

**Estudio metatranscriptómico de mecanismos metabólicos implicados en la degradación
microbiana de asfaltenos en suelo**

Mayra Alejandra Parada Peñaloza

Trabajo de Grado para Optar al Título de Magíster en Microbiología

Director

German Alexis Zafra Sierra

Doctor en Biotecnología

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Salud

Escuela de Microbiología

Maestría en Microbiología

Bucaramanga

2023

Tabla de Contenido

	Pág.
Introducción	8
Objetivos	12
1.1 Objetivo General	12
1.2 Objetivos Específicos.....	12
2. Marco conceptual.....	13
2.1 Generalidades del petróleo crudo.....	13
2.2 Fracción asfáltica del petróleo crudo	14
2.3 Biodegradación de hidrocarburos del petróleo	16
2.4. Biorremediación de suelos impactados con hidrocarburos del petróleo.....	18
2.5 Transcriptómica	19
3. Metodología	21
3.1 Muestras de suelo y asfaltenos.....	21
3.2 Consorcio microbiano degradador	21
3.3 Ensayos de biodegradación de asfaltenos en suelo.....	22
3.4 Seguimiento analítico de la biodegradación	23
3.4.1 Medición de la actividad microbiana.....	24
3.4.2 Cuantificación de la biodegradación.....	24
3.5 Extracción de ARN total y secuenciación masiva de transcritos.....	25
3.6 Análisis bioinformático.....	26
3.6.1 Control de calidad de secuencias crudas.....	26
3.6.2 Análisis de perfiles transcriptómicos mediante MG-RAST	26

3.6.3 Multiensamblaje y análisis de expresión génica diferencial.....	27
3.6.5. Análisis estadístico.....	28
4. Resultados y discusión.....	29
4.1 Seguimiento analítico de la biodegradación de asfaltenos en suelo	29
4.1.1. Medición de la actividad microbiana durante la biodegradación	29
4.1.2 Medición de la biodegradación de asfaltenos en suelo.....	30
4.2 Patrones de expresión génica durante la degradación de los asfaltenos en suelo.....	36
4.3 Análisis de expresión génica diferencial entre reactores contaminados y no contaminados con asfaltenos.....	41
4.3 Mecanismos metabólicos implicados en la degradación de los asfaltenos en suelo.....	52
5. Conclusiones.....	55
6. Recomendaciones	57
Referencias Bibliográficas	58

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1 Diseño experimental de los ensayos de biodegradación de asfaltenos en suelo.....	23
Tabla 2 Utilización/degradación de sustratos por aislados bacterianos que componen el consorcio microbiano degradador de asfaltenos.....	32
Tabla 3 Principales cambios en la expresión génica atribuibles a la biodegradación de asfaltenos.	42

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1 Estructura molecular de los asfaltenos.....	15
Figura 2 Concentración de CO ₂ producida durante la biodegradación de asfaltenos en suelo.....	31
Figura 3 Biodegradación de asfaltenos luego de 52 días de incubación.....	35
Figura 4 Abundancia de transcritos agrupados por familias de genes según el nivel 1 de la ortología KEGG	37
Figura 5 Gráfico de barras de error de las familias de genes según el nivel 2 de la ortología KEGG	38
Figura 6 Gráfico de barras de error de las familias de genes según el nivel 3 de la ortología KEGG entre suelos contaminados y no contaminados con asfaltenos al día 52 de tratamiento.....	39
Figura 7 Estructura química del menaquinol	45
Figura 8 Expresión de genes que codifican para transportadores ABC por parte del consorcio microbiano en el día 52 de tratamiento.....	47
Figura 9 Gráfico de tipo Volcano plot que representa gráficamente la expresión génica diferencial por parte del consorcio microbiano en presencia de suelos contaminados con asfaltenos	49
Figura 10 Expresión de genes relacionados con la ruta metabólica del ácido cítrico como posible mecanismo energético involucrado en la degradación de asfaltenos.....	50
Figura 11 Expresión de genes relacionados con la ruta metabólica de la glucólisis como posible mecanismo metabólico involucrado en la degradación de asfaltenos	51

Resumen

Título: Estudio metatranscriptómico de mecanismos metabólicos implicados en la degradación microbiana de asfaltenos en suelo*

Autor: Mayra Alejandra Parada Peñaloza**

Palabras Clave: Asfaltenos, Biodegradación, Biorremediación, Metatranscriptómica.

Descripción: La fracción asfáltica corresponde a la porción de mayor peso molecular, hidrofobicidad y complejidad estructural del petróleo; esto le confiere a los asfaltenos una gran resistencia a la biodegradación. Se han reportado microorganismos capaces de biotransformar asfaltenos, sin embargo, hasta la fecha, las rutas metabólicas específicas involucradas en el proceso continúan siendo desconocidas. El objetivo del presente trabajo fue identificar posibles mecanismos metabólicos implicados en la degradación de asfaltenos en suelo por parte de un consorcio microbiano degradador, mediante el análisis de los perfiles de expresión génica. Se llevaron a cabo ensayos de biodegradación en suelo contaminado con 5000 ppm de asfaltenos por un total de 52 días utilizando un consorcio microbiano degradador. Los cambios en la expresión génica se evaluaron mediante *RNA-seq* y metatranscriptómica funcional a partir de muestras de ARN tempranas (día 6) y tardías (día 52) entre suelos contaminados y no contaminados. Se efectuó un seguimiento analítico de la biodegradación por medio de mediciones de CO₂ y el porcentaje de biodegradación. Se obtuvo una eficiencia de la biodegradación del 86% al día 52 de incubación, asociado a una actividad metabólica significativamente mayor en suelos contaminados. Se evidenció una sobreexpresión de genes pertenecientes a diferentes procesos metabólicos y fisiológicos, de los cuales fue posible concluir que, los posibles mecanismos metabólicos asociados a la degradación de asfaltenos corresponden al metabolismo de carbohidratos, aminoácidos y oxidación de compuestos aromáticos mediante enzimas de tipo citocromo oxidasas, posible obtención alternativa de energía mediante la β -oxidación y producción de *novo* de GMP, además de rutas metabólicas como la glucólisis y el ciclo del ácido cítrico. Los posibles mecanismos fisiológicos estuvieron asociados con la tolerancia y adaptación, así como con como la expresión de transportadores de tipo ABC, procesamiento de la información genética y ambiental.

* Trabajo de Grado

** Facultad de Salud. Escuela de Microbiología. Director: German Alexis Zafra Sierra, PhD. En Ciencias en Biotecnología.

Abstract

Title: Metatranscriptomic study of metabolic mechanisms involved in the microbial degradation of asphaltenes in soil *

Author(s): Mayra Alejandra Parada Peñaloza **

Key Words: Asphaltenes, Biodegradation, Bioremediation, Metatranscriptomics.

Description: The asphaltenic fraction corresponds to the portion with the highest molecular weight, hydrophobicity, and structural complexity of the heavy crude oil, which confers asphaltenes a great resistance to biodegradation. Microorganisms capable of biotransforming asphaltenes have been reported, however, to date, the metabolic pathways remain unknown. The objective of this work was to identify the possible metabolic mechanisms involved in the degradation of asphaltenes in soil by a microbial consortium, through the analysis of gene expression profiles. Biodegradation tests were carried out in asphaltenes-contaminated soil with 5000 ppm asphaltenes for 52 days using a degrading microbial consortium. Changes in gene expression were assessed by RNA-seq and functional metatranscriptomics from early (day 6) and late (day 52) RNA samples between contaminated and uncontaminated reactors. An analytical follow-up of the biodegradation was carried out by measuring CO₂ and the percentage of biodegradation. A biodegradation efficiency of 86% was obtained at day 52 of incubation, associated with a significantly higher metabolic activity in contaminated soils. An overexpression of genes belonging to different metabolic and physiological processes was evidenced, from which it was possible to conclude that the possible metabolic mechanisms associated with the degradation of asphaltenes corresponding to the metabolism of carbohydrates, amino acids, and oxidation of aromatic compounds by means of enzymes of the cytochrome oxidase type, a possible alternative for obtaining energy through β -oxidation and de novo production of GMP, in addition to metabolic pathways such as glycolysis and the citric acid cycle. The possible physiological mechanisms associated with tolerance and adaptation included the expression of ABC transporters and the processing of genetic and environmental information.

