



**Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.**

**Posgrado en Ciencias en Energía Renovable**

**CARACTERIZACIÓN METAGENÓMICA DE SEDIMENTOS MARINOS PARA LA  
IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS CON CAPACIDAD PARA DEGRADAR  
HIDROCARBUROS TOTALES DEL PETRÓLEO (HTP)**

**Tesis que presenta:**

**BIOL. ITZA SUGEY GARCÍA BAUTISTA**

**En opción al título de:**

**MAESTRO EN CIENCIAS EN ENERGÍA RENOVABLE**

Mérida, Yucatán

(Octubre, 2016)

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el proyecto CB-2011/166371: “Diversidad Molecular de Microorganismos en Sedimentos y Aguas de la Costa Yucateca con Capacidad para la Producción de Bioenergía” a cargo de la Dra. Ruby Alejandra Valdez Ojeda.

A mi directora de tesis, la Dra. Ruby Alejandra Valdez Ojeda, por su gran apoyo y por todas las enseñanzas brindadas durante mi estancia en la maestría, así como por todo el apoyo incondicional.

A mis asesores de tesis, la Dra. Liliana María Alzate Gaviria y el Dr. Roberto Briones Gallardo, por sus excelentes comentarios y gran interés.

Al Dr. David Valdez y al laboratorio de química marina del CINVESTAV por el apoyo brindado en los análisis físico-químicos del sedimento colectado.

Al Dr. Felipe Barahona Pérez, por sus grandes enseñanzas y por la ayuda brindada durante los análisis de cromatografía.

A la Dra. Gloria Sandoval, por sus consejos y por la ayuda brindada durante los análisis de Infrarrojo.

A la técnico Q.I. Tanit Toledano Thompson por la ayuda incondicional durante el trabajo de experimentación.

Al técnico M.C Jorge Arturo Domínguez Maldonado, por la ayuda otorgada durante la colecta de sedimentos y por los consejos otorgados, relacionados con el tema de esta investigación.

A mis compañeros de laboratorio por su apoyo en los días difíciles.

## ÍNDICE

ÍNDICE .....	i
LISTADO DE TABLAS.....	iv
LISTADO DE FIGURAS .....	v
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT .....	viii
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPITULO 1 .....	3
ANTECEDENTES .....	3
I.1. Hidrocarburos en el ambiente marino.....	3
I.1.1. Contaminación por hidrocarburos en la costa de Yucatán .....	4
I.1.2. Composición del petróleo crudo y sus productos derivados .....	6
I.1.3. Efectos de los hidrocarburos en ambientes marinos.....	8
I.1.4. Intemperización de los hidrocarburos en el ambiente marino.....	8
I.2. Biodegradación de HTP.....	10
I.2.1 Importancia de la biodegradación de HTP. ....	11
I.2.2. Biodegradación de HTP bajo condiciones anaeróbicas.....	12
I.2.3. Biodegradación de HTP mediante bacterias reductoras de sulfatos (BRS) .....	16
I.3. Celdas de combustible microbiana de sedimento alternativa para biodegradar HAP y generar energía eléctrica .....	18
I.4. Métodos independientes del cultivo bacteriano para estudiar comunidades microbianas .....	19
I.4.1. Metagenómica.....	21
I.4.2. Métodos de aislamiento de ADNmg .....	22
I.5 HIPÓTESIS.....	23
OBJETIVOS .....	24
I.6. Objetivo general .....	24
I.7. Objetivos específicos .....	24

CAPITULO 2 .....	25
METODOLOGÍA .....	25
II.1. Estrategia experimental .....	25
II.1.1. Colecta de sedimento .....	25
II.1.2. Almacenamiento de sedimento .....	25
II.2. Extracción de ADN metagenómico (ADNm <sub>g</sub> ) .....	26
II.2.1. Pasos adicionales al protocolo de extracción de ADN <sub>m<sub>g</sub></sub> .....	27
II.2.2. Pretratamiento de sedimento y modificación del protocolo de extracción de ADN <sub>m<sub>g</sub></sub> .....	27
II.2.3. Cuantificación de ADN <sub>m<sub>g</sub></sub> mediante los índices de absorbancia (A <sub>260/280</sub> y A <sub>260/230</sub> ) .....	28
II.2.4. Purificación del ADN <sub>m<sub>g</sub></sub> por medio de membrana de diálisis .....	28
II.2.5. Amplificación del gen 16S ARNr para corroborar pureza del extracto .....	28
II.2.6. Electroforesis en gel de agarosa .....	29
II.2.7. Secuenciación del gen 16S ARNr .....	29
II.2.8. Análisis de amplicones y diversidad microbiana .....	30
II.3. Preparación de muestra de sedimento para extracción de hidrocarburos del petróleo .....	30
II.3.1. Extracción de hidrocarburos mediante agitación-centrifugación .....	31
II.3.2. Cuantificación gravimétrica de HTP (hidrocarburos totales del petróleo) .....	31
II.3.3. Caracterización de HTP por espectroscopia de infrarrojo .....	32
II.3.4. Caracterización de HTP por cromatografía de gases - espectrometría de masas (CG-MS).....	32
CAPITULO 3 .....	34
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	34
III.1. Colecta de sedimentos .....	34
III.2. Extracción de ADN <sub>m<sub>g</sub></sub> con previas modificaciones.....	37
III.2.1. Pasos adicionales al protocolo de extracción de ADN <sub>m<sub>g</sub></sub> .....	40
III.2.2. Pretratamiento de sedimento y modificación del protocolo de extracción de ADN <sub>m<sub>g</sub></sub> .....	41
III.2.3 Amplificación del gen 16S del ARNr y Purificación del ADN <sub>m<sub>g</sub></sub> por medio de membrana de diálisis .....	46

III.2.4. Análisis de amplicones y diversidad microbiana .....	48
III.3. Preparación de muestra de sedimento para extracción de hidrocarburos del petróleo .....	65
III.3.1. Extracción de hidrocarburos mediante agitación-centrifugación .....	66
III.3.2. Cuantificación gravimétrica de HTP (hidrocarburos totales del petróleo) .....	68
III.3.3. Caracterización de HTP (hidrocarburos totales del petróleo) por espectroscopía de infrarrojo .....	69
III.3.4. Caracterización de HTP (hidrocarburos totales del petróleo) por cromatografía de gases - espectrometría de masas (CG-MS) .....	71
CONCLUSIONES .....	75
BIBLIOGRAFÍA .....	76
ANEXOS .....	91
Anexo 1 .....	91
Anexo 2 .....	93
Anexo 3 .....	97
Anexo 4 .....	101
Anexo 5 .....	105
Anexo 6 .....	108
Anexo 7 .....	112
Anexo 8 .....	116
Anexo 9 .....	119
Anexo 10 .....	122
Anexo 11 .....	126
Anexo 12 .....	132

## LISTADO DE TABLAS

Tabla I.1.	Concentración promedio de hidrocarburos disueltos (Valenzuela-Sánchez et al., 2005).....	5
Tabla II.2.	Biodegradación de HTP utilizando BRS.....	17
Tabla III.1.	Etiquetado e identificación de los sedimentos almacenados en tubos Falcón.....	26
Tabla IV.1.	Posición geográfica y datos fisicoquímicos de los sedimentos colectados en Progreso durante las épocas de lluvias y secas.....	35
Tabla III.1.1.	Posición geográfica y datos fisicoquímicos de los sedimentos colectados en Sisal durante las épocas de secas y lluvias.....	36
Tabla III.2.	Protocolo de Zhou et al. [134], Osborn, [137] y modificaciones.....	37
Tabla III.2.1.	Concentración y pureza del ADNmg aislado de los sedimentos muestreados en Progreso.....	39
Tabla III.2.2.	Rendimiento de ADNmg respecto a la adición de diferentes volúmenes de ARNAsa.....	41
Tabla III.2.3.	Concentración de ADNmg del sedimento de PE3C a partir de diferentes tamaños de muestra inicial.....	41
Tabla III.2.4.	Rendimiento y calidad de ADNmg, de las muestras de sedimento colectado en Progreso.....	43
Tabla III.2.5.	Rendimiento y calidad de ADNmg de sedimentos colectados en Sisal durante época de secas y lluvias.....	45
Tabla III.2.6.	Bacterias identificadas en Progreso durante la época de secas y reportadas como capaces de degradar HTP.....	54
Tabla III.2.7.	Bacterias identificadas en Progreso durante la época de lluvias y reportadas como capaces de degradar HTP.....	55
Tabla III.2.8.	Bacterias identificadas en Sisal durante la época de secas y reportadas como capaces de degradar HTP.....	62
Tabla III.2.9.	Bacterias identificadas en Sisal durante la época de lluvias y reportadas como capaces de degradar HTP.....	63
Tabla III.3.	Porcentaje de humedad de las muestras de Progreso y Sisal.....	65
Tabla III.3.1.	Concentración de HTP en sedimentos de Progreso.....	68
Tabla III.3.2.	Concentración de HTP en sedimentos de Sisal.....	69

## LISTADO DE FIGURAS

Figura I.1.	Clasificación de hidrocarburos derivados del petróleo.....	7
Figura I.1.2.	16 HAP prioritarios para la biodegradación según la EPA.....	12
Figura I.2.	Utilización microbiana de los compuestos aromáticos.....	14
Figura I.2.1.	Ejemplo de compuestos aromáticos degradados a través de rutas periféricas y principales intermediarios que entrarán en el metabolismo central para su posterior degradación.....	15
Figura III.2.	Ácidos nucleicos extraídos de cada punto de muestreo.....	39
Figura III.2.1	Aislados con diferentes lavados y adición de ARNAsa en volúmenes diferentes (los tratamientos se realizaron por separado).....	40
Figura III.2.2.	ADNm <sub>g</sub> obtenido a partir de diferentes tamaños de muestra de sedimento inicial.....	42
Figura III.2.3	ADNm <sub>g</sub> aislado a partir de sedimento de Progreso.....	44
Figura III.2.4.	ADNm <sub>g</sub> aislado partir de sedimentos colectados en Sisal....	45
Figura III.2.5	Amplificación inicial del gen 16S a partir de los ADN <sub>m</sub> g obtenidos de sedimentos de Progreso y Sisal. Antes de la purificación por membrana de diálisis.....	46
Figura III.2.6.	Amplificación del gen 16S posterior a la purificación de los ADN <sub>m</sub> g mediante membrana de diálisis.....	47
Figura III.2.7.	Especies más representativas de PC1C.....	48
Figura III.2.8.	Especies más representativas de PD1C.....	49
Figura III.2.9	Especies más representativas de PE1C.....	50
Figura III.2.10	Especies más representativas de PC3C.....	51
Figura III.2.11.	Especies más representativas de PD3C.....	52
Figura III.2.12	Especies más representativas de PE3C.....	53
Figura III.2.13.	Especies más representativas de SA2C.....	56
Figura III.2.14	Especies más representativas de SB2C.....	57
Figura III.2.15.	Especies más representativas de SC2C.....	58
Figura III.2.16	Especies más representativas de SA1C.....	59
Figura III.2.17	Especies más representativas de SB1C.....	60

Figura III.2.18	Especies más representativas de SC1C.....	61
Figura III.3	Extracción de HTP a partir de sedimentos colectados en Progreso.....	66
Figura III.3.1	Extracción de HTP a partir de sedimentos colectados en Sisal.....	67
Figura III.3.2	Espectros de infrarrojo del sedimento PD1C y PD3C.....	70
Figura III.3.3.	Espectros de infrarrojo del sedimento de SB2C y SB1C.....	70
Figura III.3.4	Cromatogramas (CG-MS) obtenidos a partir del sedimento PD1C, A) HTP identificados a partir de cloroformo; B) HTP identificados a partir acetato de etilo; C) HTP identificados a partir de metanol.....	71
Figura III.3.5	Cromatogramas (CG-MS) obtenidos a partir del sedimento PD3C, A) HTP identificados a partir de cloroformo; B) HTP identificados a partir acetato de etilo; C) HTP identificados a partir de metanol.....	72
Figura III.3.6	Cromatogramas (CG-MS) obtenidos a partir del sedimento SB2C, A) HTP identificados a partir de cloroformo; B) HTP identificados a partir acetato de etilo.....	73
Figura III.3.7	Cromatogramas (CG-MS) obtenidos a partir del sedimento SB1C, A) HTP identificados a partir de cloroformo; B) HTP identificados a partir acetato de etilo; C) HTP identificados a partir de metanol.....	74



## RESUMEN

En el presente trabajo se analizaron sedimentos marinos de Progreso y Sisal, Yucatán, en época de secas con precipitación menor a 60 mm (PC1C, PD1C, PE1C para Progreso y SA2C, SB2C, SC2C para Sisal) y en época de lluvias con precipitación mayor a 60 mm (PC3C, PD3C, PE3C para Progreso y SA1C, SB1C, SC1C para Sisal). De los sitios analizados los que presentaron índices de contaminación por hidrocarburos totales del petróleo (HTP) más elevados fueron PD3C con una concentración de HTP de 174  $\mu\text{g/g}$  y SB1C con 109.1  $\mu\text{g/g}$ . Por otra parte, los sitios que presentaron menor índice de contaminación fueron PE1C con 85.1  $\mu\text{g/g}$  y SA2C con 22.6  $\mu\text{g/g}$ . Esto indica que los sedimentos colectados en época de lluvias en ambos puertos, rebasan los límites de contaminación por hidrocarburos (70  $\mu\text{g/g}$ ), establecidos por la UNESCO en 1976, para sedimentos marinos contaminados por HTP. Los análisis realizados a los extractos de HTP, identificaron alcanos y cicloalcanos, lo cual además de indicar contaminación por derivados del petróleo crudo, también indica contaminación por residuos de gasolina y diésel. Por otra parte, el análisis metagenómico permitió identificar bacterias con posible capacidad para degradar hidrocarburos entre las que destacan las pertenecientes al género *Pseudomonas* y *Geobacter*.

## ABSTRACT

In this paper, marine sediments of Progreso and Sisal, Yucatán, were analyzed in dry season with rainfall less than 60 mm (PC1C, PD1C, PE1C for Progreso and SA2C, SB2C, SC2C for Sisal) and in the rainy season more rain 60 mm (PC3C, PD3C, PE3C for Progress and SA1C, SB1C, SC1C for Sisal). Of the sites analyzed those presenting the higher of contamination rates total petroleum hydrocarbons (TPH) were PD3C HTP with a concentration of 174 µg/g and SB1C with 109.1 µg/g. Moreover, sites had lower pollution index were PE1C with 85.1 µg/g and SA2C with 22.6 µg/g. This indicates that the sediments collected in the rainy season in both ports, exceed the limits of oil pollution (70 µg/g), established by UNESCO in 1976, HTP contaminated with marine sediments. Tests on extracts HTP, identified alkanes and cycloalkanes, which also indicate contamination derived from crude oil, also indicates contamination by waste petrol and diesel. Moreover, metagenomic analysis identified bacteria with possible capacity to degrade hydrocarbons among which are those belonging to the genus *Pseudomonas* and *Geobacter*

## INTRODUCCIÓN

El golfo de México tiene gran importancia económica, debido a que posee una de las reservas petroleras más grandes del mundo. La industria petrolera se ha desarrollado generando asentamientos humanos en sus costas, incrementando el nivel de contaminación de las mismas [1]. En este mismo sentido, ha penetrado en todos los ecosistemas del golfo de México, la contaminación por hidrocarburos, derivados de procesos y desechos de la industria petrolera, actividades de refinación, almacenamiento de petróleo y gas natural, así como también por el uso de combustibles fósiles como gasolina, diésel, aceites lubricantes, combustóleo, etc. [2; 3].

Las operaciones asociadas al transporte de petróleo por barco, es otro medio de contaminación [2]. Es por esto, que la contaminación por hidrocarburos en la zona costera de Yucatán se ha incrementado, debido a que, aunque no presenta actividades petroleras; el canal de Yucatán, es la ruta inicial para el transporte del petróleo mexicano hacia el sur del continente americano [1].

Los sedimentos componente importante de los ecosistemas acuáticos, son un reservorio que proporciona información sobre la contaminación, al actuar como trampa de contaminantes, puesto que acumulan sustancias tóxicas como hidrocarburos totales del petróleo (HTP). Sin embargo, la capacidad de acumulación de los sedimentos, está fuertemente influenciada por diversos parámetros físicos y químicos, tales como el contenido de materia orgánica y las concentraciones de sulfuro disuelto [4].

Los tiempos de residencia de estos compuestos en los sedimentos varían de 3 a 10 años dependiendo de la velocidad de degradación. La transformación de estos compuestos mediante actividad microbiana, genera gran eficiencia de transformación [5]. En este sentido, el potencial de bacterias para la degradación de hidrocarburos totales del petróleo, no ha sido rigurosamente estudiado en la zona costera de Yucatán, siendo que ya han sido reportados altos niveles de contaminación por HTP en zonas como la laguna de Chelem, puerto Sisal y puerto Celestún [5; 6].

Una alternativa viable para generar energía eléctrica simultáneamente a la degradación de HTP por la actividad de las bacterias electrogénicas, ya ha sido reportado [7]. Sin embargo, es necesaria la identificación de bacterias con potencial para degradar

hidrocarburos de la zona costera de Yucatán, así como verificar los niveles de contaminación por HTP.

Por lo mencionado anteriormente, este trabajo propone evaluar la diversidad bacteriana presente en sedimentos marinos de Progreso y Sisal, Yucatán (ya que estos sitios frecuentemente se encuentran expuestos a contaminación por HTP), mediante el análisis metagenómico utilizando el gen 16SARNr, así como también se propone determinar los niveles de contaminación por HTP en ambos sitios y realizar la caracterización de estos contaminantes. Este trabajo es importante ya que permite la identificación de bacterias presentes en sedimentos de Progreso y Sisal, con posible potencial para la degradación de HTP.

## CAPITULO 1

### ANTECEDENTES

#### **I.1. Hidrocarburos en el ambiente marino**

Los hidrocarburos se encuentran entre los compuestos más abundantes del Planeta, pudiendo ser encontrados en los seres vivos como producto de las reacciones de biosíntesis; o en la geosfera, como producto de las transformaciones abióticas de materia orgánica en sistemas sedimentarios [8].

La explotación de hidrocarburos fósiles, fue iniciada a partir del siglo XIX, con el fin de reemplazar a la energía eólica estacionaria y a las tecnologías de accionamiento hidráulico. El uso global de hidrocarburos como combustible ha aumentado casi 800 veces desde 1750 y alrededor de 12 veces desde el 2003, lo cual ha provocado un gran desarrollo social y económico, sin embargo, la extracción de hidrocarburos no solo fue clave para el progreso del humano, si no que tuvo un impacto negativo en el medio ambiente [9].

El ambiente marino ha recibido especial atención como consecuencia del aumento de fugas y derrames durante la extracción, el transporte marítimo, refinado, almacenamiento y uso del petróleo [10]. De las toneladas de petróleo que ingresan cada año al medio ambiente marino, se calcula que aproximadamente 50% proviene de actividades antropogénicas y el otro 50% de filtraciones de origen natural [11].

El impacto y la duración de un derrame de hidrocarburos por fuentes antropogénicas depende de una variedad de factores como: la cantidad y el tipo de hidrocarburo derramado, su comportamiento en el medio marino, la ubicación del derrame en cuanto a condiciones ambientales, características físicas y las condiciones meteorológicas del lugar. Otros factores clave son la composición biológica del entorno afectado y su sensibilidad a la contaminación [12].

Los derrames de petróleo o hidrocarburos refinados afectan con mayor frecuencia los sitios “vírgenes”, debido a que carecen de capacidad de adaptación y mecanismos naturales para su degradación, es por esto que la contaminación antropogénica con hidrocarburos debe ser minimizada para evitar graves consecuencias en el ambiente marino [13], y debe ser evaluada en los sitios con mayor exposición como es el caso de la costa de Yucatán.

### **I.1.1. Contaminación por hidrocarburos en la costa de Yucatán**

El territorio de la zona costera de Yucatán comprende una franja que llega hasta 20 km tierra dentro a partir de la línea litoral, este territorio está integrado por 13 municipios, los cuales se agrupan en cuatro subregiones: la occidental; la de progreso; la central y la oriental [14]. El crecimiento de la población en la región costera responde a la aparición de actividades económicas, principalmente turísticas, portuarias, agrícolas e industriales. Estas actividades económicas que se realizan en la zona costera han provocado cambios y transformaciones en los espacios litorales naturales [14].

Además de la intensa actividad pesquera y el arribo de embarcaciones turísticas, la costa de Yucatán posee una importante terminal portuaria: el puerto de altura de progreso utilizada para la exportación de petróleo mediante el uso de buques, ya que una gran parte del petróleo mexicano es movilizado hacia el sur del continente americano a través del canal de Yucatán. Esta intensa actividad para el transporte del petróleo crudo representa un constante riesgo ya que pueden producirse derrames accidentales o fallas durante las maniobras operacionales: descargas y lavado de buques tanque, incrementando los niveles de contaminación por hidrocarburos del petróleo en la zona costera de Yucatán [15].

Estas operaciones de transporte de petróleo representan un riesgo importante de contaminación para esta zona, ya que por otra parte las corrientes marinas y el efecto de los vientos contribuyen a la distribución de estos contaminantes hacia sectores costeros con mayor sensibilidad ambiental [16].

A pesar de que, afortunadamente, los derrames de hidrocarburos en la zona costera de Yucatán han sido poco frecuentes, lamentablemente reportes indican contaminación por petróleo tanto en su forma cruda como refinada en distintos municipios costeros [17], lo cual ha causado severas alteraciones metabólicas en los organismos, repercutiendo además en importantes cambios estructurales y funcionales en los ecosistemas marinos [18].

Entre los principales contaminantes de la península de Yucatán a causa del petróleo se encuentran los hidrocarburos clorados y los hidrocarburos aromáticos policíclicos, los

cuales han sido detectados en el canal de Yucatán [17]. La laguna de Chelem también ha sido afectada debido a que presenta valores promedios de hidrocarburos disueltos totales por arriba del criterio establecido por la UNESCO en 1976, es decir por arriba de  $70 \mu\text{g/g}^{-1}$ , tanto en época de secas y de lluvias [19]. Mientras que, en sedimentos marinos del puerto de Progreso, se detectaron niveles de hidrocarburos por debajo del límite permisible establecido por la UNESCO, durante secas y lluvias [19] (Tabla I.2).

**Tabla V.1.** Concentración promedio de hidrocarburos disueltos (Valenzuela-Sánchez et al., 2005).

Lugar	Promedio de Hidrocarburos disueltos	Época	Límite máximo permisible de HTP (UNESCO)
Chelem	169.76 $\mu\text{g/g}$	Norte	70 $\mu\text{g/g}$
Progreso	10.42 $\mu\text{g/g}$	Norte	
Chelem	544.07 $\mu\text{g/g}$	Seca	
Progreso	16.62 $\mu\text{g/g}$	Seca	
Chelem	254.53 $\mu\text{g/g}$	Lluvia	
Progreso	23.25 $\mu\text{g/g}$	Lluvia	

Además de los puertos mencionados anteriormente, Sisal y Celestún también han sido afectados. Las concentraciones totales de hidrocarburos presentes en sedimentos del puerto de Sisal varían desde 48.18 hasta 273  $\mu\text{g/g}$ , rebasando de esta manera los límites máximos permisibles establecidos por la UNESCO [20]. Cabe señalar que estos valores son más altos que los reportados en sedimentos costeros de Celestún, los cuales están en el rango de 13.855- 50.003  $\mu\text{g/g}$  [21].

Sin embargo, los datos mencionados son los únicos reportados hasta el momento con fechas del año 2005.

Es por lo anterior que en la costa Yucateca es prioritario establecer programas de monitoreo físico-químico, circulación de hidrocarburos, cambios en la temperatura del agua, incremento de nutrientes, carga orgánica y bacterias con capacidad para degradar hidrocarburos. Esto con el fin de entender la circulación litoral y registrar cambios en la calidad del agua, así como para conocer el grado de contaminación por hidrocarburos y

poder establecer programas adecuados para prevenir posibles efectos nocivos. Ya que, debido a la relativa frecuencia y regularidad de los giros oceánicos, la influencia del viento, oleaje, mareas y corrientes; estos contaminantes son desplazados y acumulados en zonas como dársenas portuarias, estuarios, marismas, playas y bahías, alejados del lugar de origen del derrame [22].

### **I.1.2. Composición del petróleo crudo y sus productos derivados**

La mayoría de los componentes presentes en el petróleo crudo son hidrocarburos (componentes orgánicos compuestos por átomos de hidrógeno y carbono). Asimismo, se pueden encontrar no sólo carbono e hidrógeno, sino también pequeñas (pero importantes) cantidades de otros (“he tero”) elementos, en particular azufre, nitrógeno y ciertos metales (por ejemplo, níquel, vanadio, etc.). El petróleo crudo está compuesto por la molécula de hidrocarburo más pequeña y simple – CH<sub>4</sub> (metano) – hasta las moléculas más grandes y complejas que contienen 50 o más átomos de carbono [23].

El petróleo es utilizado en grandes cantidades principalmente como combustible, formando mezclas complejas cuyos componentes principales son los hidrocarburos derivados del petróleo crudo por destilación y fraccionamiento. Debido al método de producción, origen diferente y composición compleja no es posible caracterizar muchas sustancias del petróleo en términos de composición química exacta, fórmula molecular o estructural [24]. Sin embargo avances recientes han permitido la identificación de más de 17,000 compuestos químicos diferentes [25].

Los hidrocarburos totales del petróleo (HTP) se pueden clasificar en cuatro grupos diferentes como se muestra en la (Figura I.1):

- 1) Saturados
- 2) Aromáticos
- 3) Resinas
- 4) Asfáltenos

Los saturados son compuestos que no contienen dobles ligaduras y de acuerdo a su estructura química se clasifican en alcanos (parafinas) y ciclo alcanos (naftenos).



Los aromáticos son caracterizados por tener uno o más anillos bencénicos con o sin un alquilo sustituyente, son usualmente menos abundantes que los saturados y contienen uno o más anillos bencénicos íntimamente ligados o conectados en su estructura molecular, estos pueden presentarse como no-sustituídos o bien presentar una sustitución en un átomo de hidrógeno por grupos metilo, denominándose a este proceso alquilación.

Las resinas y asfáltenos contienen compuestos de hidrocarburos polares, estos compuestos contienen además del carbono y el hidrógeno, cantidades trazas de nitrógeno, oxígeno y/o azufre [26].

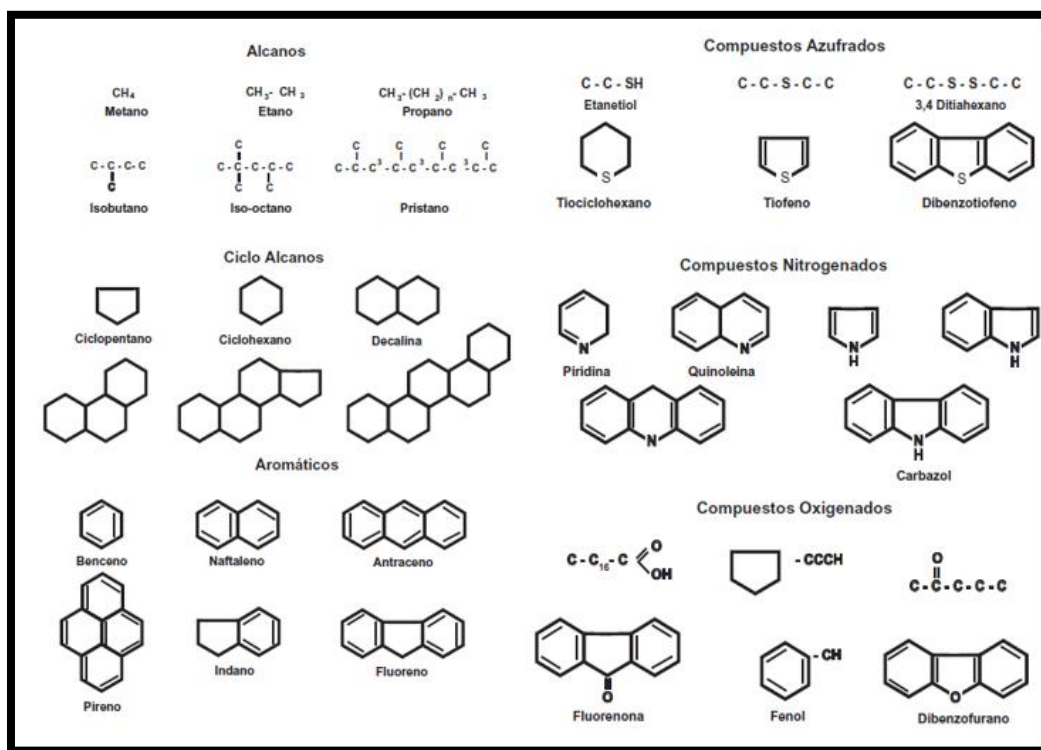


Figura I.1 Clasificación de hidrocarburos derivados del petróleo.

### **I.1.3. Efectos de los hidrocarburos en ambientes marinos**

Se sabe que los hidrocarburos con particular preocupación son los hidrocarburos hidrofóbicos debido a sus características toxicológicas y su capacidad para acumularse en el medio marino [27, 28 y 29].

La contaminación del ambiente marino originado por hidrocarburos ocasiona severas alteraciones metabólicas en los organismos de esta manera los organismos sésiles, en su mayoría filtradores, que habitan en la zona intermareal de las playas y rocas desaparecen casi por completo debido tanto al cubrimiento directo por hidrocarburos como a la intoxicación derivada del proceso de filtrado del agua de mar contaminada. Otros organismos no sésiles, como muchos peces, experimentan las consecuencias de la acumulación de sustancias tóxicas en sus órganos vitales y en sus reservas de grasa al alimentarse de organismos como el plancton marino el cual también se ve afectado por el vertido. Además, la fracción viscosa de los hidrocarburos, que se acumula en la superficie impregna las plumas de las aves incapacitándolas como aislante térmico. Muchas aves mueren debido al frío, mientras que otras perecen intoxicadas al ingerir parte del hidrocarburo que cubre sus plumas, mientras intentan limpiárselas [30].

### **I.1.4. Intemperización de los hidrocarburos en el ambiente marino**

Una vez que el petróleo ingresa al mar está sujeto a una serie de procesos físicos, químicos, y biológicos, que en conjunto se denominan intemperismo. Los principales son: dispersión, foto-oxidación, emulsificación, disolución, evaporación, adsorción, sedimentación y biodegradación [31; 32]. Los procesos de intemperismo que comienzan a los pocos días de haberse ocasionado el derrame y que pueden durar largo periodo de tiempo, incluso años son la foto-oxidación, adsorción y la biodegradación, esta última dependerá del acoplamiento de los organismos al contaminante [33].

Propagación: ocurre normalmente por acción del viento, olas y corrientes marinas, la velocidad de propagación de estos compuestos dependerá principalmente de la temperatura y de la viscosidad de la mezcla [33].

Evaporación: para muchos compuestos orgánicos, la evaporación puede ser una importante ruta, ya que es un proceso muy rápido, que en pocas horas puede separar hasta la mitad del petróleo derramado. Este proceso depende de las características de los compuestos tales como presión de vapor, temperatura y solubilidad, así como, también

depende de las características hidrodinámicas del entorno en particular. Además, el proceso de propagación favorece la evaporación de la fracción volátil presente en la mezcla, de esta manera los compuestos como los hidrocarburos monoaromáticos y los alcanos de bajo peso molecular se ven favorecidos con este proceso [29; 31; 33].

Dispersión: por estar compuesto por sustancias hidrofóbicas, el petróleo se dispersa sobre la superficie del agua, formando gotas de diferentes tamaños y ocasionando grandes manchas, incrementando el área expuesta al sol, oleaje, etc. [31; 33].

Fotooxidación: la luz del sol, principalmente la región ultravioleta modifica el petróleo, formando principalmente productos de oxidación [29; 31].

Emulsificación: el viento y el oleaje forman una emulsión de agua en aceite, conocida como “mousse de chocolate”, que al llegar a las playas forma las bolas de alquitrán comunes en todo el litoral del Golfo del Golfo de México [34; 32].

Adsorción: por ser una sustancia hidrofóbica, el petróleo tiende a adsorberse sobre las partículas del sedimento en suspensión, así como sobre los organismos del plancton. Este proceso favorece la degradación del petróleo [35].

Sedimentación: el petróleo se adsorbe sobre las partículas en suspensión, incluyendo al plancton, con lo cual eventualmente sedimenta. Este proceso es reconocido como un vector importante en el transporte del petróleo en el ambiente marino, por lo tanto, tiene un papel importante en la dispersión y en la degradación del petróleo derramado [36]. Por otra parte, la sedimentación permite la acumulación de estos compuestos en los sedimentos subyacentes constituyendo de esta forma un reservorio de hidrocarburos y, por lo tanto, una fuente secundaria de contaminación [16].

Biodegradación: puede llevarse a cabo por una serie de organismos acuáticos, particularmente bacterias las cuales pueden degradar el petróleo, ya que poseen la capacidad de utilizar determinados hidrocarburos como única fuente de carbono y energía. Algunos de estos organismos se encuentran especializados en la degradación de diferentes compuestos del petróleo, por lo que incluso se han desarrollado industrialmente para degradar manchas de petróleo derramado [29; 31; 37; 38].

## I.2. Biodegradación de HTP.

De los hidrocarburos totales del petróleo (HTP), los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) son los compuestos más tóxicos, ya que se consideran carcinogénicos y mutagénicos, estos son compuestos que constantemente se liberan al ambiente marino, aparte de que su degradación es muy difícil, los hidrocarburos poli-aromáticos permanecen de manera persistente en el ambiente constituyendo un grave problema de contaminación [39].

Una vez que los HAP se introducen en el medio ambiente marino son sometidos a una serie de procesos de intemperización, como se mencionó anteriormente. El proceso que permite remover mayor cantidad de estos compuestos es la biodegradación, siendo las levaduras, hongos, algas y bacterias, los principales organismos degradadores [40; 41].

La biodegradación microbiana dependerá principalmente de las características químicas y estructurales del compuesto a degradar, del microorganismo implicado y de los factores ambientales como temperatura, pH, potencial redox, salinidad, etc. La degradación también es influenciada por la concentración y disponibilidad de otras fuentes de carbono y energía, presencia de donadores de electrones, nutrientes esenciales, humedad, ausencia de compuestos en concentraciones tóxicas y finalmente por la presencia de oxígeno, la cual determina la vía metabólica de degradación [42].

La biodegradación de los HAP por actividad microbiana posee una alta tasa de remoción o transformación de estos compuestos [43; 44], en condiciones aerobias o anaerobias [45]. De los microorganismos del medio marino con capacidad biodegradadora, las bacterias poseen la habilidad de metabolizar hidrocarburos aromáticos sencillos tales como tolueno, xileno y naftaleno (estudiados ampliamente), sin embargo también se han identificado bacterias con capacidad para degradar hidrocarburos aromáticos policíclicos en particular antraceno, fenantreno y dibenzotiofeno [46].

Tal es la importancia de las bacterias que más de 200 especies han sido identificadas por su capacidad para degradar hidrocarburos derivados del petróleo [30]. Entre las especies identificadas como las más eficaces en la remoción de hidrocarburos, se encuentran las pertenecientes a los géneros: *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Micrococcus*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Brevibacterium*, *Flavobacterium*, *Corynebacterium*, *Cyanobacterium*, y *Vibrio* [47; 48; 49].

