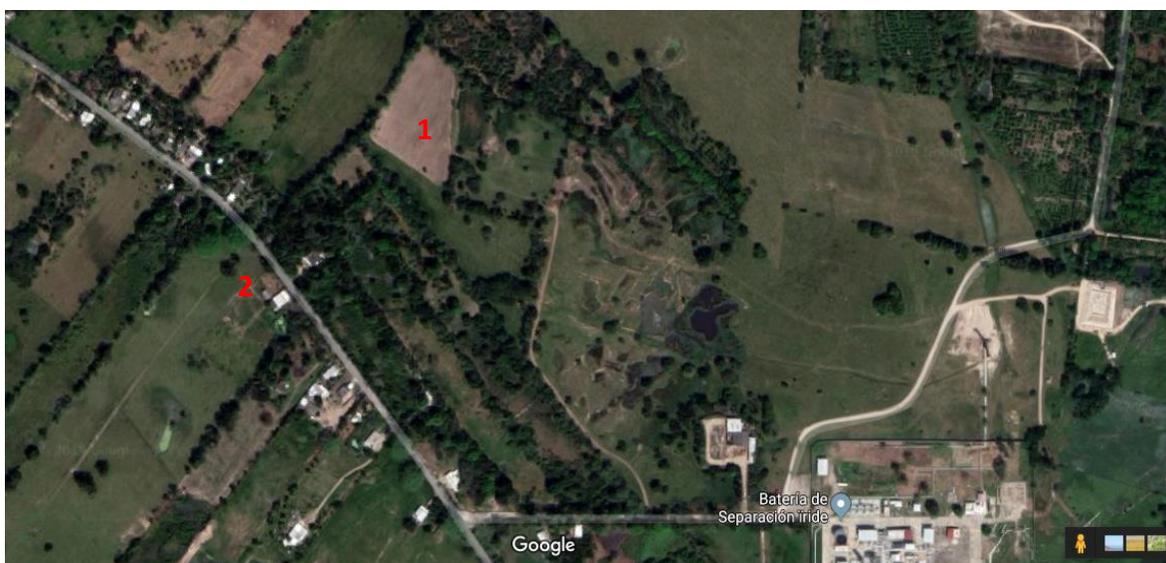


Figura 8: Vista satelital de las zonas de toma de muestras (Google maps). 1= Quemador de refinería, 2= Derrame de diésel.

A partir de estas superficies de suelo contaminadas, se aislaron un total de 12 morfotipos distintos (Tabla 7) los cuales fueron crecidos en PDA con 3% de diésel. Once de estos mostraron crecimiento levaduriforme. Mientras que la cepa nombrada como CR, mostró una morfología similar a la de un hongo filamentoso, con textura gelatinosa. Para probar que las cepas aisladas eran capaces de utilizar

a los hidrocarburos se sembraron en medio mínimo con 3% de diésel, en este experimento todas las cepas aisladas crecieron en presencia de esta condición.

En estudios previos se han obtenido resultados similares, un ejemplo de ello es el trabajo de Acosta y colaboradores en el 2012, en dicho trabajo aíslan un total de 16 microorganismos, a partir de 12 muestras de sedimentos contaminados con hidrocarburos, de los que 15 fueron bacterias y solo uno era un hongo. Por otro lado, aun cuando se han reportado un gran número de organismos fúngicos hidrocarbonoclastas, pocos de estos han sido aislados de sitios contaminados (Pernia *et al.*, 2012).

Posteriormente, para restringir las cepas a caracterizar se crecieron en medio mínimo con 3% de diésel y 10 ppm de fenantreno y BaP como única fuente de carbono.

Tabla 7: Cepas aisladas de distintas muestras de sitios contaminados con derivados de petróleo crecidas con 3% diésel en PDA (Las cepas que crecieron en estas condiciones se indican en color rojo).

MUESTRA	CEPAS
M1 QUEMADOR SUELO	L3, L6, L4, L1, L6', L5', L4', CR
M2 QUEMADOR PLATAFORMA	L7, L3'
M3 QUEMADOR HORIZONTAL	—
M4 DIÉSEL (DERRAME DE 6 MESES)	L2, L5
TOTAL	12

Posteriormente, con el objetivo de seleccionar a aquellas cepas con mayor tolerancia a los derivados del petróleo, se cultivó a las cepas aisladas en agar con medio mínimo suplementado con 3% diésel y con 10 ppm de fenantreno y BaP. Se eligieron estos HPAs debido a que son recalcitrantes, siendo altamente tóxicos y mutagénicos. Las cepas L3, L3', L2, L6 y CR fueron las únicas que crecieron bajo estas condiciones. El porcentaje de diésel utilizado (3%) estuvo de acuerdo a reportes previos (Buendía 2012), sin embargo, se aumentó el porcentaje de diésel a 4, 5 y 6% para restringir el número de aislados a los más robustos. Bajo estas condiciones solo dos aislados (L3' y CR) crecieron (Tabla 8). Este resultado es relevante ya que la mayoría de los reportes usan 3% de derivados del petróleo (gasolina, diésel, petróleo ligero) como máxima concentración (Buendía 2012; Ameen *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2018). En este sentido, se ha documentado que la concentración de hidrocarburos totales detectados en sitios contaminados, varían del 2% al 5% (Buendía 2012; Barbosa 2016). Lo que sugiere que nuestras cepas toleran un porcentaje elevado de hidrocarburos.

Tabla 8: Cepas crecidas por 7 días en presencia de distintos porcentajes de diésel (1= crecimiento, 0= sin crecimiento visible).

Cepa	3% diésel	4% diésel	5% diésel	6% diésel
L2	1	0	0	0
L3	1	0	0	0
L3'	1	1	0	0
L6	1	0	0	0
CR	1	1	1	1

Los resultados en la tabla 8 muestran que solo la cepa CR fue capaz de crecer en concentraciones de hasta 6% de diésel, por otro lado, de las cepas con crecimiento levaduriforme únicamente la cepa L3' creció en una concentración mayor al 3% de diésel.

Para verificar que todos los aislados fuesen organismos fúngicos se observaron al microscopio usando contraste de fases (Anexo 1), y de esta manera observar a las células sin tinción. La cepa L3' tiene un tamaño mayor al de las cepas L3, L2 y L6 (Figura 9). En cambio, las cepas L3, L2 y L6 tienen un tamaño pequeño y no se observó el núcleo, lo que sugiere que se trata de bacterias, que son resistentes a distintos antibióticos (kanamicina, ampicilina y gentamicina). Además, no se obtuvo amplificación del marcador molecular ITS de eucariontes utilizando el DNA genómico de estas. Por otro lado, en las imágenes microscópicas del hongo

nombrado como CR se observan hifas septadas y los conidióforos, (estructuras de reproducción asexual).

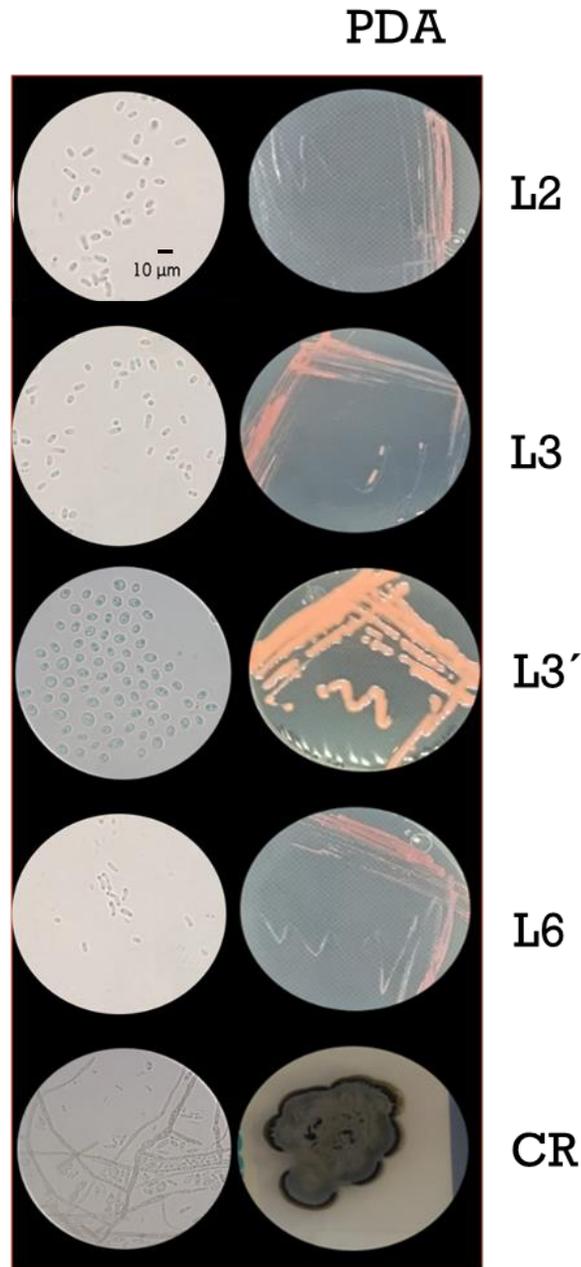


Figura 9: Morfología macroscópica y microscópica (microscopía de contraste de fases 1000x) de las cepas aisladas.

7.2. Pruebas de pH, temperatura y halotolerancia.

Con el fin de conocer las condiciones óptimas de crecimiento de las cepas se realizaron pruebas de crecimiento en distintas condiciones de pH, temperatura y salinidad. Se utilizó la técnica de goteo en placa para determinar las condiciones de crecimiento de las cepas con crecimiento levaduriforme, (figura 10). (Lugo *et al.*, 2012).