* Bachelor Thesis

**Faculty of Health. School of Microbiology. Director: German Alexis Zafra Sierra. PhD. in Sciences in Biotechnology.

Introducción

El petróleo es uno de los recursos naturales más importantes del planeta, siendo reconocido como el principal combustible fósil de la sociedad. Sin embargo, la contaminación por hidrocarburos del petróleo se ha convertido en uno de las principales problemáticas ambientales de interés mundial, debido a sus consecuencias en la salud humana y ecológica generada por la toxicidad de sus constituyentes (Michael-Igolima et al., 2022). Teniendo en cuenta el reporte de del *Environmental Justice Atlas*, en America Latina se presentan el 30,2% de los conflictos socioambientales asociados a la industria petrolera a nivel mundial, siendo estos más frecuentes en México, Colombia, Perú y Venezuela (Rojas-Bahamón et al., 2022).

En Colombia, el consolidado de producción de petróleo fue de 736.356 barriles promedio día para el año 2021. El departamento de Santander se caracteriza por sus reservas de petróleo crudo pesado, cuya producción ha incrementado hasta un 137% durante los años 2004 y 2017, pasando de 24,7 mil barriles promedio por día a 58,4 mil barriles promedio día en 2017 (Malagón, 2016; Martínez, 2018). Según Ecopetrol, 697 mil barriles de petróleo diarios fueron producidos en el 2020, así mismo, se presentaron 13 eventos de pérdida de contención P hidrocarburos de causa operativa con afectación de suelos y recursos hídricos (Ecopetrol S.A, 2020).

Los derrames accidentales de crudo ocurren durante y/o como resultado de la extracción, producción, almacenamiento, refinación, transporte del petróleo, fugas de oleoductos y contenedores (Al-Zaban et al., 2021). Dichas actividades de la industria petroquímica contribuyen en la contaminación del medio ambiente mediante la liberación de compuestos tóxicos en el ecosistema, tales como hidrocarburos aromáticos policíclicos, metales pesados y demás

constituyentes del petróleo crudo (Jabbar et al., 2022). La presencia de hidrocarburos del petróleo en ambientes de suelo y agua ocasiona un impacto ambiental significativo y representa un peligro sustancial, tanto para los seres humanos como para las diferentes formas de vida, en los entornos contaminados (Ossai et al., 2020). Estos incidentes de contaminación ambiental evidencian la necesidad de seguir investigando en este campo para poder generar alternativas eficientes y útiles en la prevención y mitigación del daño ambiental ocasionado por contaminantes persistentes en el suelo y los cuerpos hídricos (Trujillo & Ramírez, 2012).

De los hidrocarburos constituyentes del petróleo crudo pesado, los asfaltenos son reconocidos como la fracción de mayor peso molecular y complejidad estructural (Adebiyi, 2021). Sus características fisicoquímicas, tales como hidrofobicidad, alta toxicidad y persistencia, dificultan el proceso de biodegradación natural mediante las comunidades microbianas presentes en ecosistemas impactados, en consecuencia, estos se acumulan en el medio ambiente afectando el balance ecológico del mismo (Tavassoli et al., 2012). Es por esto que, hasta la fecha, limitados estudios se han dedicado en la comprensión de los mecanismos de degradación de este compuesto recalcitrante (Nzila & Musa, 2021).

Estudios realizados en Colombia, han contribuido en la identificación de un grupo relevante de microorganismos, tales como *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., *Ralstonia* spp., *Bacillus* spp. y *Chrysobacterium* spp., entre los más diversos en términos de riqueza y abundancia durante los procesos de biorremediación de compuestos aromáticos-alifáticos-poliaromáticos y de metales pesados (Dussán et al., 2010). Esto evidencia la diversidad de microorganismos que puede ser encontrada en el país, así como el potencial de estos para ser implementados en procesos de

biorremediación. Por otra parte, diversos estudios han puesto en evidencia la capacidad que poseen algunos microorganismos para degradar compuestos de alto peso molecular tales como los asfaltenos, como por ejemplo *Neosartorya fischeri*, *Bacillus* sp, *Garciaella petrolearia*, *Pseudomonas* sp, *Citrobacter amalonaticus*, *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus hominis*, *Lysinibacillus fusiformis*, *Parvibaculum* sp., *Alcanivorax* sp., *Hyphomonas* sp., *Flavobacterium* sp. y *Reyranella* sp. (Ali et al., 2012; Fernández et al., 2012; Jahromi et al., 2014; Lavania et al., 2012; Song et al., 2018; Tavassoli et al., 2012; Uribe-Alvarez et al., 2011). A pesar de esto, se ha demostrado que la degradación de estos compuestos recalcitrantes es más rápida y efectiva utilizando un consorcio microbiano en comparación con el uso de cultivos microbianos axénicos. Esto se debe principalmente al cometabolismo generado entre las poblaciones presentes en el consorcio y su diversidad enzimática, lo cual permite que los compuestos sean degradados de forma más eficiente (Hernández-López et al. 2015).

Es importante mencionar que la naturaleza química de los asfaltenos representa un desafío para el desarrollo de estudios de biodegradación. Por esta razón, la mayoría de publicaciones hasta la fecha centralizan su objetivo en la identificación del potencial de biodegradación de un determinado microorganismo o consorcio microbiano por medio de mediciones gravimétricas, sin considerar reacciones de oxidación, producción de biosurfactantes o los mecanismos metabólicos involucrados el proceso de degradación (E. Lorena Hernández-López et al., 2016). La mayoría de las rutas metabólicas y mecanismos específicos implicadas en la biotransformación de asfaltenos continúan siendo desconocidas hasta la fecha. Sin embargo, algunas aproximaciones teóricas se han realizado teniendo en cuenta la información sobre la biotransformación de compuestos

aromáticos altamente hidrofóbicos, tales como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (E. L. Hernández-López et al., 2015).

Como solución a este vacío en el conocimiento, las técnicas de secuenciación de próxima generación ofrecen nuevas oportunidades para obtener una visión general, pero también con suficiente nivel de profundidad para estudiar las relaciones metabólicas complejas que tienen lugar dentro de una comunidad microbiana. Los análisis metatranscriptómicos proporcionan información relacionada con la actividad metabólica real de los microorganismos en las muestras ambientales, mediante la extracción del ARNm de una comunidad microbiana y su posterior secuenciación (Hernández Macedo, 2020). La realización de estudios ambientales con un enfoque metatranscriptómico ha llevado al descubrimiento de nuevos genes y mecanismos con el potencial de ser utilizados en el desarrollo de nuevas alternativas aplicables en procesos de remediación de suelos contaminados, con el fin de avanzar y optimizar la degradación de compuestos tóxicos (Mesa et al., 2018; Thakur et al., 2018). Por lo anterior, en este trabajo se utilizó un abordaje metatranscriptómico para estudiar los mecanismos metabólicos implicados en el proceso de biodegradación de los asfaltenos durante un proceso de biorremediación en suelo, utilizando un consorcio microbiano degradador de asfaltenos e hidrocarburos pesados.

Con base en lo anterior, se planteó la siguiente pregunta de investigación: **¿Cuáles son los principales cambios a nivel transcripcional producidos durante el proceso de biorremediación de un suelo impactado con asfaltenos por parte de un consorcio microbiano degradador?**

Objetivos

1.1 Objetivo General

Identificar posibles mecanismos metabólicos implicados en la degradación de asfaltenos en suelo por parte de un consorcio microbiano degradador, mediante el análisis de los perfiles de expresión génica.

1.2 Objetivos Específicos

Establecer diferencias en los patrones de expresión génica durante el proceso de degradación de asfaltenos en suelos mediante un consorcio microbiano degradador.

Identificar los principales transcritos expresados diferencialmente y rutas metabólicas microbianas afectadas durante el proceso de degradación de asfaltenos en suelos mediante un consorcio microbiano degradador.

2. Marco conceptual

2.1 Generalidades del petróleo crudo

El petróleo es un líquido viscoso complejo, constituido principalmente por hidrocarburos de diversas estructuras, principalmente de origen fósil, que se encuentra dentro de las formaciones geológicas de la tierra (Harman, 2013; Stepanova et al., 2022). Según el modelo básico de Pfeiffer y Saal existen cuatro fracciones del petróleo, Saturados, Aromáticos, Resinas y Asfaltenos, conocidas como fracciones SARA (Pfeiffer & Saal, 1940):

- Fracción de hidrocarburos saturados: Hidrocarburos alifáticos, lineales.
- Fracción de hidrocarburos Aromáticos: Hidrocarburos que poseen al menos un anillo bencénico.
- Fracción de resinas: Hidrocarburos que poseen entre 4 a 87 anillos bencénicos.
- Fracción de asfaltenos: Hidrocarburos de mayor peso molecular.