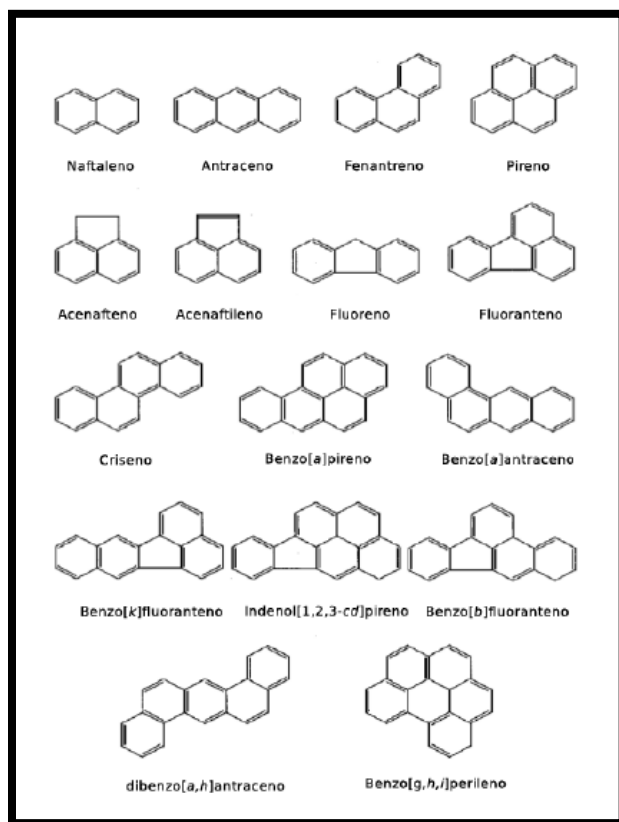
Recientes investigaciones han demostrado que las especies pertenecientes al género *Sphingomonas* presentan mayor eficacia para la degradación de hidrocarburos aromáticos polinucleares, mientras que el género *Micrococcus* presenta mayor capacidad para degradar HAP [50].

### **I.2.1 Importancia de la biodegradación de HTP.**

Los HTP representan un gran riesgo de contaminación marina, sin embargo, los que más peligro representan son los HAP. Estos son una clase de compuestos orgánicos que están constituidos de dos o más anillos de benceno y/o moléculas pentacíclicas fusionados en diversas configuraciones estructurales (Figura I.1.2). Los HAP son moléculas altamente recalcitrantes debajo peso molecular o de alto peso molecular, resistentes debido a su hidrofobicidad y baja solubilidad en el agua [51].

El aumento en la hidrofobicidad de estos compuestos favorece la afinidad de los HAP hacia entornos no polares, como los lípidos de un organismo o la materia orgánica que rodea una partícula de sedimento. Lo anterior, aunado a la estabilidad de los HAP en función al incremento en su peso molecular, haciendo que dichos compuestos sean menos sensibles a la degradación [52; 53; 54].

Estos contaminantes se pueden encontrar en sedimentos marinos, lo cual es de gran preocupación debido a sus propiedades tóxicas, mutagénicas y carcinogénicas [55; 56], por ejemplo, el fenantreno, fotosensibilizador de la piel humana, es causante de alergias leves, inductor de intercambios en las cromátidas y potente inhibidor de comunicación intercelular [57]. Este compuesto puede persistir en los sedimentos de 16 días a 4 meses, o como el benzopireno que puede persistir de 7 a 47 meses [58]. Debido a estas propiedades, la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) considera 16 HAP como contaminantes prioritarios para su remediación (Figura I.1.2) [59]. En este sentido, la biodegradación de HAP como parte de los procesos normales del ciclo del carbono, debe ser complementada mediante el uso de microorganismos para recuperar ambientes contaminados con HAP [57].



**Figura I.1.2.** 16 HAP prioritarios para la biodegradación según la EPA.

### I.2.2. Biodegradación de HTP bajo condiciones anaeróbicas

La biodegradación de HTP puede llevarse a cabo en condiciones aerobias o anaerobias (estricta o facultativa). Sin embargo, cuando se pretenden degradar los HTP presentes en sedimentos marinos, las condiciones anaerobias son preferidas debido a que las condiciones anóxicas prevalecientes en los sedimentos [60].

La biodegradación anaerobia de HTP es un proceso alternativo y efectivo llevado a cabo específicamente por consorcios bacterianos formados por bacterias fermentativas (acidogénicas y acetogénicas), bacterias sulfato reductoras (BSR), desnitrificantes, metanogénicas y reductoras de ion férrico, con estos grupos bacterianos se ha alcanzado una eficacia de degradación de 9 a 100% [61; 62; 63].

Además de la degradación de estos compuestos por bacterias anaerobias (facultativas y/o obligadas), también puede ser acoplada a la respiración anaerobia, fermentación y fotosíntesis anoxigénica [68].

Durante la degradación bacteriana de HAP en condiciones anaerobias, el oxígeno molecular no puede ser incorporado a la estructura del anillo aromático, por lo tanto los aceptores de electrones son compuestos alternativos como  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{Mn}^{4+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  o  $\text{CO}_2$  [42], dependiendo de su disponibilidad y competencia por los donadores de electrones (Figura I.2) [64; 65; 66; 67].

En términos energéticos la degradación anaerobia de HAP utilizando nitrato y Fe (III) como aceptor final de electrones es casi tan eficiente como el oxígeno (Figura I.2), debido a que los microorganismos conservan mayor energía (Figura I.2) [69; 65].

Las bacterias fermentativas también pueden usar compuestos aromáticos, pero por lo general la biodegradación completa solo es viable energéticamente, cuando las metanógenas o sulfato reductoras consumen los productos finales del metabolismo fermentativo [68].

Finalmente, las bacterias fotótrofas anoxigénicas obtienen la energía de la luz y degradan los compuestos aromáticos anaeróbicamente hasta formar metabolitos intermediarios, como acetyl-CoA [67; 65].

Es por lo anterior que el potencial redox del sistema aceptor de electrones en la descomposición anaerobia de compuestos aromáticos, dicta la estrategia bioquímica para la degradación. Así, el mismo compuesto aromático puede estar sujeto a una ruta bioquímica más exigente de energía en anaerobios facultativos, como las bacterias desnitrificantes, que en anaerobios obligados como reductores de sulfato o fermentadores [70; 71; 72].

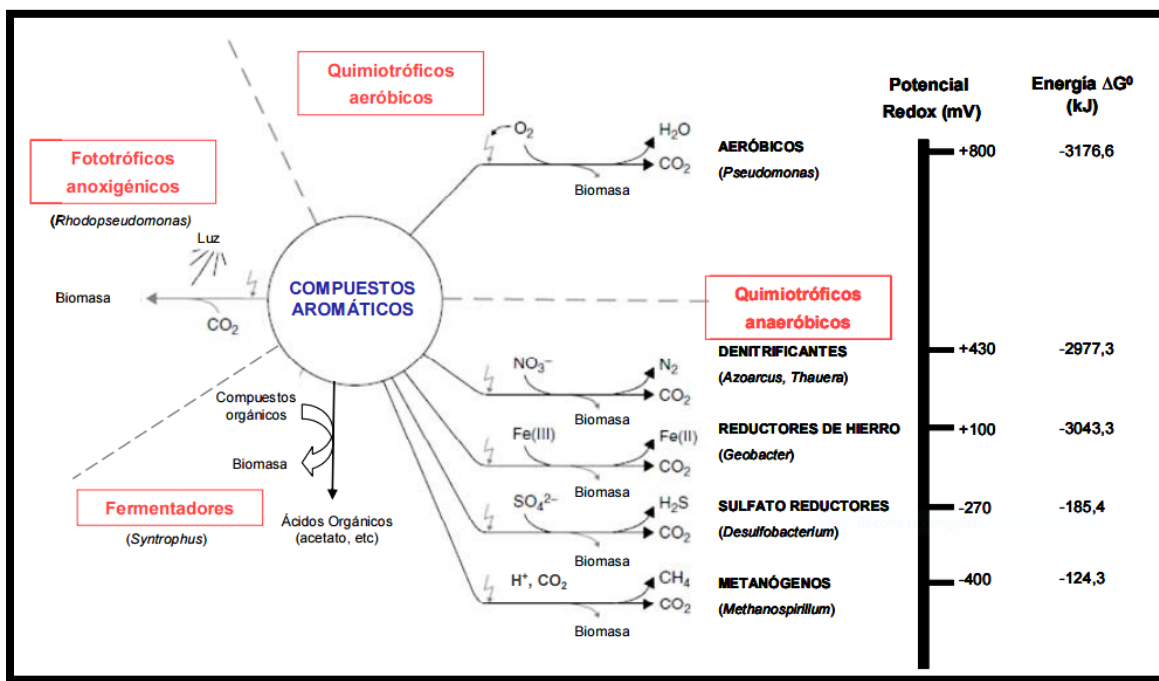


Figura I.2 Utilización microbiana de los compuestos aromáticos.

Como se mencionó anteriormente la degradación anaerobia de HAP es un proceso que implica varios pasos, este proceso comienza con la activación inicial, llevada a cabo mediante algunas de las siguientes reacciones [62]:

- 1) Adición del fumarato al compuesto aromático, mediante enzimas para producir un aromático sustituido con succinatos.
- 2) Metilación de los compuestos aromáticos.
- 3) Hidroxilación de un sustituyente alquilo a través de una deshidrogenasa en el compuesto aromático.
- 4) Carboxilación directa del compuesto aromático, que puede representar en realidad una combinación de la metilación seguida de una hidroxilación.

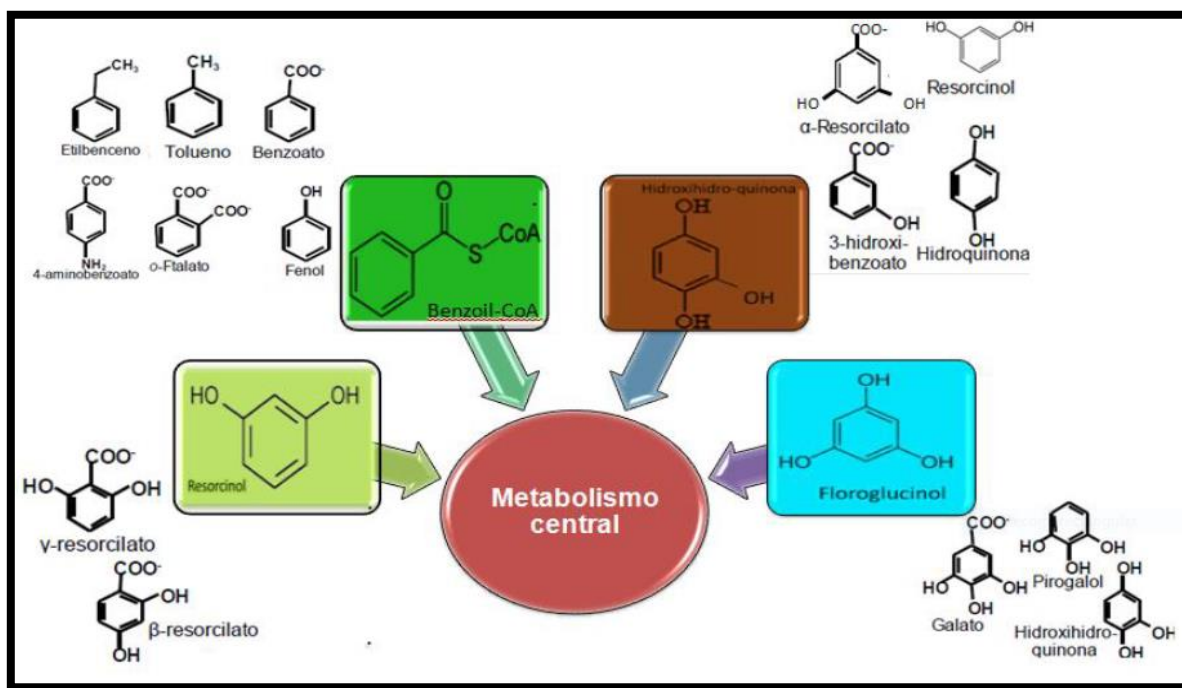
Seguido de la activación inicial, los HAP son reducidos mediante dos vías [61; 62; 73]:

- 1) Vía del fumarato: después de la activación de los HAP por acción de la enzima benzoilsuccinatosintetasa (Bss) se forma el intermedio central con fumarato como radical [74;75].



2) Vía del Benzoil-CoA: una vez que han sido activados los HAP por medio de las enzimas benzoilCoAligasa (BcL) y benzoilCoAreductasa (BcR), estos compuestos son convertidos en alguno de los productos intermedios centrales del catabolismo.

Estos productos intermediarios centrales son el benzoato y el benzoil-CoA, hidroxihidroquinona (HHQ, 1,2,4-trihidroxibenceno), floroglucinol (1,3,5-trihidroxibenceno), resorcinol (1,3-dihidroxibenceno), 6-hidroxinicotinato, o derivados del benzoil-CoA (Figura I.2.1). Asimismo estos productos pueden sufrir una reacción de  $\beta$ -oxidación o degradar benzoil-CoA a través de un par de vías conocidas como pimilica y adipica. Posterior a esto se formará acetil-CoA, ácidos grasos y pimelil-CoA, que serán convertidos a  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2$  y  $\text{CH}_4$  [76].



**Figura I.2.1.** Ejemplo de compuestos aromáticos degradados a través de rutas periféricas y principales intermediarios que entrarán en el metabolismo central para su posterior degradación.

### I.2.3. Biodegradación de HTP mediante bacterias reductoras de sulfatos (BRS)

Debido a la abundante concentración de sulfatos en sedimentos marinos, la biodegradación de HTP, en muchas ocasiones resulta más efectiva bajo condiciones sulfato reductoras [77; 78]. Por lo que la posibilidad de degradar HTP bajo condiciones sulfato reductoras, ha sido tema de interés desde hace varias décadas. Uno de los primeros estudios acerca de este tema fue realizado por Coates [79], sin embargo, en años recientes las investigaciones acerca de la degradación de HTP por bacterias reductoras de sulfato se ha intensificado.

En estudios previos Musat *et al.* [80], Selesi *et al.* [73], Mathava *et al.* [81] y Bergmann *et al.* [82; 83] reportaron la degradación, mediante BRS, de naftaleno, 2-metilnafataleno y fluoreno, presentes en sedimentos. Mientras que Dadidova *et al.* [5] reportó la degradación de 45% de fenantreno, mediante un cultivo mixto de BRS ( $\delta$ -proteobacteria). Las BRS removieron entre un 88 y 65% de fluoreno y fenantreno, respectivamente Tsai *et al.*, [84]. Kumar *et al.*, [85] también demostró que las bacterias reductoras de sulfato pueden remover hasta el 90% de fluoreno, como se muestra en la (Tabla I.2)

Por otra parte, especies aisladas de BRS, han demostrado su capacidad para degradar HAP, como es el caso de *Desulfovibrio meridiei* [86], y *Desulfovibrio carboniliphilus* [87]. Recientemente se han aislado bacterias a partir de sedimentos marinos contaminados con hidrocarburos, las cuales han sido identificadas como *Desulfotomaculum* sp., *Desulfomicrobium* sp., *Desulfobacter* sp. y *Desulfobulbus* sp. [88] (Tabla I.2).

**Tabla VI.2.** Biodegradación de HTP utilizando BRS.

<b>Hidrocarburo contaminante</b>	<b>Microorganismo (s)</b>	<b>Eficiencia de remoción (%)</b>	<b>Tiempo de remoción (días)</b>	<b>Referencia</b>
Tolueno	<i>Desulfosporisinus</i> sp.	99	220	Sunet <i>et al.</i> [89]
	$\delta$ -proteobacteria	97.7	80	Kasai <i>et al.</i> [90]
	Consorcio sulfato reductor (clona Z2Bs 1.4)	100	21	Kleinsteube <i>et al.</i> [91]
	Consorcio sulfato reductor ( <i>Desulfosporisinus</i> sp., <i>Desulfovibrio</i> sp.)	100	33	Fowler <i>et al.</i> [92]
Benceno	Cultivo sulfato reductor (clona BznS295)	95	45	Musat y Widel [93]
	Consorcios bacterianos ( $\delta$ -proteobacteria)	71.4	90	Cervantes <i>et al.</i> [94]
	( $\delta$ -proteobacteria)	67.4	80	Kasai <i>et al.</i> [90]
	Consorcio sulfato reductor (clona Z28s1.4)	100	46	Kleinsteube <i>et al.</i> [91]
Naftaleno	Consorcio bacteriano ( $\delta$ -proteobacterias)	62.82	60	Musat <i>et al.</i> [93]
Fenantreno	Consorcio sulfato reductor	60.7	21	Tsai <i>et al.</i> [84; 95]
Fluoreno	Consorcio sulfato reductor	74.5	21	Tsai <i>et al.</i> [84]
	Consorcio sulfato reductor	83.3	21	Kumar <i>et al.</i> [85]

### **I.3. Celdas de combustible microbiana de sedimento alternativa para biodegradar HAP y generar energía eléctrica**

Como se mencionó anteriormente de los HTP los hidrocarburos aromáticos policíclicos son moléculas recalcitrantes en los sedimentos marinos que mayor preocupación causan debido a su toxicidad, por lo que su degradación anaerobia en celdas de combustible microbiana de sedimento es una alternativa atractiva.

Las celdas de combustible microbiano (CCM) son una tecnología emergente que pueden contribuir a solucionar uno de los problemas más críticos que afronta la sociedad actual: la crisis energética. Una CCM es un dispositivo que utiliza microorganismos para convertir la energía química presente en un sustrato en energía eléctrica, esto es posible bajo ciertas condiciones en las cuales algunos microorganismos transfieren los electrones resultantes de su metabolismo, a un electrodo (ánodo) en lugar de un aceptor químico de electrones (como el oxígeno) [96].

Las CCM se distinguen de otros sistemas de generación de energía porque [97; 98; 96]:

- a) Operan eficientemente a temperatura ambiente e incluso a muy bajas temperaturas.
- b) Producen menor cantidad de CO<sub>2</sub> que cualquier otra tecnología actual que utilice combustibles fósiles para generar energía, por lo que las pocas emisiones de este gas no requieren ningún tipo de tratamiento.
- c) En el futuro podrían ser utilizadas en lugares remotos donde haya demandas de consumos básicos de energía eléctrica, por lo que el potencial de estos dispositivos es enorme.

En diversos trabajos se ha demostrado su efectividad, lo que ha creado grandes expectativas en la comunidad científica, ya que es posible producir energía limpia mediante la explotación de la biomasa, adicionalmente, el estudio de biocátodos capaces de usar no solamente oxígeno sino también otros contaminantes como posibles aceptores de electrones permite la remoción de nutrientes y la biorremediación conjuntamente con la generación de electricidad [99].

Las celdas de combustible microbiana de sedimentos (CCMS) son un tipo de CCM que recientemente ha generado atracción [100; 99] debido a su característica única para

remover compuestos orgánicos de suelos y sedimentos. Las celdas de combustible microbianas de sedimento consisten de un ánodo enterrado en una matriz reducida (sedimento) y un cátodo en la capa oxidada del agua (Figura I.3.1) [100; 101]. No obstante la investigación realizada hasta el momento no ha detallado la capacidad de las CCMS para degradar compuestos complejos como HAP, ya que la mayoría se enfocan en la degradación de compuestos no complejos a excepción de los estudios realizados por Morris *et al.* [102] donde demuestra la degradación anaeróbica de diésel; y el realizado por Sherafatmand y Yong [103], donde investigan la capacidad de las CCMS para la biodegradación de HAP presentes en sedimentos contaminados, bajo condiciones aerobias y anaerobias, obteniendo una generación de energía de 6.02 y 3.63 mW/m<sup>2</sup>, respectivamente, además de lograr la remoción de contaminantes como naftaleno, acenafteno y fenantreno.

#### **I.4. Métodos independientes del cultivo bacteriano para estudiar comunidades microbianas**

Los microorganismos son una fuente importante de productos y procesos biotecnológicos, hasta hace unos años, estos procesos se basaban en el análisis de las capacidades metabólicas de los microorganismos que podían ser cultivados en el laboratorio mediante técnicas microbiológicas tradicionales, sin embargo, los métodos clásicos de cultivo sólo permiten recuperar entre el 0.1 y el 10% de los microorganismos ambientales (microorganismos cultivables) [104; 105]. Lo anterior se debe a que se desconocen los requerimientos nutricionales necesarios, las condiciones fisicoquímicas precisas de su ambiente natural y la información sobre las relaciones simbióticas, comensales o parasitarias que se mantienen en una comunidad microbiana [106; 107].

Debido a esta problemática, se ha optado por metodologías alternas para determinar la diversidad de una población que no dependa de los nutrimentos artificiales, sino del estudio y análisis de su información genética. Un método pionero fue el análisis del gen 16S ARNr mediante el uso de la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) y de técnicas electroforéticas como DGGE (Electroforesis en Gel con Gradiente de Desnaturalización), ARDRA (Análisis de Restricción del ADN ribosomal Amplificado), RFLP (Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica), y RADP (Amplificación Aleatoria de ADN Polimórfico), entre otras [68].

Uno de los métodos moleculares pioneros más utilizado, es el análisis del gen 16S ARNr, el cual facilita la contabilidad explícita de la diversidad genética de los biodegradadores

anaerobios de compuestos del petróleo. Esto ha permitido la comprensión de la estructura de la comunidad microbiana, así como el rol que desempeña cada organismo dentro de la comunidad, teniendo de esta manera un mejor control y predicción de las perturbaciones ambientales. También ha permitido establecer los procedimientos pertinentes para la atenuación natural de contaminantes aromáticos [68].

El uso del gen 16S ARNr y algunos genes funcionales como *apsA* (adenosina 5-fosfosulfato (APS) reductasa) [108] y *dsrAB* (sulfito reductasadisimilatoria) [109], han ampliado la identificación de comunidades de BRS en 2 clases bacterianas diferentes:  $\epsilon$ -*Proteobacteria* y  $\delta$ -*Proteobacteria* (*Desulfovibrio*, *Desulfomicrobium*, *Desulfovermiculus*, *Desulfanium*, *Thermonsulforhabdus*, *Desulfobacter*, *Desulfobulbus*, *Desulfotignum* y *Desulfobacterium*), *Firmicutes* (*Desulfotomaculum*), *Nitrospira* (*Thermodesulfovibrio*) y *Thermodesulfobacterium* (*Thermodesulfobacter*) [110].

Si bien en las últimas décadas el desarrollo de herramientas moleculares independientes del cultivo de microorganismos ha permitido incrementar nuestro conocimiento sobre la diversidad microbiana presente en nuestro planeta, aun no es suficiente, por lo que el uso de estas herramientas sigue incrementado, a tal grado que dentro de estas herramientas pueden distinguirse dos tipos de estrategias, la amplificación y análisis de un gen o familia de genes (los cuales son llamados genes biomarcadores), y el estudio de la totalidad de los genes presentes en una comunidad microbiana, estrategia llamada metagenómica [111; 112; 113; 114].

Ambas estrategias estiman la función, el potencial metabólico y la diversidad de los microorganismos a partir del ADN purificado de una muestra ambiental, sin embargo se diferencian en la información que pueden aportar [115].

#### **I.4.1. Metagenómica**

El conjunto de herramientas y el campo de estudio destinados a la caracterización y análisis de la totalidad de los genomas microbianos presentes en una muestra ambiental se denominan "Metagenómica" [115]. Dicho de otra manera, la metagenómica es el análisis del conjunto del ADN de los diversos microorganismos presentes en una muestra [116].

En la última década, la metagenómica ha revolucionado el estudio de la diversidad microbiana, la obtención de metabolitos y el entendimiento de la dinámica de poblaciones microbianas. Por lo que, desde el punto de vista biotecnológico, es una herramienta importante que permite el escrutinio masivo de todo el conjunto de genomas de microorganismos presentes en una muestra (cultivable y no cultivable).

El primer trabajo donde se demostró el potencial de la metagenómica en el descubrimiento de nuevos genes fue realizado en el año 2000 donde a partir del análisis de suelos se identificaron nuevas enzimas [117]. Posteriormente, se han identificado otros productos y actividades de interés biotecnológico como antibióticos nuevos, proteínas de membrana y genes que codifican la ruta metabólica de síntesis de compuestos como el poli-hidroxibutirato (PHB). En el año 2003, se identificaron en muestras de suelos, agarasas (de las cuales seis fueron totalmente nuevas), celulasas, amilasas, pectatoliasas, lipasas, así como diversas proteínas desconocidas [118].

A partir de estos primeros estudios, la metagenómica se diversificó en diversas áreas del conocimiento, como estudios ecológicos y aplicaciones biotecnológicas. Si bien las estrategias metagenómicas aún presentan desvíos y limitaciones, este abordaje permite acceder al potencial genético contenido en una comunidad microbiana de forma mucho más completa [119, 120].

La alta diversidad que presentan los microorganismos en las comunidades microbianas representa el mayor desafío de este nuevo campo de estudio. Sin embargo, esta diversidad presenta también un gran valor, y la metagenómica representa una disciplina clave para acceder a dicho potencial. La metagenómica está contribuyendo a incrementar nuestro conocimiento sobre el rol que presentan los microorganismos para el funcionamiento de los ecosistemas de nuestro planeta, a conocer las distintas especializaciones que han adquirido a lo largo de su evolución, y a revelar sus posibles utilidades biotecnológicas [121].

Por lo tanto la metagenómica es una magnífica herramienta que permite la recuperación simultánea de diferentes tipos de genes de muestras ambientales, lo que facilita la reconstrucción completa de las vías de degradación de HAP, así también permitirá identificar las BRS con capacidad para degradar hidrocarburos [68]. Sin embargo esta herramienta depende del protocolo de aislamiento del ácido nucleico puesto que este es un punto crítico debido a la heterogeneidad de las muestras [112; 123].

#### **I.4.2. Métodos de aislamiento de ADNmg**

La metagenómica ha alentado la capacidad de proporcionar una visión general de la riqueza de especies en una muestra de un ecosistema en particular. Sin embargo, la detección y caracterización exitosa de ADN microbiano, depende de la extracción eficiente y de una adecuada purificación de ADN metagenómico (ADNmg), para eliminar los contaminantes orgánicos que puedan inhibir la *Taq polimerasa* y otras enzimas utilizadas en estudios moleculares [124].

A pesar de los avances en los métodos de aislamiento de ADN, la extracción de ADN a partir de sedimentos contaminados sigue siendo un paso crítico, ya que la mayoría de los protocolos de aislamiento han sido diseñados para muestras mesofílica. Además de que son particulares del sedimento a estudiar ya que las características físicas y químicas de los contaminantes presentes en cada muestra van a variar. En general es común que los principales problemas de la extracción sean causados por dos tipos de inhibidores [125; 126; 127; 128]:

1. Sustancias interferentes como metales pesados (hidrófilos) y/o materia orgánica (hidrófobos) los cuales restringen la eficacia de las soluciones empleadas para la extracción.
2. Las impurezas orgánicas co-extraídas, tales como ácidos húmicos y fúlvicos, los cuales son física y químicamente similares al ADN.

Existen diferentes métodos para el aislamiento directo de ADN de los sedimentos y en su mayoría varían en los procedimientos de preparación de las muestras y de la eliminación de contaminantes que puedan afectar la calidad del ADNmg [129; 130; 131; 132; 133; 134; 135], la mayoría de ellos implican la eliminación de material húmico a través de polivinilpolipirrolidona (PVPP) y la cromatografía de exclusión de tamaño, sin embargo en



su mayoría se obtiene ADN degradado, por lo que éste y otros contaminantes son comúnmente eliminados ya sea por precipitación de ADN con isopropanol, etanol, polietilenglicol o por filtración a través de una membrana de columna [136; 137, 138] lo cual encarece el proceso de extracción. También han sido diseñados kits comerciales para la extracción de ADN de suelos, pero los rendimientos que se obtienen son por lo general muy bajos, además de que estos paquetes son caros y poco prácticos para estudiar numerosas muestras [139].

Sobre la base de los métodos mencionados anteriormente fue desarrollado un protocolo, el cual permite extraer ADNmg de alto rendimiento y alta calidad a partir de sedimentos que presentaban una fuerte contaminación. [140].

## **I.5 HIPÓTESIS**

Las bacterias identificadas en los sedimentos marinos de Pogram y Sisal, Yucatán, posiblemente han sido reportadas por su capacidad para degradar hidrocarburos totales del petróleo (HTP).

## **OBJETIVOS**

### **I.6. Objetivo general**

Identificar las bacterias presentes en sedimentos marinos de Progreso y Sisal, con posible capacidad para degradar HTP, mediante el análisis del gen 16S ARNr.

### **I.7. Objetivos específicos**

1. Establecer un protocolo de extracción de ADNmg de calidad y alto rendimiento.
2. Identificación mediante el análisis de secuencia del gen 16S ARNr de la comunidad microbiana con potencial de degradación de hidrocarburos.
3. Determinar el grado de contaminación de los sitios de colecta mediante la cuantificación y caracterización de HTP.
4. Analizar los resultados obtenidos.

## CAPITULO 2

### METODOLOGÍA

#### **II.1. Estrategia experimental**

Se realizó una colecta de 12 muestras de sedimento durante época de lluvias y secas, en Progreso y Sisal en Yucatán, México. Por cada puerto se establecieron seis puntos de muestreo. Los sedimentos colectados se procesaron para la extracción de ADN metagenómico.

##### **II.1.1. Colecta de sedimento**

Una vez que se situaron los 12 puntos de colecta en los puertos de Progreso y Sisal, se registraron las coordenadas geográficas (Garmin, GPSmap76CSx). En cada punto se registró la profundidad del agua con una Ecosonda (SpeedTech, SM-5). El pH, la temperatura y el potencial Redox del agua, con un sistema Multiparámetro (YSI, 556). El sedimento superficial se colectó con una draga con capacidad para 5 L. En seguida, se midió el potencial Redox (ExStikORP Meter RE300), pH y temperatura (ExStikII pH/Conductivity Meter EC500) con dispositivos portátiles.

Las muestras de sedimento se depositaron en bolsas de plástico con cierre hermético, previamente etiquetadas y se colocaron en una nevera con hielo para su traslado al Laboratorio de Energía Renovable del CICY.

##### **II.1.2. Almacenamiento de sedimento**

El sedimento colectado se almacenó en tubos Falcón estériles de 50 mL en congelación a -20 °C. Los tubos se identificaron con la primera letra del puerto es decir P para progreso y S para Sisal, seguida de la letra del sitio de colecta C, D y E para Progreso; y A, B y C para Sisal, seguida de la época de colecta es decir 1C (época de secas) y 3C (época de lluvias) para Progreso y 2C (época de secas) y 1C (época de lluvias) para Sisal, como se muestra en la Tabla II.1.

**Tabla VII.1.** Etiquetado e identificación de los sedimentos almacenados en tubos Falcón.

Lugar de colecta	Época de colecta	Etiquetado final		
Progreso	Época de secas	PC1C	PD1C	PE1C
	Época de lluvias	PC3C	PD3C	PE3C
Sisal	Época de secas	SA2C	SB2C	SC2C
	Época de lluvias	SA1C	SB1C	SC1C

## II.2. Extracción de ADN metagenómico (ADNm<sub>g</sub>)

La extracción de ADN metagenómico se realizó de acuerdo al protocolo de Zhou *et al.* [134] modificado por Osborn *et al.* [137]. Se tomaron 5 g de sedimento y se resuspendió en 12 mL de buffer de extracción (Tris 100 mM; EDTA 100 mM; buffer de fosfato de sodio 100 mM, pH 8.0; 100  $\mu$ L de proteinasa K (10 mg·mL<sup>-1</sup>) y 180  $\mu$ L de lisozima (100 mg·mL<sup>-1</sup>). Posteriormente, se incubó a 37°C y 150 rpm durante 30 minutos. Al término se adicionó 3 mL de SDS al 10%, 4.5 mL de NaCl 5 M, 1.5 mL de CTAB al 5%/NaCl 1.5 M y nuevamente se incubó a 65°C por 15 min. Posteriormente, la muestra se sometió tres veces a choque térmico (congelación en nitrógeno líquido y descongelación durante 15 min a 65°C).

Seguidamente, se centrifugó a 4200 rpm durante 10 min a 4°C. El sobrenadante se transfirió a otro tubo. El precipitado se resuspendió mediante vortex durante 10 segundos, en 4 mL de buffer de extracción y 1 mL de SDS 10%. Posteriormente se incubó a 65°C por 10 min para después separar el sobrenadante mediante centrifugación a 4200 rpm durante 10 min a 4°C. El sobrenadante de la primer y segunda incubación se combinó.

Posteriormente un volumen igual de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) fue adicionado al sobrenadante, se mezcló por inversión, y centrifugó a 4200 rpm durante 10 min a 4°C. La capa superior acuosa se transfirió y, se adicionó un volumen igual de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se mezcló por inversión, y se centrifugó a 4200 rpm durante 10 min a 4°C. Al término el sobrenadante de la fase acuosa se transfirió a otro tubo y se adicionó 0.7 vol. de isopropanol a temperatura ambiente y 0.3 vol. de acetato de sodio 3M, se mezcló por inversión y centrifugó a 12000 rpm durante 30 min a 4°C. Después se retiró cuidadosamente el sobrenadante, se agregó 1.5 mL de etanol al 70% y

se centrifugó a 14000 rpm por 15 min a 4°C. Nuevamente el sobrenadante se descartó y el precipitado se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en 50 µL de agua destilada estéril.

### **II.2.1. Pasos adicionales al protocolo de extracción de ADNmg**

Los extractos nucleicos de ADNmg obtenidos mediante el protocolo mencionado anteriormente, fueron precipitados con acetato de sodio/isopropanol (0.3 y 0.7 vol.) en dos ocasiones. El extracto fue lavado con etanol al 70% y tratado con ARNasa a diferentes volúmenes (20, 30 y 50 µL) con una concentración inicial de 10 mg/mL.

### **II.2.2. Pretratamiento de sedimento y modificación del protocolo de extracción de ADNmg**

Debido a que el ADNmg obtenido se mostraba degradado. Se realizaron pretratamientos al sedimento de acuerdo a Fang *et al.* [140], pero con una menor cantidad de sedimento. Se pesaron 0.25 g de sedimento fresco y se agregaron 3 mL de solución S0 (0.1 mol·L<sup>-1</sup> de EDTA, 0.1 mol·L<sup>-1</sup> de Tris (pH 8.0), 1.5 mol·L<sup>-1</sup> de NaCl, 0.1 mol·L<sup>-1</sup> de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), e incubó a 65°C durante 15 minutos a 180 rpm. Al término se centrifugó a 9000 rpm a 25°C durante 6 min, seguidamente el precipitado fue resuspendido en S0 y nuevamente fue centrifugado. Esta operación se repitió en tres ocasiones hasta observar transparente el sobrenadante.