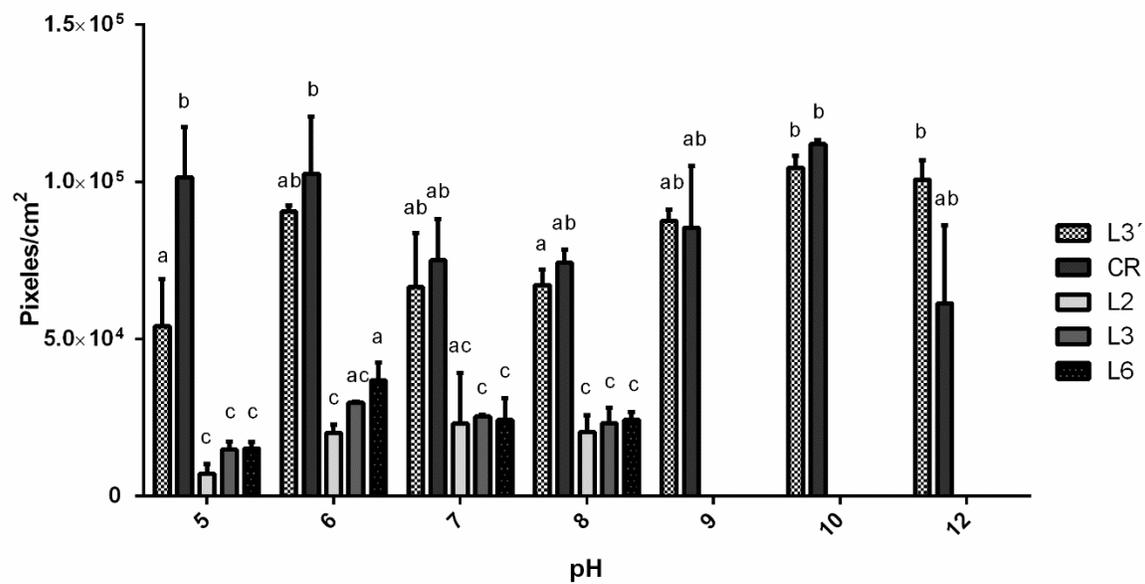


Figura 10: Determinación del pH óptimo de las distintas cepas (72 horas de crecimiento a 32 °C Two-way ANOVA $p < 0,05$).

Las cepas L3' y CR son pH tolerantes, ya que crecen en un rango de pH de 5 a 12, mientras que las cepas L2, L3, y L6 crecen en un rango de pH 5 a 8. El mejor crecimiento se observa cuando las cepas crecen en pH=6 sobre placas de PDA (Figura 10). Al evaluar el crecimiento de la cepa L3' en medio líquido con distintos pHs (5, 6, 10 y 12), se observó que esta tiene un mejor crecimiento a pH 6 y pH 10; donde el tiempo de duplicación fue de 2.338 h y 2.136 h respectivamente (Figura 11). Al final de la cinética se observa que la densidad óptica vuelva a subir, este se debe a que la cepa L3' produce pigmentos que podrían estar absorbiendo a esa longitud de onda. Además de obtener la curva de crecimiento midiendo densidad óptica, también se contó el número de células, donde el resultado se muestra como sigue: pH 5 a las 54 hrs: 13×10^6 células/ml, 138 hrs: 11×10^6 células/ml; pH 6 a las 54 hrs: 16×10^6 células/ml, 138 hrs 16×10^6 células/ml; pH 10 54 hrs: $16,5 \times 10^6$ células/ml, 138 hrs $16,6 \times 10^6$ células/ml; pH 12 54 hrs: 13×10^6 células/ml, 138 hrs 13×10^6 células/ml.

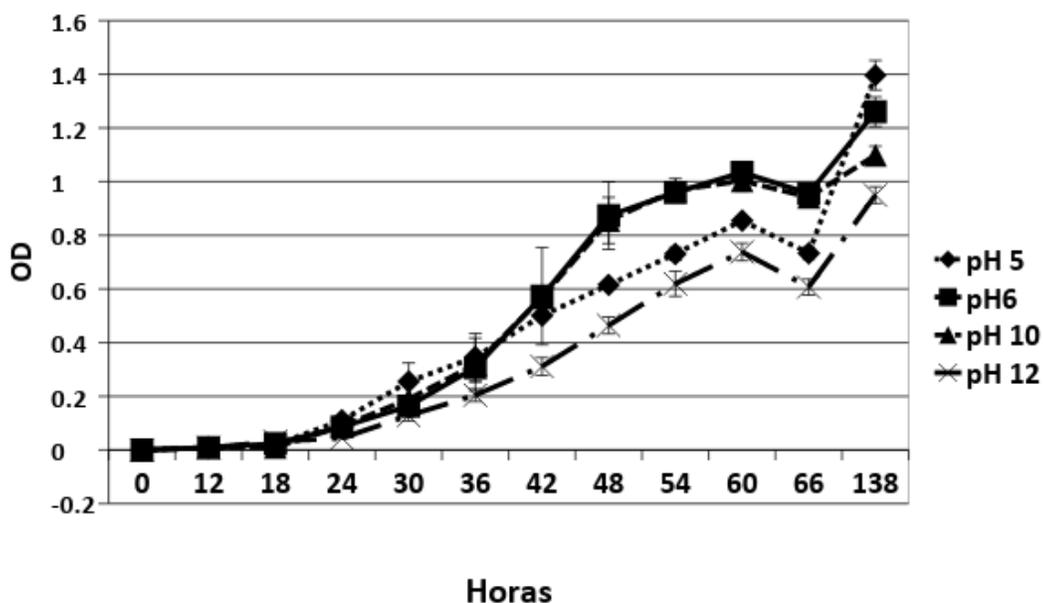


Figura 11: Cinética de crecimiento de la cepa L3' a pH distintos en PDB.

Una vez que determinamos el pH óptimo de crecimiento de las cepas L3' y CR, se procedió a evaluar el crecimiento de las cepas en las siguientes temperaturas: 25, 32 y 37 °C. La cepa L3' creció a 25 y 32 °C, sin embargo, su crecimiento fue menor a 37 °C. En contraste las cepas L2 y L3 crecieron a 32 °C, mientras que la cepa L6 creció a 32 y 37 °C (Figura 12). La cepa CR crece mejor a 32 °C que a 37 °C.

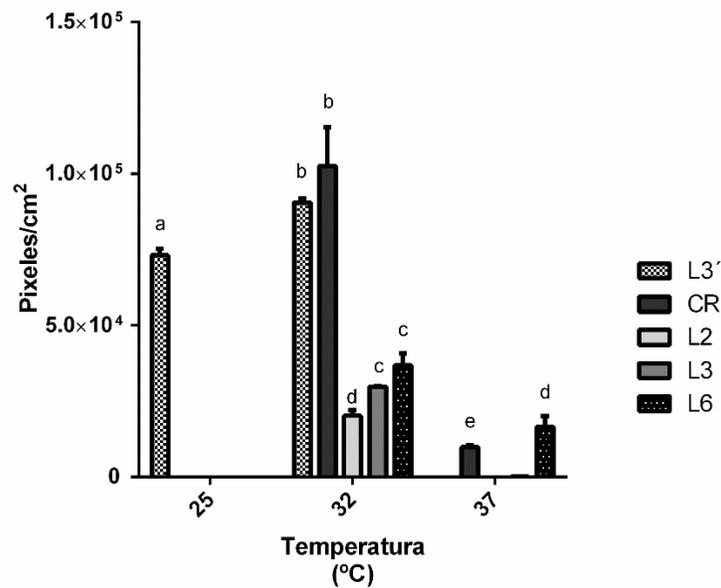


Figura 12: Determinación de la temperatura óptima de crecimiento de las distintas cepas (72 horas de crecimiento Two-way ANOVA $p < 0.05$).

Como se mencionó anteriormente, la salinidad es una de las principales limitantes del crecimiento de distintos organismos, por lo cual se procedió a evaluar si las cepas son halotolerantes. Se determinó que las cepas L3' y CR toleran hasta 1M de NaCl de acuerdo a las mediciones radiales que se obtuvieron del crecimiento en caja y evaluando distintas concentraciones de NaCl (Tabla 9). Por otro lado, se observó que la cepa CR en presencia de cloruro de sodio, presentó crecimiento levaduriforme (Figura 13).

Tabla 9: Determinación del diámetro de la colonia (en cm) de las cepas L3' y CR

Strain	No NaCl	1M NaCl	2M NaCl
L3'	1.9 ± 0.3cm	0.5 ± 0.1cm	0 cm
CR	1.7 ± 0.2cm	0.5 ± 0.1cm	0 cm
Ctr	1.2 ± 0.1cm	0 cm	0 cm

Inóculo de 10 mil células en caja de Petri con agar PDA y distintas concentraciones de NaCl (5 días de crecimiento). Ctr= Bacteria no tolerante a NaCl.