Esta definición y caracterización se ha realizado con base en la solubilidad y polaridad de las diferentes fracciones del petróleo (Adebisi, 2021). Según el Instituto Americano de Petróleo (API), el petróleo se puede clasificar con base a su densidad en crudos livianos, pesados, extrapesados e hidrocarburos no convencionales (Gudiña & Teixeira, 2017). En el crudo pesado o asfáltico predominan los naftenos (cicloalcanos), alcanos de cadena larga e hidrocarburos aromáticos policíclicos (Viñas & Solanas, 2005). La alta viscosidad del petróleo crudo pesado se debe en primera medida a su contenido elevado de asfaltenos, resinas y ceras, lo cual genera gran

cantidad de complicaciones asociadas a la recuperación, separación y procesamiento de crudos pesados y bitúmenes (Uribe-Alvarez et al., 2011).

2.2 Fracción asfáltica del petróleo crudo

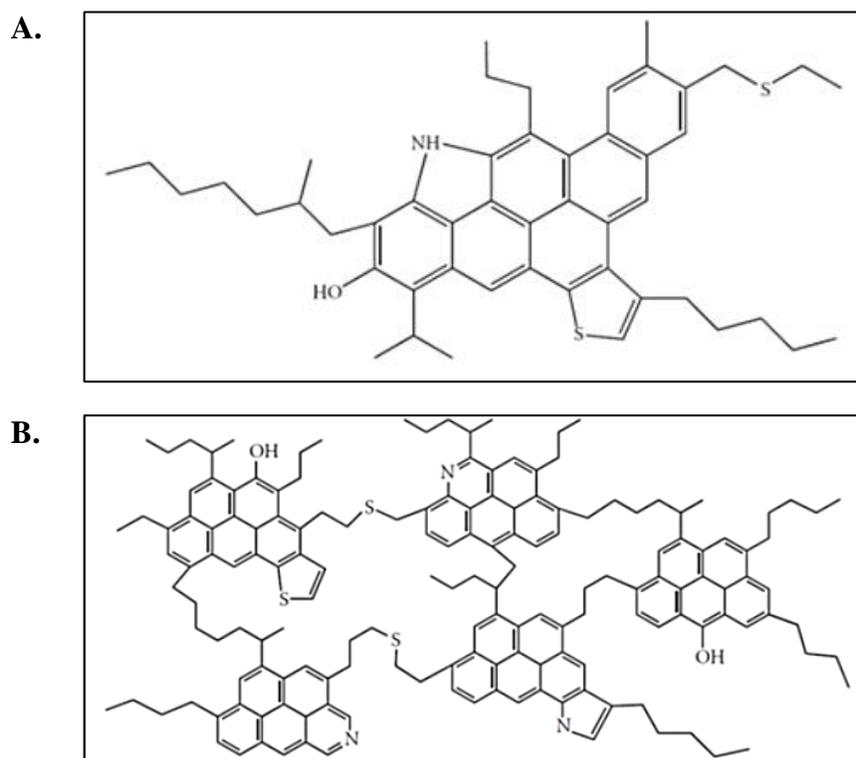
Los asfaltenos constituyen la fracción más pesada y polar del petróleo; se caracterizan por ser solubles en solventes aromáticos (benceno y tolueno) e insolubles en *n*-alcanos (Gudiña & Teixeira, 2017). La concentración de asfaltenos en crudos livianos puede llegar a ser menor al 1%, mientras que, en el petróleo crudo pesado puede superar el 20% del peso total; es decir, al aumentar la densidad del petróleo, la concentración de asfaltenos se incrementa, dificultando así su producción (Adebiyi, 2021; E. L. Hernández-López et al., 2015). El peso molecular de los asfaltenos ha sido una controversia por más de 20 años (E. L. Hernández-López et al., 2015). El comportamiento termodinámico de los asfaltenos, debido a su naturaleza química, varía entre reservorios de crudo, razón por la cual no ha sido posible definir su peso molecular específico. Sin embargo, se ha reportado que su peso molecular puede variar entre 10^3 y 10^9 g/mol (Gudiña & Teixeira, 2017; Hasanvand et al., 2018).

La estructura química de la molécula de asfalteno ha sido un enigma durante varias décadas debido a su complejidad y su tendencia a formar agregados, lo cual dificulta directamente su estudio (Gudiña & Teixeira, 2017). Esta fracción se encuentra constituida principalmente por heteroátomos de nitrógeno, azufre y oxígeno, así como metales pesados (Vanadio, Hierro y Níquel). Su estructura molecular se caracteriza por una alta complejidad y se constituye de estructuras aromáticas heterocíclicas, unidas a cadenas alifáticas de hidrocarburos (Tavassoli et al., 2012; Uribe-Alvarez et al., 2011). Desde el punto de vista estructural, existen dos teorías que

describen la estructura y organización de la molécula de asfalteno: el modelo clásico de organización en islas y el modelo del archipiélago (Figura 1).

Figura 1

Estructura molecular de los asfaltenos



Nota. A) Modelo de organización en islas. B) Modelo del archipiélago. Adaptado de: Hasanvand et al., 2018

El modelo clásico de organización en islas enuncia que el monómero de asfalteno cuenta con un peso molecular de 500 a 1000 Daltons; además, establece que cada monómero de asfalteno se encuentra constituido de 6-8 anillos aromáticos unidos por enlaces saturados de átomos heterogéneos (Figura 1) (Adebiyi, 2021; Hasanvand et al., 2018). Por otra parte, el modelo del

archipiélago sugiere que el monómero de asfalteno consta de una masa de grupos policondensados que contienen de 5 a 7 anillos aromáticos y, estos grupos se encuentran unidos por medio de ramas alifáticas y puentes polares (Figura 1.B) (Adebiyi, 2021; Hasanvand et al., 2018). La conclusión más completa y reciente en este campo está relacionada con Mullins y sus colegas con base en los resultados de su trabajo, en el cual se concluyó que los asfaltenos son una estructura monomérica con un peso molecular de alrededor de 750 a 1000 Daltons, y este peso molecular corresponde a una estructura en organización en islas (Mullins et al., 2008).

2.3 Biodegradación de hidrocarburos del petróleo

Desde el siglo pasado el uso de microorganismos en la degradación del petróleo ha sido ampliamente estudiado (Xue et al., 2015b). Durante el proceso de biodegradación los microorganismos utilizan los hidrocarburos del petróleo como fuente de carbono y energía, por lo tanto, es un proceso energéticamente favorable (Varjani, 2017a). Más de 100 géneros bacterianos han sido reportados en la literatura por su capacidad de degradar hidrocarburos del petróleo, de los cuales se destacan *Achromobacter* spp., *Acinetobacter* spp., *Alkanindiges* spp., *Alteromonas* spp., *Arthrobacter* spp., *Burkholderia* spp., *Dietzia* spp., *Enterobacter* spp., *Kocuria* spp., *Marinobacter* spp., *Mycobacterium* spp., *Pandoraea* spp., *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptobacillus* spp., *Streptococcus* spp., y *Rhodococcus* spp. (Xu et al., 2018).

Los hidrocarburos del petróleo pueden ser degradados mediante diferentes mecanismos, tales como la oxidación terminal, oxidación sub-terminal, β - oxidación y ω -oxidación (Varjani, 2017b), sin embargo, las rutas metabólicas para la degradación de cada una de las fracciones SARA varían entre sí debido a sus diferencias estructurales (Xue, J., et al. 2015). En este orden de

ideas, la biodegradabilidad de los hidrocarburos del petróleo disminuye de la siguiente forma: n-alcanos > alcanos ramificados > alquenos ramificados > aromáticos de bajo peso molecular > monoaromáticos > alcanos cíclicos > hidrocarburos aromáticos policíclicos >> asfaltenos (Tyagi, M., *et al*, 2011). La biodegradación, como proceso natural, puede darse de forma lenta dependiendo de las características fisicoquímicas del petróleo; es decir, el petróleo crudo liviano se biodegrada más rápido que los crudos pesados (Varjani, 2017a).