Después del pretratamiento el protocolo de Osborn *et al.* [137] se realizó en función al tamaño de muestra inicial. Al término, el precipitado se resuspendió en 400 µL de buffer TE y e incubó por 30 min a 65°C. Se centrifugó a 15000 rpm por 20 min a 4°C y el sobrenadante se transfirió a otro tubo, se adicionó 5 µL de ARNasa (10mg/ml) y se incubó a 37°C por 30 min. Al finalizar, se adicionó 0.7 vol. de isopropanol a temperatura ambiente y 0.3 vol. de acetato de sodio 3M, se mezcló por inversión y centrifugó 15000 rpm a 4°C por 15 min. Se descartó el sobrenadante y se adicionó 200 µL de etanol al 70%, nuevamente se centrifugó a 1000 rpm a 4°C por 10 minutos, se descartó el sobrenadante y el precipitado se secó a temperatura ambiente. Finalmente, se resuspendió en 50 µL de agua bidestilada estéril.

### **II.2.3. Cuantificación de ADNmg mediante los índices de absorbancia (A260/280 y A260/230)**

La concentración y pureza del ADNmg obtenido anteriormente, se determinaron usando un Nanodrop 2000 (ThermoScientific). Las lecturas de absorbancia se realizaron a 260, 280, y 230nm.

### **II.2.4. Purificación del ADNmg por medio de membrana de diálisis**

La purificación del ADNmg se realizó utilizando membrana de diálisis (también llamados tubos visking o tubos de diálisis) de acuerdo a Lewis [141]. Primeramente, se realizó una electroforesis con el extracto de ADNmg en gel de agarosa al 1%. Posteriormente se observó el gel bajo luz UV (Benchtop 3UV™ Transiluminator 302/365NM). La banda se cortó y se mantuvo a -20°C por 30 min. Mientras tanto, se cortó un segmento de 7cm de la membrana de diálisis, se sumergió en agua bidestilada estéril y después en buffer TAE1X. Finalmente se enjuagó en agua bidestilada estéril.

Se preparó el “tubo” de diálisis mediante un clip sujeto a un extremo de la membrana, se introdujo la banda congelada dentro del tubo, se adicionaron 400 µL de buffer TAE 1X y se colocó otro clip en el otro extremo. El tubo de diálisis se colocó dentro de la cámara de electroforesis y se aplicó una corriente de 100 V durante 15 min. Al término, el buffer TAE 1X del interior del tubo de diálisis fue removido y sujeto a precipitación, para lo cual se adicionaron 200 µL de etanol al 70% y posteriormente se centrifugó a 10000 rpm a 4°C por 10 minutos. El precipitado fue resuspendido en 20 µL de agua bidestilada estéril y se congeló a -20°C hasta su cuantificación y amplificación.

### **II.2.5. Amplificación del gen 16S ARNr para corroborar pureza del extracto**

La amplificación del gen 16S ARNr se realizó por PCR, utilizando cebadores específicos para la región codificante V1-V3 con un tamaño de 600pb: primer 28F (5'-GAGTTTGATCNTGGCTCAG-3') y primer 534R (5'-ATTCCGCGGCTGCTGG-3'). La reacción se realizó a un volumen de 10 µL, la cual contendrá las siguientes

concentraciones finales: 1 µL de Buffer de PCR 10x (Invitrogen); 0.8 µL de dNTP's (Bioline) con una concentración de 2mM; 0.3 µL de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen) a 50 mM; 0.5 µL de Primer 28F (Invitrogen) a 10 µM; 0.5 µL de primer 534R (Invitrogen) a 10 µM; 0.02 µL de Taq Pol (Invitrogen); 1 µL de ADNmg con una concentración de 10 ng/µL y 5.88 µL de agua bidestilada estéril. El perfil cíclico fue el siguiente: desnaturalización inicial a 94.5 °C por 4 min, seguida de 25 ciclos de desnaturalización a 94.5°C por 1 min, alineamiento a 61.9 °C por 1 min y elongación a 72°C por 1 min, y una fase de elongación final a 72°C por 10 min (Bio-Rad T100 Thermal Cycler).

### **II.2.6. Electroforesis en gel de agarosa**

Los amplicones y extracto nucleico fueron separados en gel de agarosa al 1% con buffer de corrida TAE 1X (Tris-acetato-EDTA) y 1.2 µL de Gelred. En cada pozo se depositó 5 µL del extracto nucleico y 2 µL de Orange G. Para verificar el tamaño de los fragmentos se empleó un marcador molecular de 1 Kb (Invitrogen). La separación de los fragmentos se realizó a 75 mv por 30 min y la visualización de las bandas se realizó mediante un fotodocumentador (Enduro GDS Gel DocumentationSystem).

### **II.2.7. Secuenciación del gen 16S ARNr**

Después de la purificación 20 µL de ADNmg a una concentración de 20 ng/µL fueron secuenciados en Research and Testing Laboratory Lubbock Texas. En este laboratorio se amplificó la región hipervariable V4 del gen 16S ARNr para identificar especies del dominio Bacteria y Arquea, utilizando los primers fusionados como sigue: el primer forward fue construido con adaptadores illumina i5 (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3'), un barcode de 8 a 10 pb, un primer pad y primer 515F; mientras que el primer reverse con adaptadores illumina i7 (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') un barcode de 8 a 10 pb, un primer pad y primer 806R. El primer pad se diseñó para asegurar la combinación de primer pad/primer a 63° a 66°C de acuerdo a Schloos *et al.* [142]. La amplificación se llevó a cabo en 25 µL de reacción: Qiagen Hot Start Taq master mix (Qiagen Inc, Valencia, California), 1 µL de cada primer a una concentración de 5 µM y 1 µL de templado. La reacción se realizó en ABI Veriti Thermocycler bajo el siguiente perfil cíclico: 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 54°C por 40 segundos y 72°C

por 10 minutos. Los productos fueron secuenciados utilizando Illumina Mi Seqtechnology para generar 2x300 lecturas pareadas en los pair-end.

### **II.2.8. Análisis de amplicones y diversidad microbiana**

Un total de 486,546 secuencias fueron obtenidas y posteriormente analizadas mediante FastQC v.0.11.2 seguidamente las secuencias de baja calidad fueron eliminadas, y se realizó el ensamble de los join con un script personalizado de Phyton usando PEAR v.0.9.8 (Paired-endreadmerger) [143]. Las secuencias filtradas fueron sometidas a la detección y eliminación de quimeras mediante scripts personalizados, la detección de secuencias quiméricas se realizó utilizando Usearch con RDP (classifier training database, v.9) y su remoción se realizó con Qiime. Las secuencias restantes fueron analizadas utilizando el método Uparse [144] para la identificación microbiana.

### **II.3. Preparación de muestra de sedimento para extracción de hidrocarburos del petróleo**

Para la extracción de Hidrocarburos totales del petróleo, primeramente, se preparó el sedimento con el fin de determinar el porcentaje de humedad y obtener muestras de sedimento homogéneas, esta preparación se realizó siguiendo el método de Fernández, [145]. Primero se pesaron 20 g de sedimento, esta se extendió sobre papel aluminio y se mantuvo a una temperatura constante de 28°C por 48 horas. Al término la muestra se pulverizó en un mortero hasta obtener partículas finas, para proveer una mayor área de superficie y contacto con los solventes orgánicos y se almacenó hasta su uso.

Posteriormente se determinó el contenido de humedad, para lo cual se pesó 1 g de sedimento en un crisol a peso constante. Posteriormente se mantuvo por 24 horas a 80°C. Al término, se registró el peso y el porcentaje de humedad se calculó por diferencia de pesos:

$$\% \text{ Humedad del suelo} = (\text{Peso inicial} - \text{Peso final}) / \text{Peso inicial} * 100$$



### **II.3.1. Extracción de hidrocarburos mediante agitación-centrifugación**

Existen diferentes técnicas para la extracción de hidrocarburos, siendo la extracción con Soxhlet la más utilizada. Sin embargo, el procesamiento es tardado y el número de muestras condiciona la cantidad de equipos a utilizar. Por el contrario, la extracción por agitación-centrifugación es eficiente y económica en términos de tiempo y cantidad de solvente a utilizar. Empleando los métodos 3500B y 3540C de las USEPA (U.S. Environmental Protection Agency) [146; 147], Schwab *et al.* [148], y modificaciones por Arce *et al.* [149], se desarrolló la técnica de la siguiente manera: Se pesaron 5 g de sedimento y se colocaron en tubos de polipropileno, seguidamente se adicionó 3 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhídrido y se mezcló mediante vortex hasta homogenizar. Posteriormente, se adicionó 5 mL de diclorometano y se homogenizó mediante vortex durante 45 seg. Posteriormente se centrifugó a 6,000 rpm a 4°C por 10 min, se recuperó el sobrenadante y se colocó en un vial de vidrio a peso constante. El precipitado se resuspendió en 5 mL de diclorometano y se repitió la centrifugación y recuperación de sobrenadante por 3 ocasiones más hasta obtener 15 mL del extracto orgánico (sobrenadante). Los 15 mL de extracto orgánico se transfirieron a un vial de vidrio con tapa de teflón a peso constante para su posterior cuantificación.

### **II.3.2. Cuantificación gravimétrica de HTP (hidrocarburos totales del petróleo)**

La cuantificación de HTP se realizó por gravimetría, se basó en el método 821-B94-004 de la US EPA (U.S. Environmental Protection Agency) [150]. Este método permite cuantificar los compuestos totales extraídos, es decir, HTP y asfáltenos, contenidos en las muestras, por medio de balance de pesos. Primeramente, se pusieron a peso constante en viales de vidrio con tapa de teflón. Posteriormente, se registró el peso del vial (R<sub>A</sub>), se adicionó 15 mL del extracto orgánico y se evaporó el solvente bajo flujo constante de nitrógeno hasta concentrar a sequedad. Seguidamente se pesó nuevamente el vial de vidrio con el extracto libre de solvente y se registró el peso (R<sub>B</sub>). La diferencia en peso corresponde al contenido total de HTP. El cálculo se realizó utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{HTP } (\mu\text{g/ g de sedimento seco}) = (\text{RB} - \text{RA}) / (\text{P} * \text{FH})$$

Dónde:

HTP ( $\mu\text{g}/\text{g}$  de s.s) = hidrocarburos totales del petróleo en  $\mu\text{g}/\text{g}$  de sedimento seco

RA= peso (mg) del recipiente vacío a peso constante

RB = peso (mg) del recipiente con el extracto orgánico concentrado

P = cantidad de suelo extraído (g)

FH = factor de corrección de humedad ( $1-(\% \text{humedad}/100)$ )

### **II.3.3. Caracterización de HTP por espectroscopia de infrarrojo**

La espectroscopia de infrarrojo (EI), juega un papel de siempre reconocido entre las técnicas disponibles para la caracterización de compuestos derivados del petróleo [151; 152; 153]. La caracterización se realizó únicamente en las muestras con mayor concentración de HTP. En el caso de las de Progreso se eligieron PD1C y PD3C, y de Sisal SB2C y SB1C. La caracterización se realizó mediante el método 8440 de la US EPA [154]. El extracto orgánico obtenido anteriormente se resuspendió en 5 mL de diclorometano, se tomó 1 mL y se evaporó a sequedad. Una vez que se obtuvo el extracto sin solvente se adicionó tetracloroetileno hasta completar 5 ml. Posteriormente, se colocó la muestra en una celda de cuarzo, la cual se introdujo al espectrofotómetro de infrarrojo. El blanqueo se realizó empleando un testigo del solvente (tetracloroetileno), para evitar interferencias. La huella característica de los HTP en infrarrojo produce una huella digital de 3 picos a 2,956, 2,926 y 2,855  $\text{cm}^{-1}$  [145], por lo tanto, la determinación se realizó a una longitud de onda de 2,950  $\text{cm}^{-1}$ .

### **II.3.4. Caracterización de HTP por cromatografía de gases - espectrometría de masas (CG-MS)**

La caracterización de HTP por CG-MS, se realizó igualmente en las muestras que presentaron mayor cuantificación gravimétrica. Por tanto se utilizaron PD1C y PD3C, de Progreso y SB2C y SB1C de Sisal, previamente las muestras se purificaron mediante cromatografía en columna por gravedad utilizando 5 mL de Cloroformo, 5 mL de Acetato de etilo y 5 mL de Metanol. Toda vez que se purificaron, se concentraron a sequedad y se

resuspendieron en 10  $\mu$ L del solvente utilizado (cloroformo, acetato de etilo o metanol, separadamente). Seguidamente se tomó 1  $\mu$ L y se inyectó al cromatógrafo de gases (Agilent Technologies, 7890B), equipado con un detector de masas (Agilent Technologies-5977A) y una columna HP-1. El horno se calentó a 70°C por 5 min inicialmente. Seguidamente se usó una rampa de 10°C por min hasta 200°C y mantenida 5 minutos a esta última temperatura. Posteriormente se usó una segunda rampa de 20°C por min hasta 290°C y mantenida por 15 minutos. Se acarrearón los compuestos fragmentados mediante el acarreo con He a un flujo de 19 mL/min. Los compuestos fragmentados por espectrometría de masas, fueron identificados mediante la biblioteca pre-cargada (Enhanced Data) considerándose únicamente los compuestos que presentaban una calidad superior a 90.

## CAPITULO 3

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### III.1. Colecta de sedimentos

La posición geográfica y las actividades portuarias de los sitios de colecta hacen posible que existiera contaminación por hidrocarburos [155], lo cual a su vez puede implicar la presencia de comunidades bacterianas adaptadas a la degradación de estos compuestos. Los datos fisicoquímicos de cada sitio de colecta (Tabla III.1. y III.1.1.) indicaron que el potencial de óxido reducción de los sedimentos colectados en los puntos de muestreo SA, SB y SC fue muy diverso. Los potenciales oxidantes (37mV) y reductores (-279mV) registrados permitirán identificar una mayor diversidad de especies, tales como: bacterias reductoras de hierro, bacterias reductoras de sulfato y metanogénicas [66, 67, 68]. Los puntos PC, PD y PE mostraron potencial reductor (-186 a -365 mV). El potencial redox oscila de las BRS oscila entre -200 y 300 mv, por lo que es probable encontrar mayor diversidad de bacterias sulfato reductoras y metanogénicas [65, 66], es decir, especies con metabolismo anaerobio. Los potenciales detectados en los sedimentos de Progreso, indican presencia de bacterias anóxicas, mismas que han demostrado su capacidad para degradar hidrocarburos totales del petróleo [95].

**Tabla VIII.1.** Posición geográfica y datos fisicoquímicos de los sedimentos colectados en Progreso durante las épocas de lluvias y secas.

Datos	EPOCA DE MUESTREO					
	Época de secas			Época de lluvias		
Sitio	PC	PD	PE	PC	PD	PE
<b>Localización geográfica</b>	21°17.117' N 89°41.833' O	21°18.983' N 89°40.167' O	21°19.050' N 89°41.850' O	21°18.991' N 89°40.149' O	21°17.117' N 89°41.833' O	21°19.021' N 89°41.843' O
<b>Profundidad (m)</b>	2.8	6.4	3.3	6	2.8	5.4
<b>T (°C)</b>	27.6	26	27.6	25.5	28.3	26.6
<b>pH</b>	6.9	6.63	7.6	8.15	7.10	7.67
<b>E<sub>h</sub> (mV)</b>	-361	-368	-306	-193	-278	-186
<b>H<sub>2</sub>S (mg l<sup>-1</sup>)</b>	0.008	102.19	31.27	0.008	0.007	0.007
<b>COT (%)</b>	4.62	2.43	1.07	2.83	0.57	0.94
<b>Arena (%)</b>	42.05	52	38	68.33	75.60	59.60
<b>Limo (%)</b>	36	33.95	56	14.11	18.75	32.65
<b>Arcilla (%)</b>	21.95	14.05	6	17.56	5.65	7.75
<b>N<sub>T</sub> (µM)</b>	530.34	359.32	110.81	237.2	53.59	82.84
<b>P<sub>T</sub> (µM)</b>	6.76	6.75	5.36	7.14	6.12	6.72

\*T= Temperatura; E<sub>h</sub>= Potencial Redox; COT= Carbono Orgánico Total; N<sub>T</sub>= Nitrógeno Total; P<sub>T</sub>= Fósforo Total.

**Tabla III.1.1.** Posición geográfica y datos fisicoquímicos de los sedimentos colectados en Sisal durante las épocas de secas y lluvias.

Datos	EPOCA DE MUESTREO					
	Época de secas			Época de lluvias		
Sitio	SA	SB	SC	SA	SB	SC
<b>Localización geográfica</b>	21°10.048' N 90°02.506' O	21°09.541' N 90°03.012' O	21°09.490' N 090°02.569' O	21°10.100' N 90°02.817' O	21°09.917' N 90°03.17' O	21°09.850' N 90°02.950' O
<b>Profundidad (m)</b>	3.8	1.6	0.9	4.1	2.3	1.7
<b>T (°C)</b>	28.2	28.5	28.6	28.8	30.3	30.5
<b>pH</b>	6.65	7.58	7.33	7.88	6.66	6.75
<b>E<sub>h</sub> (mV)</b>	-225	37	34	28	-279	-251
<b>H<sub>2</sub>S (mg l<sup>-1</sup>)</b>	0.012	0.006	0.014	0.824	0.006	469
<b>COT (%)</b>	3.46	0.46	0.57	0.38	3.28	1.92
<b>Arena (%)</b>	53.85	95.65	94.05	77.5	61.6	63.4
<b>Limo (%)</b>	32.20	2.25	2.00	18.25	22.25	24.3
<b>Arcilla (%)</b>	13.95	2.10	3.95	4.25	16.15	12.3
<b>N<sub>T</sub> (µM)</b>	226.10	25.62	32.24	19.86	339.47	158.64
<b>P<sub>T</sub> (µM)</b>	7.86	7.47	5.81	5.33	6.3	5.9

\*T= Temperatura; E<sub>h</sub>= Potencial Redox; COT= Carbono Orgánico Total; N<sub>T</sub>= Nitrógeno Total; P<sub>T</sub>= Fósforo Total.

### III.2. Extracción de ADNmg con previas modificaciones

La extracción de ADN metagenómico se realizó mediante el protocolo de Zhou *et al.* [134], con algunas modificaciones propuestas por Osborn [137], y algunas más realizadas para la obtención de ADNmg de alta calidad y alto rendimiento, indicados en la Tabla III.2.

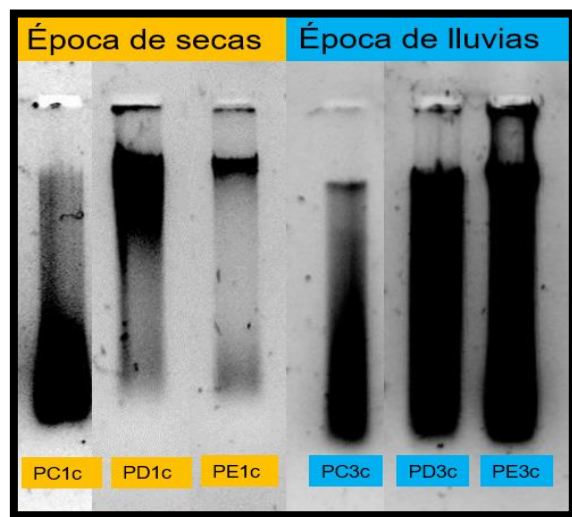
**Tabla III.2.** Protocolo de Zhou *et al.* [134], Osborn [137] y modificaciones.

	<b>Protocolo de Zhou <i>et al.</i> [134], modificado por Osborn [137].</b>	<b>Protocolo modificado</b>
<b>Incubación y agitación</b>	37°C por 45 min a 150 rpm	37°C por 30 min a 150 rpm
<b>Incubación</b>	65°C por 15 min	65°C por 10 min
<b>Choque térmico</b>	Nitrógeno líquido 15 minutos	Nitrógeno líquido 5 minutos
<b>Descongelamiento 2 veces</b>	65°C por 15 minutos	65°C por 10 minutos
<b>Centrifugación</b>	4200 rpm por 10 min a 4°C	9000 rpm por 10 min a 4°C
<b>Resuspensión del pellet</b>	4 mL de B.E, 1 mL de SDS 10% y Agitación por vortex 10 seg	Sin resuspensión del pellet
<b>Centrifugación después del fenol: cloroformo: isoamílico</b>	4200 rpm por 10 min a 4°C	7500 rpm por 5 min a 4°C
<b>Centrifugación después del cloroformo: isoamílico</b>	4200 rpm por 10 min a 4°C	7500 rpm por 5 min a 4°C
<b>Sobrenadante</b>	0.7 vol. de isopropanol y 0.3 vol. de Acetato de sodio 10M (pH 7.5)	0.7 vol. de isopropanol y 0.3 vol. de Acetato de sodio 5M (pH 9.0)
<b>Centrifugación</b>	9000 rpm por 45 min a 4°C	12000 rpm por 30 min a 4°C
<b>Centrifugación</b>	9000 rpm por 15 min a 4° C	10000 rpm por 10 min a 4°C
<b>Pellet</b>	250 µL de agua destilada estéril	400 µL de TE 1x

Además de las modificaciones enlistadas, se realizaron lavados adicionales con NaCl, acetato de sodio, isopropanol, ARNasa y etanol, ya que los resultados obtenidos con el protocolo mencionado anteriormente mostraban degradación de ADNmg con presencia de contaminantes celulares y ARN. Estos lavados adicionales permitieron eliminar los contaminantes celulares como lípidos y proteínas acarreados durante la separación con fenol: cloroformo: isoamílico [156] y así evitar interferencias o inhibición en la PCR. En este caso el isopropanol y acetato de sodio, se unieron a los grupos fosfatos, reduciendo las fuerzas repulsivas entre las cadenas y permitiendo que el ADNmg se plegara sobre sí mismo, haciéndolo insoluble, de esta forma al añadir el lavado con etanol el ADNmg precipitó y se logró eliminar los contaminantes celulares [157]. Por otra parte la adición de ARNasa la cual es una enzima bastante específica a su sustrato, es decir que solo degrada las moléculas para las cuales ha sido diseñada, permitió cortar y degradar las secuencias de ARN, evitando de esta manera la degradación de ADNmg por contaminación de ARN en las muestras [158].

Este protocolo de ADNmg aislado se realizó para las muestras de sedimento colectado en lluvias y secas, en Progreso (PC, PD y PE). Los extractos (Figura III.2) muestran degradación en el ADNmg y presencia de ARN, indicando insuficiente la adición de 5  $\mu$ L de ARNasa de acuerdo al protocolo de Osborn modificado [137]. A pesar de la reproducibilidad del protocolo, se logró la obtención de altos rendimientos en la concentración de ADNmg de 41.9 a 1640.1 ng/g (Tabla III.2.1.) en comparación con el rendimiento reportado por Zhou et al. [134] de 2.5 a 26.9 ng/g. Esto demuestra que la adición de lavados con acetato de sodio, isopropanol y etanol, así como el uso de ARNasa si logran remover mayor cantidad de contaminantes celulares y por lo tanto mejorar el rendimiento de ADNmg.





**Figura III.2.** Ácidos nucleicos extraídos de cada punto de muestreo.

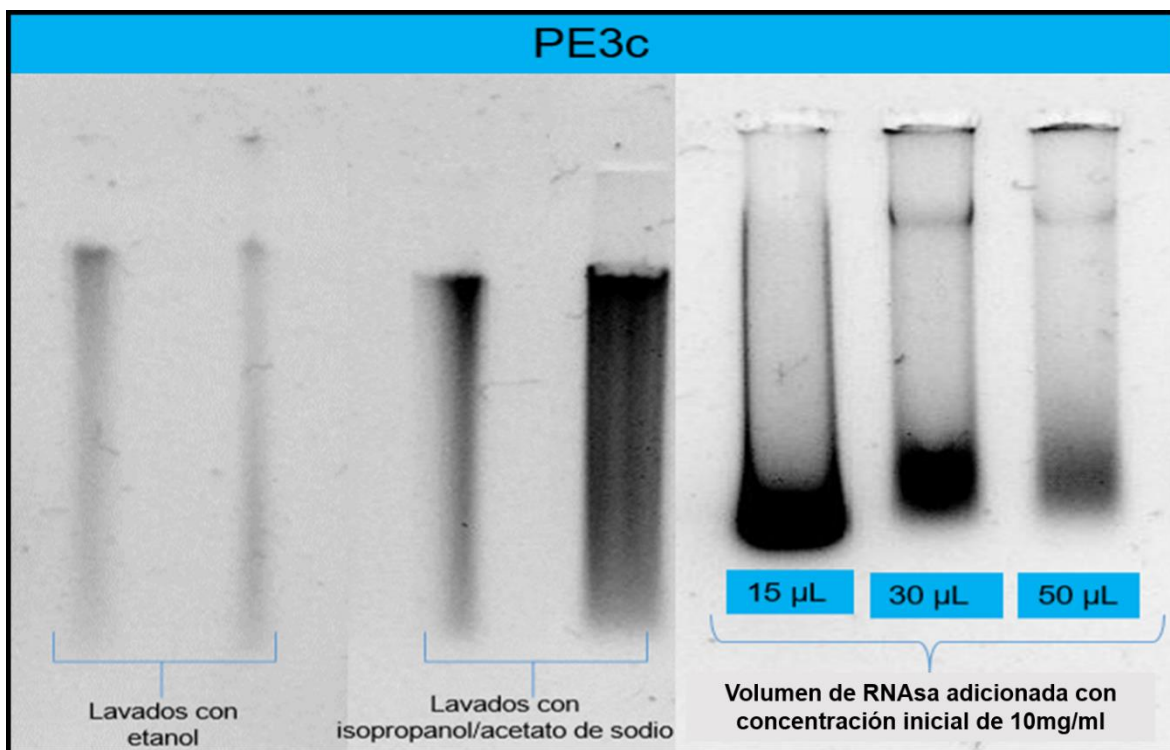
Las relaciones de absorbancia A260/280 fueron alrededor de 1.8 (Tabla III.2.1.), lo cual indica pureza del ADN y eliminación de contaminantes celulares [159]. Los extractos son de mejor calidad en comparación con los obtenidos mediante el protocolo de Zhou [134] (A260/280 1.35 nm). Sin embargo, los índices de absorbancia A260/230 se encuentran por debajo de los esperado (2.0), indicando contaminación por ácidos húmicos precursores de combustibles fósiles o bien presencia de otros contaminantes orgánicos como proteínas, carbohidratos o ácidos fúlvicos [140].

**Tabla III.2.1.** Concentración y pureza del ADNmg aislado de los sedimentos muestreados en Progreso.

Muestra		Concentración de ADNmg ng/μL	Índice 260/280 nm	Índice 260/230 nm
Secas	PC1C	463.2	1.81	1.16
	PD1C	116.8	1.76	1.02
	PE1C	41.9	1.83	1.19
Lluvias	PC3C	914.5	1.80	2.41
	PD3C	914.5	1.86	1.14
	PE3C	98.1	1.74	0.18

### III.2.1. Pasos adicionales al protocolo de extracción de ADNmg

De acuerdo a los resultados obtenidos, se precipitó el ADNmg empleando isopropanol/acetato de sodio (0.7 y 0.3 vol.), además se incrementó el volumen adicionado de RNAsa (10mg/mL). Estas modificaciones se realizaron en el aislado PD3C, ya que fue el que presentó mayor contaminación de acuerdo a los índices A260/230 como se observa en la Tabla III.2.1. Los resultados de estos pasos adicionales se muestran en la Figura III.2.1.



**Figura III.2.1** Aislados con diferentes lavados y adición de RNAsa en volúmenes diferentes (los tratamientos se realizaron por separado).

Como se muestra en la Figura III.2.1, la precipitación con acetato de sodio/isopropanol no disminuyó la contaminación por ácidos húmicos y el ADNmg se degradó. Esto sugiere que aún existen contaminantes coextraídos durante el proceso de aislamiento, los cuales se encuentran unidos al ADNmg, por lo que cualquier procedimiento posterior a la obtención

del extracto, no los elimina. Por tanto, es necesario la remoción de estos contaminantes previo a la lisis celular [140]. Por otro el incremento en el volumen de ARNasa si degrada y elimina el ARN, aunque disminuye el rendimiento del ADNmg como se muestra en la Tabla III.2.2.

**Tabla III.2.2.** Rendimiento de ADNmg respecto a la adición de diferentes volúmenes de ARNasa.

<b>Muestra</b>	<b>Volumen de ARNasa adicionada</b>	<b>Concentración del ADNmg (ng/μL)</b>	<b>Índice 260/280 nm</b>	<b>Índice 260/230 nm</b>
PE3C	20 μL	68.0	1.84	1.10
PE3C	30 μL	41.1	1.80	0.99
PE3C	50 μL	8.5	1.60	0.53

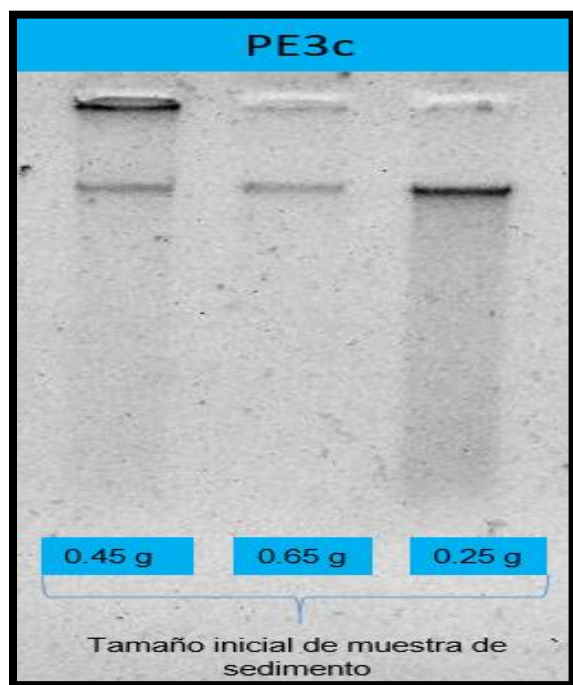
### III.2.2. Pretratamiento de sedimento y modificación del protocolo de extracción de ADNmg

El pretratamiento de acuerdo a Fang *et al.* [140] se realizó partiendo de diferentes tamaños de muestra (Tabla III.2.3). Esto se realizó a partir de la muestra de sedimento PE3C, antes de la lisis celular mediante modificaciones de Osborn [137]. Los resultados obtenidos (Tabla III.2.3), fueron exitosos, debido a que el rendimiento de ADNmg, fue de 772.5 ng/ μL a 265.0 ng/ μL, superior al reportado por Zhou *et al.* Así como también se demuestra una mejor calidad del ADNmg obtenido de acuerdo a los índices de absorbancia (260/280 y 260/230). También se comprueba que a mayor tamaño de muestra inicial (0.65, 0.45 y 0.25 g), aumenta la cantidad recuperada del ADNmg y que este protocolo acoplado es reproducible.

**Tabla III.2.3.** Concentración de ADNmg del sedimento de PE3C a partir de diferentes tamaños de muestra inicial.

<b>Tamaño de muestra inicial (g)</b>	<b>Concentración de ADNmg ng/ μL</b>	<b>A260/280 nm</b>	<b>A260/230 nm</b>
0.65	772.5	1.74	1.63
0.45	272.5	1.83	1.63
0.25	265.0	1.81	1.71

De acuerdo con Fang *et al.*, [140], 0.25 g de muestra resulta representativo, ya que el rendimiento de ADNmg (265.0 ng/ $\mu$ L) se considera alto. Para análisis posteriores, solo en caso de que el rendimiento de ADNmg resultara bajo se deberá seleccionar un tamaño mayor de muestra inicial, ya que esto indicaría bajos niveles de biomasa microbiana. La integridad del ADNmg de la muestra PE3C fue confirmada en la electroforesis (Figura III.2.2.), por lo que se decidió usar el protocolo acoplado para extraer el ADNmg de las demás muestras.



**Figura III.2.2.** ADNmg obtenido a partir de diferentes tamaños de muestra de sedimento inicial.

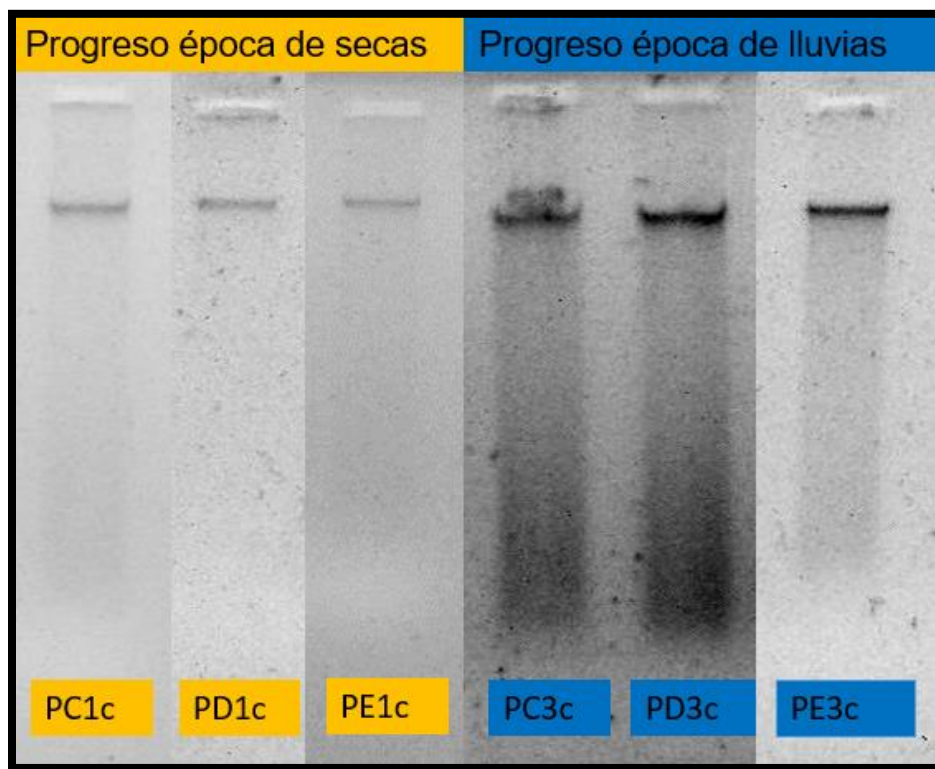
De acuerdo a los resultados obtenidos, se extrajo el ADNmg de todas las demás muestras de Progreso (PC1C, PD1C, PE1C, PC3C, PD3C y PE3C) y Sisal (SA1C, SB1C, SC1C, SA2C, SB2C y SC2C), confirmando la reproducibilidad del protocolo y la obtención de alto rendimiento y la alta calidad del ADNmg (Tabla III.2.4.).

**Tabla III.2.4.** Rendimiento y calidad de ADNmg, de las muestras de sedimento colectado en Progreso.

Época de colecta	Muestras	Concentración de ADNmg ng/ $\mu$ L	Índice A260/280 nm	Índice A260/230 nm
Secas	PC1C	302.4	1.87	1.98
	PD1C	288.2	1.86	1.99
	PE1C	161.8	1.67	2.09
Lluvias	PC3C	359.9	1.88	1.90
	PD3C	318.0	1.87	1.97
	PE3C	273.3	1.88	1.98

Los resultados indican que a partir del sedimento del sitio PC se obtuvo mayor rendimiento de ADNmg, mientras que menor rendimiento se obtuvo del sedimento del sitio PE. Adicionalmente los índices 260/280 y 260/230, indican alta calidad y pureza de los ADNs aislados, aun cuando las muestras fueron colectadas de sitios contaminados.