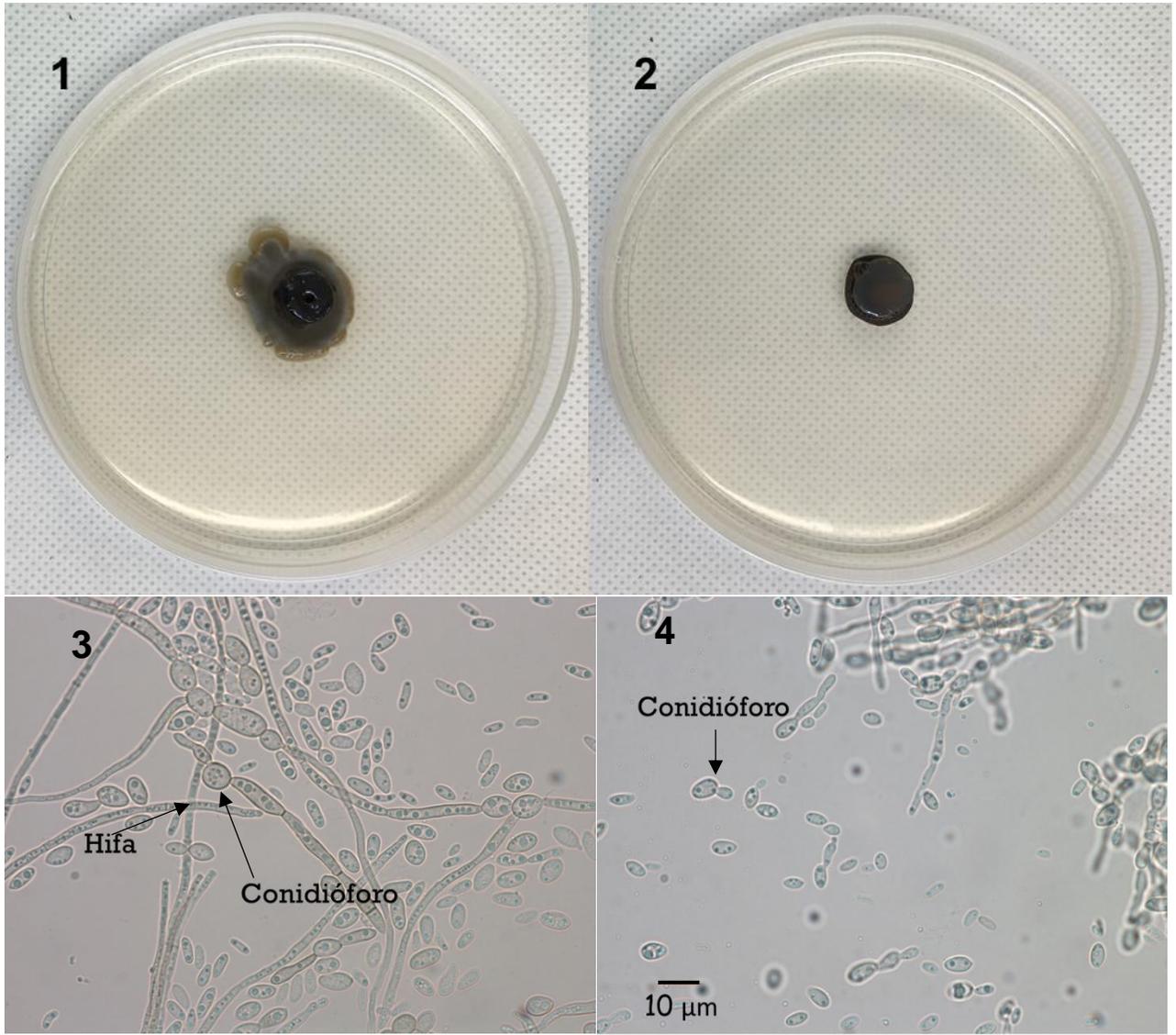


Figura 13: Morfología macroscópica (1,2) y microscópica (3,4) de la cepa CR crecida PDA sin NaCl y PDA con 1M de NaCl.

En la imagen de microscopia con contraste de fases (3) se observa que en la condición sin NaCl los conidióforos se encuentran unidos en las hifas, sin embargo, en presencia de NaCl (4) las células conidiógenas están separadas independientemente.

Se ha determinado que la presencia de ácidos orgánicos (ácidos húmicos y fúmicos) en un suelo, provoca que el pH sea ligeramente ácido ($\text{pH}6 \pm 0,5$). Sin embargo, cuando hay un derrame de hidrocarburos, el pH del sitio se vuelve más básico ($\text{pH}8 \pm 0,5$) (Pardo *et al.*, 2011; Barbosa 2016). Los resultados que hemos obtenido indican que nuestras cepas crecen en un pH ácido, pero también en uno básico, esto resulta interesante para técnicas de biorremediación, ya que Loya en el 2012 y Buendía en el 2013, mencionan que es necesario un rango de pH de 6 - 8 y una temperatura mayor a los 30 °C para que los procesos de biorremediación puedan ser eficaces. La salinidad es otro factor importante a considerar en los procesos de biorremediación, se ha descrito que los sitios contaminados con hidrocarburos, aumentan la concentración de sales y de metales divalentes (Loya 2012). Es importante mencionar que distintos estudios en los que se evalúa la remoción de hidrocarburos por microorganismos no consideran evaluar estos parámetros para llevar a cabo una remoción más eficaz del hidrocarburo (Ramírez *et al* 2010; Marchand y colaboradores en el 2017; Ameen y colaboradores en el 2015), Tales estudios solo reportan si las cepas aislados (hongos y bacterias) son o no capaces de degradar estos hidrocarburos bajo condiciones óptimas de los microorganismos.

7.3. Identificación de las cepas aisladas.

Para la identificación molecular, se purificó el ADN genómico de las cepas aisladas crecidas en PDB (Figura 14).

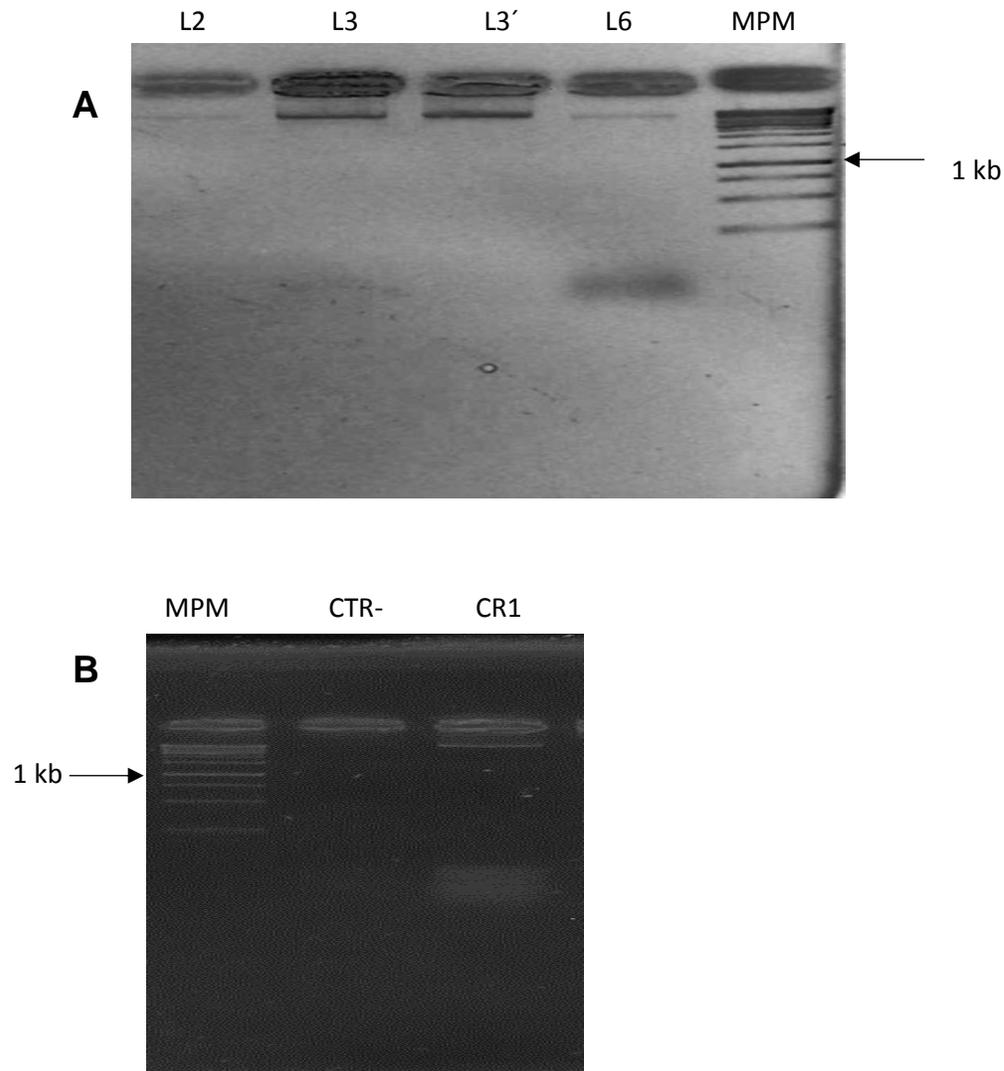


Figura 14: DNA genómico obtenido de las cepas aisladas. A) gDNA de las distintas cepas L2, L3, L3' y L6. B) gDNA de la cepa CR. Se corrió un gel de agarosa al 1%, y se utilizó el marcador de peso molecular de 1 kb (ThermoScientific).

En la imagen se observa que el gDNA se encuentra íntegro y no muestra ningún tipo de degradación.

Una vez purificado el gDNA, se realizaron reacciones de PCR (reacción en cadena de la polimerasa), para amplificar la región ITS (utilizando a los oligos ITS3-4) de las cepas (Figura 15). Solo se obtuvieron amplicones de las cepas L3' y CR. Se realizaron varios intentos de amplificación para las cepas L3, L2 y L6, partiendo de diferentes purificaciones de ADN genómico, sin embargo, todos fueron negativos. Este resultado y la morfología y el tamaño de las células observadas por microscopía nos sugirieron que eran bacterias. Por lo que se procedió a amplificar el marcador para este grupo de organismos con el rDNA 16S.