Los procesos y rutas metabólicas relacionadas con la degradación de hidrocarburos saturados e hidrocarburos aromáticos se encuentran documentadas en la literatura. En la degradación de hidrocarburos saturados, se destaca la importancia de enzimas clave, tales como deshidrogenasas y monooxigenasas, encargadas de realizar el metabolismo gradual hasta la obtención de Acetil-CoA (Xue et al., 2015b). Por otra parte, en la biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos, enzimas como dioxigenasas, lacasas y peroxidasas, son de gran importancia en el clivaje de los anillos aromáticos presentes en compleja estructura (Timmis, 2010; Zafra, 2015). Sin embargo, a pesar de que se han documentado gran cantidad de estudios con información de las rutas metabólicas de hidrocarburos saturados y aromáticos, no existe información sobre los mecanismos metabólicos específicos relacionados con la biodegradación de los asfaltenos (Nzila & Musa, 2021).

Algunos autores han realizado aproximaciones teóricas de los posibles mecanismos de biodegradación de asfaltenos, teniendo en cuenta la estructura química que presentan y los procesos de degradación de hidrocarburos de alto peso molecular conocidos. La biotransformación de compuestos aromáticos altamente hidrofóbicos puede estar relacionada y dar un indicio sobre

las rutas metabólicas de la degradación de asfaltenos (Hernández-López et al., 2015). Por otra parte, la combinación de eventos como la fragmentación, adición de sustratos cometabólicos (alcanos, propano, succinato) y consorcios microbianos adaptados al petróleo como única fuente de carbono y energía, brinda la posibilidad que las estructuras sean susceptibles a la degradación (Pineda-Flores & Mesta-Howard, 2001). Estas aproximaciones continúan siendo la base del entendimiento sobre los posibles mecanismos metabólicos implicados en la degradación de asfaltenos, debido a que aún no se han reportado estudios que evalúen la veracidad de estas hipótesis teóricas de manera experimental. El desarrollo de estudios con enfoques “ómicos” ofrece excelentes oportunidades para mejorar la comprensión de los mecanismos moleculares en la biodegradación de asfaltenos, sin embargo, este tipo de investigaciones no han sido documentadas hasta el momento (Nzila & Musa, 2021).

2.4. Biorremediación de suelos impactados con hidrocarburos del petróleo

La biorremediación es el proceso que aprovecha las capacidades metabólicas de los organismos para convertir contaminantes en productos menos tóxicos, mediante su degradación, mineralización o por medio de su conversión en biomasa microbiana con el fin de restaurar un ecosistema que se encuentre afectado a su condición natural (Fulekar, 2017; Sardrood et al., 2013; Trujillo & Ramírez, 2012; Xue et al., 2015). Esta resulta ser una técnica ampliamente utilizada para tratar la contaminación por hidrocarburos derivados del petróleo en ecosistemas terrestres y acuáticos (Varjani, 2017a). Diferentes estrategias han sido desarrolladas con el fin de mejorar la velocidad de remediación, tales como la adición de nitrógeno y fósforo, la modificación de las variables operacionales como la humedad, pH y oxígeno, además de la inoculación de microorganismos degradadores (Trujillo & Ramírez, 2012). Estas acciones hacen referencia a dos

enfoques generales de la biorremediación, denominados bioaumentación y bioestimulación (Sardrood et al., 2013).

La bioaumentación es la adición de microorganismos a una matriz contaminada, aplicada frecuentemente en procesos de remediación *in situ* (Sardrood et al., 2013). Las opciones más utilizadas para la bioaumentación son: la adición de una cepa bacteriana pura y tolerante o la adición de un consorcio microbiano previamente adaptado. La selección de los microorganismos a utilizar debe basarse en el potencial metabólico de estos y en sus características esenciales, las cuales permitirán su viabilidad en las condiciones ambientales a las que serán sometidos (Tyagi et al., 2011).

Por otra parte, un suelo contaminado con hidrocarburos usualmente presenta un exceso de carbono, mientras que elementos como nitrógeno y fósforo se encuentran en bajas concentraciones para mantener un balance de nutrientes (C:N:P), lo que limita el proceso de biodegradación (García et al., 2011). Por tal razón, la bioestimulación adiciona nutrientes u oxígeno al suelo con el fin de mejorar la tasa de biodegradación de los contaminantes en el sitio afectado (Tyagi et al., 2011). La bioestimulación hace referencia a la estimulación de las poblaciones microbianas nativas del suelo o agua que se encuentre contaminada. Esta técnica puede realizarse en procesos de remediación *in situ* o *ex situ* (Sardrood et al., 2013).

2.5 Transcriptómica

La transcriptómica se define como el estudio del transcriptoma, es decir, el estudio completo de los perfiles de expresión de ARN mensajero de una célula o población celular determinada (Munshi & Sharma, 2018). El transcriptoma es un vínculo crucial entre el fenotipo celular, el genoma y el proteoma, dado que representa el conjunto de genes que se transcriben en

un momento y condición específico (Bala et al., 2022). Por esta razón, la transcriptómica permite determinar el patrón de cambios en la expresión génica debido a factores internos y externos, como el estrés biótico y abiótico (Munshi & Sharma, 2018). Las técnicas moleculares han estado llenando aquellos vacíos en el conocimiento de la ecología, la expresión génica y el metabolismo de las comunidades microbianas, sin embargo, los estudios que incorporan estas tecnologías son escasos (Giovanella et al., 2020). Sin embargo, mediante el análisis de los perfiles de expresión génica es posible obtener información funcional sobre las actividades de las comunidades microbianas en el medio ambiente (Sharma et al., 2022).

Teniendo en cuenta el vacío en el conocimiento actual sobre los procesos metabólicos relacionados con la degradación de asfaltenos, es necesario el desarrollo de estudios con enfoques transcriptómicos. La importancia de analizar y caracterizar los transcritos asociados con los procesos de biorremediación radica en la gran cantidad de información que puede proporcionar sobre los procesos microbianos implicados, lo cual proporcionaría una mejor comprensión sobre aquellos mecanismos metabólicos relacionados, como el planteado en el presente trabajo de investigación.

3. Metodología

3.1 Muestras de suelo y asfaltenos

Para la realización de los ensayos de biodegradación de asfaltenos en suelos se utilizaron muestras de suelo no contaminado con hidrocarburos del petróleo provenientes del campo la Lizama Santander (7°05'39.7"N; 73°33'29.7"W), cedidas por el Instituto Colombiano del Petróleo. Estas se tomaron a diferentes profundidades (0, 15 y 30 cm), siguiendo los procedimientos recomendados por la EPA (U.S. EPA, 1996), luego, estas fueron mezcladas para obtener una muestra compuesta de 300 g. Durante la recolección de las muestras de suelo no se afectó la flora o fauna circundante. Las muestras no fueron recolectadas directamente por parte del cuerpo investigador de este proyecto, sino por personal de Ecopetrol S.A. presente en el sitio. Las muestras de suelo fueron conservadas en refrigeración a 4°C hasta el momento de su uso. Los asfaltenos utilizados para la realización de los ensayos de biodegradación consistieron en asfaltenos puros extraídos a partir del crudo pesado Castilla mediante precipitación con n-heptano, con una composición aproximada de C: 84 %, H: 8 %, N: 1.5 %, S: 4.5 %, O: 1.5 %, H/C: 1.14, Ni: 406 ppm, V: 1601 ppm, PM: 2000 daltons. Las muestras fueron almacenadas a temperatura ambiente y protegidas de la luz hasta su utilización en los ensayos.

3.2 Consorcio microbiano degradador

Para la realización de los ensayos de biodegradación de asfaltenos en suelo se utilizó un consorcio bacteriano previamente construido en el laboratorio del Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología (GIBIM). El consorcio microbiano se encuentra constituido por cinco aislados, *Paenibacillus cellulositrophicus* strain 21S, *Rhodococcus corynebacterioides* strain 18S,

Stutseudomonas stutzeri strain PH, *Rhodococcus qingshengii* strain PH3D y *Cellulosimicrobium cellulans* strains AB3, los cuales fueron aislados a partir de muestras de suelo contaminadas con petróleo crudo pesado (Navas-Cáceres, 2021). La selección de los aislados se realizó teniendo en cuenta los siguientes criterios: 1) Alta tolerancia a asfaltenos (60.000 ppm); 2) Su capacidad de utilizar los asfaltenos como única fuente de energía y de carbono; y 3) No presentar relaciones antagónicas entre ellos. Cada uno de los aislados del consorcio microbiano se caracterizó desde el punto de vista bioquímico mediante el uso de los sistemas RapID™ CB PLUS y RapID™ NF PLUS (Thermo Scientific) con el fin de identificar el potencial de degradación de sustratos específicos, como carbohidratos, aril C-glucósidos, lípidos y aminoácidos.