El ADNmg aislado a partir del protocolo acoplado se observa íntegro (Figura III.2.3), lo cual es favorable para los análisis que continúan. Por otro lado, la intensidad de las bandas que se observan en esta imagen confirman que el rendimiento de ADNmg fue mayor en época de lluvias que en secas, congruente con Velázquez et al. [160].



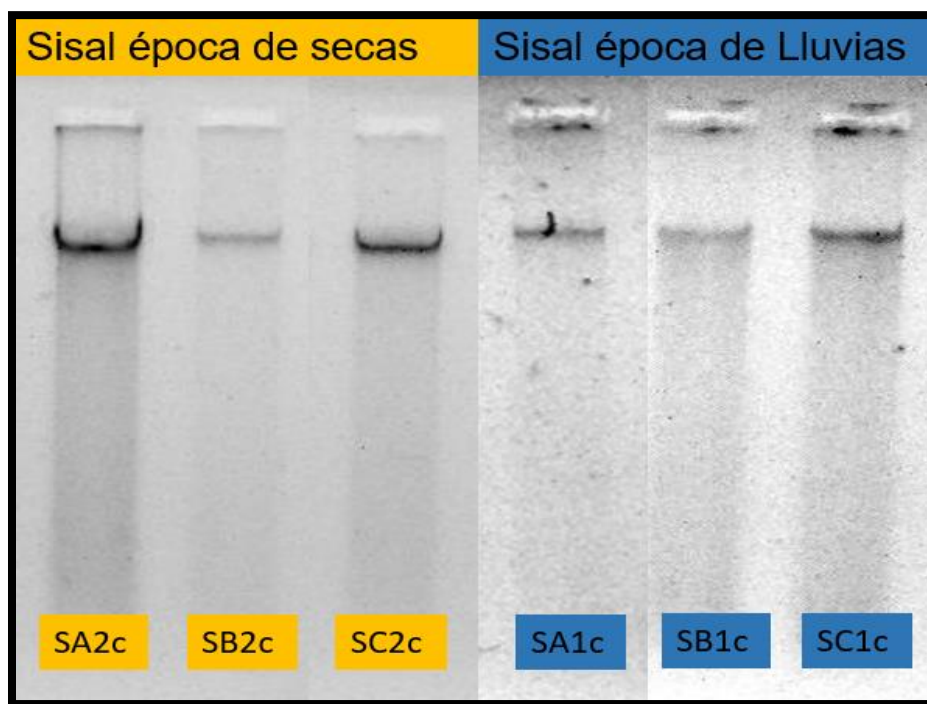
**Figura III.2.3** ADNmg aislado a partir de sedimento de Progreso.

La calidad y rendimiento del ADNmg aislado de las muestras colectadas en Sisal durante la época de secas y de lluvias, se muestra en la Tabla III.2.5., donde se demuestra que los rendimientos de ADNmg fueron mayores a partir de sedimentos colectados en los sitios SC para ambas épocas.

**Tabla III.2.5.** Rendimiento y calidad de ADNmg de sedimentos colectados en Sisal durante época de secas y lluvias.

Época de colecta	muestra	Concentración de ADNmg ng/ $\mu$ L	Índice A260/280	Índice A260/230
Secas	SA2C	239.3	1.81	1.92
	SB2C	247.5	1.83	1.98
	SC2C	251.1	1.87	2.01
Lluvias	SA1C	311.3	1.85	1.98
	SB1C	309.8	1.81	2.09
	SC1C	389.6	1.86	1.99

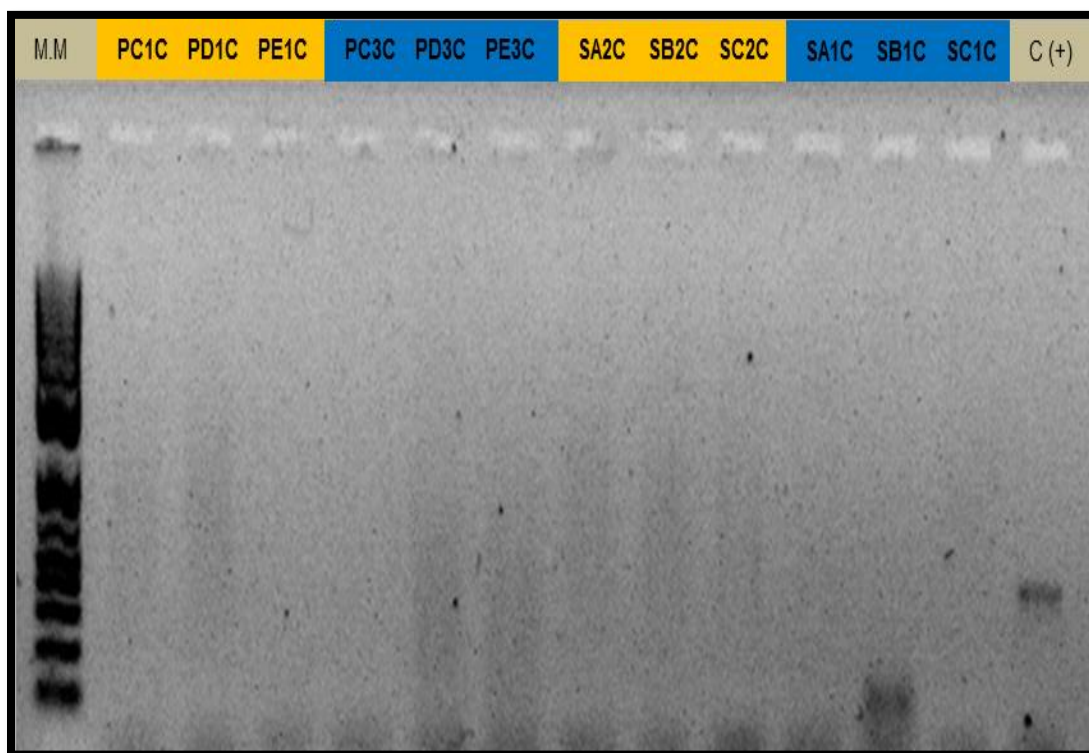
La electroforesis permitió comprobar la integridad del ADNmg como se muestra en la Figura III.2.4, ya que de acuerdo a Velázquez *et al.* [160], cuando el ADN esta integro, se observa una banda estrecha menor a 1 cm y esta se encuentra cercana al pozo en el cual se colocó la muestra de ADNmg.



**Figura III.2.4.** ADNmg aislado partir de sedimentos colectados en Sisal.

### III.2.3 Amplificación del gen 16S del ARNr y Purificación del ADNmg por medio de membrana de diálisis

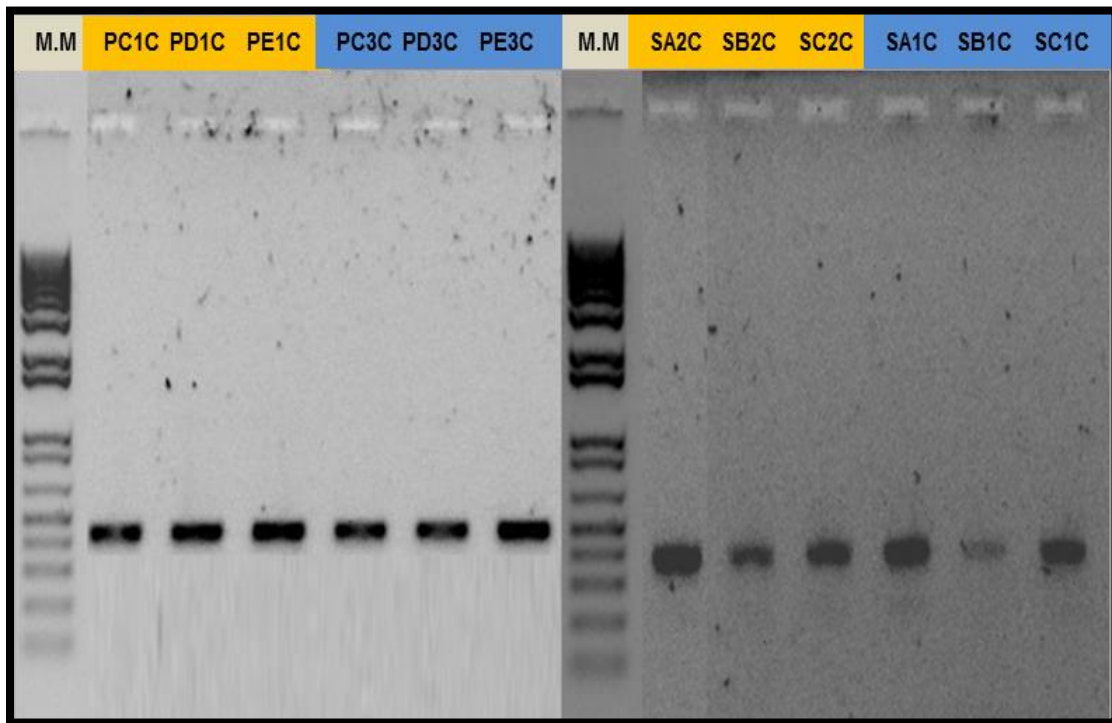
Los ADNmg obtenidos se usaron como templados para amplificar el gen 16S; sin embargo, los resultados logrados no fueron exitosos ya que no hubo amplificaciones. Este resultado indica que aun cuando el ADNmg presente alto rendimiento, buena calidad e integridad, aún están presentes contaminantes que inhiben el proceso de amplificación, debido a que el control positivo si se logró amplificar como se muestra en la Figura III.2.5.



**Figura III.2.5** Amplificación inicial del gen 16S a partir de los ADNmg obtenidos de sedimentos de Progreso y Sisal. Antes de la purificación por membrana de diálisis.



De acuerdo a los resultados obtenidos en la amplificación inicial, se utilizó una membrana de diálisis para purificar el ADNmg, ya que de acuerdo a Contreras [161], Mejía *et al.*, [162] y Zarzosa *et al.*, [163], la electroelución permite recuperar hasta 80% del ADNmg a partir de geles de agarosa de manera eficiente para llevar a cabo estudios moleculares posteriores como es la secuenciación. Este método se basa en la unión del ADN a la membrana por medio de interacciones electrostáticas, entre la carga positiva de la membrana y la carga negativa del ADNmg. Los resultados de amplificación del gen 16S fueron exitosos, como se muestra en la Figura III.2.6.



**Figura III.2.6.** Amplificación del gen 16S posterior a la purificación de los ADNmg mediante membrana de diálisis.

### III.2.4. Análisis de amplicones y diversidad microbiana

A partir del análisis de las secuencias de ADNmg, se caracterizó la diversidad microbiana presente en los sedimentos de puerto Progreso y Sisal. En la muestra PC1C la cual corresponde a Progreso en época de secas, se identificaron un total de 4,881 organismos representados en 83 especies diferentes (enlistadas en Anexo 1).

De las 83 especies identificadas en PC1C, las más representativas en 67%, son *Psychroserpens* sp., *Enterococcus faecalis*, *Halospirulina* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Geobacter* sp., *Clostridium* sp., *Methanosphaera* sp., *Cytophaga* sp., *Desulfurococcus* sp., *Sulfurovum* sp., *Muriicola* sp., *Acidobacterium* sp. y *Dehalococcoides* sp. (Figura III.2.7), de acuerdo con la literatura en este sitio si fue posible la identificación de bacterias con posible potencial para degradar HTP.

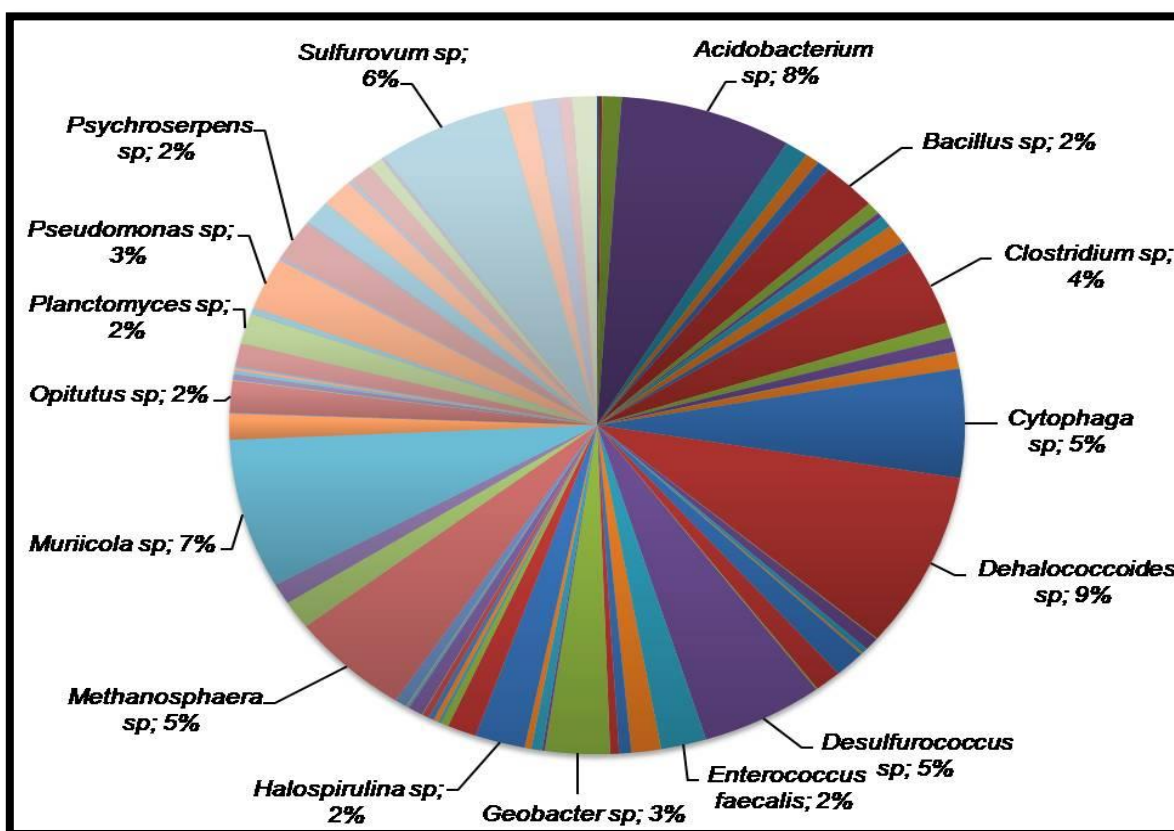


Figura III.2.7. Especies más representativas de PC1C.

En la muestra PD1C se identificaron 6,351 organismos distribuidos en 144 especies diferentes, como se detalla en el Anexo 2. De las 144 especies identificadas en este sitio las más representativas en 70% son: *Actibacter sp.*, *Spirochaeta sp.*, *Dehalococcoides sp.*, *Methanosphaera sp.*, *Syntrophus sp.*, *Halospirulina sp.*, *Thioalkalivibrio sp.*, *Desulfurococcus sp.*, *Flavobacterium sp.*, *Clostridium sp.*, *Cytophaga sp.*, *Aminobacterium sp.* y *Psychrobacter sp.* (Figura III.2.8).

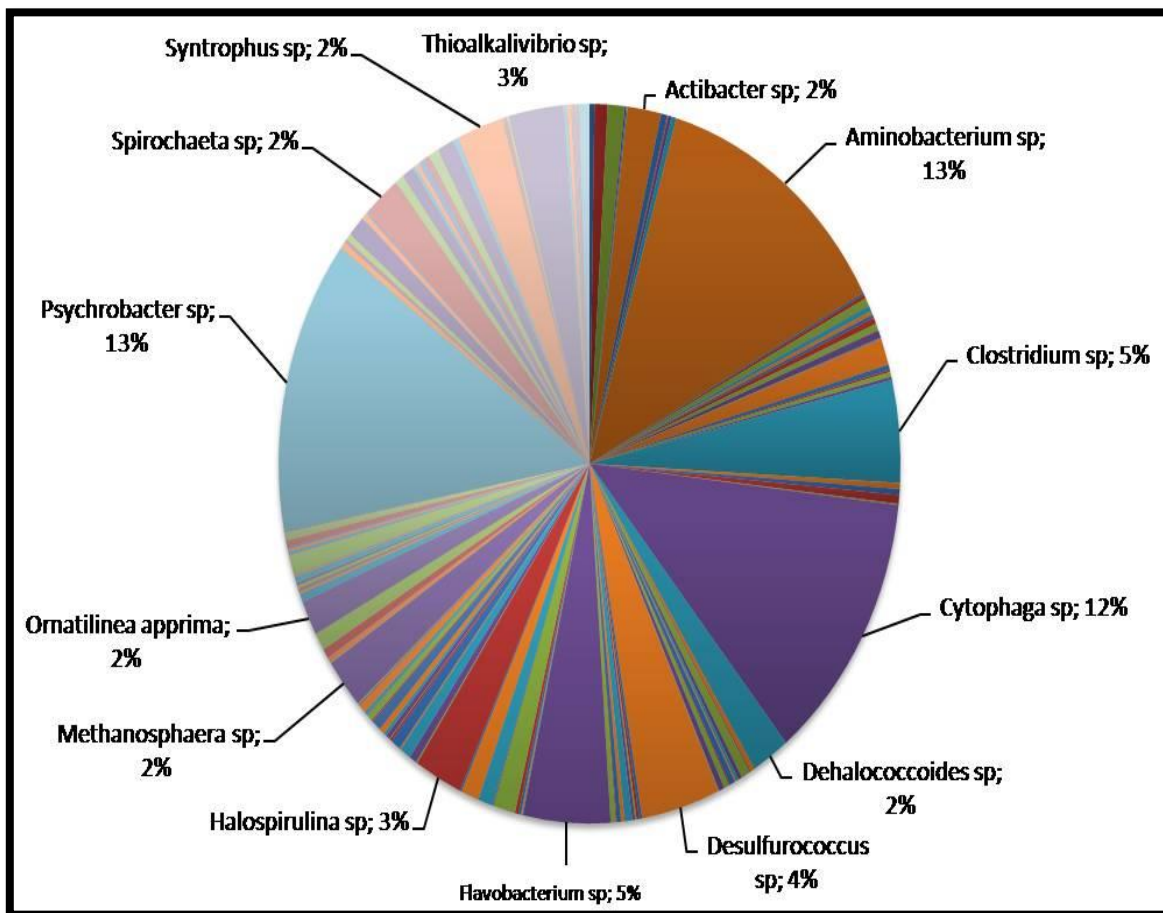


Figura III.2.8. Especies más representativas de PD1C.

Mientras que en la muestra PE1C se identificaron un total de 5,123 organismos distribuidos en 183 especies, esto se detalla en el Anexo 3. De las especies identificadas en este sitio las más representativas en 59%, fueron las siguientes: *Muriicola* sp., *Desulfurococcus* sp., *Aciditerrimonas* sp., *Pseudomonas* sp., *Thiohalophilus* sp., *Desulfosarcina variabilis*, *Oceanicola granulosus*, *Verrucomicrobium* sp., *Lacinutrix* sp., *Ruegeria* sp., *Actibacter* sp., *Streptomyces* sp., *Thioalkalivibrio* sp., *Flavobacterium* sp., *Lamia* sp., *Phaeochromatium* sp., *Clostridium* sp., *Acidobacterium* sp. y *Cytophaga* sp. (Figura III.2.9).

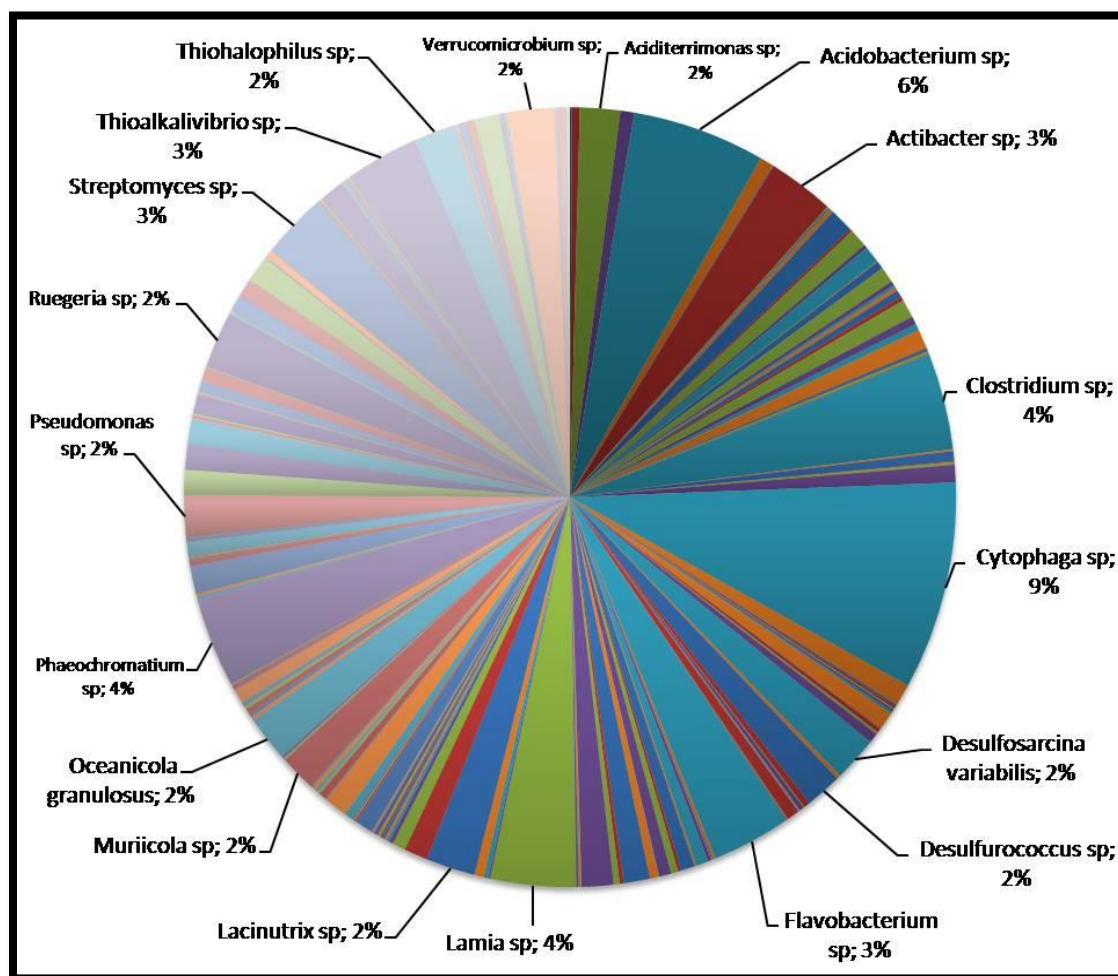
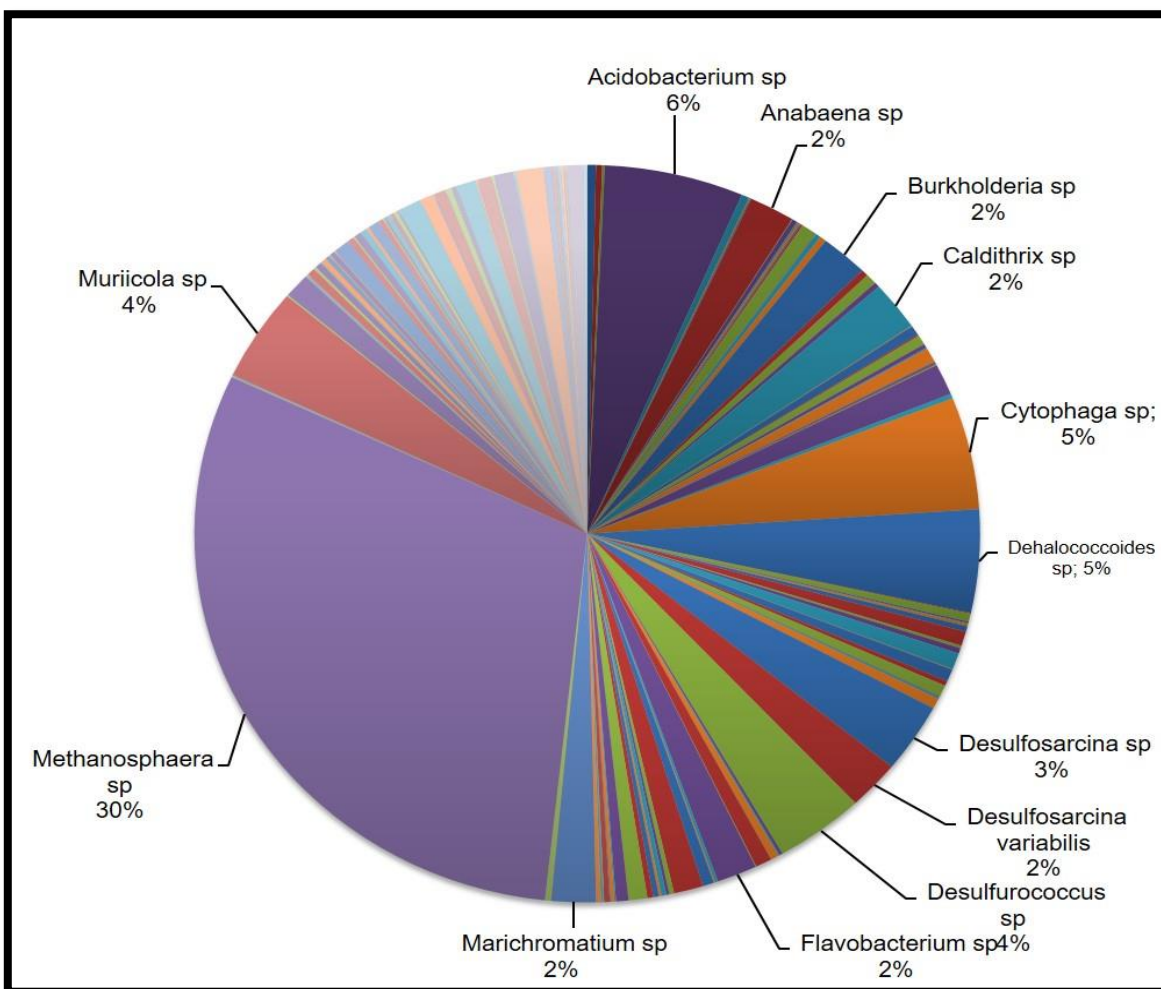


Figura III.2.9 Especies más representativas de PE1C.

Para Progreso durante la época de lluvias, en la muestra PC3C se encontraron 7819 organismos los cuales se encontraron distribuidos en 149 especies, estos datos se pueden ver detalladamente en el Anexo 4. De todas las especies identificadas en esta muestra las más representativas en 69%, fueron las siguientes: *Cyanobacterium* sp., *Flavobacterium* sp., *Marichromatium* sp., *Anabaena* sp., *Burkholderia* sp., *Caldithrix* sp., *Desulfosarcina variabilis*., *Desulfosarcina* sp., *Desulfurococcus* sp., *Muriicola* sp., *Dehalococcoides* sp., *Cytophaga* sp., *Acidobacterium* sp., y *Methanosphaera* sp. (Figura III.2.10).



**Figura III.2.10** Especies más representativas de PC3C.

En la muestra PD3C se encontraron un total de 2974 organismos los cuales estaban distribuidos en 124 especies, como se muestra en el Anexo 5. De las 124 especies identificadas las más representativas fueron las siguientes: *Burkholderia* sp., *Desulfosarcina* sp., *Marinobacter* sp., *Ralstonia* sp., *Spirochaeta* sp., *Desulfurococcus* sp., *Lewinellacoaerens*, *Bdellovibrio* sp., *Muriicola* sp., *Acidobacterium* sp., *Oceanicola granulosa*, *Verrucomicrobium* sp., *Ornatilinea apprima*, *Sphingobacterium* sp., *Methanosphaera* sp., *Lamia* sp., *Streptomyces* sp., *Cyanobacterium* sp., *Thiohalophilus* sp., *Cytophaga* sp. y *Phaeochromatium* sp. Estas especies representan el 66% de la muestra, donde la especie más abundante fue *Phaeochromatium* sp. (Figura III.2.11).

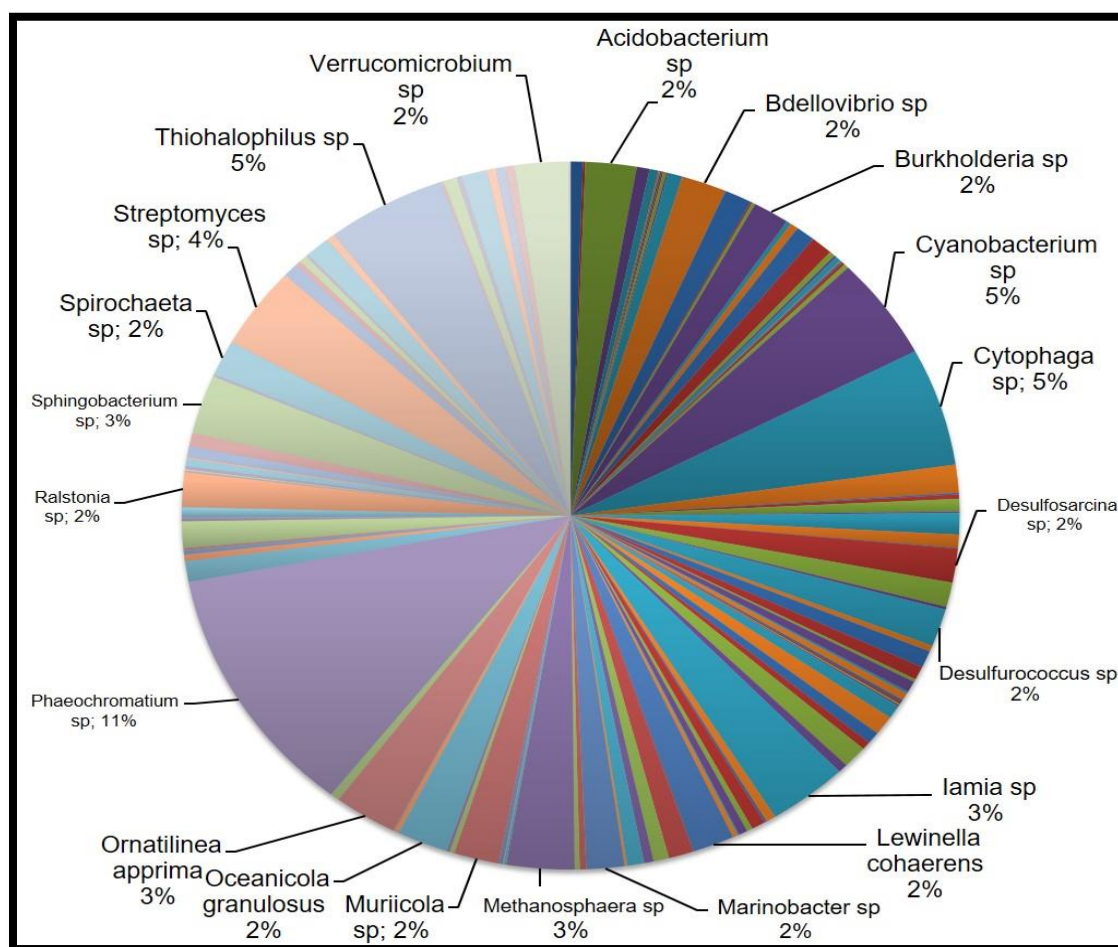
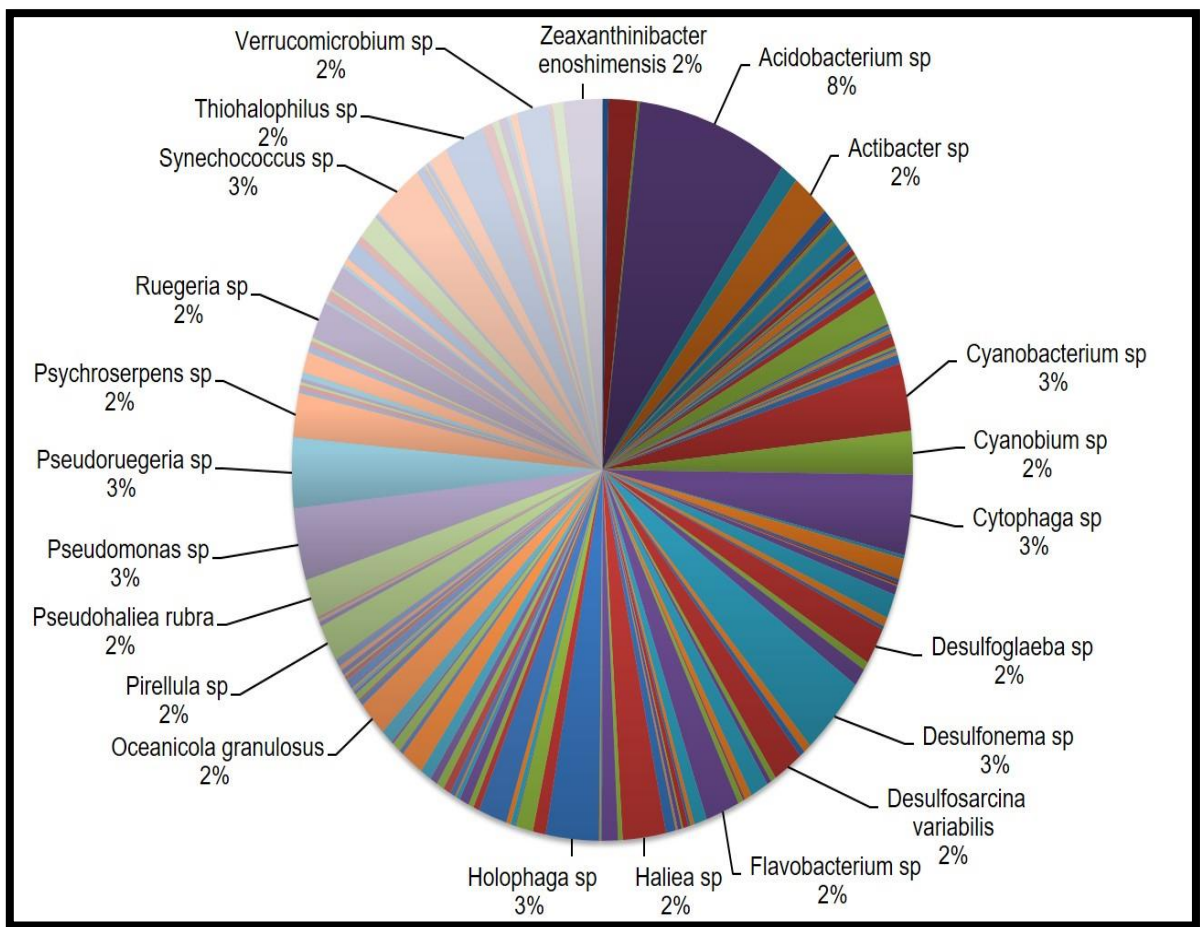


Figura III.2.11. Especies más representativas de PD3C.