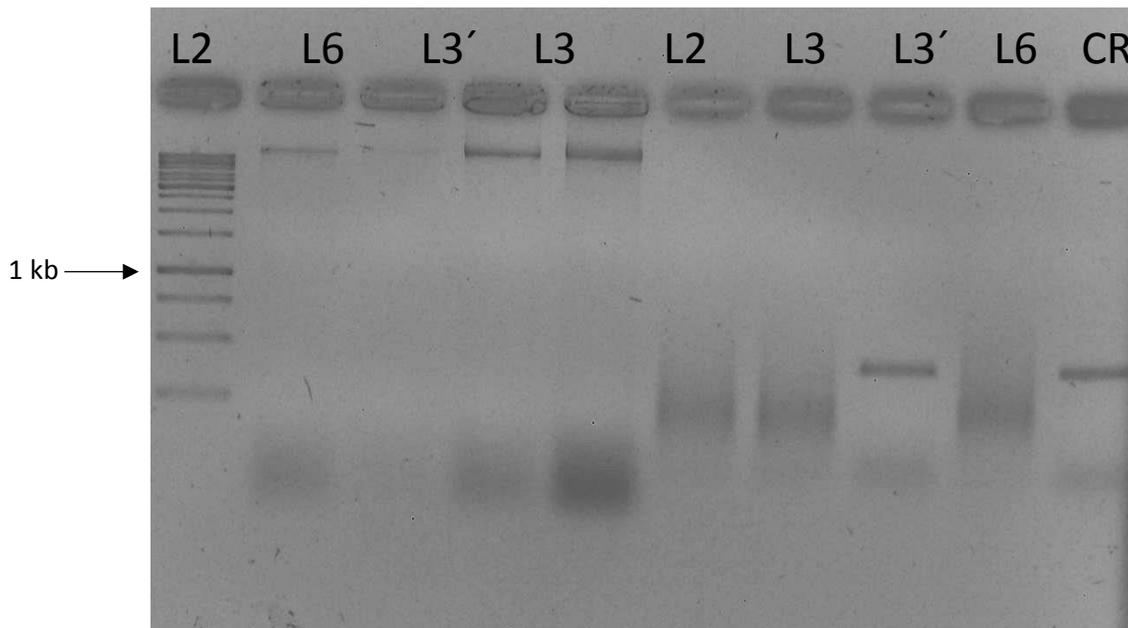


Figura 15: Amplificación del marcadores ITS para eucariontes Productos de PCR de la región its 2 usando los primer its 3 y 4. Carriles 2-5 gDNA NUMERAR LOS CARRILES de las cepas L2, L3. L3' y L6, carriles 6-10 producto de PCR de la región ITS de las cepas L3' y CR.

En la imagen del gel se observan que únicamente las cepas L3' y CR amplificaron para el marcador ITS2, dichos amplicones tienen un tamaño aproximado de 500 pb. Los amplicones se purificaron y se secuenciaron. Teniendo las secuencias de las cepas, se realizó un blast en la base de datos del NCBI. Los resultados del blast arrojaron que la cepa CR tiene un 99,8% de identidad con la cepa KP959255.1

(*Exophila heteromorpha*), mientras que la cepa L3 tuvo un 99,8% de identidad con la cepa NR_073296 (*Rhodotorula mucilaginosa*) (Anexo 2).

Se realizó la construcción de los árboles filogenéticos, usando el método de distancias BioNeigbor junin (BioNJ) con el modelo K2P (Kimura 2 parámetros). Como se muestra en la figura 16, la cepa CR se encuentra filogenéticamente cercana a la cepa *E. heteromorpha* antes mencionada. Esta pertenece al orden Chaetothyriales y al género *Exophiala* del que se conoce poco y se relaciona con las levaduras negras, el cual pertenece al orden (Blasi *et al.*, 2016). Este género de hongos ha sido poco reportado para la remoción/degradación de hidrocarburos. En los últimos 4 años, solo existen dos reportes del aislamiento de cepas del género *Exophiala* en sitios con alto contenido de hidrocarburos (Zhang *et al.*, 2019; Blasi *et al.*, 2016). En décadas recientes se ha propuesto el grupo de levaduras negras (*Capronia spp.*, *Cladophialophora spp.*, *Phialophora spp.*, *etc*) como agentes de biorremediación, ya que estos son encontrados principalmente en lugares contaminados como: residuos industriales, tanques de gasolina de autos, y filtros de aire (Blasi *et al.*, 2016), aunado a esto, este grupo de levaduras puede sobrevivir a condiciones extremas (un pH ácido o básico, temperatura altas y bajas, baja actividad de agua, etc.), esta característica de extremo-tolerancia favorece su uso para técnicas de biorremediación (Blasi *et al.*, 2016). Sin embargo, pocos estudios han demostrado que estos microorganismos puedan remover hidrocarburos como los BTX's (Zhang *et al.*, 2019).

La relación filogenética de la cepa L3' resultó cercana a la cepa KY495729 clasificada como *Rhodotorula pacifica* (Figura 17). En contraste con las cepas del género *Exophiala*, las cepas del género *Rhodotorula* han sido más estudiadas. Hashem y colaboradores en el 2017, mencionan que cepas del género pueden crecer en compuestos tales como gasolina y diésel y utilizándolo como única fuente de carbono y energía. Ellos reportaron que *R. taiwanensis* fue la mejor degradando hidrocarburos alifáticos, y *R. ingeniosa* la mejor para degradar HPAs.

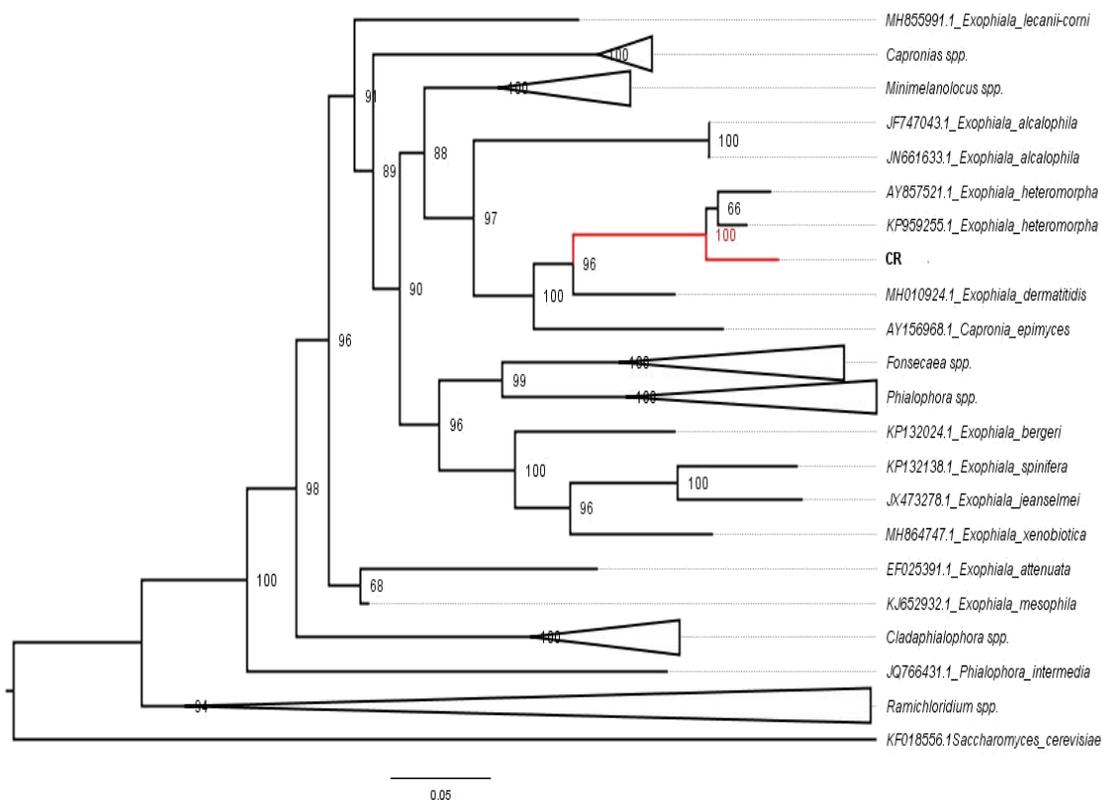


Figura 16: Filograma de la familia Herpotrichiellaceae BioNJ modelo K2P 1000 bootstrap Seaview versión 3,2.

Cabe destacar, que los ITS son marcadores moleculares con los que se pueden realizar árboles filogenéticos que nos permiten resolver a nivel de género. Sin embargo, para llevar a cabo la identificación a nivel de especie es necesario usar marcadores específicos tales como el gen para el factor de transcripción 1- α (TEF1) y el gen para β -tubulina (TUB2) (Zhang *et al.*, 2019).

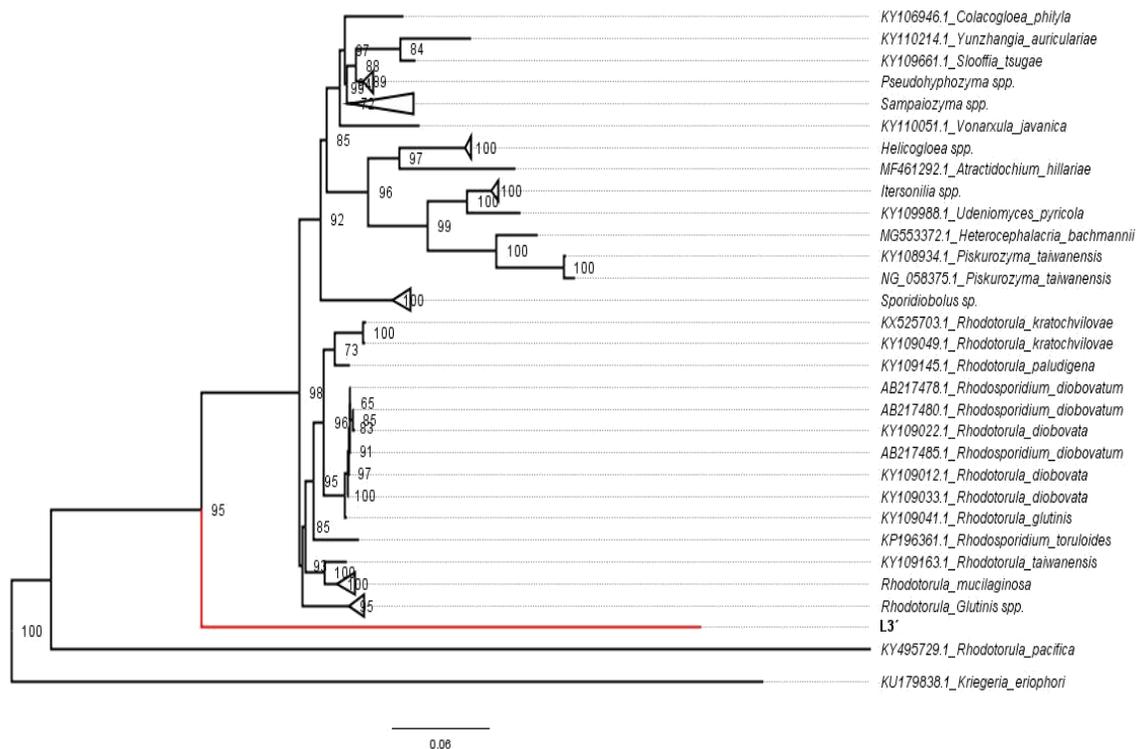


Figura 17: Filogenia de la cepa L3' BioNJ modelo K2P 1000 bootstrap Seaview versión 3,2.