3.3 Ensayos de biodegradación de asfaltenos en suelo

Se llevaron a cabo ensayos de biodegradación de asfaltenos en suelo mediante la construcción de sistemas de cultivo sólido a nivel microcosmos. El proceso involucró las estrategias de bioaumentación, mediante la inoculación del consorcio microbiano degradador, y bioestimulación, por medio de la adición de bagazo de caña y aireación periódica. Previo a la construcción de los sistemas, se realizó la esterilización del suelo y el bagazo de caña por separado. Este proceso se llevó a cabo un total de cinco veces a 120 °C por 15 minutos.

Se construyeron tres tipos de biorreactores (Tabla 1) y, de cada uno se realizaron tres réplicas biológicas. Dichos sistemas constaron de reactores contruidos con erlenmeyers estériles de vidrio de 100 ml con sello hermético de caucho, a los cuales se adicionó 13,3 g de suelo estéril y 0,7 g de bagazo de caña estéril para completar 20 g de materia total en relación 95:5. Para el Tratamiento 1 y el Control (Tabla 1) los reactores fueron contaminados con un total de 5.000 ppm

de asfaltenos disueltos en tolueno. Este proceso se llevó a cabo luego de la esterilización del suelo en cada uno de los Erlenmeyer con el fin de conservar la esterilidad del sistema. Una vez adicionada la mezcla de asfaltenos y tolueno, se permitió evaporar la totalidad del solvente a temperatura ambiente. Luego, se ajustó cada reactor a una humedad relativa del 30% mediante la adición de 6 ml de medio líquido Czapek con 5×10^8 UFC/ml de cada uno de los aislados del consorcio microbiano. Los reactores se sellaron herméticamente con septas de caucho estéril y se incubaron a 30 °C durante 52 días.

Tabla 1.

Diseño experimental de los ensayos de biodegradación de asfaltenos en suelo

Tipo de biorreactor	Construcción del biorreactor	Objetivo
Tratamiento 1	✓ Suelo contaminado con asfaltenos	Análisis de expresión génica diferencial y medición de biodegradación
	✓ Bioaumentación	
	✓ Bioestimulación	
Tratamiento 2	✓ Suelo no contaminado con asfaltenos	medición de biodegradación
	✓ Bioaumentación	
	✓ Bioestimulación	
Control	✓ Suelo contaminado con asfaltenos Bioestimulación	Control de biodegradación abiótica

3.4 Seguimiento analítico de la biodegradación

Se realizaron aireaciones y mediciones de CO₂ cada 48 horas durante los 52 días de incubación de los ensayos de biodegradación. Al finalizar este periodo, se determinó el porcentaje de biodegradación.

3.4.1 Medición de la actividad microbiana

La actividad microbiana durante los ensayos de biodegradación fue medida mediante la cuantificación de la producción de CO₂ cada 48 horas para cada uno de los tratamientos. Para esto, se construyó un sistema de aireación constituido por una bomba de aire al vacío, acoplada a una trampa de KOH encargada de capturar el CO₂ atmosférico, una trampa de agua destilada estéril y filtros de 0,22 μm para mantener la esterilidad del sistema. El CO₂ liberado durante la respiración aeróbica del biorreactor fue capturado mediante una solución alcalina de NaOH, la cual favorece la producción de Na₂CO₃ y agua como resultante. Con el fin de precipitar el carbonato producido, se adicionó 1ml de BaCl₂ para favorecer la formación de NaCl y BaCO₃. Finalmente, para identificar el exceso de NaOH en solución se utilizó HCl y fenolftaleína como indicador de pH para llevar a cabo una reacción de titulación ácido-base. La cantidad de CO₂ producido en cada biorreactor es inversamente proporcional al volumen de HCl gastado en la titulación.

3.4.2 Cuantificación de la biodegradación.

El proceso de cuantificación de la biodegradación de asfaltenos se realizó por medio del método gravimétrico (Fernández Linares et al., 2006). Dicho método se fundamenta en la evaporación del solvente extractor con el fin de obtener un extracto orgánico, el cual es reportado como porcentaje de la muestra total en peso seco. Este método consiste en pesar el recipiente vacío, previo a la adición del solvente con el extracto orgánico, para ser llevado a peso constante (RA). Una vez pesado el recipiente vacío, se añadió el solvente con el extracto orgánico y se dejó evaporar totalmente a 45°C hasta sequedad. Luego de obtener el extracto orgánico residual libre de solvente, el recipiente se pesó nuevamente (RB). La diferencia de peso corresponde al contenido total de asfaltenos en la muestra de suelo analizada en mg/kg de suelo seco. Dicho cálculo se realizó mediante la siguiente ecuación:

Asfaltenos residuales (mg/kg de suelo seco): $(RB - RA) * (FC) / (P * FH)$

Donde:

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 correlación de humedad $(1 - (\% \text{humedad}/100))$

FC= Factor de corrección para transformar a kg de suelo seco = 1000

3.5 Extracción de ARN total y secuenciación masiva de transcritos

A partir de los tratamientos 1 y 2 (Figura 1) se realizaron extracciones de ARN total de cada una de las réplicas biológicas construidas. Para ello se tomaron muestras de 10 g de suelo proveniente de cada biorreactor para realizar extracciones de ARN al día 52 de incubación. Previo al proceso de extracción, se realizaron lavados del suelo utilizando una solución estabilizadora de ARN enriquecida en sales, RNAlater (ThermoScientific, Wilmington, USA) para remover la mayor cantidad posible ácidos húmicos provenientes del suelo e hidrocarburos presentes en el suelo contaminado con asfaltenos, los cuales interfieren directamente en la calidad del ARN a extraer. La extracción de ARN total se efectuó utilizando el kit comercial Soil Total RNA Purification Kit (Norgen Biotek, CA, USA) siguiendo las condiciones descritas por el fabricante, seleccionado por su capacidad de remoción de ácidos húmicos del suelo. La verificación de la calidad, pureza y concentración del ARN extraído se realizó mediante el espectrofotómetro Implen NanoPhotometer®. Una vez obtenido un mínimo de 3 µg de ARN por cada una de las réplicas biológicas, se realizó el proceso de secuenciación de ARN mediante un proveedor de servicios

externo. Previo a la generación de librerías de secuenciación, se realizó un tratamiento de las muestras con ADNasa y depleción de ARN ribosomal mediante el Kit RiboZero (Illumina) con el fin de mejorar la calidad, la presencia de ADN contaminante y de ARN ribosomal. Para el proceso de secuenciación se utilizó la plataforma NovaSeq de Illumina, con un modo de corrido *paired-end* de 2x150 pb.

3.6 Análisis bioinformático

3.6.1 Control de calidad de secuencias crudas

Con el fin de realizar el control de calidad de las secuencias crudas obtenidas a partir de cada una de las muestras, se empleó FastQC v.0.11.9 (Babraham Bioinformatics®, RRID:SCR_014583). Luego, se realizó la remoción de adaptadores de secuenciación mediante Trim Galore v.0.6.6 (Babraham Bioinformatics®, RRID:SCR_011847). Las secuencias de baja calidad se excluyeron del estudio.

3.6.2 Análisis de perfiles transcriptómicos mediante MG-RAST

Una vez finalizado el control de calidad inicial, se realizó un ensamble *de novo* de secuencias mediante la plataforma MG-RAST v.4.0.3 (Meyer et al., 2008). Como resultado, se obtuvieron *contigs* que se analizaron mediante la misma plataforma con el fin de obtener los perfiles transcriptómicos y realizar anotaciones funcionales, utilizando el método de corrido predeterminado. Las secuencias de baja calidad se removieron mediante el programa DynamicTrim, (*phred*: 15 -5). Luego, se realizó un control de calidad adicional, utilizando las herramientas Solexa QA, DRISEE y Bowtie, con un error máximo de 10^{-5} , punto de corte mínimo de identidad de 90%, longitud mínima de 15 pb y abundancia mínima de 100. Las anotaciones

funcionales de las secuencias se llevaron a cabo teniendo en cuenta la ortología KEGG (Kanehisa et al., 2016). Mediante este análisis inicial, se identificaron los principales transcritos involucrados en el proceso de biodegradación de asfaltenos, llevando a cabo una comparación entre muestras obtenidas de suelo contaminado y no contaminado.