Mientras que en la muestra PE3C se encontraron un total de 2543 organismos, los cuales pertenecían a las 166 especies identificadas en este sitio, como se muestra en el Anexo 6. De las 166 especies las más representativa en 55% fueron las siguientes: *Oceanicola granulosa*, *Desulfosarcina variabilis*, *Desulfoglaeba* sp., *Pirellula* sp., *Ruegeria* sp., *Pseudohalaea rubra*, *Verrucomicrobium* sp., *Flavobacterium* sp., *Cyanobium* sp., *Psychroserpens* sp., *Actibacter* sp., *Zeaxanthinibacter enoshimensis*, *Thiohalophilus* sp., *Haliea* sp., *Synechococcus* sp., *Holophaga* sp., *Cyanobacterium* sp., *Pseudoruegeria* sp., *Pseudomonas* sp., *Cytophaga* sp., *Desulfonema* sp. y *Acidobacterium* sp. (Figura III.2.12).



**Figura III.2.12** Especies más representativas de PE3C.

En Progreso durante la época de secas el sitio con mayor diversidad fue PE1C y el sitio que presentó menor diversidad fue PC1C. Así también en Progreso durante la época de lluvias el sitio con mayor diversidad fue PE3C mientras que el de menor diversidad fue PD3C. Los análisis de diversidad indican que Progreso en secas es más diverso que en lluvias, ya que su riqueza absoluta es más alta. En los 6 sitios los análisis de identificación hicieron posible la detección de bacterias que han sido reportadas por su capacidad para degradar hidrocarburos totales del petróleo, desde un 40 hasta un 98%, como es el caso de las bacterias reductoras de sulfato y las pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Flavobacterium*, *Syntrophus*, *Rhodococcus* y *Sphingomonas*, [30, 47, 48, 49, 50, 84, 85, 86, 87, 88, 90]. Estos resultados se muestran en la Tabla III.2.6. y en la Tabla III.2.7. Estos resultados y la cuantificación de HTP, indican que las bacterias encontradas pudieran estar acopladas a la degradación de hidrocarburos. Por otra parte, también se identificaron bacterias que han sido reportadas por su potencial electrogénico como es el caso del género *Geobacter*, *Pseudomonas*, *Clostridium* y *Enterococcus* (Esteve, 2008).

**Tabla III.2.6.** Bacterias identificadas en Progreso durante la época de secas y reportadas como capaces de degradar HTP.

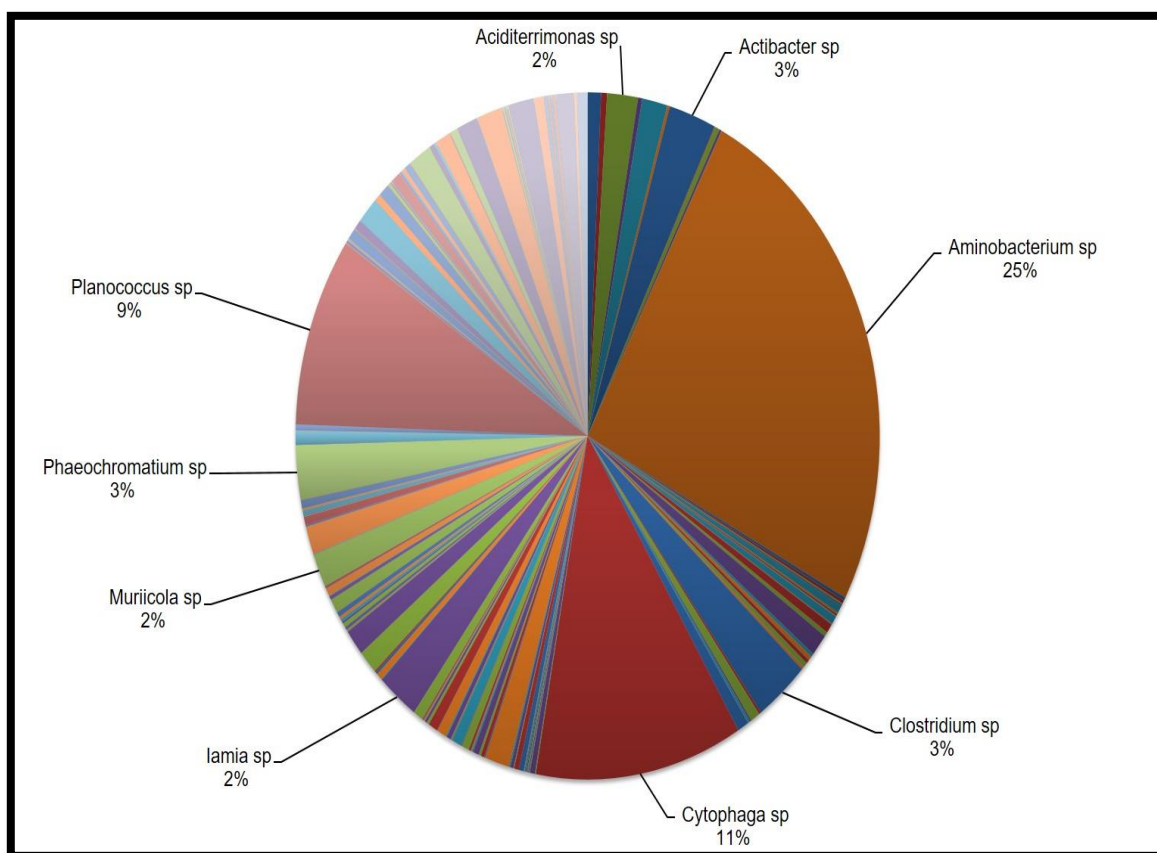
<b>Muestra</b>	<b>Géneros de Bacterias identificadas con potencial para degradar HTP</b>	<b>Capacidad para degradar HTP (de acuerdo a la literatura)</b>	<b>Referencia</b>
PC1C	<i>Desulfurococcus</i>	40 a 98%	[30; 47; 48; 49; 84; 85; 90; 93; 95]
	<i>Pseudomonas</i>		
	<i>Methanosphaera</i>		
PD1C	<i>Methanosphaera</i>	60 a 90%	[30; 47; 48; 49; 50; 84; 85; 93; 95]
	<i>Thioalkalivibrio</i>		
	<i>Desulfurococcus</i>		
	<i>Flavobacterium</i>		
	<i>Syntrophus</i>		
PE1C	<i>Desulfurococcus</i>	40 a 98%	[30; 47; 48; 49; 84; 85; 90; 93; 95]
	<i>Pseudomonas</i>		
	<i>Flavobacterium</i>		
	<i>Thioalophilus</i>		
	<i>Desulfosarcina</i>		



**Tabla III.2.7.** Bacterias identificadas en Progreso durante la época de lluvias y reportadas como capaces de degradar HTP.

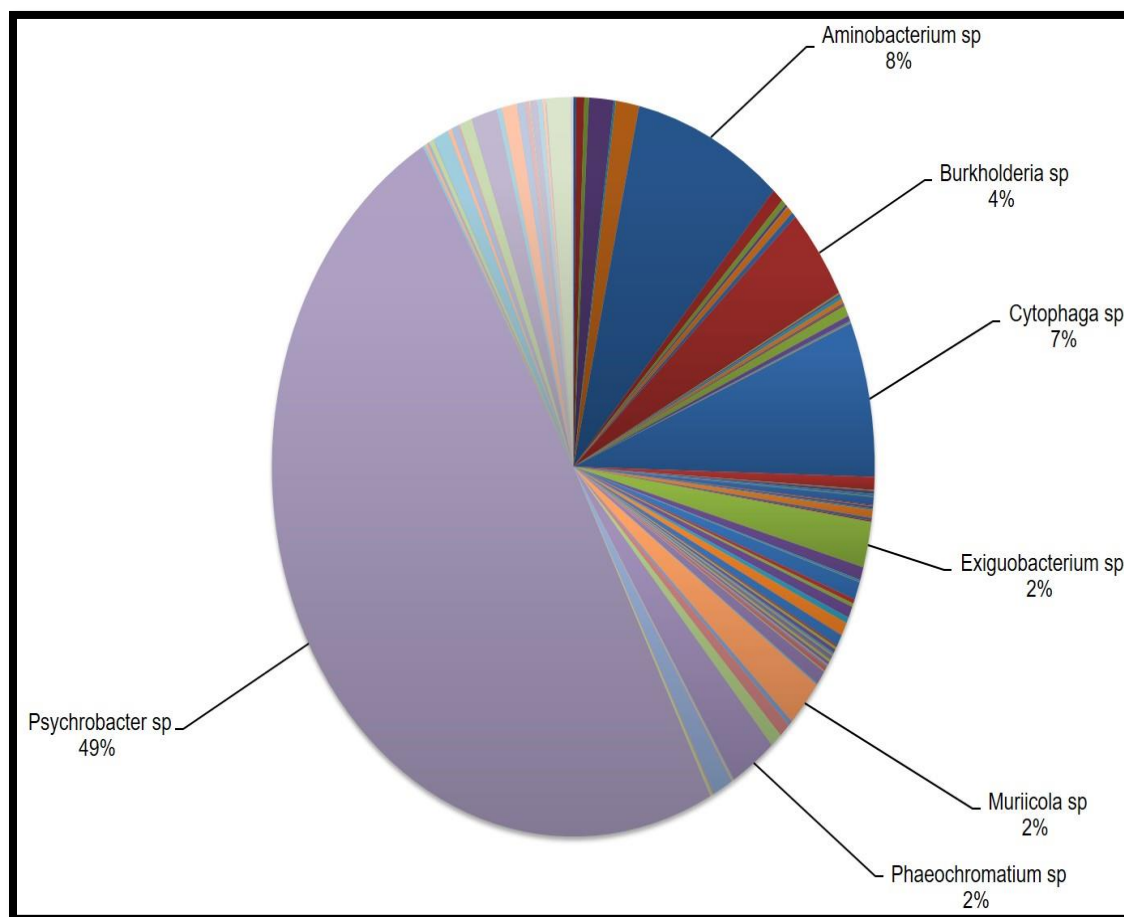
<b>Muestra</b>	<b>Géneros de Bacterias identificadas con potencial para degradar HTP</b>	<b>Capacidad para degradar HTP (de acuerdo a la literatura)</b>	<b>Referencia</b>
PC3C	<i>Cyanobacterium</i>	40 a 98%	[30; 47; 48; 49; 84; 85; 90; 93; 95]
	<i>Flavobacterium</i>		
	<i>Desulfosarcina</i>		
	<i>Desulfurococcus</i>		
	<i>Marinobacter</i>		
	<i>Thioalophilus</i>		
	<i>Pseudomonas</i>		
PD3C	<i>Methanosphaera</i>	40 a 98%	[30; 47; 48; 49; 50; 84; 85; 93; 95]
	<i>Pseudomonas</i>		
	<i>Methanosphaera</i>		
	<i>Marinobacter</i>		
	<i>Cyanobacterium</i>		
	<i>Thioalkalivibrio</i>		
	<i>Desulfurococcus</i>		
PE3C	<i>Flavobacterium</i>	40 a 98%	[30; 47; 48; 49; 84; 85; 90; 93; 95]
	<i>Thioalophilus</i>		
	<i>Desulfosarcina</i>		
	<i>Desulfurococcus</i>		
	<i>Marinobacter</i>		
	<i>Cyanobacterium</i>		

Para las muestras colectadas en Sisal durante la época de secas los resultados fueron los siguientes: en SA2C se encontraron un total de 7,583 organismos, los cuales pertenecían a las 187 especies identificadas en este sitio, como se detalla en el Anexo 7. De las 187 especies identificadas las más representativas en 25% fueron las siguientes: *Muriicola* sp., *Aciditerrimonas* sp., *Lamia* sp., *Phaeochromatium* sp., *Actibacter* sp., *Clostridium* sp., *Planococcus* sp., *Cytophaga* sp., *Aminobacterium* sp. Estas especies representan el 60% de la muestra, siendo la especie *Aminobacterium* sp. (Figura III.2.13).



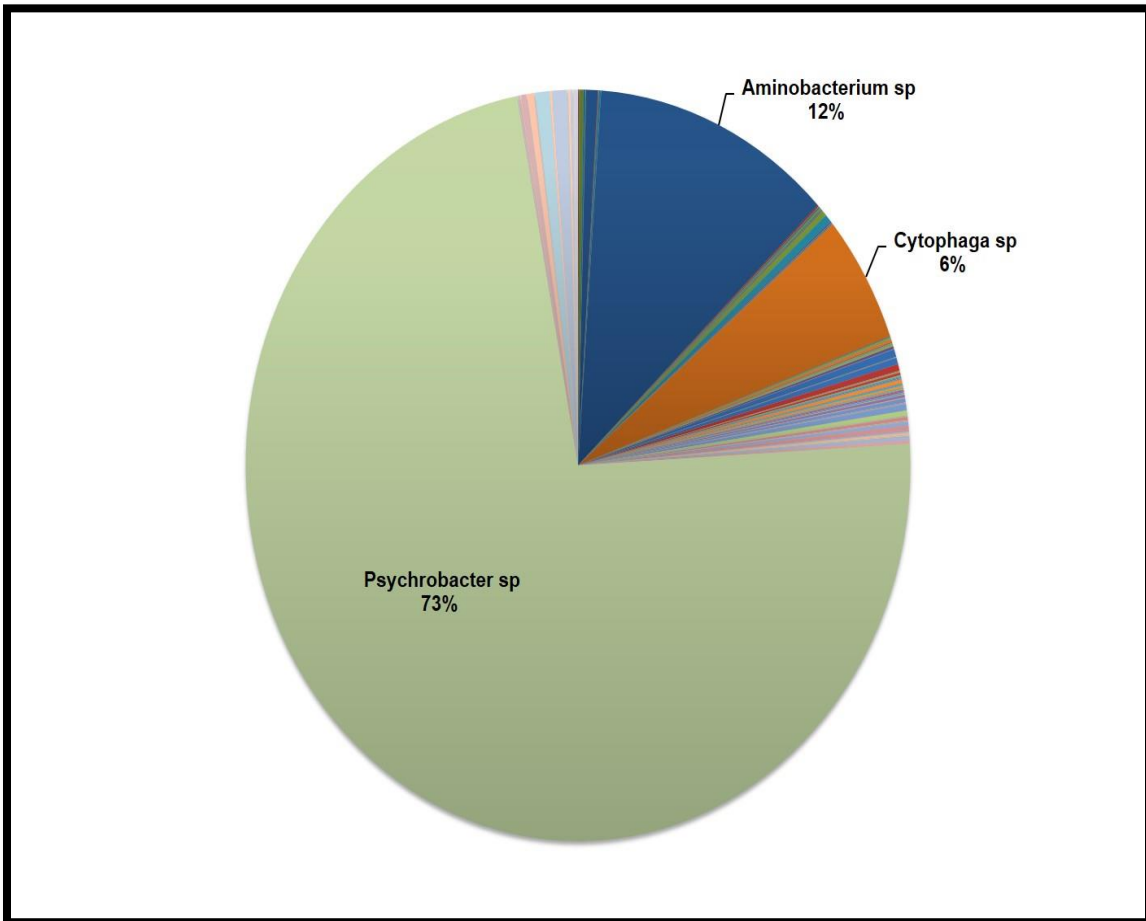
**Figura III.2.13.** Especies más representativas de SA2C.

En SB2C se encontraron 4,611 organismos en total, los cuales pertenecían a las 100 especies identificadas en este sitio, como se detalla en el Anexo 8. De las 100 especies identificadas las más representativas en 74% fueron las siguientes: *Exiguobacterium* sp., *Muriicola* sp., *Phaeochromatium* sp., *Burkholderia* sp., *Cytophaga* sp., *Aminobacterium* sp., *Psychrobacter* sp. La especie más representativa fue *Psychrobacter* sp. en 49% (Figura III.2.14).



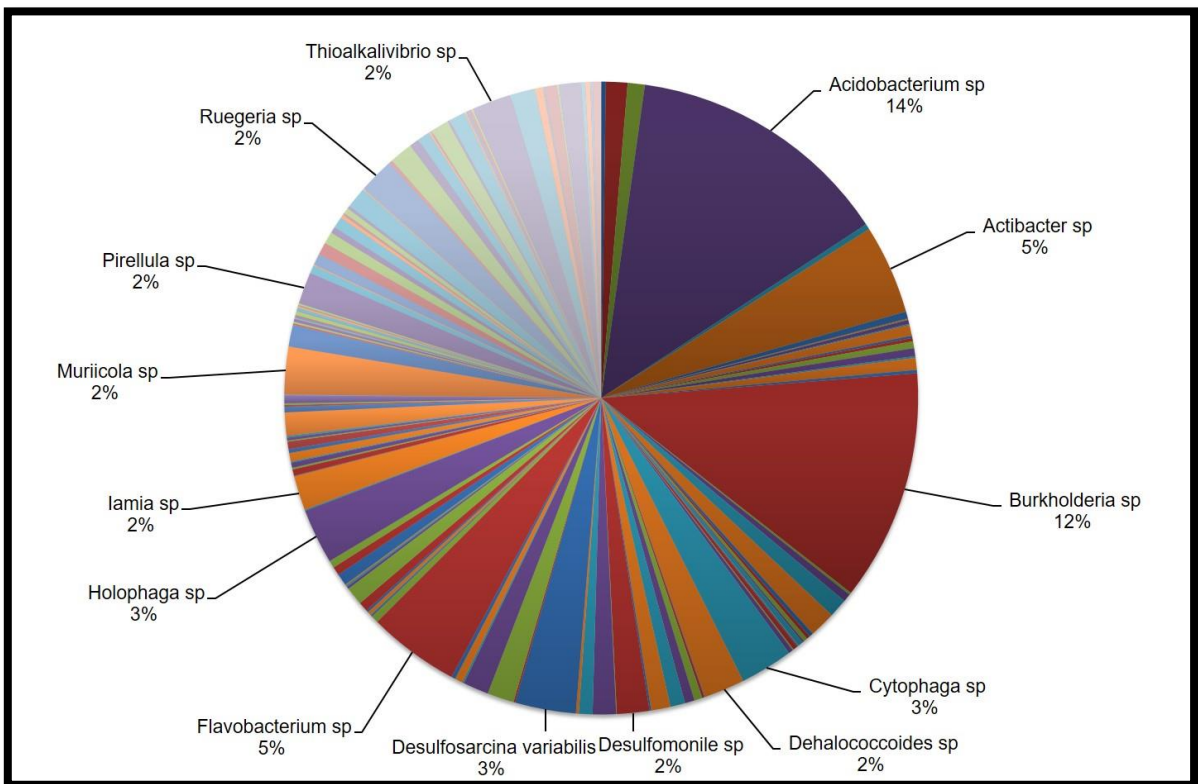
**Figura III.2.14** Especies más representativas de SB2C.

En SC2C se encontraron 32,271 organismos en total, los cuales pertenecen a las 172 especies identificadas, como se detalla en el Anexo 9. De las 172 especies identificadas las más representativas en 91% fueron las siguientes: *Cytophaga* sp., *Aminobacterium* sp., *Psychrobacter* sp (Figura III.2.15).



**Figura III.2.15.** Especies más representativas de SC2C.

Para las muestras colectadas en Sisal durante la época de lluvias, los resultados fueron los siguientes. En SA1C se encontraron 3448 organismos en total, los cuales pertenecían a las 146 especies identificadas en este sitio, como se detalla en el Anexo 10. De las 146 especies identificadas las más representativas en 59% fueron las siguientes: *Pirellula* sp., *Desulfomonile* sp., *Lamia* sp., *Ruegeria* sp., *Thioalkalivibrio* sp., *Dehalococcoides* sp., *Muriicola* sp., *Cytophaga* sp., *Holophaga* sp., *Desulfosarcina variabilis*, *Actibacter* sp., *Flavobacterium* sp., *Burkholderia* sp., *Acidobacterium* sp. La especie más representativa en 14% fue *Acidobacterium* sp. (Figura III.2.16).



**Figura III.2.16** Especies más representativas de SA1C.

En SB1C se encontraron 33202 organismos en total, los cuales se distribuyen en las 265 especies identificadas en este sitio, como se detalla en el Anexo 11. De las 265 especies identificadas las más representativas en 68% fueron las siguientes: *Caldithrix abyssi*, *Caldithrix palaeochoryensis*, *Caldithrix* sp., *Thermobaculum* sp., *Opiritus* sp., *Coraliomargarita* sp., *Pedosphaera párvula*, *Pedosphaera* sp., *Haloferula helveola*, *Luteolibacter cuticulihirudinis*, *Luteolibacter pohnpeiensis*, *Roseibacillus persicicus*, *Roseibacillus* sp. y *Verrucomicrobium* sp. La especie más representativa en 12% fue *Verrucomicrobium* sp. (Figura III.2.17).

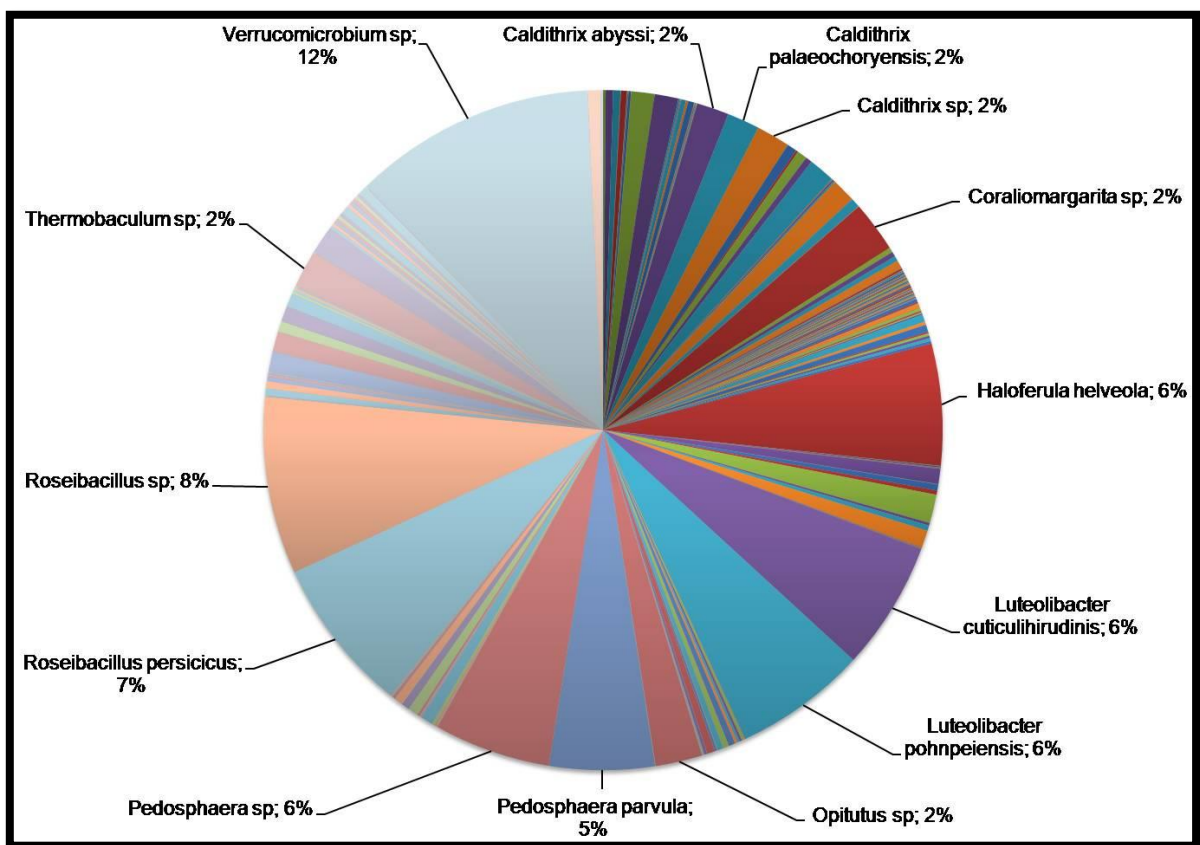


Figura III.2.17 Especies más representativas de SB1C.

Mientras que en SC1C se encontraron 2950 organismos en total, los cuales se distribuyen en 90 especies, como se muestra en el Anexo 12. De las 90 especies identificadas las más representativas en 72% fueron las siguientes: *Spirochaeta* sp., *Sulfurovum* sp., *Clostridium* sp., *Flavobacterium* sp., *Clostridium butyricum*, *Methanosphaera* sp., *Desulfurococcus* sp., *Psychrobacter* sp., *Syntrophus* sp., *Cytophaga* sp., *Aminobacterium* sp. La más representativa en 28% fue *Aminobacterium* sp. (Figura III.2.18).

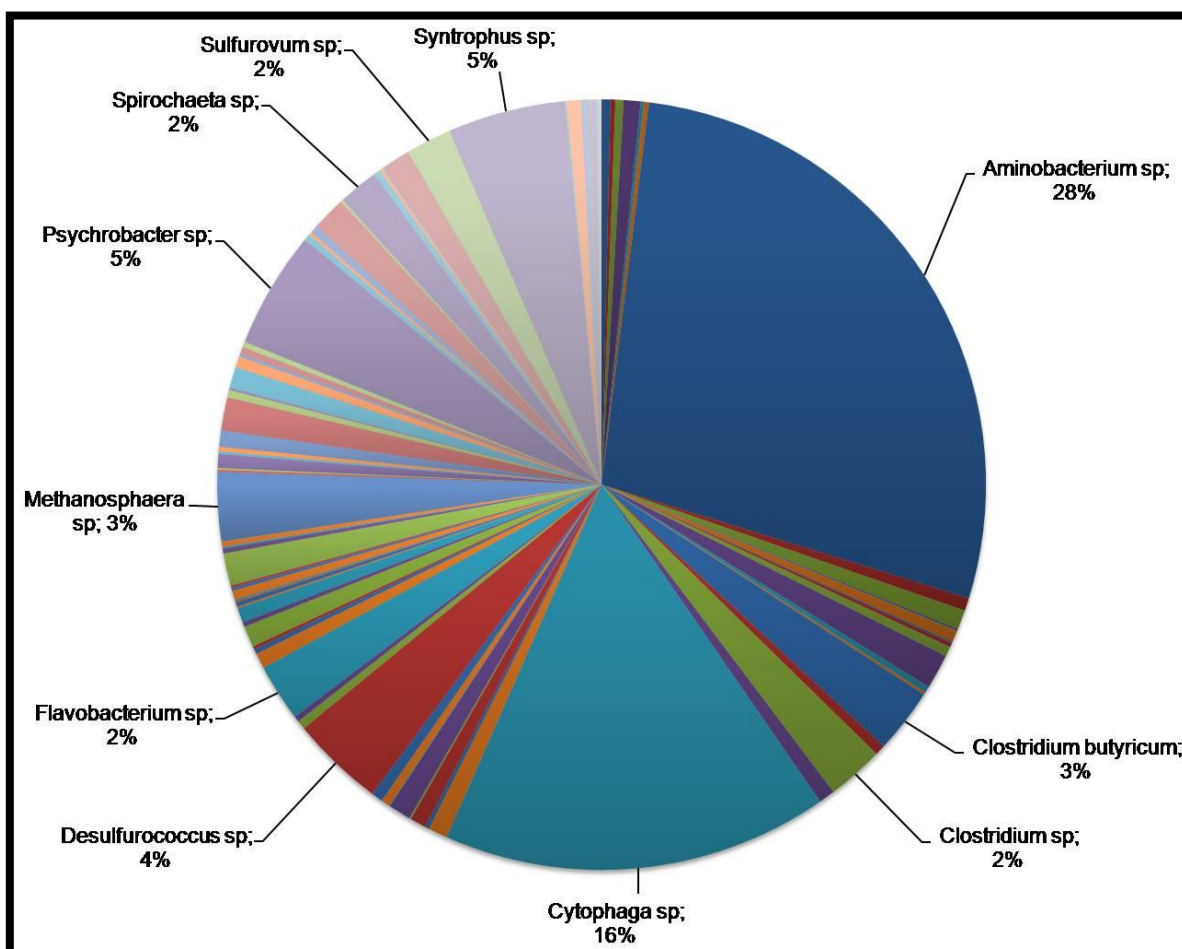


Figura III.2.18 Especies más representativas de SC1C.

Durante la época de secas, en Sisal el sitio con mayor diversidad fue SA2C y el de menor fue SB2C. Durante la época de lluvias el sitio de mayor diversidad fue SB1C y el de menor SC1C. Los análisis de diversidad indican que la época de lluvias es más diversa que la de secas. Los análisis de identificación en los 6 sitios analizados detectaron la presencia de bacterias que han sido reportadas por su capacidad para degradar hidrocarburos totales del petróleo. Entre las bacterias identificadas destacan las reductoras de sulfato y las pertenecientes a los siguientes géneros: *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Flavobacterium*, *Marinobacter*, *Cyanobacterium*, *Corynebacterium*, *Thiohalophilus* y *Sphingomonas*, [30, 47, 48, 49, 50, 84, 85, 86, 87, 88] (Tabla III.2.7 y Tabla III.2.8).

**Tabla III.2.8.** Bacterias identificadas en Sisal durante la época de secas y reportadas como capaces de degradar HTP.

<b>Muestra</b>	<b>Géneros de Bacterias identificadas con potencial para degradar HTP</b>	<b>Capacidad para degradar HTP (de acuerdo a la literatura)</b>	<b>Referencia</b>
SA2C	<i>Cyanobacterium</i>	40 a 98%	[30; 47; 48; 49; 50; 84; 85; 90; 93; 95]
	<i>Flavobacterium</i>		
	<i>Vibrio</i>		
	<i>Desulfobacter</i>		
	<i>Desulfomicrobium</i>		
	<i>Desulfurococcus</i>		
	<i>Pseudomonas</i>		
	<i>Methanosphaera</i>		
SB2C	<i>Thiohalophilus</i>	40 a 98%	[30; 47; 48; 49; 50; 84; 85; 90; 93; 95]
	<i>Pseudomonas</i>		
	<i>Methanosphaera</i>		
	<i>Desulfomicrobium</i>		
	<i>Desulfurococcus</i>		
SC2C	<i>Flavobacterium</i>	40 a 98%	[30; 47; 48; 49; 50; 84; 85; 90; 93; 95]
	<i>Thioalophilus</i>		
	<i>Pseudomonas</i>		
	<i>Desulfosarcina</i>		
	<i>Desulfurococcus</i>		
	<i>Desulfomicrobium</i>		
	<i>Desulfobacterium</i>		
	<i>Desulfovibrio</i>		
<i>Geoalkalibacter</i>			
<i>Cyanobacterium</i>			
	<i>Flavobacterium</i>		



**Tabla III.2.9.** Bacterias identificadas en Sisal durante la época de lluvias y reportadas como capaces de degradar HTP.

<b>Muestra</b>	<b>Géneros de Bacterias identificadas con potencial para degradar HTP</b>	<b>Capacidad para degradar HTP (de acuerdo a la literatura)</b>	<b>Referencia</b>
SA1C	<i>Cyanobacterium</i>	40 a 98%	[30; 47; 48; 49; 50; 84; 85; 90; 93; 95]
	<i>Flavobacterium</i>		
	<i>Desulfosarcina</i>		
	<i>Desulfurococcus</i>		
	<i>Marinobacter</i>		
	<i>Pseudomonas</i>		
SB1C	<i>Vibrio</i>	40 a 98%	[30; 47; 48; 49; 50; 84; 85; 90; 93; 95]
	<i>Marinobacter</i>		
	<i>Methanosphaera</i>		
	<i>Pseudomonas</i>		
	<i>Desulfurococcus</i>		
	<i>Desulfobacterium</i>		
	<i>Desulfobolbus</i>		
	<i>Desulfomicrobium</i>		
	<i>Desulfobacter</i>		
	<i>Sphingomonas</i>		
<i>Flavobacterium</i>			
SC1C	<i>Desulfurococcus</i>	40 a 98%	[30; 47; 48; 49; 50; 84; 85; 90; 93; 95]
	<i>Desulfobacterium</i>		
	<i>Desulfobacter</i>		
	<i>Desulfosarcina</i>		
	<i>Methanosphaera</i>		
	<i>Cyanobacterium</i>		
	<i>Pseudomonas</i>		
<i>Flavobacterium</i>			

Por otra parte también se pudieron identificar bacterias que han sido reportadas por su potencial electrogénico como es el caso del género *Geobacter*, *Pseudomonas*, *Clostridium* y *Enterococcus* (Esteve, 2008).

De acuerdo a los resultados obtenidos, a partir de la identificación de especies, en todos los sitios tanto de Progreso como de Sisal, fue posible hallar bacterias con potencial para degradar HTP y con potencial para utilizarse en celdas de sedimento de combustible microbiano, además de acuerdo a Sherafatmand *et al.* [103] como los sitios utilizados en este trabajo se encuentran contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo, es posible que a partir de la degradación de HTP se pueda generar energía eléctrica, ya que en todos los sitios se encuentran conviviendo tanto bacterias degradadoras de HTP como electrogénicas.

### III.3. Preparación de muestra de sedimento para extracción de hidrocarburos del petróleo

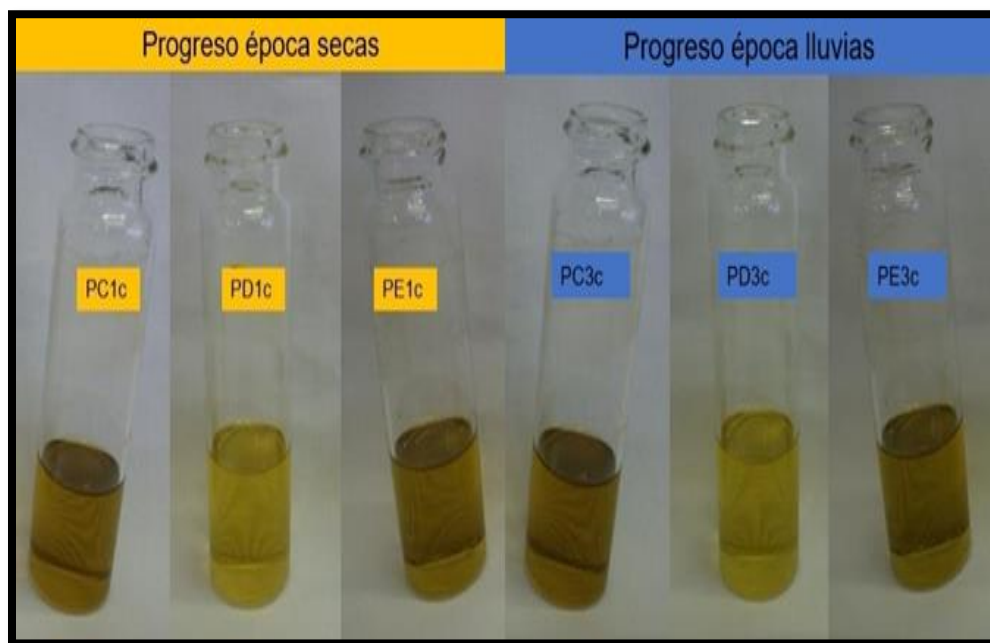
La preparación de las muestras consistió en homogeneizar las muestras de sedimento antes de la extracción de HTP, de acuerdo a [145] permitió determinar la humedad en los sedimentos para la cuantificación de HTP (Tabla III.3.).