Dados los resultados de los filogramas la cepa L3' se clasifico como *Rhodotorula* sp. y la cepa CR como *Exophiala* sp.

7.4. Remoción de hidrocarburos aromáticos.

Para evaluar la capacidad de *Exophiala* sp (CR) y de *Rhodotorula* sp (L3') para remover hidrocarburos, se generó una gasolina artificial la cual tiene la siguiente composición: benceno (0.1%), xilenos (0.22%), tolueno (0.8%), fenantreno (0.5%) y BaP (0.5%). Se utilizó HPLC para determinar la remoción de estos hidrocarburos en el sobrenadante de los cultivos (Anexo 3). Se determinó que la cepa identificada como *Rhodotorula* sp fue capaz de remover el ± 100 % de xilenos, benceno y tolueno en 15 días, esto se puede deducir porque que los picos que corresponden a cada uno de ellos no se detectan. Sin embargo, al día 18 de la cinética se vuelven a detectar, la cuantificación muestra la presencia de 28.57% para el tolueno, 33.03% para el benceno y ± 2 % para los xilenos en relación a la concentración inicial. Posteriormente al día 21 de la cinética ya no fueron detectados. De manera relevante, en ningún punto de los días evaluados se observa remoción del BaP o del fenantreno (Figura 18).

De manera paralela, se evaluó el crecimiento de la cepa en las mismas condiciones y se pudo determinar que la fase exponencial tiene su máximo a los 15 días de la cinética. Al día 18 la cantidad células fue similar a las obtenidas al día 15, este dato coincide con el día en que los picos de los hidrocarburos evaluados volvieron a detectarse. Esto sugiere que los hidrocarburos monocíclicos estaban adsorbidos en

la pared celular y que, fueron desadsorbidos al día 18. Para el día 21 hubo crecimiento celular y los picos de los HMA no se detectaron (Figura 18).

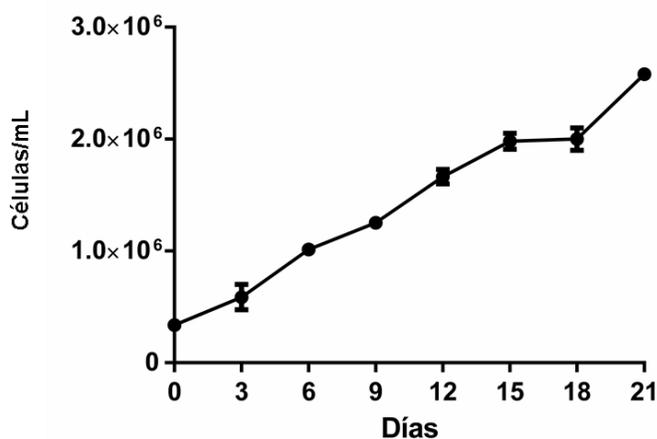
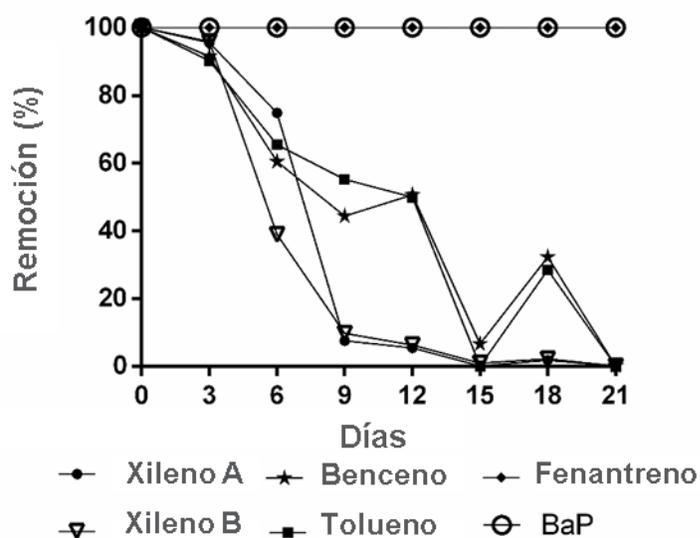


Figura 18: Remoción de hidrocarburos por *Rhodotorula* sp.

A partir de una mezcla artificial de gasolina A) Remoción de BTXs tomando como 100% la concentración inicial (0.1 Benceno, 0.22% de Xilenos y 0.8% de tolueno) y 0.1% de HPAs (0.05% Fenantreno y 0.05% de BaP). B) Crecimiento de *Rhodotorula* sp. en presencia de BTXs y HPAs (Fenantreno y BaP). En la imagen se muestra que la cepa evaluada es capaz de disminuir el porcentaje de los hidrocarburos la cual contrasta con el aumento en el número de células.

El ensayo de remoción utilizando la cepa de *Exophiala* sp. se realizó utilizando las mismas condiciones de crecimiento y la misma técnica para su evaluación. Esta cepa muestra preferencia por el uso de los HPAs ya que removió un 80% de BaP y un 63,6% de fenantreno a los 21 días. Aunado a esto, la cepa removió un 50% de xilenos. Por otro lado, la cepa removió un 25% del benceno y del tolueno a los 18 y 21 días respectivamente. De manera paralela se monitoreo el crecimiento de *Exophiala* sp. bajo las mismas condiciones, a través del conteo celular en los mismos días que se tomaron para evaluar la remoción. La figura 19 muestra que la cepa tiene una fase de adaptación en los primero seis días, y la fase exponencial inicia a partir del día 9. Esto coincide con lo observado con *Rhodotorula* sp. ya que, en el día 3 y 6 se detecta un 69% y 56.5% de fenantreno, mientras que para el día nueve hay un 84.7% de fenantreno, en los días siguientes la disminución de fenantreno disminuyó gradualmente (Figura 19). Es importante mencionar que los resultados son consistentes con el modelo de crecimiento microbiano el cual menciona que la concentración de sustrato suele ser limitante, es por ello que a medida que disminuyen los hidrocarburos hay un aumento en la biomasa (Gómez *et al.*, 2017)

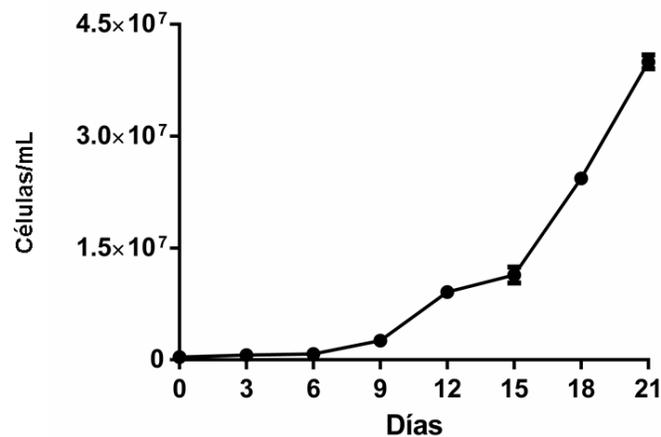
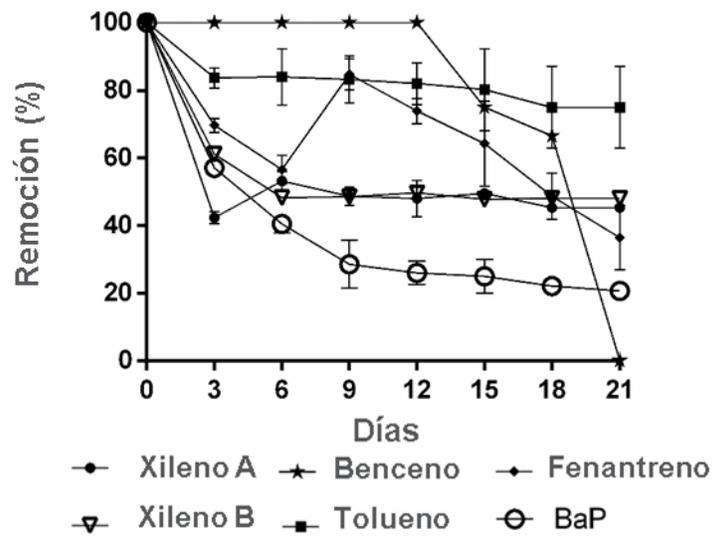


Figura 19: Remoción de BTXs y PHAs por *Exophiala* sp.

A) Remoción de BTXs tomando como 100% la concentración inicial (0.1 Benceno, 0.22% de Xilenos y 0.8% de tolueno) y 0.1% de HPAs (0.05% Fenantreno y 0.05% de BaP). B) Crecimiento de *Exophiala* sp. en presencia de BTXs y HPAs (Fenantreno y BaP). En la imagen se muestra que la cepa evaluada es capaz de disminuir el porcentaje de los hidrocarburos la cual contrasta con el aumento en el número de células.

Cabe mencionar que en distintos trabajos se han reportado cepas de organismos fúngicos capaces de degradar HPAs (fenantreno, pireno, BaP etc) y BTXs (Pernia *et al.*, 2012). Entre estos microorganismos podemos encontrar a los pertenecientes a los géneros *Aspergillus*, *Penecillium* y recientemente levaduras tales como *Yarrowia* y algunos géneros pertenecientes a las levaduras negras (Ameen *et al.*, 2015).