Los resultados obtenidos por medio de la plataforma MG-RAST fueron soportados estadísticamente mediante el programa STAMP v2.1.3 (D. H. Parks et al., 2014). Se empleó la prueba de Welch con un test de corrección de Bonferroni y se tomó un valor de significancia estadística de $(p) \leq 0.05$. De esta forma, fue posible identificar las diferencias estadísticamente significativas entre los principales transcritos expresados en relación con la biodegradación de asfaltenos.

3.6.3 Multiensamblaje y análisis de expresión génica diferencial

Con el fin de incrementar la cobertura del proceso de secuenciación, se realizó un ensamblaje de *novο* de secuencias utilizando el programa MetaSPAdes ver. 3.15.3 (van der Walt et al., 2017). Seguido a esto, las secuencias ensambladas se cargaron en la plataforma Galaxy ver. 2.11.40.7 (Afgan et al., 2022). Se utilizó la herramienta Transdecoder ver 5.5.0 para identificar las regiones codificantes de genes dentro de los transcritos y obtener secuencias peptídicas para los ORF candidatos finales, eliminando los candidatos más cortos dentro de los ORFs más largos. Se utilizó Trinotate ver 3.2.2 para realizar la anotación funcional de los transcriptomas crudos utilizando los mapas generados en Transdecoder a partir de los datos ensamblados. Los resultados de la anotación, en forma de tablas de conteo, se compararon en la herramienta DESEQ2 para el análisis de expresión génica diferencial, calculando los valores de p y el logaritmo de la razón de

cambio (\log_2 *fold change*). Los resultados generados fueron cargados en la herramienta ggplot2 (Version 3.3.3) para generar *volcano plots*.

3.6.5. Análisis estadístico

El análisis bioinformático realizado mediante Galaxy se soportó estadísticamente mediante el programa STAMP v2.1.3 (D. Parks, 2014)(D. H. Parks et al., 2014). Para realizar la comparación entre sets de datos se utilizó un análisis estadístico de tipo G-test con la prueba exacta de Fisher utilizando un método de prueba de hipótesis bilateral, se tomó un valor de significancia estadística de $(p) \leq 0.05$. Con el fin de detectar transcritos expresados de forma diferencial, se llevaron a cabo los métodos de análisis estadístico de DESeq2 integrado en el marco de análisis de Galaxy.

4. Resultados y discusión

4.1 Seguimiento analítico de la biodegradación de asfaltenos en suelo

4.1.1. *Medición de la actividad microbiana durante la biodegradación*

Los resultados correspondientes a la concentración de CO₂ producida durante la biodegradación de asfaltenos indican un comportamiento variable a través del tiempo, tanto en los reactores contaminados como no contaminados. Sin embargo y como era de esperar, los suelos contaminados con asfaltenos inoculados con el consorcio bacteriano produjeron cantidades significativamente más altas de CO₂ en los días 6 y 52 en comparación con suelos no contaminados con asfaltenos ($p < 0.05$), lo cual indica que se está dando un proceso de mineralización significativamente más elevado por parte del consorcio microbiano en el suelo (figura 3).

La mayor producción diaria de CO₂ se evidenció durante los primeros 10 días de los ensayos de biodegradación, correspondientes al proceso de adaptación y degradación inicial por parte del consorcio microbiano. Teniendo en cuenta la estructura de la molécula de asfaltenos, la cual consta de fracciones alifáticas unidas a anillos aromáticos con diferentes tipos de heteroátomos, es posible que, durante estos primeros días, la producción de CO₂ sea atribuible a la degradación y mineralización de las fracciones alifáticas del hidrocarburo. En orden de biodegradabilidad, las fracciones de hidrocarburos alifáticos son más susceptibles a la degradación que los aromáticos y los compuestos cíclicos no aromáticos (Jabbar et al., 2022). La degradación de hidrocarburos alifáticos se da mediante la acción de enzimas monooxigenasas y dioxigenasas que incorporan uno o dos átomos de oxígenos a la cadena de n-alcano, dando lugar a la producción de un alcohol por oxidación terminal. Este alcohol continúa el proceso de oxidación para dar

resultado intermediarios del ciclo de Krebs, como ATP y CO₂, para la producción de energía través del metabolismo central microbiano (Nzila & Musa, 2021).

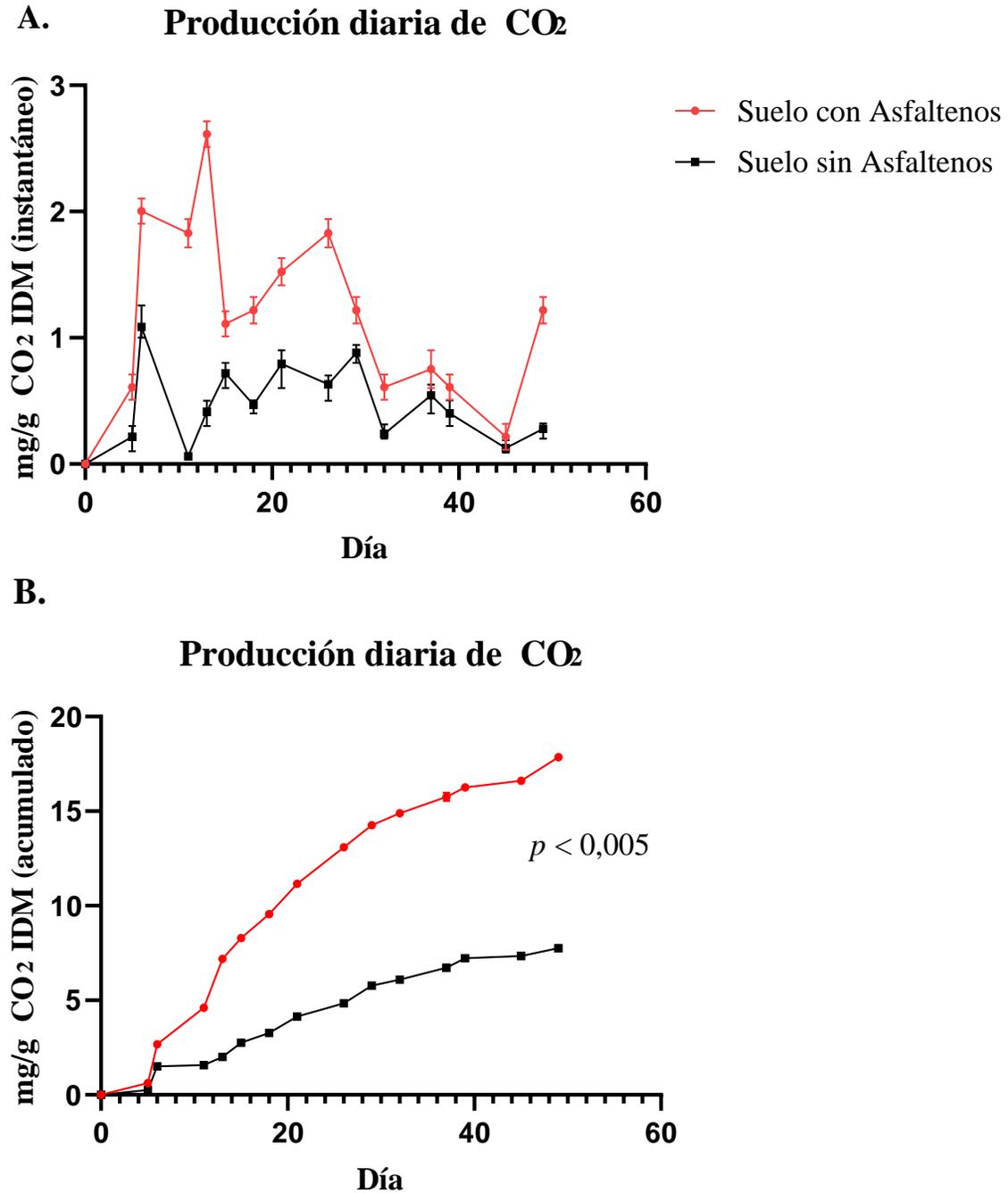
Como se puede observar en la figura 2, la producción de CO₂ a través del tiempo, no se mantiene de forma constante. Este resultado podría ser atribuible a las modificaciones estructurales de la molécula de asfalteno a medida que esta va siendo transformada por el metabolismo microbiano. Una vez utilizadas las fracciones alifáticas, la estructura residual estaría enriquecida con compuestos aromáticos y ricos en metales pesados, los cuales resultan ser recalcitrantes. A pesar de esto, se evidencia una respuesta positiva en la actividad metabólica del consorcio microbiano, dado que, a partir del día 20 de incubación, se incrementa nuevamente la producción diaria de CO₂. Este comportamiento metabólico sugiere una adecuada adaptabilidad y supervivencia del consorcio en presencia de altas concentraciones de asfaltenos en el suelo durante los 52 días de los ensayos de biodegradación.