**Tabla III.3.** Porcentaje de humedad de las muestras de Progreso y Sisal.

Lugar de muestreo	Época de colecta	Muestra	Porcentaje de humedad %
Progreso	Secas	PC1C	26.6951
		PD1C	59.6854
		PE1C	58.1962
	Lluvias	PC3C	27.8196
		PD3C	57.5447
		PE3C	21.6302
Sisal	Secas	SA2C	46.2658
		SB2C	57.7079
		SC2C	31.9085
	Lluvias	SA1C	30.8570
		SB1C	56.3806
		SC1C	24.1243

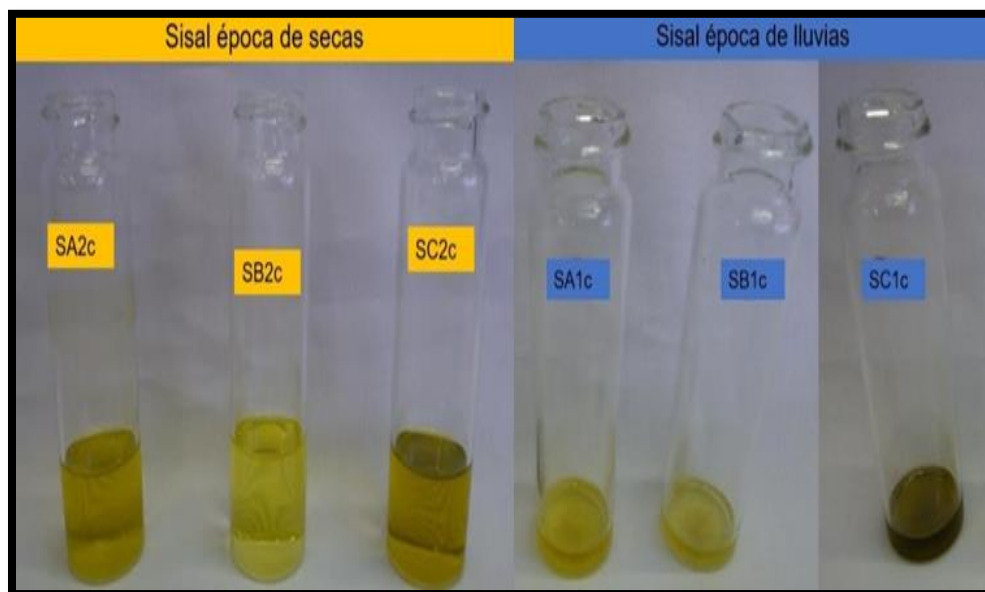
### III.3.1. Extracción de hidrocarburos mediante agitación-centrifugación

La extracción de hidrocarburos mediante agitación- centrifugación a partir del sedimento de Progreso se muestra en la Figura III.3.



**Figura III.3** Extracción de HTP a partir de sedimentos colectados en Progreso.

La coloración de los solventes con extractos orgánicos obtenidos a partir de las muestras de Progreso (Figura III.3.1), y Sisal (Figura III.3.2) durante la época de lluvias indica la presencia de HTP. A pesar de que los extractos orgánicos obtenidos muestran diferente coloración dependiente de los sedimentos. Sin embargo, una coloración oscura no se asocia directamente con una mayor concentración de HTP [145].



**Figura III.3.1** Extracción de HTP a partir de sedimentos colectados en Sisal.

Los HTP extraídos a partir de las muestras de sedimento colectado en Sisal (Figura III.3.1), mostraron coloración diferencial en función al sitio de colecta. Los extractos a partir de sedimentos colectados en época de lluvias presentan menor volumen, debido a que se habían evaporado para concentrar a sequedad.

### III.3.2. Cuantificación gravimétrica de HTP (hidrocarburos totales del petróleo)

Los resultados de la cuantificación de HTP, a partir de los sedimentos de Progreso durante ambas épocas se muestran en la Tabla III.3.1.

**Tabla III.3.1.** Concentración de HTP en sedimentos de Progreso.

Época de colecta	Muestra	Concentración de HTP ( $\mu\text{g/g}$ de sedimento seco)
Secas	PC1c	88.1
	PD1c	104.2
	PE1c	85.2
Lluvias	PC3c	146.6
	PD3c	174.3
	PE3c	151.7

Los resultados indican que la contaminación por HTP en Progreso es más alta en lluvias que en secas, este resultado coincide con los reportados en el 2005 por Valenzuela *et al.*, [19]. Es importante señalar que el sedimento del punto PD mostró la mayor concentración de hidrocarburos tanto en secas ( $104.2 \mu\text{g/g}$  de S.S.) como en lluvias ( $174.3 \mu\text{g/g}$  de S.S.), mientras que los sedimentos de los puntos PC y PE presentaron una concentración similar. El incremento en la concentración de HTP durante la época de lluvia indica el arrastre de contaminantes derivados del petróleo como diésel, gasolina y aceites, de tierra hacia el mar [19].

Los resultados obtenidos son preocupantes, debido a que las concentraciones de HTP encontradas en los sedimentos en todos los sitios de Progreso y Sisal rebasan el límite máximo permisible establecido por la UNESCO ( $70 \mu\text{g/g}$ ), con excepción del punto SA en el cual las concentraciones de HTP se encuentran por debajo de este límite (Tabla III.3.2), esto a pesar de que Progreso es una zona costera abierta, influenciada por corrientes, olas y mareas.

Las concentraciones de HTP en los sedimentos de Sisal son similares a los reportados por Iturria [20]. Al igual que en los sedimentos del puerto de Progreso, la concentración de HTP en los sedimentos de Sisal, es mayor en lluvias, lo cual sugiere que la contaminación es de origen terrestre, es decir de contaminantes derivados del petróleo como diésel, gasolina o aceites que son acarreados de tierra hacia el mar, o por filtraciones de estos contaminantes [19].

**Tabla III.3.2.** Concentración de HTP en sedimentos de Sisal.

<b>Época de colecta</b>	<b>Muestra</b>	<b>Concentración de HTP (µg/g de sedimento seco)</b>
Secas	SA2C	22.6
	SB2C	104.0
	SC2C	73.4
Lluvias	SA1C	48.9
	SB1C	109.1
	SC1C	81.9

Por otra parte, las concentraciones de HTP en los sedimentos bajo estudio, sugieren la presencia grupos bacterianos con capacidad para degradar hidrocarburos. Así mismo, las concentraciones de HTP pudieron haber influido en la dificultad para la amplificación del ADNmg obtenido.

### **III.3.3. Caracterización de HTP (hidrocarburos totales del petróleo) por espectroscopía de infrarrojo**

Los análisis de espectroscopía de infrarrojo (IR) se realizaron en los sedimentos de PD1C y PD3C, debido a que estos sitios presentaron mayor concentración de HTP. Los picos característicos de C-H en la región de hidrocarburos alifáticos alcanos ( $2855-2956\text{ cm}^{-1}$ ), fueron detectados en el espectro obtenido, revelando la presencia de hidrocarburos alcanos, por el pico característico a  $2856.09\text{ cm}^{-1}$  en PD1C, y  $2853.46\text{ cm}^{-1}$  en PD3C (Figura III.3.2).

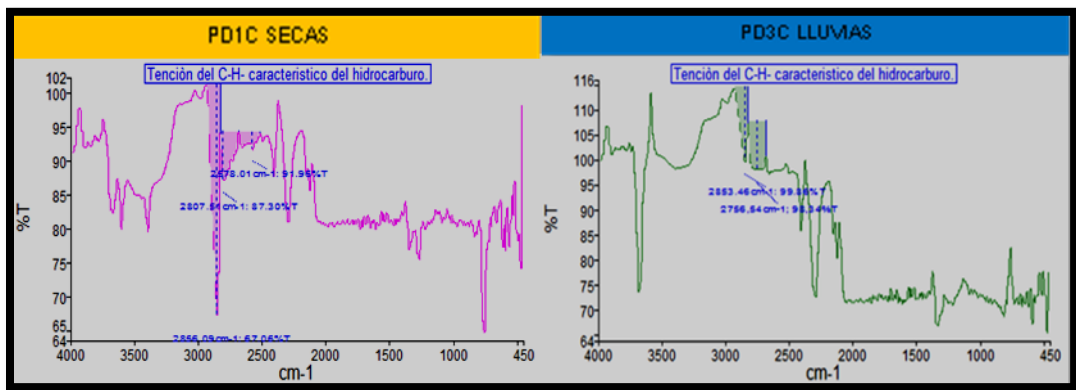


Figura III.3.2 Espectros de infrarrojo del sedimento PD1C y PD3C.

Resultados similares fueron obtenidos en SB2C y SB1C de Sisal, donde las concentraciones de HTP fueron más altas, ya que el espectro infrarrojo detectó el pico característico de los hidrocarburos alifáticos a  $2855.65 \text{ cm}^{-1}$  y  $2855.30 \text{ cm}^{-1}$ , respectivamente como se muestra en la Figura III.3.3, indicando la presencia de alcanos. Estos resultados coinciden con Iturria [20] quien también reportó este tipo de hidrocarburos en Sisal.

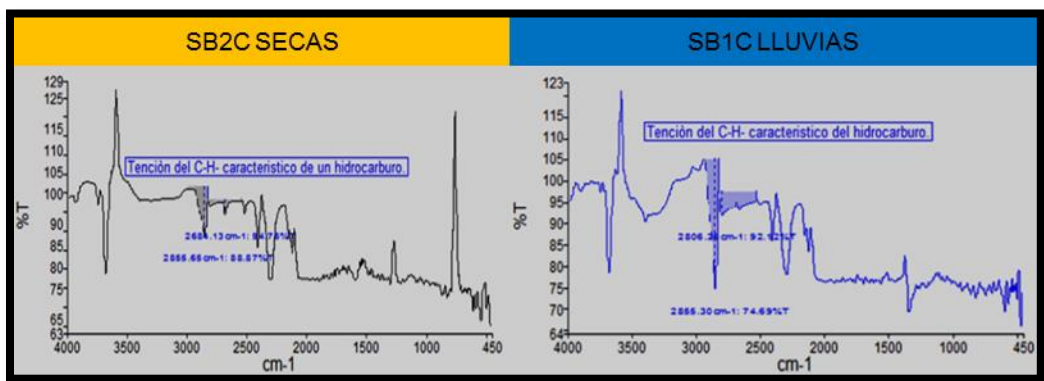
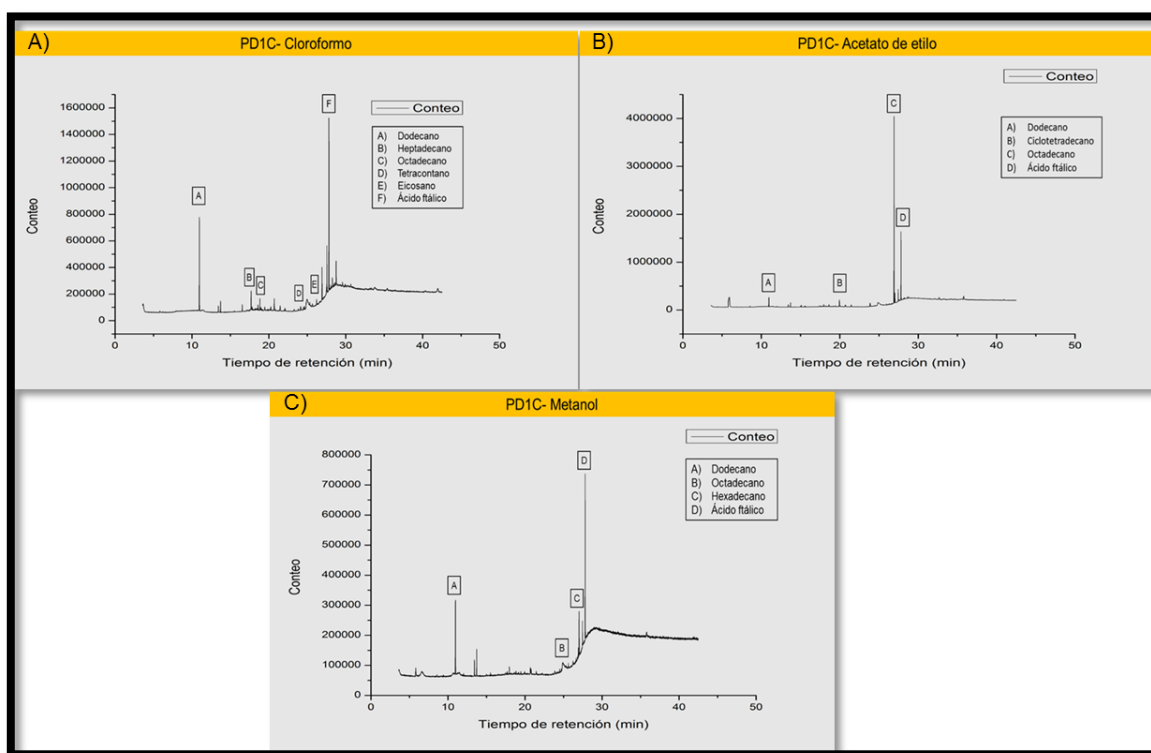


Figura III.3.3. Espectros de infrarrojo del sedimento de SB2C y SB1C.



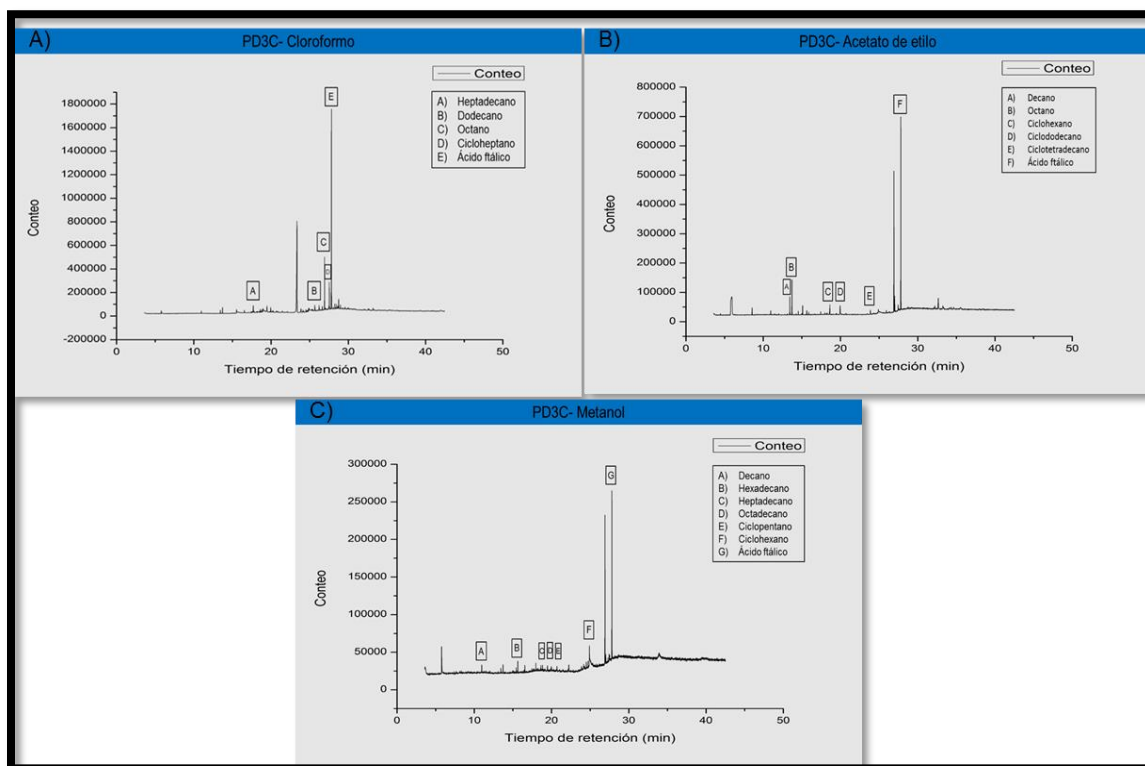
### III.3.4. Caracterización de HTP (hidrocarburos totales del petróleo) por cromatografía de gases - espectrometría de masas (CG-MS)

La cromatografía de gases-masas, confirmó la presencia de hidrocarburos alifáticos en PD1C y PD3C. En el sedimento PD1C purificado con cloroformo se identificó la presencia de alcanos como se muestra en la Figura III.3.4 (A), mientras que a partir de acetato de etilo se identificaron ciclo alcanos Figura III.3.4 (B) y mediante metanol se identificaron alcanos Figura III.3.4 (C). Los hidrocarburos con mayor presencia en PD1C fueron dodecano y octadecano, hidrocarburos presentes en el diésel y disolvente [148; 149].



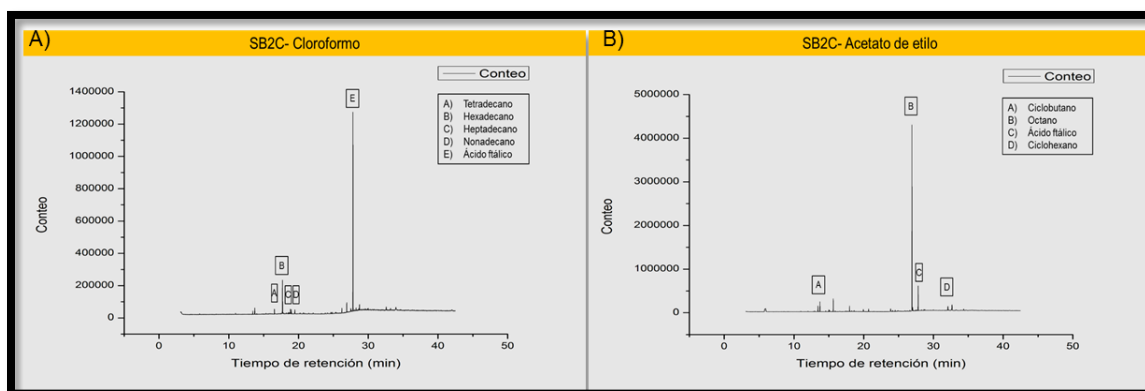
**Figura III.3.4** Cromatogramas (CG-MS) obtenidos a partir del sedimento PD1C, A) HTP identificados a partir de cloroformo; B) HTP identificados a partir acetato de etilo; C) HTP identificados a partir de metanol.

En la muestra PD3C de la época de lluvias, se identificaron más hidrocarburos que en la muestra PD1C de secas. A partir de la purificación con cloroformo se identificaron 5 compuestos correspondientes a alcanos y ciclo alcanos, como se muestra en la Figura III.3.5(A), mientras a partir de acetato de etilo y metanol se identificaron 6 compuestos de alcanos y cicloalcanos como se muestra en la Figura III.3.5 (B, C). Los hidrocarburos con mayor presencia en PD3C fueron octano, el cual se utiliza en constitución de la gasolina; el decano que forma parte de la gasolina y el ciclohexano que se emplea en la producción de nailon [148; 149].



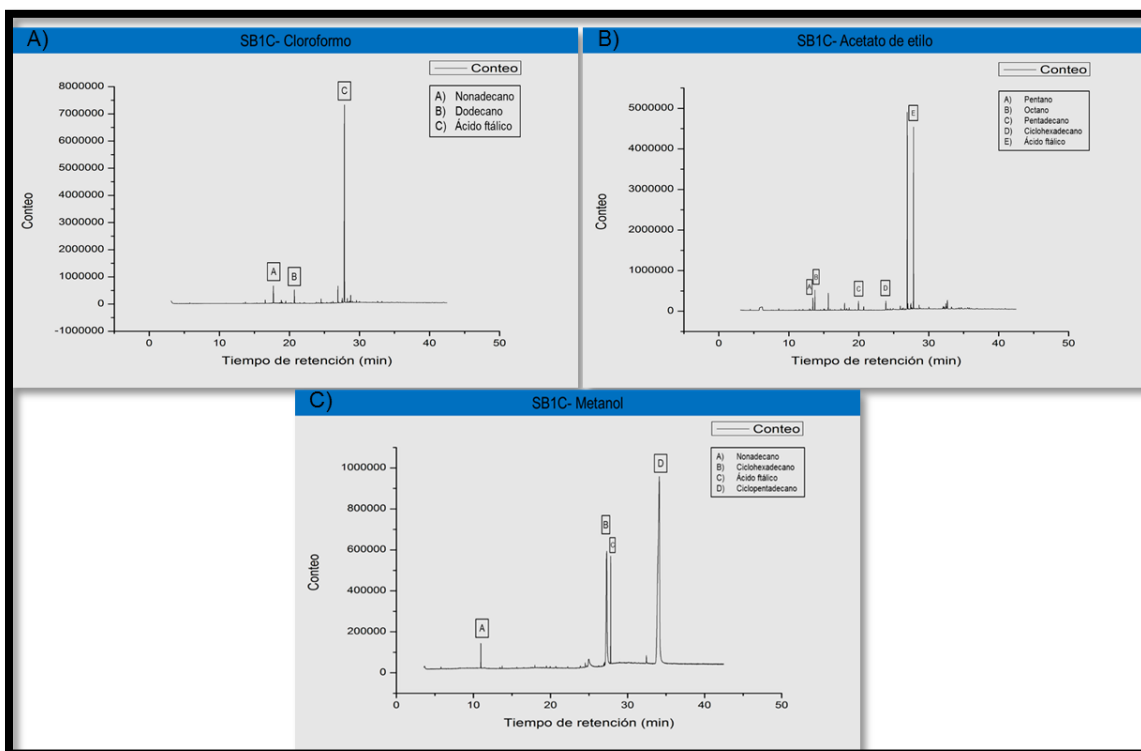
**Figura III.3.5** Cromatogramas (CG-MS) obtenidos a partir del sedimento PD3C, A) HTP identificados a partir de cloroformo; B) HTP identificados a partir acetato de etilo; C) HTP identificados a partir de metanol.

En la muestra de Sisal SB2C se identificó a partir de la purificación con cloroformo la presencia de alcanos, mientras que a partir de la purificación con acetato de etilo se logró la identificación de cicloalcanos, estos resultados se muestran en los cromatogramas de la Figura III.3.6 (A, B). Por otra parte, a partir de la purificación con cloroformo se logró identificar mayores números de compuestos, identificando con mayor frecuencia el octano, el cual como ya se mencionó, forma parte de la constitución de la gasolina [148; 149].



**Figura III.3.6** Cromatogramas (CG-MS) obtenidos a partir del sedimento SB2C, A) HTP identificados a partir de cloroformo; B) HTP identificados a partir acetato de etilo.

En la muestra SB1C se logró la caracterización de 10 compuestos de HTP diferentes, de los cuales en su mayoría fueron cicloalcanos, a partir de la purificación con cloroformo se lograron identificar 2 compuestos alcanos, mientras que, de la purificación con acetato de etilo se identificaron 5 cicloalcanos y de la purificación con metanol se identificaron 3 cicloalcanos, estos resultados se muestran en los cromatogramas de SB1C que se observan en la Figura III.3.7 (A-C). Además se debe mencionar que a partir de la muestra SB1C se identificaron más cicloalcanos que en SB2C, coincidiendo con Iturria [20].



**Figura III.3.7** Cromatogramas (CG-MS) obtenidos a partir del sedimento SB1C, A) HTP identificados a partir de cloroformo; B) HTP identificados a partir acetato de etilo; C) HTP identificados a partir de metanol.

Los resultados indican que en los sedimentos analizados de Progreso y Sisal, se identificaron HTP, siendo mayor la concentración en lluvias, y alcanos la mayoría en comparación con ciclo alcanos.

De los compuestos identificados el octano y decano llaman la atención, debido a que son constituyentes de la gasolina, lo cual indica que efectivamente, en la zona hay contaminación por hidrocarburos derivados del petróleo [20].

## CONCLUSIONES

Se logró establecer un protocolo de aislamiento de ADNmg con alto rendimiento y alta calidad a partir de sedimentos costeros contaminados con hidrocarburos. Este protocolo implicó el pretratamiento del sedimento previo a la lisis celular, así como también la purificación de ADNmg obtenido mediante membrana de diálisis.

La secuenciación del gen 16S ARNr, resultó en la identificación de bacterias con posible potencial para degradar HTP. Este es el caso de especies de bacterias pertenecientes al género *Pseudomona*, y bacterias electrogénicas pertenecientes a los géneros *Pseudomonas* y *Geobacter*.

El grado de contaminación de los sitios de colecta, se confirmó debido a la presencia de HTP, principalmente alcanos y cicloalcanos en los puertos de Progreso y Sisal, Yucatán. Además, se determinó mediante la cuantificación gravimétrica, que la contaminación por HTP en estos sitios se encuentra por encima del límite máximo permisible de 70 µg/g de sedimento (establecido por la UNESCO en 1976).

## BIBLIOGRAFÍA

1. Ponce G; Botello A en *Niveles de hidrocarburos en el Golfo de México*, Botello A; Rendón J; Gold G; Agraz C. Ed; Epomex, Mexico, 2005; Vol. 2, 657-682.
2. Gold G en *Hidrocarburos en el sur del Golfo de México*, Caso M; Pisanty I; Ezcurra E, Ed.; Instituto de Ecología, A.C., México, 2004; Vol. 2, 657-682.
3. Cato J, *Gulf of Mexico origins, waters and biota*, Ocean and coastal economy, United State of America, 2009; Vol. 2, 1-107.
4. De Bartolomeo A. et al., Relationship among parameters of lake polluted sediments evaluated by multivariate statistical analysis, *Chemosphere*. 55, 1323-1329, 2004.
5. Davidova I. et al., Anaerobic phenantreno mineralization by a carboxylating sulfate-reducing bacterial enrichment, *International Society for Microbial Ecology*. 1, 436-442, 2007.
6. Valbuena O. et al., Actividades sulforeductoras y desulfurizadora por bacterias termófilas aisladas de lodos hidrotermales de las trincheras Venezuela, *Interciencia*. 35(6), 414-420, 2010.
7. Sherafatmand M; How Y N, Using sediment microbial fuel cells (SMFCs) for bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), *Bioresource Technology*. 195, 122-130, 2015.
8. Wilkes H. et al., *Hydrocarbons: an introduction to structure, physico-chemical properties and natural occurrence*, Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology, 2010, 1-48.
9. Hall C; Tharakan P; Hallock J. Hydrocarbons and the evolution of human culture, *Nature*. 426 (6964), 318-322, 2003.
10. Adams E E. et al., A tale of two spills: Novel science and policy implications of an emerging new oil spill model, *BioScience*. 62 (5), 461-469, 2012.

11. McKenna A. et al., *Biodegradation at the seafloor: Ultrahigh resolution ft-icr mass spectral characterization of natural petroleum seeps*, American Petroleum Institute, 2014, Vol. 1, 2083- 2097.
12. International Tanker Owners Pollution Federation, *Efectos de la contaminación por hidrocarburos en el medio marino*, Technical information. 2012, 1-13.
13. Farrington J W, Oil Pollution in the Marine Environment II: Fates and Effects of Oil Spills, Environment. *Science and Policy for Sustainable Development*. 56(4), 16-31, 2014a.
14. Graizbord B. et al., *Diagnostico actual de la zona costera del Golfo de México*, INEC, 2009; Vol. 1, 376-340.
15. Botello A. et al., Ecología, recursos costeros y contaminación en el Golfo de México, *Ciencia y desarrollo*. 18(102), 28-24, 1992.
16. Commendatore M G. et al., Sources and distribution of aliphatic and polyaromatic hydrocarbons in coastal sediments from the Ushuaia Bay (Tierra del Fuego, Patagonia, Argentina), *Marine Environmental Research*. 74, 20-31, 2012.
17. Botello A, en *Características, composición y propiedades fisicoquímicas del petróleo*, Botello A; Rendón J; Gold G; Agraz C, Ed.; EPOMEX, México, 2005; Vol. 2, 261-268.
18. Davison W. et al., The effects of acute exposure to the water soluble fraction of diesel fuel oil on survival and metabolic rate of an antartic fish (Pagotheniaborchgevinki), *Comparative Biochemistry and Physiology*. 102, 185-188, 1992.
19. Valenzuela I; Gold G; Ceja V, en *Hidrocarburos en agua y sedimentos de la laguna de Chelem y Puerto Progreso, Yucatán México*, Botello A; Rendón J; Gold G; Agraz C, Ed.; EPOMEX, México, 2005; Vol. 2, 311-328.
20. Iturria R, Contaminación histórica por hidrocarburos en el puerto de abrigo de Sisal, Yucatán, Tesis de licenciatura, UNAM, Mexico, 2012.

21. Gold G. et al., *Muestreo y análisis de sustancias tóxicas persistentes y bioacumulables (STPBs) en el sitio índice Ría Celestún en el estado de Yucatán en el marco de la implementación de PRONAME*, CINVESTAV, México, 2009, 111-112.
22. Day J. et al., en *Diagnostico ambiental del golfo de México*, Caso M; Pisanty I; Ezcurra E; Ed.; INE-SEMARNAT, México, 2004; Vol. 1, 15-44.
23. Liang Y T. et al., 2012. Spatial variations of hydrocarbon contamination and soil properties in oil exploring fields across China, *J Hazard Mater.* 241, 371–378, 2012.
24. Bierkens J; Geerts L, Environmental hazard and risk characterization of petroleum substances: A guided “walking tour” of petroleum hydrocarbons, *Environment international.* 66, 182-193, 2014.
25. Marshall A; Rodgers R, Petroleomics: The next grand challenge for chemical analysis, *Accounts of Chemical Research*, 37, 53-59, 2004.
26. Harayama S; Kishira H, Petroleum biodegradation in marine environments, *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 1, 63-70, 1999.
27. Board O S; Board M, *Oil in the sea III: Inputs, fates, and effects*, National Academies Press, Washington, DC., 2003, 63-169.
28. De la Huz R. et al., Biological impacts of oil pollution and cleaning in the intertidal zone of exposed sandy beaches: preliminary study of the prestige oil spill, *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 65(1), 19-29, 2005.
29. Jaffé R, Fate of Hydrophobic Organic Pollutants in the Aquatic Environment: A Review, *Environmental Pollution.* 69, 237-257, 1991.
30. Heintz R A, Chronic exposure to polynuclear aromatic hydrocarbons in natal habitats leads to decreased equilibrium size, growth, and stability of pink salmon populations, *Integrated Environmental Assessment and Management.* 3(3), 351-363, 2007.
31. Gold G, *Hidrocarburos en el sur del Golfo de México*, SEMARNAT. México, DF. 2004; Vol. 2, 657-682.



32. Gong Y. et al., A review of oil, dispersed oil and sediment interactions in the aquatic environment: influence on the fate, transport and remediation of oil spills, *Marine Pollution Bulletin*. 79, 16-33, 2014.
33. International Tanker Owners Pollution Federation, *Fate of marine oil spills*. Technical information paper, 2014.
34. Fingas M; Fieldhouse B, Studies of the formation process of water in oil emulsions, *Marine Pollution Bulletin*. 47, 369-396, 2003.
35. Owens E H; Lee K, Interaction of oil and Mineral fines on shorelines: Review and Assessment, *Marine Pollution Bulletin*. 47, 397-405, 2003.
36. Muschenheim D K; Lee K; Removal of oil from the sea surface through particulate interaction: Review and prospectus, *Spill Science and Technology Bulletin*. 8(1), 9-18, 2002.
37. Liu Z. et al., The Weathering of Oil after the Deepwater Horizon Oil Spill: insights from the chemical composition of the oil from the sea surface, salt marshes and sediments, *Environmental Research Letters*, 7(3), 2012.
38. Lyu Y. et al., Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Novosphingobium pentaromativorans* US6-1, *PloS One*, 9(7), 2014.
39. Bracho M; Díaz L; Soto L M, Biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos y heterocíclicos por *Pseudomonas* sp, *Ciencia*. 12(4), 269-275, 2004.
40. Das N; Chandran P, Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview, *Biotechnology Research International*. 1-13, 2011.
41. Haritash A; Kaushik C P, Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review, *Journal of Hazardous Materials*. 169 (3), 1-15, 2009.
42. Villatoro- Monzón W; Mesta A M; Razo E, La biodegradación anaerobia de compuestos aromáticos (BTEX), *Biotecnología*. 7(3), 7-21, 2002.

43. Tian Y. et al., Contamination and potential biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in mangrove sediments of Xiamen China, *Marine Pollution Bulletin*. 6, 1184-1191, 2008.
44. Baboshin M A; Golovleva L A, Aerobic bacterial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PHAs) and kinetics aspects, *Microbiol*. 6, 639-650, 2012.
45. McGenity T J. et al., Marine crude-oil biodegradation: a central role for interspecies interactions, *Aquatic Biosystems*. 8(1), 1-10, 2012.
46. Fuentes S. et al., Bioremediation of petroleum hydrocarbons: catabolic genes, microbial communities, and applications, *Appl Microbial Biotechnology*. 98, 4781-4794, 2014.
47. Eve R, Bioremediation Biotechnology, *Wile Black Well*, USA, 1992, 466-467.
48. Aamand G. et al., en *Degradation of PHAs in soil by indigenous and inoculated bacteria*, Hinche R; Alleman B; Fredrickson J; Ed.; Battelle Press. USA. 1995; 121-128.
49. Barry R; Sheldon J; Long G, *Practical environmental bioremediation*, The field Guide. 1997, 1-208.
50. Altamirano M; Pozzo M. Aislamiento e identificación de bacterias hidrocarburolicas provenientes de un suelo sometido a biorremediación, *ABES*. 27, 1-6, 2000.
51. Bamforth S M; Singleton I, Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions, *J. Chem. Technol. Biotechnol*. 80(7), 723-736, 2005.
52. Wilkes H. et al., en *Hydrocarbons: an introduction to structure, physico-chemical properties and natural occurrence*, Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology, USA, 2010, 1-48.
53. Colquhoun D R; Hartmann E M; Halden R U, Proteomic Profiling of the Dioxin-Degrading Bacterium *Sphingomonas wittichii* RW1, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 1-9, 2012. doi:10.1155/2012/408690.

54. Tatyana Y I. et al., The organization of naphthalene degradation genes in *Pseudomonas putida* strain Ak15, *Res Microbiol.* 164, 244-253, 2013.
55. Johnsen A R; Karlson U, Diffuse PAH contamination of surface soils: environmental occurrence, bioavailability, and microbial degradation, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76, 533-543, 2007.
56. Ramdine G. et al., Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in surface sediment and oysters (*Crassostrea* spp.) from mangrove of Guadeloupe: levels, bioavailability, and effects, *Ecotoxicol Environ Saf.* 79, 80–89, 2012.
57. Mrozik A; Piotrowska Z; Labuzek S, Bacterial Degradation and Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, *Polish Journal of Environmental Studies.* 12(1), 15-25, 2003.
58. Shuttleworth K L; Cerniglia C E, Environmental aspects of PAH biodegradation, *App. Biochem. Biotechnol.* 54, 291- 302, 1995.
59. Renner R; EPA to strengthen persistent, bioaccumulative, and toxic pollutant controls mercury first to be targeted, *Environmental Science & Technology.* 33(3), 62, 1999.
60. Lu X Y; Zhang T; Fang H H P, Bacteria mediated PAH degradation in soil and sediment, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89(5), 1357-1371, 2011.
61. Morlett J A. et al., en *Relación entre las bacterias nitrato- sulfato reductoras y las metanogénicas en la biodegradación de anaerobios de compuestos aromáticos*, Martínez J L, Ed.; Proteomas y Genomas del Siglo XXI: Biotecnología Ambiental, Mexico, 2008.
62. Foght J, Review anaerobic biodegradation of aromatic hydrocarbons: pathway and prospects, *Journal. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 15, 93-120, 2008.
63. Annweiler E; Michaelis W; Meckenstock R U, Identical ring cleavage products during anaerobic degradation of naphthalene, 2-methylnaphthalene, and tetralin indicate a new metabolic pathway, *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 852-858, 2002.