En trabajos como el de Araujo en el 2015, se evaluó la capacidad de *Aspergillus niger* y *Aspergillus flavus*, para remover hasta 20 ppm de HPAs, y que estas cepas pueden remover hasta de 5 ppm de estos compuestos en un periodo de 60 días. Además, cepas bacterianas y microorganismos fúngicos donde destacan los géneros *Rhodococcus spp* y *Pseudomonas sp.* y los hongos *Trichoderma tomentosum* y *Fusarium oxysporum*, remueven antraceno, fenantreno, fluoreno y pireno en 7 semanas, mostrando una disminución del 33,55%, 43,25%, 49,85% y 77,45% para cada compuesto (Marchand *et al.*, 2017). Aunado a esto Visitación y colaboradores en el 2016 obtuvieron remoción de un 80 al 90% de distintos HPAs en 120 días usando compost, mencionando que dicha remoción fue influenciada por la presencia de microorganismo que puede degradar estos compuestos. De manera relevante, la cepa *Exophiala sp.* del presente trabajo mostró la capacidad de remover hasta 62 ppm de HPA's (BaP y fenantreno) en un periodo de 21 días, demostrando que nuestra cepa remueve HPA's más eficientemente en comparación con los organismos fúngicos mencionados por Araujo en el 2015 y Marchand y colaboradores en el 2017.

Por otro lado, dado que los organismos pertenecientes a los géneros *Exophiala* y *Rhodotorula* generalmente presentan la capacidad de sobrevivir en condiciones hostiles, se han propuesto a estos como organismos con potencial para de biodegradación *in situ*, principalmente para su uso en biorremediación de sitios contaminados con hidrocarburos, en la siguiente tabla se muestran reportes de años recientes sobre el aislamiento de cepas de los géneros antes mencionados.

Tabla 10: Reportes del aislamiento de levaduras del género *Exophiala* y *Rhodotorula*.

Levadura	Sitio de aislamiento	Hidrocarburo utilizado en el estudio	Autor
<i>Exophiala</i> sp.	Mar rojo (Arabia Saudita)	Diésel	Ameen <i>et al.</i> , 2016
<i>E. macquariensis</i>	Contaminación de diésel (Antártico)	Tolueno	Zhang <i>et al.</i> , 2018
<i>E. mesophila</i>	Humano (USA)	Tolueno y hexadecano	Blasi <i>et al.</i> , 2016
<i>E. xenobiotica</i>	Agua contaminada con benceno (Brasil)	Benceno	Blasi <i>et al.</i> , 2016
<i>Rhodotorula</i> sp.	Katpadi India	BaP	Mandal y Das 2017
<i>R. calyptogenae</i> y <i>R. diarenensis</i>	Tanques de gasolina (Colombia)	BTX's, fenentreno y pireno	Delgadillo <i>et al.</i> , 2017
<i>R. taiwanensis</i> y <i>R. ingeniosa</i>	Dato no publicado (Arabia Saudita)	Alcanos y Hidrocarburos aromáticos	Hashem <i>et al.</i> , 2017

7.5. Ensayos toxicológicos.

Con el objetivo de evaluar la toxicidad de los medios líquidos con gasolina artificial tratados con las cepas aisladas, se realizaron ensayos toxicológicos usando como modelo la germinación de semillas de pepino (*Cucumis sativus*) y los sobrenadantes de los días 0, 6, 15 y 21 de los medios tratados independientemente con la cepa *Rhodotorula* sp y la cepa *Exophiala* sp.

Las semillas de *C. sativus* han sido ampliamente usadas para estudios toxicológicos no solo de daños tóxicos por hidrocarburos, sino también para evaluar la toxicidad de metales pesados (Cu, Mg, etc.) (Hussain, *et al.*, 2015).

Los resultados indican que los sobrenadantes de los medios tratados con la cepa *Rhodotorula* sp. mostraron ser tóxicos para el modelo a estudio en los primeros días de tratamiento. Sin embargo, las semillas que se inocularon con el sobrenadante obtenido en el sexto día del experimento de remoción de hidrocarburos, mostraron un porcentaje de germinación del 84%, indicando un buen porcentaje de remoción de la toxicidad del medio (Tabla 11).

Por otro lado, cuando se usaron los sobrenadantes de medios con BTXs y HPAs a los días 6 y 15 del tratamiento con la cepa de *Exophiala* sp, el porcentaje de germinación de las semillas fue de un 92.3%. Curiosamente, las semillas inoculadas con los medios obtenidos del día 21 de tratamiento sólo alcanzaron un 76.9% de germinación (Tabla 11), sugiriendo que tratamientos muy largos podrían generar sustancias otras tóxicas.

Tabla 11: Porcentaje de germinación de las semillas de *C. sativus*

		% de germinación	D.E
Controles	-	100,0	0,58
	Hexano	92,3	0,00
	+	61,5	0,58
<i>Exophiala sp.</i>	D6	92,3	0,00
	D15	92,3	0,00
	D21	76,9	0,00
<i>Rhodotorula sp.</i>	D6	84,6	0,58
	D15	0,0	0,00
	D21	0,0	0,00

(Control=Agar agua; control hexano=agar agua+ 20%hexano (solvente utilizado para la extracción de la mezcla de hidrocarburos); control+=agar agua+ gasolina artificial disuelta en hexano; D6, D15, D21 son los días en que las muestras de los cultivos de hongos de los medios con la mezcla de AH (como fuentes de carbono) se recogen y extraen con hexano.)

Durante este experimento se observó que el tamaño de la radícula se veía afectado de acuerdo con el tratamiento. En los sobrenadantes obtenidos del experimento con *Rhodotorula sp.* Las semillas que germinaron obtuvieron un tamaño promedio de 1.67 cm (Figura 20). Así mismo se evidenció que el tamaño de la radícula de las semillas con los medios tratados con *Exophiala sp.* en los días 6 y 15, mostraron un crecimiento mayor que las semillas germinadas usando el sobrenadante del control positivo (medio con BTXs y HPAs sin inocular), sin embargo, las semillas germinadas en el sobrenadante del día 21 mostraron una longitud de radícula menor comparada con la del control negativo (figura 20). Este comportamiento ya se ha observado en otros estudios, por ejemplo, en un ensayo germinación de semillas *Lactuca sativa* (lechuga) inoculadas en sobrenadantes obtenidos durante la degradación de una mezcla de HPAs tratados con compost. Este presenta un comportamiento al que ellos llaman anormal, debido a que el índice de germinación

disminuye al ser inoculado en el sobrenadante obtenido en el día 28 en comparación con el control negativo (sobrenadantes del día 0), adjudicando que dicho comportamiento puede deberse a la formación de productos intermedios con mayor toxicidad como los son epóxidos y dihidrioles (Visitación *et al.*, 2016).

En contraste con nuestro trabajo, Gonzales en el 2018 reporta que en sobrenadantes obtenidos a partir de cultivos suplementados con fenantreno y BaP tratados con *Aspergillus sydowii* y *A. destrudens* durante 12 días, en los sobrenadantes tratados por *A. sydowii* las semillas de *C. sativus*, mostraron 7.7 ± 0.42 cm de longitud de radícula, dicha longitud fue mayor a la mostrada por las semillas germinadas en el control positivo (agua). Sin embargo, las semillas germinadas en los sobrenadantes tratados con *A. destrudens* el tamaño de la radícula fue similar al del sobrenadante con hidrocarburos sin inocular.

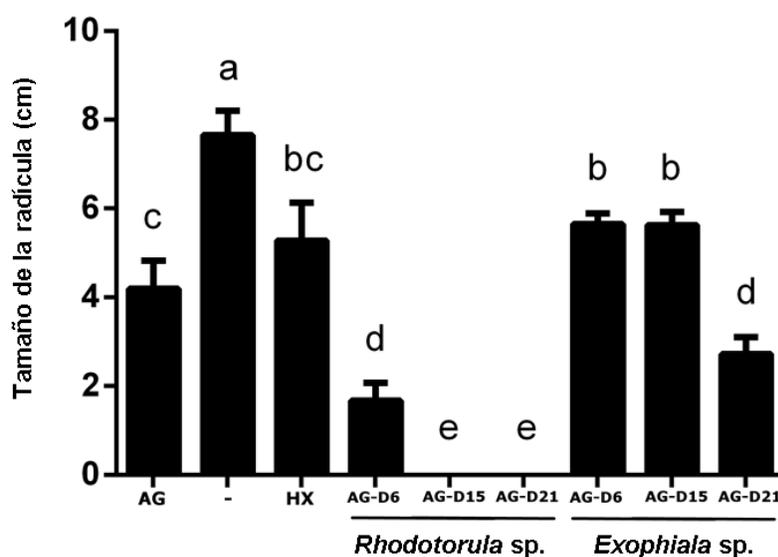


Figura 20: Gráfica del tamaño de radícula de los germinados de semillas de *C. sativus* inoculadas en Agar agua con los sobrenadantes tratados (6,15 y 21 días) por *Exophiala sp* (AG-D6, AG-D16, AG-D21) y *Rhodotorula sp.* (AG-D6, AG-D15, AG-D21). -= Agar agua, AG = Agar agua + BTXs y HPAs, HX= Agar agua + Hexano.

8. Conclusiones.

En el presente trabajo se aislaron 12 microorganismos levaduriformes a partir de sitios contaminados con derivados del petróleo, todos ellos toleran 3% de diésel. De estos aislados únicamente cinco de ellos poseen capacidades metabólicas para usar derivados del petróleo como fuente de carbono, sin embargo, únicamente las cepas identificadas como *Rhodotorula sp* y *Exophiala sp* pueden crecer en mayor concentración de diesel (4% para *Rhodotorula sp* y >4% para *Exophiala sp*), además de crecer en presencia de fenantreno y BaP.

Por otro lado, las cepas antes mencionadas mostraron ser poliextremófilas debido a que toleran un amplio rango de pH (pH 4-12), pueden crecer hasta en 1M de NaCl y en temperaturas entre los 25 a 37 °C.

La cepa de *Rhodotorula sp* mostró la habilidad de remover el 100% de las concentraciones usadas de BTXs en un periodo de 21 días, sin embargo, no se observó remoción HPA's. Por su parte la cepa *Exophiala sp* removió 62% de la combinación de fenantreno y BaP, 100% de benceno, ±50% de xilenos y 10% de tolueno durante el mismo tiempo.