4.1.2 Medición de la biodegradación de asfaltenos en suelo

Los resultados obtenidos a partir de la medición gravimétrica de la biodegradación de asfaltenos en suelo durante los 52 días de ensayo se correlacionaron con los obtenidos a partir de la cuantificación de CO₂, en los cuales, se evidencia un posible proceso de mineralización de los asfaltenos. Fue posible alcanzar una remoción del 86% de los asfaltenos iniciales por parte del consorcio microbiano durante 52 días de incubación (Figura 3). Estos resultados evidencian la capacidad de tolerancia y el potencial metabólico del consorcio microbiano para utilizar los

Figura 2

Concentración de CO₂ producida durante la biodegradación de Asfaltenos en suelo.



Nota. A) Producción de CO₂ diario. B) Concentración de CO₂ acumulada.

asfaltenos como única fuente de carbono y energía, incluso, partiendo de una concentración

elevada de asfaltenos en suelo.

Los cinco aislados bacterianos que componen el consorcio microbiano presentaron diferentes patrones de utilización de sustrato (Tabla 2), lo cual demuestra su potencial metabólico. La versatilidad metabólica identificada en el consorcio le podría conferir una ventaja tanto en términos de adaptación como en eficiencia de biodegradación. Todos los aislados presentaron la capacidad de utilizar lípidos, especialmente, ésteres de ácidos grasos. La capacidad de *Stutzerimonas stutzeri* PH5 para utilizar tioles alifáticos sugiere que posee el potencial para usar compuestos alifáticos que contienen Azufre como fuente de energía, que, junto con ésteres y éteres, se han identificado como estructuras de unión en puentes alifáticos de asfaltenos. Se ha reportado que la escisión biocatalítica de estos enlaces carbono-azufre produce una reducción de cuatro veces en el peso molecular de las fracciones de asfaltenos pesados (Kirkwood et al., 2005). Dicha actividad metabólica podría resultar en la escisión inicial de la estructura de asfaltenos en fragmentos más pequeños, y así, dar inicio al proceso de biodegradación de asfaltenos.

Tabla 2.

Utilización/degradación de sustratos por aislados bacterianos que componen el consorcio microbiano degradador de asfaltenos.

Sustrato	Aislado				
	<i>Paenibacillus</i>	<i>Rhodococcus</i>	<i>Cellulosimicrobium</i>	<i>Rhodococcus</i>	<i>Stutzerimonas</i>
	<i>cellulositrophic</i> us 21S	<i>corynebacterioides</i> 18S	<i>cellulans</i> AB3	<i>gingshengii</i> PH3D	<i>stutzeri</i> PH5
Glucosa	+	+	+	+	+
Sucrosa	-	+	+	-	-

Sustrato	Aislado				
	<i>Paenibacillus</i>	<i>Rhodococcus</i>	<i>Cellulosimicrobium</i>	<i>Rhodococcus</i>	<i>Stutzerimonas</i>
	<i>cellulositrophic</i>	<i>corynebacterioides</i>	<i>cellulans</i> AB3	<i>gingshengii</i>	<i>stutzeri</i> PH5
	us 21S	18S		PH3D	
Ribosa	+	+	+	+	NE
Maltosa	+	+	+	-	NE
Tiol alifático	NE	NE	NE	NE	+
αGLU	+	+	+	+	+
βGLU	+	+	+	+	-
NAG	+	+	-	-	-
GLY1	-	-	-	-	-
ONPG	-	+	-	-	-
PHS	+	-	+	+	+
FAE	+	+	+	+	+
Trigliceridos	NE	NE	NE	NE	+
PRO	-	+	+	+	+
TRY	+	+	+	+	+
PYR	+	+	-	-	-
LGLY	+	+	+	+	NE
LEU	+	+	+	+	NE
GGT	NE	NE	NE	NE	+
BANA	NE	NE	NE	NE	+
Urea	-	-	-	+	-
Nitrato	-	+	-	-	-

Nota. +: Positivo; -: Negativo; NE: No evaluado; αGLU: ρ-Nitrofenil-α,D- glucósido ; βGLU: ρ-Nitrofenil -β,D-glucósido; NAG: ρ- Nitrofenil -n-acetil-β, D-glucosamina; GLY1: ρ-Nitrofenil -

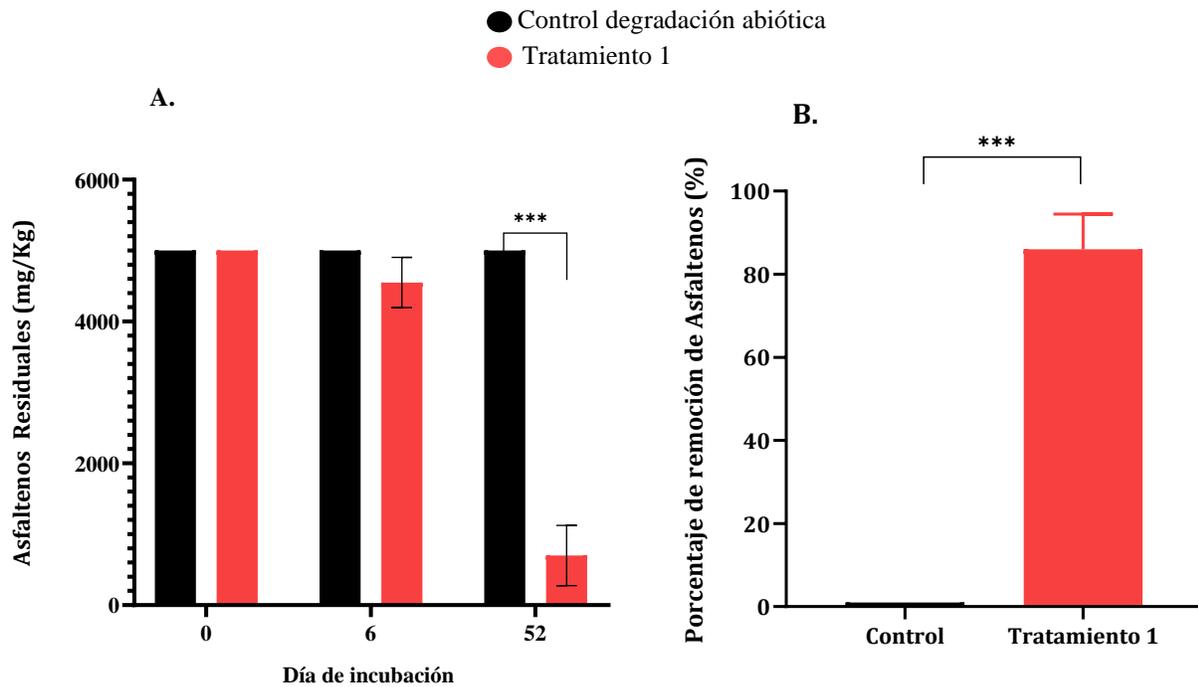
glicosido; ONPG: σ - Nitrofenil - β ,D-galactosido; PHS: p - Nitrofenil fosfato; FAE: Éster de ácido graso; PRO: Prolina- β -naftilamina; TRY: Triptófano- β -naftilamida; PYR: Pirrolidina- β -naftilamina; LGLY: Leucil-glicina- β -naftilamida; LEU: Leucina- β -naftilamida; GGT: γ -Glutamil β -naftilamida; BANA: N-Benzil-arginina- β -naftilamida; Nitrato: Reducción de Nitrato.