64. Lovley D R, Cleaning up whit genomics: applying molecular biology to bioremediation, *Nat. Rev. Micro.* 1, 35-44, 2003.
65. Diaz E, Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility, *Int. Microbiol.* 7, 173–180, 2004.
66. Widdel F; Rabus R, Anaerobic biodegradation of saturated and monoaromatic hydrocarbons, *Current opinion in Biotechnology.* 12, 259-276, 2001.
67. Gibson J; Harwood C S, Metabolic diversity in aromatic compound utilization by anaerobic microbes, *Rev. Microbiol.* 56, 345-369, 2002.
68. Carmona M. et al., Anaerobic Catabolism of Aromatic Compounds: a Genetic and Genomic View, *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 73(1), 71-133, 2009.
69. Field J A, Enhanced biodegradation of aromatic pollutants in cocultures of anaerobic bacterial consortia, *Antonie van Leeuwenhoek.* 67, 47-77, 1995.
70. Heider J, Adding handles to unhandy substrates: anaerobic hydrocarbon activation mechanisms, *Curr Opin Chem Biol.* 11, 188-194, 2007.
71. Kniemeyer O. et al., Anaerobic degradation of ethylbenzene by a new type of marine sulfate reducing bacterium, *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 760-768, 2003.
72. Schink B; Phillips B; Muller J, Anaerobic degradation of phenolic compounds, *Naturwissenschaften.* 82,12-23, 2000
73. Salesi D. et al., Combined genomic and proteomic approaches identify gene clusters involved in anaerobic 2-methylnaphtalene degradation in the sulfate reducing enrichment culture N47, *J. Bacteriol.* 192(1), 295-306, 2010.
74. Safinowski M; Griebler C; Meckenstock R U, Anaerobic cometabolic transformation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons: evidence from laboratory and field studies, *Environ. Sci. Technol.* 40, 4165-4173, 2006.
75. Safinowski M; Meckenstock R U, Methylation is the initial reaction in anaerobic naphthalene degradation by a sulfate reducing enrichment culture, *Environ. Microbiol.* 8, 347-35, 2006.

76. Villarreal S. et al., Anaerobic biodegradation of aromatic hydrocarbon pollutants of the environment and food, *AQM*. 6(11), 28-39, 2014.
77. Chang B V; Shiung L C; Yuan S Y, Anaerobic biodegradation of polycyclic aromatic Hydrocarbons in soil, *Chemosphere*. 48, 717- 724, 2002.
78. Kraig J, Anaerobic biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in dredged material, PhD Tesis, The University of Utah, USA, 2000.
79. Coates J, Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons under sulfate reducing conditions, *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1099-1102, 1996.
80. Musat F. et al., Anaerobic degradation of naphthalene and 2-methylnaphtalene by strains of marine sulfate-reducing bacteria, *Environ. Microbiol.* 11, 209-219, 2009.
81. Mathava K. et al., Versatility of fluorine metabolite (phenol) in fluorine biodegradation by sulfate reducing culture, *Int Biodeter Biodegr.* 65, 522-526, 2011.
82. Bergmann F D. et al., Genomic insights into the metabolic potential of the polycyclic aromatic hydrocarbon degrading sulfate-reducing Deltaproteobacterium N47, *Environ. Microbiol.* 13 (5), 1125–1137, 2011.
83. Bergmann F D; Selesi D; Meckenstock R U, Identification of new enzymes potentially involved in anaerobic naphthalene degradation by the sulfate reducing enrichment culture N47, *Arch. Microbiol.* 193, 241–250, 2011.
84. Tsai J C; Kumar M; Lin J G, Anaerobic biotransformation of fluorene and phenanthrene by sulfate-reducing bacteria and identification of biotransformation pathway, *J Hazard Mater.* 164, 847- 855, 2009.
85. Kumar W C. et al., Versatility of fluorene metabolite (phenol) in fluorene biodegradation by a sulfate reducing culture, *Int Biodeter Biodegr.* 65, 522- 526, 2011.
86. Robertson W J. et al., *Desulfosporosinus meridieisp. nov.*, a spore forming sulfate reducing bacterium isolated from gasoline-contaminated groundwater, *Int Journal Syst Evol Microbiol.* 51, 133–140, 2001.

87. Allen T D. et al., *Desulfovibriocarbinolophilus* sp. nov., a benzyl alcohol-oxidizing, sulfate-reducing bacterium isolated from a gas condensate-contaminated aquifer, *Int Journal Syst Evol Microbiol.* 58, 1313–1317, 2008.
88. Guan J. et al., Diversity and distribution of sulfate-reducing bacteria in four petroleum reservoirs detected by using 16S rRNA and *dsrAB* genes, *Int Biodeterior Bidegr.* 76, 58-66, 2013.
89. Sun W; Sun X; Cupples M, Identification of *Desulfosporosinus* as toluene-assimilating microorganisms from a methanogenic consortium. *Int. Biodeterior, Bidegr.* 88, 13-19, 2014.
90. Kasai Y. et al., Physiological and molecular characterization of a microbial community established in unsaturated, petroleum-contaminated soil, *Environ Microbiol.* 7 (6), 806- 818, 2005.
91. Kleinsteuber S. et al., Molecular characterization of bacterial communities mineralizing benzene under sulfate-reducing conditions, *FEMS Microbiol Ecol.* 66, 143–157, 2008.
92. Fowler S J. et al., Methanogenic toluene metabolism: community structure and intermediates, *Environ. Microbiol.* 14, 754–764, 2012.
93. Musat F; Widdel F, Anaerobic degradation of benzene by a marine sulfate-reducing enrichment culture, and cell hybridization of the dominant phylotype, *Environ Microbiol.* 10 (1), 10-19, 2008.
94. Cervantes F J. et al., Anaerobic degradation of benzene by enriched consortia with humic acids as terminal electron acceptors, *Journal Harzard Mater.* 195, 201- 207, 2011.
95. Tsai J C. et al., Determination of optimal phenanthrene, sulfate and biomass concentrations for anaerobic biodegradation of phenanthrene by sulfate-reducing bacteria and elucidation of metabolic pathway, *Journal Harzard Mater.* 171, 1112-1119, 2009.
96. Pant D. et al., A review of the substrate used in microbial fuel cell (MFCs) for sustainable energy production, *Bioresource Technology.* 101(6), 1533-1543, 2010.

97. Rabaey K. et al., A microbial fuel cell capable of converting glucose to electricity at high rate and efficiency, *Biotechnology Letters*. 25(3), 1531-1535, 2003.
98. Du Z; Li H; Gu T, A state of the art review on microbial fuel cells: A promising technology for wastewater treatment and bioenergy, *Biotechnology Advances*: 25(5), 464-482, 2007.
99. Huang L; Regan J M; Quan X, Electron transfer mechanism, new applications, and performance of biocathode microbial fuel cells, *Bioresource Technology*, 102 (1), 316-323, 2011.
100. Rezaei F. et al., Substrate enhanced microbial fuel cells for improved remote power generation from sediment based system, *Environ Sci. Technol.* 41(11), 4053-4058, 2007.
101. Logan B E, Exoelectrogenic bacteria that power microbial fuel cells, *Nat Rev Microbiol.* 7, 875-381, 2009.
102. Morris J M. et al., Microbial fuel cell in enhancing anaerobic biodegradation of diesel, *Journal Chem Eng.* 146(2), 161-167, 2009.
103. Sherafatmand M; How Y N, Using sediment microbial fuel cells (SMFCs) for remediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), *Bioresource Technology*. 195, 122-130, 2015.
104. Handelsman J, Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 68 (4), 669-685, 2004.
105. Torsvik V; Ovreas L, Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems, *Current Opinion in Microbiology*. 5 (3), 240-245, 2002.
106. Zengler K. et al., Cultivating the uncultured, *Proc Natl Acad Sci.* 99(24), 15681-15686, 2002.
107. Keller M; Zengler K, Tapping into microbial diversity, *Nat Rev Microbiol.* 2, 141-150, 2004.

108. Friedrich M W, Phylogenetic analysis reveals multiple lateral transfers of adenosine-50-phosphosulfate reductase genes among sulfate-reducing microorganisms, *Journal of Bacteriology*. 184, 278-289, 2002.
109. Wagner M. et al., Phylogeny of dissimilatory sulfite reductases supports an early origin of sulfate respiration, *Journal of Bacteriology*. 180, 2975-2982, 1998.
110. Guan J, Diversity and distribution of sulfate-reducing bacteria in four petroleum reservoirs detected by using 16S rRNA and dsrAB genes, *International Biodeterioration and Biodegradation*, 76, 58-66, 2013.
111. Edwards R. et al., Using pyrosequencing to shed light on deep mine microbial ecology, *BMC Genomics*. 7(57), 1-13, 2006.
112. Muangchinda C. et al., Abundance and diversity of functional genes involved in the degradation of aromatchydrocarbons in Antarctic soils and sediments around Syowa Station, *Environmental Science and Pollution Research*, 22(6), 4725-4735, 2015.
113. Pilloni G. et al., Testing the limits of 454 pyrotag sequencing: reproducibility, quantitative assessment and comparison to T-RFLP fingerprinting of aquifer microbes, *PloS One*. 7(7), 1-7, 2012.
114. Suenaga H; Mizuta S; Miyazaki K, The molecular basis for adaptive evolution in novel extradioldioxygenases retrieved from the metagenome, *FEMS Microbiology Ecology*. 69(3):472-80, 2009.
115. Riesenfeld C S; Schloss P D; Handelsman J, Metagenomics: genomic analysis of microbial communities, *Annu Rev Genet*. 38, 525-552, 2004.
116. Ferrer M, Metagenoma: acceso a los recursos potencialmente ilimitados de microorganismos no cultivables, *Microbiología*. 38, 11-17, 2004.
117. Rondon M R. et al., Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms, *Appl Environ Microbiol*. 6, 2541-2547, 2000.



118. Voget S. et al., Prospecting for novel biocatalysts in a soil metagenome, *Appl Environ Microbiol.* 10, 6235-6242, 2003.
119. Ferrer M. et al., Metagenomics for mining new genetic resources of microbial communities, *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology.* 16 (2), 109-23, 2009.
120. Simon C; Daniel R, Achievements and new knowledge unraveled by metagenomic approaches, *Appl Microbiology and Biotechnology.* 85(2):265-76, 2009.
121. Brown C T; Tiedje J M, *Metagenomics: the paths forward*, Handbook of Molecular Microbial Ecology II: Metagenomics in Different Habitats, USA, 2011, 579-588.
122. Gonzalez J. et al., Protocol for extraction of bacterial metagenome DNA to prawn *Macrobrachium carcinus* L, *Tropical and subtropical agroecosystems.* 14, 875-883, 2011.
123. Maciel B. et al., Simple DNA extraction protocol for a 16S rDNA study of bacterial diversity in tropical landfarm soil used for bioremediation of oil waste, *Genetics and Molecular Research.* 8(1), 375-388, 2009.
124. Tebbe C; Vahjen W, Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and a yeast, *Applied and Environmental Microbiology.* 59, 2657–2665, 1993.
125. Ning J. et al., Different influences of DNA purity indices and quantity on PCR based DGGE and functional gene microarray in soil microbial community study, *Applied Microbiology and Biotechnology.* 82(5), 983–993, 2009.
126. Delmont T O. et al., Metagenomic comparison of direct and indirect soil DNA extraction approaches, *Journal of Microbiological Methods.* 86(3), 397–400, 2011.
127. Amorim J H. et al., An improved extraction protocol for metagenomic DNA from a soil of the Brazilian Atlantic Rainforest, *Genetics and Molecular Research.* 7(4), 1226–1232, 2008.
128. Fitzpatrick K A; Kersh G J; Massung R F, Practical method for extraction of PCR-quality DNA from environmental soil samples, *Applied and Environmental Microbiology.* 76(13), 4571–4573, 2010.

129. Leff L. et al., Comparison of methods of DNA extraction from stream sediments. *Applied and Environmental Microbiology*. 61, 1141–1143, 1995.
130. Tsai Y; Olson B, Rapid method for separation of bacterial DNA from humic substances in sediments for polymerase chain reaction, *Applied and Environmental Microbiology*. 58, 2292–2295, 1992.
131. Jacobsen C S; Rasmussen O F, Development and application of a new method to extract bacterial DNA from soil based on separation of bacteria from soil with cation exchange resin, *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 2458–2462, 1992.
132. Picard C. et al., Detection and enumeration of bacteria in soil by direct DNA extraction and polymerase chain reaction, *Applied and Environmental Microbiology*. 58, 2717–2722, 1992.
133. Porteous L A; John L A, A simple mini-method to extract DNA directly from soil for use with polymerase chain reaction amplification, *Current Microbiology*. 27, 115–118, 1993.
134. Zhou J; Bruns M A; Tiedje J M, DNA recovery from soils of diverse composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 316–322, 1996.
135. Roose C; Garnier E; Harry M, Extraction and purification of microbial DNA from soil and sediments samples, *Applied Soil Ecology*. 18, 47–60, 2001.
136. Miller D. et al., Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples, *Applied and Environmental Microbiology*. 65, 4715–4724, 1999.
137. Osborn A. et al., An evaluation of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environ Microbiol*. 2(1), 39-50, 2000.
138. Arbeli Z; Fuentes C L, Improved purification and PCR amplification of DNA from environmental samples. *FEMS Microbiology Letters*. 272, 269–275, 2007.

139. Rojas R. et al., A simple silica based method for metagenomic DNA extraction from soil and sediments, *Mol. Biotechnol.* 40, 13-17, 2008.
140. Fang Y. et al., Modified pretreatment method for total microbial DNA extraction from contaminated river sediment, *Front Environ Sci Eng.* 9(3), 444-452, 2015.
141. Lewis M. Dialysis tubing. Fecha de acceso 6 de Noviembre de 2015, del sitio web de University of Liverpool en DNA extractation from agarose gels (basic method). <http://www.methodbook.net/dna/gelextrc.html>.
142. Schloos P D; Gevers D; Westcott S L, Reducing the effects PCR amplification and sequencing artifacts on 16S rRNA-based studies, *PLoS One.* 6(12), 1-14, 2011.
143. Zhang J. et al. Pear: A fast and accurate Illumina Paired- End read mergeR. *Bioinformatics.* 30(5), 614-620, 2014.
144. Edgar R C, UPARSE: highly accurate OUT sequences from microbial amplicon reads, *Nature Methods.* 10, 996-998, 2013.
145. Fernández L C. et al., *Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a remediación de sitios contaminados*, IMP, INE, SEMARNAT. México, 179.
146. US EPA 3500B, Organic extraction and sample preparation. SW 846 Test methods for evaluating solid waste, physical/chemical methods, 1996.
147. US EPA 3540C, Soxhlet extraction organics. SW-846 Test methods for evaluating solid waste physical/chemical methods, 1996.
148. Schwab A P. et al., Extraction of petroleum hydrocarbons from soil by mechanical shaking, *Environ Sci Technol.* 33(11), 1940-1945, 1999.
149. Arce O J M; Rodríguez V R; Rojas A N G, Identification of recalcitrant hydrocarbons present in a drilling waste-polluted soil, *J Environ Sci. Health.* 39(6), 1535-1545, 2004.
150. US EPA 821-B-94-004 (Method 1664), N-hexane extractable material (HEM) and silica gel treated N-hexane extractable material (SGTHEM) by extraction and gravimetry (oil and grease and total petroleum hydrocarbons), 1995.

151. Jones R; Sandorfy N; Sandorfy C, The application of infrared and Raman spectrometry to the elucidation of molecular structure Chemical applications of spectroscopy, *Interscience*. 247-580,1956.
152. Bellamy L, *The infra-red spectra of complex molecules*, Springer Science and Business Media, 2013.
153. Socrates G, *Infrared and Raman characteristic group frequencies: tables and charts*, John Wiley and Sons. New York, 2004, 1-366.
154. US EPA 8440, Total recoverable petroleum hydrocarbons by infrared spectrophotometry. SW 846 Test methods for evaluating solid waste, physical/chemical methods, 1996.
155. Cauich A, Modelación numérica de circulación en Puerto Progreso, Yucatán: Implicaciones para la dispersión de contaminantes, Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Yucatán, Yucatán. 2010.
156. Sambrook J; Fritsch E F; Maniatis T, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989.
157. Velázquez L P; Aragón M; Cornejo R A, *Extracción y purificación de ADN. Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*, INECC-SEMARNAT. Vol. 1, 2014, 257.
158. Nakagawa A. et al., CaspaseDependend Conversion of Dicer Ribonuclease into a Death Promoting Deoxyribonuclease, *Science*. 328(5976), 327-334, 2010.
159. Green M; Sambrook J, *Molecular cloning a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor. New York. Vol. 1, 2012, 1-2028.
160. Contreras J. et al., Comparación de métodos para la recuperación de ADN a partir de geles de agarosa, *Biomédica*. 13(3), 1-5, 1993.
161. Mejia J. et al., A two-step electrodialysis method for DNA purification from polluted metallic environmental samples, *Electrophoresis*. 29(15), 3239-3244, 2008.
162. Zarzosa A L. et al., Electroeluting DNA Fragments. *J. Vis. Exp.* 43, 1-2, 2010.

## ANEXOS

### Anexo 1

PC1C			
Especie	Cantidad	Especie	Cantidad
Ilumatobacter nonamiensis	1	Bacteriovorax sp	29
Loktanella sp	1	Arenicella sp	30
Prochlorococcus sp	1	Streptomyces sp	30
Rhodovulum sulfidophilum	1	Desulfoglaeba sp	31
Cyanobacterium sp	2	Luteolibacter pohnpeiensis	32
Desulfobacter sp	2	Coxiella sp	34
Mariniflexile jejuense	2	Cocleimonas flava	36
Octadecabacter sp	2	Cyanobium sp	39
Ornatilinea apprima	2	Aciditerrimonas sp	41
Desulfovibrio sp	3	Candidatus Pelagibacter sp	46
Desulforegula sp	4	Streptococcus agalactiae	49
Acetivibrio sp	5	Actibacter sp	50
Marichromatium sp	5	Methylococcus sp	50
Pelobacter sp	5	Ulvibacter sp	53
Ruegeria sp	5	Pirellula sp	54
Verrucomicrobium sp	5	Desulfosarcina variabilis	57
Acidimicrobium sp	6	Thioalkalivibrio sp	57
Geothermobacter sp	6	Sphingomonas sp	59
Ilumatobacter sp	6	Synechococcus sp	61
Pedosphaera parvula	6	Holophaga sp	62
Pseudoruegeria sp	7	Oceanicola granulosus	62
Sufflavibacter sp	7	Flavobacterium sp	63

Parachlamydia acanthamoebae	9	Desulfosarcina sp	66
Sporichthya sp	10	Methanotorris sp	67
Klebsiella sp	11	Spirochaeta sp	67
Zeaxanthinibacter enoshimensis	11	Planctomyces sp	73
Caldilinea sp	12	Opitutus sp	76
Lacinutrix sp	12	Psychroserpens sp	95
Desulfomonile sp	13	Enterococcus faecalis	97
Haliea sp	14	Halospirulina sp	107
Leptospira sp	14	Bacillus sp	118
Paenibacillus sp	14	Pseudomonas sp	125
Pseudohaliea rubra	14	Geobacter sp	138
Iamia sp	16	Clostridium sp	185
Geoalkalibacter sp	19	Methanosphaera sp	258
Gilvibacter sediminis	23	Cytophaga sp	260
Gelria glutamica	26	Desulfurococcus sp	261
Marinoscillum sp	26	Sulfurovum sp	279
Bacillus licheniformis	27	Muriicola sp	358
Chloroflexus sp	27	Acidobacterium sp	367
Caldithrix sp y Thiohalophilus sp.	28	Dehalococcoides sp	421

## Anexo 2

PD1C			
Especie	Número	Especie	Número
Alkaliphilus sp	1	Desulfacinum sp	13
Desulfobacter sp	1	Desulfofaba sp	13
Pelotomaculum sp	1	Chlamydia sp	14
Ulvibacter sp	1	Escherichia coli	14
Winogradskyella sp	1	Limnobacter sp	14
Aureicoccus marinus	2	Streptococcus agalactiae	14
Desulfovibrio sp	2	Thiohalophilus sp	14
Lewinella nigricans	2	Aureitalea marina	15
Merismopedia sp	2	Catellatospora sp	15
Methanogenium sp	2	Muriicola sp	15
Methylocystis sp	2	Acidimicrobium sp	16
Mycobacterium sp	2	Amaricoccus sp	16
Peredibacter sp	2	Solirubrobacter sp	16
Planctomyces sp	2	Cocleimonas flava	17
Salegentibacter sp	2	Conexibacter sp	17
Algorimarina sp	3	Desulfosarcina sp	17
Caldithrix abyssi	3	Flavisolibacter sp	17
Ferrimonas sp	3	Synechococcus sp	17
Flexithrix dorotheae	3	Blastomonas sp	18
Haliangium ochraceum	3	Desulfomonile sp	18
Methanofollis liminatans	3	Desulfosarcina variabilis	18
Methanosaeta sp	3	Marichromatium sp	18

Pelobacter sp	3	Pelagicola sp	18
Acinetobacter sp	4	Psychroserpens sp	19
Cyanobium sp	4	Roseovarius sp	19
Desulfobacterium sp	4	Streptomyces sp	19
Desulfomonile limimaris	4	Algorimarina butyrica	20
Desulfonema sp	4	Brevundimonas sp	20
Gaiella sp	4	Marinoscillum sp	20
Holophaga sp	4	Pseudohalaea rubra	20
Paenibacillus sp	4	Streptococcus gallolyticus	20
Parvularcula sp	4	Caldilinea sp	22
Pseudoruegeria sp	4	Anderseniella baltica	23
Tepidimonas sp	4	Pseudomonas sp	23
Acinetobacter radioresistens	5	Ornatilinea sp	24
Donghicola sp	5	Cyanobacterium sp	25
Kosmotoga pacifica	5	Enterococcus faecalis	25
Mariniphaga anaerophila	5	Iamia sp	25
Porphyrobacter sp	5	Methanoculleus sp	25
Rhodovulum sulfidophilum	5	Natronaerovirga pectinivora	27
Anabaena sp	6	Desulfococcus sp	29
Cenarchaeum sp	6	Sporichthya sp	29
Haloferula helveola	6	Mariniflexile jejuense	31
Roseicyclus mahoneyensis	6	Lacinutrix sp	33
Sphingopyxis sp	6	Sufflavibacter sp	34
Thiorhodospira sp	6	Verrucomicrobium sp	34



Leptolinea sp	7	Ilumatobacter sp	37
Owenweeksia sp	7	Staphylococcus sp	39
Pelagibaca bermudensis	7	Aciditerrimonas sp	43
Gemmatimonas sp	8	Haliea sp	49
Pontibacillus chungwhensis	8	Oceanicola granulosus	50
Thermomicrobium sp	8	Acidobacterium sp	56
Vallitalea sp	8	Sulfurovum sp	56
Chondromyces crocatus	9	Pirellula sp	57
Desulfomicrobium sp	9	Halobacillus sp	59
Desulfuromusa sp	9	Ruegeria sp	59
Dethiosulfatibacter aminovorans	9	Geobacter sp	73
Dongia sp	9	Caldithrix sp	77
Planococcus sp	9	Ornatilinea apprima	100
Bdellovibrio sp	10	Actibacter sp	111
Magnetococcus sp	10	Spirochaeta sp	125
Mesorhizobium sp	10	Dehalococcoides sp	126
Pediococcus pentosaceus	10	Methanosphaera sp	143
Stenotrophomonas acidaminiphila	10	Syntrophus sp	155
Thauera sp	10	Halospirulina sp	159
Trichococcus sp	10	Thioalkalivibrio sp	179
Alteromonas sp	11	Desulfurococcus sp	261
Anaeromyxobacter sp	11	Flavobacterium sp	287
Bacillus sp	11	Clostridium sp	292
Enterococcus faecium	12	Cytophaga sp	780

Geoalkalibacter sp	12	Aminobacterium sp	802
Thiohalocapsa halophila	12	Psychrobacter sp	841

### Anexo 3

PE1C			
Aureitalea marina	1	Desulfovibrio sp	8
Desulfonema magnum	1	Gaiella sp	8
Eubacterium sp	1	Maricaulis sp	8
Flexithrix dorotheae	1	Owenweeksia sp	8
Fluviicola sp	1	Zeaxanthinibacter enoshimensis	8
Halioglobus japonicus	1	Bacteriovorax sp	9
Hyphomicrobium hollandicum	1	Blastopirellula sp	9
Hyphomonas sp	1	Desulfonema sp	9
Methylococcus sp	1	Donghicola sp	9
Prochlorococcus sp	1	Haloferula helveola	9
Rhodobium sp	1	Lewinella sp	9
Staphylococcus sp	1	Micavibrio sp	9
Acinetobacter sp	2	Octadecabacter sp	9
Alkaliphilus sp	2	Ilumatobacter nonamiensis	10
Arthrobacter sp	2	Pseudohaliera rubra	10
Candidatus Giganthauma karukerense	2	Ulvibacter sp	10
Cenarchaeum sp	2	Pelobacter sp	11
Commensalibacter sp	2	Ornatilinea apprima	12
Dethiosulfatibacter aminovorans	2	Halospirulina sp	13
Enhygromyxa salina	2	Caldithrix abyssi	14
Enterococcus faecalis	2	Desulfuromusa sp	14
Ferrimicrobium sp	2	Bellilinea sp	15

Ferrimonas sp	2	Haliea mediterranea	15
Flexibacter sp	2	Aureicoccus marinus	16
Methanoculleus sp	2	Methanosphaera sp	16
Pelagicola sp	2	Planctomyces sp	16
Pelotomaculum sp	2	Acidimicrobium sp	17
Pontibacillus chungwhensis	2	Caldilinea sp	17
Rhodobacter sp	2	Streptococcus agalactiae	17
Robiginitalea myxolifaciens	2	Thiorhodovibrio sp	17
Rubrobacter sp	2	Marinoscillum sp	18
Saccharospirillum sp	2	Winogradskyella sp	18
Sporichthya sp	2	Haliscomenobacter sp	19
Tenacibaculum geojense	2	Trichococcus sp	19
Ahrensia sp	3	Ilumatobacter sp	20
Allokutzneria sp	3	Cocleimonas flava	21
Desulfococcus sp	3	Desulfosarcina sp	21
Marichromatium sp	3	Roseobacter sp	24
Marinifilum sp	3	Gemmatimonas sp	26
Marinobacterium stanieri	3	Haliea sp	26
Marinomonas sp	3	Eubacterium tarantellae	27
Paenibacillus sp	3	Lewinella nigricans	28
Planococcus sp	3	Pelagibaca bermudensis	29
Roseicyclus mahoneyensis	3	Portibacter lacus	29
Sulfurovum sp	3	Acidithiomicrobium sp	30
Thermoleophilum sp	3	Acinetobacter radioresistens	30

Acidaminobacter sp	4	Geobacter sp	30
Coccinimonas marina	4	Roseovarius sp	30
Desulfobacterium sp	4	Bacillus sp	33
Geoalkalibacter sp	4	Arenicella sp	35
Ignatzschineria larvae	4	Sphingobacterium sp	35
Lysinimicrobium mangrovi	4	Cyanobium sp	37
Muricauda sp	4	Desulfomonile sp	38
Neochlamydia sp	4	Mariniflexile jejuense	38
Rhodospirillum sp	4	Anderseniella baltica	39
Thermobaculum sp	4	Burkholderia sp	39
Desulfococcus oleovorans	5	Sphingopyxis sp	40
Desulfoglaeba sp	5	Caldithrix sp	41
Desulfomicrobium sp	5	Rhodovulum sulfidophilum	41
Desulforegula sp	5	Dehalococcoides sp	46
Flavococcus chejuensis	5	Aminobacterium sp	51
Hyphomicrobium sp	5	Lewinella cohaerens	51
Hyphomonas johnsonii	5	Mesorhizobium sp	51
Loktanella vestfoldensis	5	Pseudoruegeria sp	53
Marinobacter sp	5	Psychrobacter sp	53
Methylocystis sp	5	Psychroserpens sp	54
Rhodopirellula sp	5	Synechococcus sp	54
Syntrophus sp	5	Turicibacter sp	54
Vallitalea guaymasensis	5	Halobacillus sp	56
Vibrio sp	5	Spirochaeta sp	56

Anaeromyxobacter sp	6	Pirellula sp	59
Bacteroides sp	6	Holophaga sp	68
Candidatus Endoriftia persephone	6	Muriicola sp	77
Caulobacter sp	6	Desulfurococcus sp	78
Cyanobacterium sp	6	Aciditerrimonas sp	86
Loktanella sp	6	Pseudomonas sp	89
Maribacter sp	6	Thiohalophilus sp	92
Methanothermobacter sp	6	Desulfosarcina variabilis	95
Nitrospira sp	6	Oceanicola granulosus	96
Parvularcula sp	6	Verrucomicrobium sp	105
Photobacterium sp	6	Lacinutrix sp	106
Phycisphaera sp	6	Ruegeria sp	119
Sufflavibacter sp	6	Actibacter sp	142
Thermoanaerobacterium sp	6	Streptomyces sp	143
Thiohalophilus thiocyanatoydans	6	Thioalkalivibrio sp	158
Haliangium ochraceum	7	Flavobacterium sp	170
Lutibacter sp	7	Iamia sp	183
Olleya sp	7	Phaeochromatium sp	191
Saccharospirillum salsuginis	7	Clostridium sp	203
Amaricoccus sp	8	Acidobacterium sp	285
Antarctobacter sp	8	Cytophaga sp	442
Bdellovibrio sp	8		

#### Anexo 4

PC3C			
Donghicola sp	1	Ruegeria sp	13
Lewinella nigricans	1	Chloroflexus sp	14
Anaerolinea sp	2	Pelagibaca bermudensis	14
Bacteriovorax sp	2	Geothermobacter sp	15
Desulfofaba fastidiosa	2	Loktanella sp	15
Escherichia coli	2	Anaeromyxobacter sp	16
Lewinella cohaerens	2	Bellilinea sp	16
Mariniflexile jejuense	2	Cyanobium sp	16
Pelagibius sp	2	Haliaea sp	16
Phenylobacterium sp	2	Ralstonia sp	16
Phycisphaera sp	2	Sufflavibacter sp	16
Salmonella enterica	2	Caldithrix palaeochoryensis	17
Tepidamorphus sp	2	Desulfomicrobium sp	17
Thiopfundum sp	2	Pedosphaera sp	17
Trichodesmium sp	2	Pelotomaculum sp	17
Vallitalea sp	2	Halochromatium sp	18
Candidatus Desulfamplus magnetomortis	3	Leptospira sp	18
Coxiella cheraxi	3	Mesorhizobium sp	18
Desulfacinum sp	3	Desulfobacter sp	19
Desulfatiglans parachlorophenolica	3	Desulfococcus oleovorans	19
Desulfomonile tiedjei	3	Halospirulina sp	19
Leptolinea sp	3	Aciditerrimonas sp	20

Methanothermobacter sp	3	Streptomyces sp	20
Methanotorris sp	3	Blastopirellula sp	21
Moraxella sp	3	Paenibacillus sp	21
Orenia sp	3	Planctomyces sp	21
Pelobacter sp	3	Pseudomonas sp	21
Alcanivorax sp	4	Caldilinea sp	23
Aminobacterium sp	4	Pseudohalaea rubra	24
Bacillus aquimaris	4	Actibacter sp	25
Clostridium botulinum	4	Desulfuromusa sp	25
Coprococcus sp	4	Ornatilinea apprima	25
Gaiella sp	4	Thiohalophilus thiocyanatoxydans	25
Ochrobactrum thiophenivorans	4	Acidimicrobium sp	28
Pedosphaera parvula	4	Desulfatibacillum sp	28
Sporosarcina sp	4	Candidatus Endoriftia persephone	33
Arcobacter sp	5	Cenarchaeum sp	33
Caulobacter sp	5	Desulfonema sp	35
Desulfatiferula sp	5	Caldithrix abyssi	36
Desulfuromonas sp	5	Geoalkalibacter sp	36
Klebsiella sp	5	Psychroserpens sp	36
Nitrospira sp	5	Streptococcus agalactiae	37
Oceanirhabdus sediminicola	5	Desulfomonile sp	40
Propionigenium sp	5	Iamia sp	40
Rhizobium tropici	5	Desulfoglaeba sp	42



Bacillus cereus	6	Thermoleophilum sp	44
Cocleimonas flava	6	Sporichthya sp	46
Desulfonema magnum	6	Desulfobacterium sp	49
Rubrobacter sp	6	Bacillus sp	50
Schlegelella sp	6	Clostridium sp	50
Sphingopyxis sp	6	Pirellula sp	52
Synechococcus sp	6	Enterococcus faecalis	53
Azospirillum brasilense	7	Verrucomicrobium sp	54
Lewinella sp	7	Desulfococcus sp	56
Ulvibacter sp	7	Holophaga sp	60
Acidithiomicrobium sp	8	Thioalkalivibrio sp	62
Desulfobacca sp	8	Sulfurovum sp	65
Haliscomenobacter sp	8	Spirochaeta sp	77
Smithella sp	8	Oceanicola granulosus	83
Thermomicrobium sp	8	Thiohalophilus sp	90
Thiohalocapsa halophila	8	Geobacter sp	95
Thiorhodospira sp	8	Cyanobacterium sp	107
Desulfobulbus sp	9	Flavobacterium sp	129
Paenibacillus lautus	9	Marichromatium sp	143
Thiorhodovibrio sp	9	Anabaena sp	146
Thiothrix sp	9	Burkholderia sp	153
Desulfuromonas palmitatis	10	Caldithrix sp	168
Fusobacterium sp	10	Desulfosarcina variabilis	168
Gilliamella apicola	10	Desulfosarcina sp	238

Pseudoruegeria sp	10	Desulfurococcus sp	288
Thiopfundum hispidum	10	Muriicola sp	317
Zeaxanthinibacter enoshimensis	11	Dehalococcoides sp	352
Lacinutrix sp	12	Cytophaga sp	385
Sphingobacterium sp	12	Acidobacterium sp	448
Ruegeria sp	13	Methanosphaera sp	2366

## Anexo 5

PD3C			
Clostridium sp	1	Amaricoccus sp	11
Desulforegula sp	1	Hippea sp	11
Methanothermobacter sp	1	Lacinutrix sp	11
Olleya sp	1	Peredibacter sp	11
Rhodobacter sp	1	Thiothrix sp	11
Rhodopirellula sp	1	Ulvibacter sp	11
Anabaena sp	2	Hyphomicrobium hollandicum	12
Anaplasma phagocytophilum	2	Ilumatobacter sp	12
Anderseniella baltica	2	Maricaulis salignorans	12
Bacteriovorax sp	2	Tropicimonas sp	12
Blastopirellula sp	2	Psychroserpens sp	14
Coccinimonas marina	2	Acidimicrobium sp	15
Desulfatibacillum sp	2	Gaiella sp	15
Desulfomicrobium sp	2	Roseovarius sp	15
Haemophilus influenzae	2	Acinetobacter radioresistens	16
Haliea mediterranea	2	Halospirulina sp	16
Lamprocystis purpurea	2	Desulfoglaeba sp	17
Rhodothermus marinus	2	Kangiella sp	17
Roseicyclus mahoneyensis	2	Thiopfundum hispidum	17
Yonghaparkia sp	2	Bacteroides sp	18
Aciditerrimonas sp	3	Desulfonema sp	18
Chroococcopsis gigantea	3	Fluviicola sp	18
Geoalkalibacter sp	3	Haliea sp	18