Los ensayos toxicológicos con *C. sativus*, demostraron que los sobrenadantes obtenidos en los días 6, 15 y 21 del tratamiento con *Rhodotorula sp*, son más tóxicos que el sobrenadante colectado el día 0. En cambio, los sobrenadantes obtenidos en los días 6 y 15 con el tratamiento con *Exophiala sp*, son menos tóxicos en comparación con el control positivo (sobrenadante del día 0), sin embargo, el sobrenadante colectado el día 21 fue más tóxico que los colectados en días anteriores.

9. Perspectivas.

Realizar los PCR de los marcadores moleculares específicos β -tubulina (TUB2), posteriormente se elaborarán los filogramas de las cepas.

Realizar transcriptoma de las cepas *Exophiala sp* y *Rhodotorula sp*. usando BTXs y HPAs como única fuente de carbono, así como PCR en tiempo real para evaluar la expresión génica de estas cepas.

Realizar ensayos de remoción de hidrocarburos con consorcios de las cepas aisladas.

Anexos.

Anexo 1.

Metodología de microscopía de contraste de fases.

Sin incubaron la cepas en PDA y en PDA con 0.5M de NaCl durante 5 días, posteriormente utilizando una asa microbiológica se tomó una muestra de cada cepa. La muestra de la cepa se colocó en un portaobjetos en cual se colocaron 10 µL de azul de lactofenol y 10 µL de agua destilada. Finalmente las muestras se observaron utilizando el microscópio de contraste de fases (Axio observer) con un plano-apocromático utilizando el objetivo 100x. Las fotos se tomaron utilizando la cámara ORCA-Flash 4.0 y el software ZenPro2012.

Anexo 2.

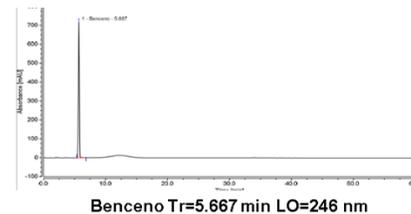
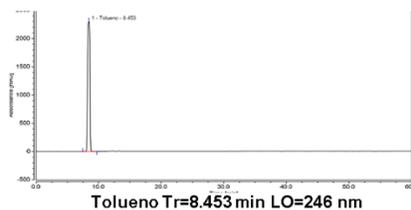
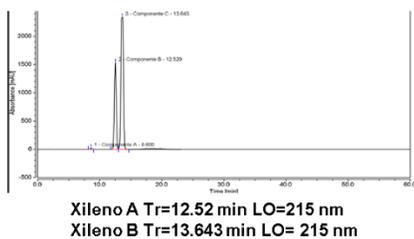
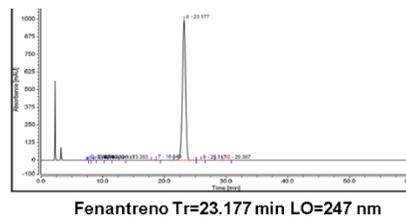
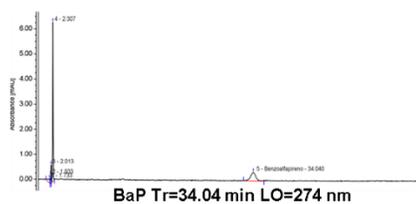
Tabla del resultado del Blast de las cepas L3 y CR.

Strain	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> strain JYC2617	665	665	0,99	0.0	98.93%	MN648703.1
<i>Rhodotorula</i> sp. strain SM03UFAM2	665	665	0,99	0.0	98.93%	MN268779.1
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> strain JYC529	665	665	0,99	0.0	98.93%	MN244371.1
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> YE-171	665	665	0,99	0.0	98.93%	LC486532.1
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> strain WUT167	665	665	0,99	0.0	98.93%	MN006818.1
<i>Rhodotorula</i> sp. strain DAMB1	665	665	0,99	0.0	98.93%	MK968443.1
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> strain IMUFRJ	665	665	0,99	0.0	98.93%	MK263185.1
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> strain JYC2514	665	665	0,99	0.0	98.93%	MK044011.1
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> strain JYC2513	665	665	0,99	0.0	98.93%	MK044010.1

Strain	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<i>Exophiala heteromorpha</i> strain IFRC 762	640	640	0,99	2E-179	99.43%	KP959253.1
<i>Exophiala</i> sp. DAOM 216391	640	640	0,99	2E-179	99.43%	AF050267.1
<i>Exophiala heteromorpha</i> strain CBS 137222	634	634	0,99	8E-178	99.15%	KJ522800.1
<i>Exophiala</i> sp. strain TC201	630	630	0,99	1E-176	98.87%	MK465183.1
<i>Exophiala heteromorpha</i> isolate 21	630	630	0,99	1E-176	99.15%	KC349856.1
<i>Exophiala heteromorpha</i> strain IFRC 686	623	623	0,99	2E-174	98.58%	KP959252.1
<i>Exophiala heteromorpha</i> strain IFRC 761	617	617	0,98	8E-173	98.57%	KP959251.1
<i>Exophiala heteromorpha</i> strain IFRC 813	612	612	0,95	4E-171	99.41%	KP959255.1
<i>Exophiala heteromorpha</i> strain CBS 137223	612	612	0,99	4E-171	98.02%	KJ522801.1

Anexo 3.

Cromatogramas de los BTX's y HPA's utilizados en la mezcla de la gasolina artificial.



Bibliografía.

- Acosta-Rodríguez, I., Moctezuma-Zárate, M. G., Tovar-Oviedo, J., & Cárdenas-González, J. F. (2011). Aislamiento e Identificación de Bacterias y Levaduras Resistentes a Petróleo. *Información Tecnológica*, 22(6), 103–110. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642011000600011>
- Aleemuddin, M., GirishBabu, M., Manjunath, M. L., &Quadri, S. S. (2015). Effects of chronicinhalation of petroleum products on hematological paremeters. *International Journal of CurrentResearch and AcademicReview*, 3(4), 196–201.
- Ameen, F., Moslem, M., Hadi, S., & Al-Sabri, A. E. (2016). Biodegradation of diesel fuel hydrocarbons by mangrove fungi from Red Sea Coast of Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23(2), 211–218. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.04.005>
- Andrea Critto a, Silvia Torresan a, Elena Semenzina,b, Silvio Giove c, Miranda Mesmand,A.J. Schouten d, M. Rutgers d, Antonio Marcomini. *Science of the Total Environment* 379 (2007) 16–33. Relationship between pollutant content and ecotoxicity of sew age’s lodges from Spanish wastewater treatment plants.
- Andrés Salazar, A. (2017). Cuantificación de los aditivos BTEX presentes en la gasolina distribuida en el Distrito Metropolitano de Quito y análisis ingenieril del trabajo de la refinería. Tesis (Ingeniero Químico), Universidad San Francisco de Quito, Colegio de Ciencias e Ingeniería; Quito, Ecuador, 2015.
- API. 2004. Interactive LNAPL guide. Version 2.0 The American Petroleum Institute. Environmental System and Technologies, Park City, Utah. EE.UU. p 1-10.
- Aranda, E., 2016. Promising approaches towards biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbon swith Ascomycota fungi. *Current Opinion in Biotechnology* 38, 1–8.
- Araujo, J., Yegres, F., Barreto, G., Antequera, A. A., Depool, B., & Rojas, Y. (2016). Biocatalizadores fúngicos hidrocarbonoclásticos del genero *Aspergillus* para la descontaminación de agua con Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos (HPAs). *Revista Cubana de Química*, 28(2), 703–735.

- Balcázar-López, E., Méndez-Lorenzo, L. H., Batista-García, R. A., Esquivel-Naranjo, U., Ayala, M., Kumar, V. V., Folch-Mallol, J. L. (2016). Xenobiotic Compounds Degradation by Heterologous Expression of a *Trametes sanguineus* Laccase in *Trichoderma atroviride*. *PLOS ONE*, 11(2), e0147997.
- Barbosa Mireles, E. E. (2016). *Aislamiento, caracterización y aplicación de consorcios bacterianos hidrocarbonoclastas para la degradación de hidrocarburos totales en suelos contaminados* (PhD Thesis). Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Benavides. L., Quintero, G., Vizcaíno, A. L. G., Cáceres, D. C. J., Riaño, S. M. G., & García, J. M. (2006). Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *Nova*, 4(5).
- Blasi, B., Poyntner, C., Rudavsky, T., Prenafeta-Boldú, F. X., de Hoog, S., Tafer, H., & Sterflinger, K. (2016). Pathogenic Yet Environmentally Friendly? Black Fungal Candidates for Bioremediation of Pollutants. *Geomicrobiology Journal*, 33(3–4), 308–317. <https://doi.org/10.1080/01490451.2015.1052118>
- Buendía, H. (2013). Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos mediante el compost de aserrín y estiércol. *Revista Del Instituto de Investigaciones de La Facultad de Geología, Minas, Metalurgia Y Ciencias Geográfica*, 15(30), 123–130.
- Cavazos-Arroyo, Judith, Pérez-Armendáriz, Beatriz, & Mauricio-Gutiérrez, Amparo. (2014). Afectaciones y consecuencias de los derrames de hidrocarburos en suelos agrícolas de Acatzingo, Puebla, México. *Agricultura, sociedad y desarrollo*, 11(4), 539-550.
- Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Gómez-Reyes, R., Medina-Moreno, S. A., Universidad Politécnica de Pachuca, Jiménez-González, A., Universidad Politécnica de Pachuca, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología-Instituto Tecnológico Superior de Tierra Blanca. (2017). AISLAMIENTO Y ANÁLISIS CUALITATIVO DE BIOMASA MICROBIANA FÚNGICA DEGRADADORA DE HIDROCARBUROS DE UN CENOTE DE QUINTANA ROO. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 33(esp01), 53–61. <https://doi.org/10.20937/RICA.2017.33.esp01.05>