Geothermobacter sp	3	Sandaracinus sp	18
Granulosicoccus sp	3	Lewinella sp	19
Jeotgalibaca dankookensis	3	Sufflavibacter sp	19
Mariniflexile jejuense	3	Marichromatium sp	21
Methanospirillum sp	3	Flavobacterium sp	23
Propionigenium sp	3	Caldithrix sp	24
Spirochaeta cellobiosiphila	3	Haliscomenobacter sp	26
Thalassobius sp	3	Candidatus Endoriftia persephone	27
Thiohalophilus thiocyanatoxydans	3	Pirellula sp	28
Bacillus sp	4	Desulfomonile sp	29
Brevundimonas sp	4	Holophaga sp	30
Cocleimonas flava	4	Lewinella nigricans	31
Desulfovibrio sp	4	Thermoleophilum sp	31
Fusobacterium sp	4	Thiorhodovibrio sp	32
Oceanicaulis alexandrii	4	Desulfosarcina variabilis	33
Rhodovulum sulfidophilum	4	Bellilinea sp	34
Methylosarcina sp	5	Pseudomonas sp	36
Pseudoruegeria sp	5	Dehalococcoides sp	38
Caldilinea sp	6	Burkholderia sp	45
Coxiella sp	6	Desulfosarcina sp	46
Desulfococcus oleovorans	6	Marinobacter sp	47
Legionella sp	6	Ralstonia sp	47
Mesorhizobium sp	6	Spirochaeta sp	48

Nitrosococcus sp	6	Desulfurococcus sp	51
Octadecabacter sp	6	Lewinella cohaerens	52
Portibacter lacus	6	Bdellovibrio sp	56
Thioprofundum lithotrophicum	6	Muriicola sp	56
Chloroflexus sp	7	Acidobacterium sp	63
Chroococcus dispersus	7	Oceanicola granulosus	63
Klebsiella sp	7	Verrucomicrobium sp	67
Synechococcus sp	7	Ornatilinea apprima	79
Desulfuromusa sp	8	Sphingobacterium sp	80
Marinoscillum sp	8	Methanosphaera sp	84
Planctomyces sp	9	Iamia sp	99
Caldithrix abyssi	10	Streptomyces sp	111
Geobacter sp	10	Cyanobacterium sp	139
Robiginitalea myxolifaciens	10	Thiohalophilus sp	149
Tepidamorphus sp	10	Cytophaga sp	160
Thioalkalivibrio sp	10	Phaeochromatium sp	340

## Anexo 6

PE3C			
Aminobacterium sp	1	Arenicella sp	7
Bacillus aquimaris	1	Caldithrix sp	7
Bdellovibrio sp	1	Desulfosarcina sp	7
Desulfatiglans parachlorophenolica	1	Desulfurococcus sp	7
Elizabethkingia meningoseptica	1	Ferrimicrobium sp	7
Gracilimonas rosea	1	Geoalkalibacter sp	7
Ilumatobacter nonamiensis	1	Lewinella nigricans	7
Methanothermobacter sp	1	Lyngbya sp	7
Peredibacter sp	1	Owenweeksia sp	7
Phycisphaera sp	1	Rhodothermus sp	7
Portibacter lacus	1	Roseicyclus mahoneyensis	7
Prochlorococcus sp	1	Acidimicrobium sp	8
Salinirepens amamiensis	1	Lewinella cohaerens	8
Aureitalea marina	2	Photobacterium sp	8
Bacteriovorax sp	2	Sphingopyxis sp	8
Caldithrix palaeochoryensis	2	Candidatus Endoriftia persephone	9
Commensalibacter sp	2	Desulfomicrobium sp	9
Conexibacter sp	2	Donghicola sp	9
Erythrobacter sp	2	Streptococcus agalactiae	9
Geobacter sp	2	Thiopfundum hispidum	9
Haliangium ochraceum	2	Crocinitomix sp	10
Haloferula helveola	2	Desulfobacter sp	10

Halospirulina sp	2	Desulfobulbus sp	10
Loktanella vestfoldensis	2	Desulforegula sp	10
Opiritutus sp	2	Marichromatium sp	10
Pedosphaera sp	2	Mariniflexile jejuense	10
Pelagicola sp	2	Marinobacter sp	10
Prauserella sp	2	Schlegelella sp	10
Propionigenium sp	2	Tepidamorphus sp	10
Saccharospirillum salsuginis	2	Ulvibacter sp	10
Sandaracinus sp	2	Bacillus sp	11
Sulfurovum sp	2	Methylococcus sp	11
Thermodesulfovibrio sp	2	Pelagibaca bermudensis	11
Thermoleophilum sp	2	Thiopfundum sp	11
Thioalkalivibrio nitratis	2	Ahrensia sp	12
Acidithiomicrobium sp	3	Coccinimonas marina	12
Alteromonas sp	3	Haliaea mediterranea	13
Aureicoccus marinus	3	Lewinella sp	13
Caldithrix abyssi	3	Thiohalophilus thiocyanatoxydans	14
Candidatus Halomonas phosphatis	3	Marinoscillum sp	15
Clostridium sp	3	Winogradskyella sp	15
Cocleimonas flava	3	Muriicola sp	16
Coxiella sp	3	Flexibacter sp	17
Desulfatibacillum sp	3	Hyphomonas sp	17
Gemmatimonas sp	3	Desulfomonile sp	20

Methylocystis sp	3	Haliscomenobacter sp	21
Paenibacillus sp	3	Spirochaeta sp	21
Parvularcula sp	3	Acinetobacter radioresistens	23
Rhodobium sp	3	Dehalococcoides sp	23
Solibacter sp	3	Iamia sp	23
Amaricoccus sp	4	Rhodovulum sulfidophilum	23
Anaeromyxobacter sp	4	Anabaena sp	24
Caldilinea sp	4	Dethiosulfatibacter aminovorans	24
Carboxydotherrmus sp	4	Thioalkalivibrio sp	25
Chondromyces sp	4	Desulfobacterium sp	27
Dasania marina	4	Sphingobacterium sp	27
Deinococcus sp	4	Streptomyces sp	28
Desulfococcus oleovorans	4	Mesorhizobium sp	30
Phaeodactylibacter sp	4	Candidatus Giganthauma karukerense	37
Ralstonia sp	4	Aciditerrimonas sp	38
Rhodospirillum sp	4	Lacinutrix sp	38
Roseovarius sp	4	Oceanicola granulosus	39
Sphingomonas sp	4	Desulfosarcina variabilis	40
Sufflavibacter sp	4	Desulfoglaeba sp	41
Thermus sp	4	Pirellula sp	41
Truepera sp	4	Ruegeria sp	41
Vibrio sp	4	Pseudohalaea rubra	43
Blastopirellula sp	5	Verrucomicrobium sp	43



Flexithrix dorotheae	5	Flavobacterium sp	45
Geothermobacter sp	5	Cyanobium sp	48
Loktanella sp	5	Psychroserpens sp	49
Methanosphaera sp	5	Actibacter sp	50
Pelagibius sp	5	Zeaxanthinibacter enoshimensis	51
Planctomyces sp	5	Thiohalophilus sp	53
Rhodobacter sp	5	Haliea sp	57
Desulfuromusa sp	6	Synechococcus sp	67
Halioglobus japonicus	6	Holophaga sp	70
Ilumatobacter sp	6	Cyanobacterium sp	75
Kangiella sp	6	Pseudoruegeria sp	78
Octadecabacter sp	6	Pseudomonas sp	80
Pelobacter sp	6	Cytophaga sp	89
Roseobacter sp	6	Desulfonema sp	89
Anderseniella baltica	7	Acidobacterium sp	201

### Anexo 7

SA2C			
Amaricoccus sp	1	Methylococcus sp	8
Aquabacterium sp	1	Roseibacillus persicicus	8
Bacillus decolorationis	1	Syntrophus sp	8
Bdellovibrio sp	1	Allokutzneria sp	9
Caldithrix palaeochoryensis	1	Cloacibacillus sp	9
Candidatus Endoriftia persephone	1	Coccinimonas marina	9
Caulobacter sp	1	Crocinitomix sp	9
Cyanobacterium sp	1	Dethiosulfatibacter sp	9
Desulfatiglans parachlorophenolica	1	Halobacillus sp	9
Desulfobulbus sp	1	Ilumatobacter sp	9
Flexibacter sp	1	Lewinella sp	9
Fluviicola sp	1	Pontibacillus chungwhensis	9
Haliea mediterranea	1	Haliscomenobacter sp	10
Maritimimonas rapanae	1	Marichromatium sp	10
Nitrosococcus sp	1	Sphingopyxis sp	10
Photobacterium sp	1	Acinetobacter radioresistens	11
Rhodopirellula sp	1	Anaeromyxobacter sp	11
Robiginitalea myxolifaciens	1	Mariniflexile jejuense	11
Sporichthya sp	1	Aminomonas sp	12
Syntrophorhabdus sp	1	Caldilinea sp	12
Thiohalocapsa halophila	1	Rhodobium sp	12
Truepera sp	1	Desulfonispora sp	13
Vibrio sp	1	Ulvibacter sp	13

Arthrobacter sp	2	Winogradskyella sp	13
Bacteroides sp	2	Caldithrix sp	14
Desulfobacter sp	2	Methanoculleus sp	14
Enhygromyxa salina	2	Thiohalophilus thiocyanatoxydans	14
Flexithrix dorotheae	2	Caldithrix abyssi	15
Halochromatium sp	2	Desulfurococcus sp	15
Halospirulina sp	2	Loktanella vestfoldensis	15
Loktanella sp	2	Roseobacter sp	15
Methanosalsum zhilinae	2	Blastopirellula sp	16
Nitrosospira sp	2	Acidithiomicrobium sp	18
Olleya sp	2	Candidatus Cloacimonas sp	18
Pelagibius sp	2	Gaiella sp	18
Planctomyces maris	2	Marinoscillum sp	18
Polaromonas sp	2	Ornatilinea apprima	18
Pseudoalteromonas sp	2	Desulfomonile sp	20
Rhodobacter sp	2	Alkaliphilus sp	21
Rubrobacter sp	2	Dehalococcoides sp	21
Sunxiuqinia sp	2	Desulfomicrobium sp	21
Syntrophomonas sp	2	Planctomyces sp	21
Thermincola sp	2	Sphingobacterium sp	22
Thermoleophilum sp	2	Acidimicrobium sp	25
Thermotomaculum hydrothermale	2	Donghicola sp	25
Turcibacter sp	2	Ilumatobacter nonamiensis	25

Vallitalea sp	2	Roseovarius sp	26
Ahrensia sp	3	Anderseniella baltica	27
Desulfoglaeba sp	3	Methanogenium sp	27
Desulfonema sp	3	Psychrobacter sp	27
Ferrimicrobium sp	3	Pelagibaca bermudensis	29
Fusibacter sp	3	Bacillus sp	30
Ignavibacterium album	3	Octadecabacter sp	30
Lewinella cohaerens	3	Exiguobacterium sp	32
Methanogenium frigidum	3	Streptomyces sp	32
Opitutus sp	3	Bellilinea sp	34
Propionigenium sp	3	Pseudomonas sp	35
Rhodospirillum sp	3	Rhodovulum sulfidophilum	38
Tepidamorphus sp	3	Cocleimonas flava	39
Thiorhodospira sp	3	Prolixibacter sp	39
Thiothrix sp	3	Geobacter sp	40
Dehalobacterium formicoaceticum	4	Flavobacterium sp	41
Desulfobacterium sp	4	Haliea sp	41
Desulfococcus sp	4	Holophaga sp	42
Desulfofaba fastidiosa	4	Thiohalophilus sp	42
Desulfovibrio sp	4	Zeaxanthinibacter enoshimensis	44
Ectothiorhodospira sp	4	Psychroserpens sp	45
Herbaspirillum sp	4	Cyanobium sp	48
Prochlorococcus sp	4	Pirellula sp	49
Rhodopila sp	4	Mesorhizobium sp	50

Rhodothermus sp	4	Acidaminobacter sp	56
Streptococcus agalactiae	4	Spirochaeta sp	63
Thermobaculum sp	4	Verrucomicrobium sp	74
Anaerovorax sp	5	Burkholderia sp	79
Gemmatimonas sp	5	Lacinutrix sp	84
Haloferula helveola	5	Sulfurovum sp	89
Portibacter lacus	5	Leptospira sp	93
Thermus sp	5	Pseudoruegeria sp	95
Anaerophaga sp	6	Ruegeria sp	98
Antarctobacter sp	6	Oceanicola granulosus	101
Arenicella sp	6	Desulfosarcina variabilis	104
Coxiella sp	6	Acidobacterium sp	106
Desulfosarcina sp	6	Thioalkalivibrio sp	106
Dongia sp	6	Synechococcus sp	107
Kosmotoga pacifica	6	Muriicola sp	119
Lewinella nigricans	6	Aciditerrimonas sp	129
Oceanirhabdus sediminicola	6	Iamia sp	175
Roseicyclus mahoneyensis	6	Phaeochromatium sp	194
Thiorhodovibrio sp	6	Actibacter sp	197
Desulfofaba sp	7	Clostridium sp	228
Lysinimicrobium mangrovi	7	Planococcus sp	678
Paenibacillus sp	7	Cytophaga sp	870
Thiopfundum sp	7	Aminobacterium sp	1911

### Anexo 8

SB2C			
Bacillus sp	1	Halobacillus sp	7
Desulfomicrobium apsheronum	1	Thiopfundum hispidum	7
Desulfomonile sp	1	Lacinutrix sp	8
Gaiella sp	1	Candidatus Nucleicultrix amoebiphila	9
Methanococcoides sp	1	Haliea sp	9
Roseovarius sp	1	Methanolobus sp	9
Solirubrobacter sp	1	Spirochaeta sp	9
Ulvibacter sp	1	Acidithiomicrobium sp	11
Crocinitomix sp	2	Bradyrhizobium sp	11
Desulfitobacterium sp	2	Conexibacter sp	11
Desulfomonile limimaris	2	Nitrosococcus sp	11
Methanoculleus sp	2	Ruegeria sp	11
Methanosalsum zhilinae	2	Thermomicrobium sp	11
Thermotogales bacterium	2	Arthrobacter sp	12
Thiorhodovibrio sp	2	Herbaspirillum sp	12
Caldilinea sp	3	Synechococcus sp	13
Catellatospora sp	3	Thiohalophilus sp	13
Caulobacter sp	3	Bacteroides fragilis	16
Corynebacterium sp	3	Desulfomicrobium sp	16
Desulfosarcina variabilis	3	Desulfurococcus sp	16
Dethiosulfatibacter aminovorans	3	Staphylococcus sp	17
Lewinella nigricans	3	Thermotomaculum hydrothermale	17

Loktanelia vestfoldensis	3	Aciditerrimonas sp	20
Methanogenium sp	3	Thermoleophilum sp	20
Methanothermobacter sp	3	Clostridium sp	22
Pirellula sp	3	Halospirulina sp	23
Planococcus sp	3	Iamia sp	23
Pseudomonas sp	3	Dehalococcoides sp	26
Caldithrix sp	4	Flavobacterium sp	26
Desulfonema sp	4	Holophaga sp	27
Fluviicola sp	4	Aquabacterium sp	28
Ilumatobacter nonamiensis	4	Oceanicola granulosus	28
Lewinella cohaerens	4	Methanosphaera sp	29
Acinetobacter radioresistens	5	Ornatilinea apprima	29
Desulfofaba sp	5	Streptomyces sp	31
Desulfuromusa sp	5	Geobacter sp	36
Ilumatobacter sp	5	Syntrophus sp	37
Lysinimicrobium mangrovi	5	Sphingobacterium sp	39
Roseobacter sp	5	Pseudoalteromonas sp	51
Steroidobacter sp	5	Actibacter sp	58
Bacillus decolorationis	6	Verrucomicrobium sp	60
Desulfobacterium sp	6	Acidobacterium sp	61
Lewinella sp	6	Sulfurovum sp	64
Mariniflexile jejuense	6	Exiguobacterium sp	92
Pseudoruegeria sp	6	Muriicola sp	94
Psychroserpens sp	6	Phaeochromatium sp	115

Rhodopila sp	6	Burkholderia sp	185
Zeaxanthinibacter enoshimensis	6	Cytophaga sp	313
Acidimicrobium sp	7	Aminobacterium sp	372
Candidatus Cloacimonas sp	7	Psychrobacter sp	2268



### Anexo 9

SB2C			
Bacillus sp	1	Halobacillus sp	7
Desulfomicrobium apsheronum	1	Thiopfundum hispidum	7
Desulfomonile sp	1	Lacinutrix sp	8
Gaiella sp	1	Candidatus Nucleicultrix amoebiphila	9
Methanococcoides sp	1	Haliaea sp	9
Roseovarius sp	1	Methanolobus sp	9
Solirubrobacter sp	1	Spirochaeta sp	9
Ulvibacter sp	1	Acidithiomicrobium sp	11
Crocinitomix sp	2	Bradyrhizobium sp	11
Desulfitobacterium sp	2	Conexibacter sp	11
Desulfomonile limimaris	2	Nitrosococcus sp	11
Methanoculleus sp	2	Ruegeria sp	11
Methanosalsum zhilinae	2	Thermomicrobium sp	11
Thermotogales bacterium	2	Arthrobacter sp	12
Thiorhodovibrio sp	2	Herbaspirillum sp	12
Caldilinea sp	3	Synechococcus sp	13
Catellatospora sp	3	Thiohalophilus sp	13
Caulobacter sp	3	Bacteroides fragilis	16
Corynebacterium sp	3	Desulfomicrobium sp	16
Desulfosarcina variabilis	3	Desulfurococcus sp	16
Dethiosulfatibacter aminovorans	3	Staphylococcus sp	17
Lewinella nigricans	3	Thermotomaculum hydrothermale	17

Loktanelia vestfoldensis	3	Aciditerrimonas sp	20
Methanogenium sp	3	Thermoleophilum sp	20
Methanothermobacter sp	3	Clostridium sp	22
Pirellula sp	3	Halospirulina sp	23
Planococcus sp	3	Iamia sp	23
Pseudomonas sp	3	Dehalococcoides sp	26
Caldithrix sp	4	Flavobacterium sp	26
Desulfonema sp	4	Holophaga sp	27
Fluviicola sp	4	Aquabacterium sp	28
Ilumatobacter nonamiensis	4	Oceanicola granulosus	28
Lewinella cohaerens	4	Methanosphaera sp	29
Acinetobacter radioresistens	5	Ornatilinea apprima	29
Desulfofaba sp	5	Streptomyces sp	31
Desulfuromusa sp	5	Geobacter sp	36
Ilumatobacter sp	5	Syntrophus sp	37
Lysinimicrobium mangrovi	5	Sphingobacterium sp	39
Roseobacter sp	5	Pseudoalteromonas sp	51
Steroidobacter sp	5	Actibacter sp	58
Bacillus decolorationis	6	Verrucomicrobium sp	60
Desulfobacterium sp	6	Acidobacterium sp	61
Lewinella sp	6	Sulfurovum sp	64
Mariniflexile jejuense	6	Exiguobacterium sp	92
Pseudoruegeria sp	6	Muriicola sp	94
Psychroserpens sp	6	Phaeochromatium sp	115

Rhodopila sp	6	Burkholderia sp	185
Zeaxanthinibacter enoshimensis	6	Cytophaga sp	313
Acidimicrobium sp	7	Aminobacterium sp	372
Candidatus Cloacimonas sp	7	Psychrobacter sp	2268

### Anexo 10

SA1C			
Alteromonas sp	1	Paenibacillus sp	7
Coccinimonas marina	1	Vibrio sp	7
Desulfatibacillum sp	1	Acidimicrobium sp	8
Desulfomonile tiedjei	1	Coxiella symbiont	8
Ilumatobacter nonamiensis	1	Cyanobium sp	8
Micavibrio sp	1	Clostridium sp	9
Octadecabacter sp	1	Lacinutrix sp	9
Opiritus sp	1	Winogradskyella sp	9
Parvularcula sp	1	Acinetobacter radioresistens	10
Pelobacter sp	1	Methanosphaera sp	10
Phaeochromatium sp	1	Rhodovulum sulfidophilum	10
Rhodobium sp	1	Ilumatobacter sp	11
Streptococcus agalactiae	1	Psychrobacter sp	11
Amaricoccus sp	2	Allokutzneria sp	12
Anderseniella baltica	2	Aureitalea marina	12
Coraliomargarita sp	2	Flexibacter sp	13
Cyanobacterium sp	2	Herbaspirillum sp	13
Flexithrix dorotheae	2	Mariniflexile jejuense	13
Frankia sp	2	Bacillus sp	14
Haliscomenobacter sp	2	Caldithrix palaeochoryensis	14
Hyphomicrobium sp	2	Desulfobacterium sp	14
Lewinella nigricans	2	Enterococcus faecalis	14
Marinimicrobium sp	2	Methylosarcina sp	14

Oxalophagus sp	2	Planctomyces sp	14
Planococcus sp	2	Thiorhodovibrio sp	14
Rubrobacter sp	2	Halospirulina sp	15
Streptococcus sp	2	Loktanella sp	15
Bellilinea sp	3	Zeaxanthinibacter enoshimensis	15
Chondromyces sp	3	Desulfococcus oleovorans	17
Desulfomonile limimaris	3	Geoalkalibacter sp	17
Desulfovibrio cavernae	3	Spirochaeta sp	17
Ectothiorhodospira sp	3	Aquabacterium sp	19
Haliea sp	3	Pontibacillus chungwhensis	20
Klebsiella sp	3	Psychroserpens sp	20
Marinoscillum sp	3	Blastopirellula sp	21
Methylococcus sp	3	Halobacillus sp	21
Methylocystis sp	3	Pseudoruegeria sp	21
Oceanirhabdus sedimnicola	3	Pseudomonas sp	22
Ochrobactrum sp	3	Sporichthya sp	22
Ornatilinea apprima	3	Ulvibacter sp	22
Pelagibaca bermudensis	3	Desulforegula sp	24
Phycisphaera sp	3	Desulfoglaeba sp	26
Rhodopila sp	3	Synechococcus sp	29
Steroidobacter sp	3	Acidithiomicrobium sp	30
Syntrophorhabdus sp	3	Geobacter sp	32
Thermoleophilum sp	3	Streptomyces sp	32
Trichococcus sp	3	Caldithrix sp	33

Vallitalea guaymasensis	3	Desulfomicrobium sp	34
Arenicella sp	4	Roseovarius sp	37
Caldithrix abyssi	4	Aciditerrimonas sp	38
Desulfobacter sp	4	Oceanicola granulosus	38
Gemmatimonas sp	4	Verrucomicrobium sp	39
Haliaea mediterranea	4	Desulfonema sp	41
Sufflavibacter sp	4	Mesorhizobium sp	41
Yonghaparkia sp	4	Sphingobacterium sp	41
Desulfosarcina sp	5	Thiohalophilus sp	44
Marinobacter sp	5	Desulfuromusa sp	45
Ochrobactrum thiophenivorans	5	Candidatus Endoriftia persephone	46
Pedosphaera sp	5	Desulfurococcus sp	47
Roseobacter sp	5	Pirellula sp	56
Syntrophus sp	5	Desulfomonile sp	57
Tepidamorphus sp	5	Iamia sp	61
Aureicoccus marinus	6	Ruegeria sp	63
Bradyrhizobium sp	6	Thioalkalivibrio sp	69
Carboxydotherrmus sp	6	Dehalococcoides sp	72
Gaiella sp	6	Muriicola sp	84
Rheinheimera sp	6	Cytophaga sp	93
Smithella sp	6	Holophaga sp	97
Aminobacterium sp	7	Desulfosarcina variabilis	107
Candidatus Pelagibacter sp	7	Actibacter sp	157

Caulobacter sp	7	Flavobacterium sp	161
Enterococcus faecium	7	Burkholderia sp	407
Loktanella vestfoldensis	7	Acidobacterium sp	467

### Anexo 11

SB1C			
Acidaminobacter sp	1	Desulfobacterium sp	13
Alkaliphilus sp	1	Desulfococcus oleovorans	13
Anaerovorax sp	1	Desulfococcus sp	13
Clostridium botulinum	1	Desulfofaba fastidiosa	14
Clostridium butyricum	1	Desulfofaba sp	14
Clostridium grantii	1	Desulfonema magnum	15
Clostridium sp	1	Desulfonema sp	15
Dethiosulfatibacter aminovorans	1	Desulforegula sp	15
Dethiosulfatibacter sp	1	Desulfosarcina sp	16
Enterococcus faecalis	1	Desulfosarcina variabilis	16
Enterococcus faecium	1	Desulfobulbus sp	17
Fusibacter sp	1	Desulfomicrobium apsheronum	17
Oceanirhabdus sediminicola	1	Desulfomicrobium sp	17
Pediococcus pentosaceus	1	Desulfovibrio cavernae	18
Streptococcus agalactiae	1	Desulfovibrio sp	18
Streptococcus gallolyticus	1	Desulfuromonas palmitatis	19
Streptococcus sp	1	Hippea sp	19
Trichococcus sp	1	Desulfuromonas sp	20
Acetivibrio sp	2	Desulfuromusa sp	20
Alkalibacter sp	2	Geoalkalibacter sp	20
Carboxydotherrmus sp	2	Geobacter sp	21
Coprococcus sp	2	Geothermobacter sp	21
Desulfitobacterium sp	2	Pelobacter sp	21



Desulfonispora sp	2	Anaeromyxobacter sp	23
Dethiobacter sp	2	Haliangium ochraceum	23
Eubacterium sp	2	Chondromyces crocatus	24
Eubacterium tarantellae	2	Chondromyces sp	24
Gelria glutamica	2	Sandaracinus sp	24
Halocella cellulositytica	2	Enhygromyxa salina	25
Natranaerovirga pectinivora	2	Desulfobacca sp	26
Orenia marismortui	2	Desulfomonile limimaris	27
Orenia sp	2	Desulfomonile sp	28
Pelotomaculum sp	2	Desulfomonile tiedjei	28
Syntrophomonas sp	2	Smithella sp	28
Tepidibacter formicigenes	2	Desulfacinum sp	30
Thermincola sp	2	Syntrophus sp	30
Thermoanaerobacterium sp	2	Desulfoglaeba sp	31
Turcibacter sp	2	Syntrophorhabdus sp	31
Vallitalea guaymasensis	2	Candidatus Desulfamplus magnetomortis	34
Vallitalea sp	2	Arcobacter sp	35
Blastopirellula sp	3	Wolinella sp	37
Brevundimonas sp	3	Acidithiobacillus sp	38
Caulobacter sp	3	Alteromonas sp	38
Fusobacterium sp	3	Sulfurovum sp	38
Gemmatimonas sp	3	Haliea mediterranea	39
Ignavibacterium album	3	Haliea sp	39

Ignavibacterium sp	3	Marinimicrobium sp	39
Magnetococcus sp	3	Marinobacter sp	39
Nitrospina sp	3	Marinobacterium stanieri	40
Nitrospira sp	3	Microbulbifer sp	41
Parvularcula sp	3	Ferrimonas sp	42
Phenylobacterium sp	3	Pseudoalteromonas sp	42
Phycisphaera sp	3	Halioglobus japonicus	43
Pirellula sp	3	Halochromatium sp	43
Planctomyces maris	3	Lamprocystis purpurea	43
Planctomyces sp	3	Marichromatium sp	44
Propionigenium sp	3	Nitrosococcus sp	46
Rhodopirellula sp	3	Phaeochromatium sp	46
Thermodesulfovibrio sp	3	Rheinheimera sp	46
Ahrensia sp	4	Thiobaca trueperi	47
Albidovulum sp	4	Ectothiorhodospira sp	48
Amaricoccus sp	4	Thioalkalivibrio nitratis	48
Anderseniella baltica	4	Thiohalocapsa halophila	48
Bradyrhizobium sp	4	Thiorhodovibrio sp	48
Hirschia baltica	4	Thioalkalivibrio sp	49
Hyphomicrobium hollandicum	4	Thiorhodospira sp	50
Hyphomicrobium sp	4	Granulosicoccus sp	51
Hyphomonas johnsonii	4	Thiohalophilus sp	52
Hyphomonas sp	4	Thiohalophilus thiocyanatoxydans	54
Maricaulis salignorans	4	Thiopfundum hispidum	54

Maricaulis sp	4	Thiopfundum lithotrophicum	60
Mesorhizobium sp	4	Thiopfundum sp	60
Methylocystis sp	4	Escherichia coli	66
Oceanicaulis alexandrii	4	Klebsiella sp	67
Ochrobactrum sp	4	Salmonella enterica	71
Ochrobactrum thiophenivorans	4	Aquicella sp	73
Rhizobium sp	4	Coxiella cheraxi	77
Rhizobium tropici	4	Coxiella sp	78
Rhodobium sp	4	Coxiella symbiont	80
Tepidamorphus sp	4	Legionella sp	83
Antarctobacter sp	5	Methylococcus sp	90
Donghicola sp	5	Methylosarcina sp	90
Loktanella sp	5	Alcanivorax sp	93
Loktanella vestfoldensis	5	Arenicella sp	95
Oceanicola granulosus	5	Kangiella sp	95
Octadecabacter sp	5	Candidatus Halomonas phosphatis	101
Pelagibaca bermudensis	5	Marinomonas sp	102
Pelagicola sp	5	Saccharospirillum salsuginis	109
Pseudoruegeria sp	5	Gilliamella apicola	115
Rhodobacter sp	5	Haemophilus influenzae	115
Rhodovulum sulfidophilum	5	Saccharospirillum sp	115
Roseicyclus mahoneyensis	5	Acinetobacter radioresistens	116
Roseobacter sp	5	Acinetobacter sp	116
Roseovarius sp	5	Moraxella sp	122

Azospirillum brasilense	6	Psychrobacter sp	129
Commensalibacter sp	6	Dasania marina	130
Defluviicoccus sp	6	Pseudomonas sp	130
Dongia sp	6	Thiomicrospira sp	132
Pelagibius sp	6	Cocleimonas flava	144
Rhodopila sp	6	Thiothrix sp	146
Rhodospirillum sp	6	Candidatus Competibacter sp	156
Ruegeria sp	6	Candidatus Endoriftia persephone	159
Thalassobius sp	6	Pseudohaliera rubra	160
Tropicimonas sp	6	Spongiibacter sp	164
Anaplasma phagocytophilum	7	Photobacterium sp	190
Blastomonas sp	7	Vibrio sp	204
Candidatus Nucleicultrix amoebiphila	7	Steroidobacter sp	210
Candidatus Pelagibacter sp	7	Ignatzschineria larvae	240
Erythrobacter sp	7	Stenotrophomonas acidaminiphila	250
Micavibrio sp	7	Leptospira sp	281
Porphyrobacter meromictius	7	Spirochaeta cellobiosiphila	323
Porphyrobacter sp	7	Spirochaeta sp	326
Sphingomonas sp	7	Aminobacterium sp	366
Sphingopyxis sp	7	Aminomonas sp	377
Aquabacterium sp	8	Cloacibacillus sp	378
Burkholderia sp	8	Candidatus Lumbricincola sp	414
Herbaspirillum sp	8	Kosmotoga pacifica	451

Limnobacter sp	8	Thermotogales bacterium	456
Polaromonas sp	8	Caldithrix abyssi	508
Ralstonia sp	8	Caldithrix palaeochoryensis	513
Schlegelella sp	8	Caldithrix sp	533
Nitrospira sp	9	Thermobaculum sp	587
Tepidimonas sp	9	Opitutus sp	740
Thauera sp	9	Coralimargarita sp	803
Algorimarina butyrica	10	Pedosphaera parvula	1663
Bacteriovorax sp	10	Pedosphaera sp	1840
Bdellovibrio sp	10	Haloferula helveola	1920
Peredibacter sp	10	Luteolibacter cuticulihirudinis	2038
Algorimarina sp	11	Luteolibacter pohnpeiensis	2094
Desulfatibacillum sp	11	Roseibacillus persicicus	2449
Desulfatiferula sp	11	Roseibacillus sp	2801
Desulfatiglans parachlorophenolica	12	Verrucomicrobium sp	3830
Desulfobacter sp	12		

## Anexo 12

SC1C			
Arthrobacter sp	1	Vallitalea sp	8
Desulfomicrobium sp	1	Ornithinibacillus sp	9
Loktanella sp	1	Sporichthya sp	9
Maribacter sp	1	Thiobaca trueperi	9
Mariniflexile jejuense	1	Acinetobacter sp	10
Mariniphaga anaerophila	1	Roseovarius sp	10
Thiohalophilus sp	1	Acidimicrobium sp	11
Thiohalophilus thiocyanatoxydans	1	Desulfomonile limimaris	11
Aquabacterium sp	2	Dethiobacter sp	11
Bellilinea sp	2	Merismopedia sp	11
Desulfococcus sp	2	Burkholderia sp	12
Lacinutrix sp	2	Clostridium grantii	13
Methanosaeta sp	2	Bacillus sp	14
Methylocystis sp	2	Desulfosarcina variabilis	14
Streptococcus agalactiae	2	Planctomyces sp	14
Thermomicrobium sp	2	Aminomonas sp	16
Winogradskyella sp	2	Muriicola sp	17
Catellatospora sp	3	Kosmotoga pacifica	18
Methanoculleus sp	3	Thioalkalivibrio sp	18
Methanothermobacter sp	3	Geobacter sp	19
Mycobacterium sp	3	Coxiella sp	20
Pelobacter sp	3	Desulfobacterium sp	20
Sphingobacterium sp	3	Oceanicola granulosus	20

Ahrensia sp	4	Actibacter sp	21
Haliscomenobacter sp	4	Anderseniella baltica	24
Methanococcoides sp	4	Dehalococcoides sp	24
Planococcus sp	4	Halospirulina sp	26
Rhodovulum sulfidophilum	4	Pirellula sp	26
Staphylococcus sp	4	Desulfofaba sp	28
Verrucomicrobium sp	4	Sufflavibacter sp	35
Bradyrhizobium sp	5	Methanogenium sp	40
Desulfobacter sp	5	Ornatilinea apprima	41
Leptolinea sp	5	Ruegeria sp	42
Acidobacterium sp	6	Caldithrix sp	43
Algorimarina sp	6	Spirochaeta sp	49
Haliea sp	6	Sulfurovum sp	57
Ignavibacterium sp	6	Clostridium sp	70
Methanolobus sp	6	Flavobacterium sp	71
Nitrospira sp	6	Clostridium butyricum	80
Enterococcus faecalis	7	Methanosphaera sp	85
Methanosalsum zhilinae	7	Desulfurococcus sp	116
Pseudoruegeria sp	7	Psychrobacter sp	145
Candidatus Cloacimonas sp	8	Syntrophus sp	146
Pseudomonas sp	8	Cytophaga sp	479
Psychroserpens sp	8	Aminobacterium sp	820