- Cerniglia, C. E., & Sutherland, J. B. (2010). Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Fungi. In K. N. Timmis (Ed.), *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* (pp. 2079–2110). Berlin, Heidelberg: SpringerBerlin Heidelberg.
- Das, N., & Chandran, P. (2011). Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview. *Biotechnology Research International*, 2011, 1–13.
- Del Angel, P. S. M. (2013). *ESPECIALISTA EN GESTIÓN E IMPACTO AMBIENTAL*. (PhD Thesis). UNIVERSIDAD VERACRUZANA.
- Delgadillo-Ordoñez, N. C., Posada-Suárez, L. R., Marcelo, E., Cepeda-Hernández, M. L., & Sánchez-Nieves, J. (2017). Aislamiento e identificación de levaduras degradadoras de hidrocarburos aromáticos, presentes en tanques de gasolina de vehículos urbanos. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 19(2), 141–151. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v19n2.70278>
- Faltan aranda, cerniglia, edgar,
- Fuentes, S., Méndez, V., Aguila, P., & Seeger, M. (2014). Bioremediation of petroleum hydrocarbons: catabolic genes, microbial communities, and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(11), 4781–4794. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5684-9>
- Garibaldi, A. A. G. (2018). Biodegradación de Hidrocarburos en Sedimento de la Bahía de Manzanillo. *KnEEngineering*, 3(1), 80.
- Garzón, J. M., Rodríguez Miranda, J. P., & Hernández Gómez, C. (2017). Aporte de la biorremediación para solucionar problemas de contaminación y su relación con el desarrollo sostenible. *Universidad Y Salud*, 19(2), 309. <https://doi.org/10.22267/rus.171902.93>
- Ghanem, K., & Al-Zahrani, M. (2016). Bioremediation of Diesel Fuel by Fungal Consortium Using Statistical Experimental Designs. *Polish Journal of Environmental Studies*, 25(1).
- Ghanem, khaled & Al-Garni, Saleh & Al-Zahrani, Majid. (2016). Bioremediation of Diesel Fuel by Fungal Consortium Using Statistical Experimental Designs. *Polish Journal of Environmental Studies*. 25. [10.15244/pjoes/42493](https://doi.org/10.15244/pjoes/42493).

- Gómez, W., Gaviria, J., & Cardona, S. (2009). Evaluación de la bioestimulación frente a la atenuación natural y la bioaumentación en un suelo contaminado con una mezcla de gasolina-suelo. *Dyna*, 76(160), 83–93.
- Haro-García, Luis, Vélez-Zamora, Nadia, Aguilar-Madrid, Guadalupe, Guerrero-Rivera, Susana, Sánchez-Escalante, Vanessa, R. Muñoz, Sergio, Mezones-Holguín, Edward, & Juárez-Pérez, Cuauhtémoc. (2012). Alteraciones hematológicas en trabajadores expuestos ocupacionalmente a mezcla de benceno- tolueno-xileno (btx) en una fábrica de pinturas. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 29(2), 181-187.
- Hashem, M., Alamri, S. A., Al-Zomyh, S. S. A. A., & Alrumman, S. A. (2018). Biodegradation and detoxification of aliphatic and aromatic hydrocarbons by new yeast strains. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 151, 28–34. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.12.064>
- Hearn, E. M., Patel, D. R., & Van den Berg, B. (2008). Outer-membrane transport of aromatic hydrocarbons as a first step in biodegradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(25), 8601–8606.
- Iturbe Argüelles, R. (2010). ¿Qué es la biorremediación? Dirección General de Divulgación de la Ciencia.
- Kim, J. N., Kim, B.-S., Kim, S.-J., & Cerniglia, C. E. (2012). Effects of Crude Oil, Dispersant, and Oil-Dispersant Mixtures on Human Fecal Microbiota in an In Vitro Culture System. *mBio*, 3(5), e00376-12-e00376-12. <https://doi.org/10.1128/mBio.00376-12>
- Kim, S.-J., Song, J., Kweon, O., Holland, R. D., Kim, D.-W., Kim, J. Cerniglia, C. E. (2012). Functional Robustness of a Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Metabolic Network Examined in a *nidA* Aromatic Ring-Hydroxylating Oxygenase Mutant of *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(10), 3715–3723.
- López Chan, O. (2018). LA POLÍTICA DE PROTECCIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES EN EL SUR-SURESTE DE MÉXICO. LAS ÁREAS NATURALES PROTEGIDAS.

- Mandal, S. K., & Das, N. (2017). Biodegradation of benzo [a] pyrene by *Rhodotorula* sp. NS01 strain isolated from contaminated soil sample. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 10(6), 1751–1757.
- Marchand, C., St-Arnaud, M., Hogland, W., Bell, T. H., & Hijri, M. (2017). Petroleum biodegradation capacity of bacteria and fungi isolated from petroleum-contaminated soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 116, 48–57.
- Marchand, C., St-Arnaud, M., Hogland, W., Bell, T. H., & Hijri, M. (2017). Petroleum biodegradation capacity of bacteria and fungi isolated from petroleum-contaminated soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 116, 48–57. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.09.030>
- Marín Velásquez, T. (2017). Extracto hidroalcohólico de cáscaras de naranja (*Citrus sinensis*) como bioestimulador en un suelo de sabana contaminado con petróleo. *Ingeniería*, 21(2).
- Martínez-Prado, A., PÉREZ-LÓPEZ, M., Pinto-Espinoza, J., Gurrola-Nevárez, B. A., & Osorio-Rodríguez, A. L. (2011). Biorremediación de suelo contaminado con hidrocarburos empleando lodos residuales como fuente alterna de nutrientes. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 27(3), 241–252.
- Navarro Machado, Víctor R. 2009. Los desastres en su interacción con la ciencia, la tecnología y la sociedad. MediSur, revista electrónica. Vol. 4, No. 2.
- Neus Roig a,b, Jordi Sierra a,c, Martí Nadal b, Esther Martí c, Pedro Navalón-Madrigal d, Marta Schuhmachera,b, José L. Domingo. *Science of the Total Environment* 425 (2012) 99–109. *versión On-line* ISSN 1851-6114. *Acta bioquím. clín. latinoam.* v.39 n.1 La Plata ene./mar. 2005.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012, Límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y lineamientos para el muestreo en la caracterización y especificaciones para la remediación.
- Paoloni, J. D. (Ed.). (2010). *Ambiente y recursos naturales del partido de Bahía Blanca: clima, geomorfología, suelo y aguas (sudoeste de la provincia de Buenos Aires)* (1. ed). Bahía Blanca, Argentina: Univ. Nacional del Sur [u.a.].

- Pernía, B., Demey, J. R., Inojosa, Y., & Naranjo-Briceño, L. (2012). Biodiversidad y potencial hidrocarbonoclástico de hongos aislados de crudo y sus derivados: Un meta-análisis. *Rev. Latinoam. Biotecnol. Amb. Algal*, 3(1), 1–40.
- Piñón-Castillo, H. A., Gutiérrez, D. L., Serna, F. J. Z.-D. de la, Hernández-Castillo, D., Muñoz-Castellanos, L. N., Rivera-Chavira, B. E., & Nevárez-Moorillón, G. V. (2018). Laboratory-Scale Biodegradation of Fuel Oil No. 6 in Contaminated Soils by Autochthonous Bacteria. In N. Shiomi (Ed.), *Advances in Bioremediation and Phytoremediation*. InTech.
- Rodríguez-Rey, A., Noris-García, E., & Fundora Torres, M. T. (2016). Principios y relevancia del ensayo cometa. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 35(2), 184–194.
- Rojo F. 2010. "Enzymes for aerobic degradation of alkanes". Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. K. N. Timmis (ed.).
- Seifert, Keith & Hughes, S.J. & Boulay, H & Louis-Seize, Gerry. (2007). Taxonomy, nomenclature and phylogeny of three cladosporium-like hyphomycetes, Sorocyberesinae, Seifertia azalea and the Hormoconisanamorph of Amorphothecaresinae. *Studies in mycology*. 58. 235-45. 10.3114
- Sergio Hurtado Melo. Memoria. Principales métodos de descontaminación de suelos 2009.
- Stefani FOP, Bell TH, Marchand C, de la Providencia IE, El Yassimi A, St-Arnaud M (2015) Culture-Dependent and Independent Methods Capture Different Microbial Community Fractions in Hydrocarbon-Contaminated Soils. *PLoS ONE* 10(6).
- Tkavc, R., Matrosova, V. Y., Grichenko, O. E., Gostinčar, C., Volpe, R. P., Klimenkova, P., Daly, M. J. (2018). Prospects for Fungal Bioremediation of Acidic Radioactive Waste Sites: Characterization and Genome Sequence of *Rhodotorula taiwanensis* MD1149. *Frontiers in Microbiology*, 8.
- Torres, K., Zuluaga, T. (2009). Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos. Tesis de Grado de Ingeniería Química, Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia.
- Ukpaka, C. (2016). Development of model for bioremediation of crude oil using moringa extract. *Chem. Int*, 2(9).

- Usemann, J., Roth, M., Bisig, C., Comte, P., Czerwinski, J., Mayer, A. C. R., Müller, L. (2018). Gasoline particle filter reduces oxidative DNA damage in bronchi al epithelial cell safter whole gasoline exhaust exposure in vitro. *Scientific Reports*, 8(1).
- Visitación Figueroa, L., Rojas, F. J., Meza Contreras, V., & Flores del Pino, L. (2016). Degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos de residuos de barrido de calles usando compost. *Revista de La Sociedad Química Del Perú*, 82(2), 162–174.
- Wasmund K, Burns KA, Kurtböke DI and Bourne DG. (2009). “Novel Alkane Hydroxylase Gene (alkB) Diversity in Sediments Associated with Hydrocarbon Seeps in the Timor Sea, Australia.” *Applied and Environmental Microbiology* 75(23):7391–98.
- Zamora, Alejandra, Ramos, Jesús, & Arias, Marianela. (2012). Efecto de la contaminación por hidrocarburos sobre algunas propiedades químicas y microbiológicas de un suelo de sabana. *Bioagro*, 24(1), 5-12.
- Zhang, C., Sirijovski, N., Adler, L., & Ferrari, B. C. (2019). *Exophiala macquariensis* sp. nov., a cold adapted black yeast species recovered from a hydrocarbon contaminated sub-Antarctic soil. *Fungal Biology*, 123(2), 151–158. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2018.11.011>.