En comparación con el comportamiento identificado en el control de degradación abiótica, el cual fue construido con suelo contaminado con asfaltenos no inoculado, es posible identificar diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,005$) entre la concentración de asfaltenos residuales del control y del Tratamiento 1 (suelos contaminados con asfaltenos) al día 52 de incubación. Sin embargo, los resultados indican que, al día 6 de incubación, el proceso de transformación de asfaltenos por parte del consorcio microbiano ya había dado inicio, debido que, de 5000 mg/kg de asfaltenos adicionados al suelo, se cuantificó un promedio de 4400 mg/kg. Por esta razón, es posible atribuir la remoción de asfaltenos se debe de forma exclusiva al metabolismo del consorcio microbiano, dado que las posibles pérdidas a causa de fotooxidación y demás procesos abióticos durante la realización de los ensayos de biodegradación, representadas por el control de biodegradación abiótica utilizado, resulta ser mínima con respecto a la actividad metabólica del consorcio en presencia de los asfaltenos como única fuente de carbono.

Dado que los asfaltenos se constituyen de una estructura química compleja, poseen la tendencia de resistir a la biodegradación. Sin embargo, al proporcionar condiciones favorables, tales como una selección apropiada de microorganismos degradadores, tiempo, minerales necesarios y un medio neutro, es posible potenciar la biodegradación de estos (Iraji & Ayatollahi, 2019).

Figura 3

Eficiencia de la biodegradación de asfaltenos luego de 52 días de incubación.



Nota. A) Concentración de asfaltenos residuales B) Eficiencia de la biodegradación de asfaltenos durante los 52 días de incubación.

Dicha información concuerda con los resultados obtenidos respecto a los ensayos de biodegradación realizados en el presente trabajo, dado que, los cinco aislados bacterianos seleccionados por su alta tolerancia a los asfaltenos, sumado al uso del bagazo de caña como agente texturizante del suelo, favorecieron la biodegradación mediante el incremento de la superficie de contacto entre los microorganismos y el hidrocarburo. La biodegradación de hidrocarburos complejos requiere de la cooperación de más de una especie; mientras que los microorganismos individuales pueden degradar un rango limitado de hidrocarburos, una comunidad microbiana

tendrá un mayor rango de utilización de sustratos y potencial enzimático que permitirá un incremento en la tasa y el alcance de un determinado proceso de biodegradación (Ghazali et al., 2004). Los géneros y especies del consorcio microbiano utilizado en el presente trabajo han sido documentados previamente por su potencial uso en biotecnología. Las especies del género *Pseudomonas* son conocidas por su capacidad de degradar una gran variedad de compuestos químicos, entre ellos, los asfaltenos (Kshirsagar et al., 2020).

4.2 Patrones de expresión génica durante la degradación de los asfaltenos en suelo

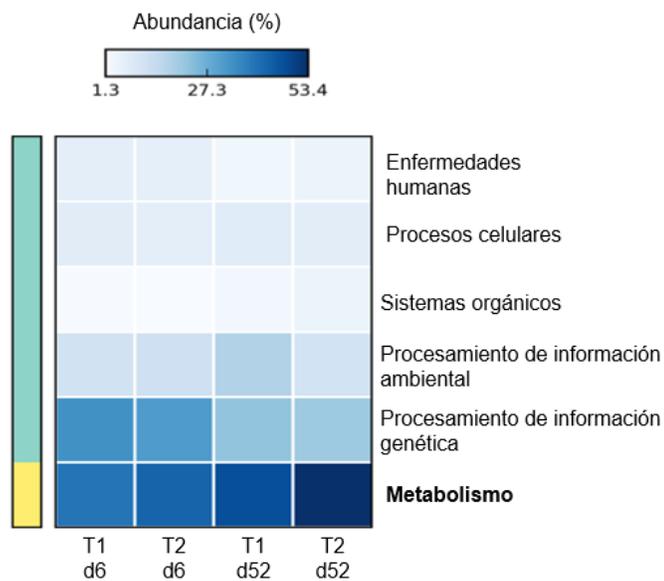
Para la evaluación de los perfiles de expresión génica se analizaron muestras de ARN extraídas en un momento temprano (día 6) y tardío (día 52) del proceso de biodegradación de los asfaltenos en el suelo por parte del consorcio degradador. Se seleccionó el sexto día de tratamiento con el fin de evaluar el comportamiento de los perfiles transcriptómicos asociados a los asfaltenos como única fuente de carbono y los posibles mecanismos de adaptación iniciales por parte del consorcio microbiano. En un estudio previo utilizando el mismo consorcio bacteriano se evidenció que el día 6 del tratamiento podría ser un punto crítico del proceso, dado que resultaba ser el día promedio en el cual se observó un incremento significativo inicial en el crecimiento microbiano (Navas-Cáceres, 2021). Dicho hallazgo concuerda con los resultados obtenidos en el presente trabajo con respecto a la liberación diaria de CO₂, en el cual se evidenció un incremento significativo durante los primeros días de incubación en los reactores contaminados con asfaltenos en comparación con los suelos no contaminados.

Al analizar los patrones de expresión génica agrupados por familias de genes según la ortología KEGG, y soportados estadísticamente mediante STAMP, se encontró que la mayor proporción de genes expresados durante todo el proceso de biodegradación, tanto en suelos

contaminados como en los no contaminados con asfaltenos, están asociados principalmente a metabolismo, procesamiento de información ambiental y procesamiento de información génica (Figura 4). Entre ellos, los genes asociados al metabolismo representaron el mayor porcentaje de expresión en todas las muestras. Los genes relacionados con el procesamiento de la información genética (transcripción, traducción, replicación, reparación, procesamiento de proteínas) suelos con y sin asfaltenos también presentaron una abundancia de transcritos significativamente más alta al día 6 que al día 52, sugiriendo un papel más activo de estos procesos en las fases iniciales del proceso de biodegradación de los asfaltenos y que también podrían relacionarse con los múltiples cambios que deben sufrir los microorganismos para adaptarse y tolerar el contaminante.

Figura 4

Abundancia de transcritos agrupados por familias de genes según el nivel 1 de la ortología KEGG

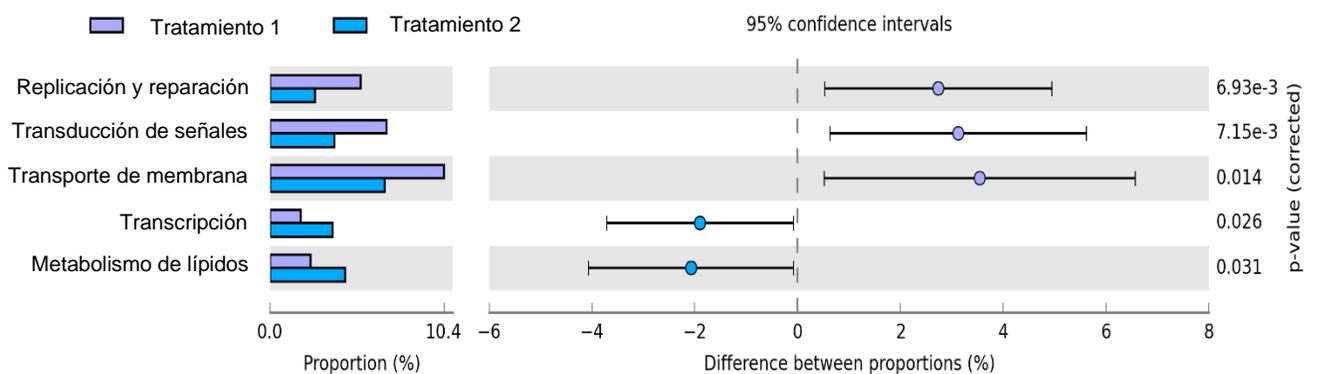


Nota. T1d6: Tratamiento 1, secuencias de ARN del día 6 de incubación. T2d6: Tratamiento 2, secuencias de ARN del día 6. T1d52: Tratamiento 1, secuencias de ARN del día 52 de incubación. T2d52: Tratamiento 2, secuencias de ARN del día 52.

Con respecto a la abundancia en la expresión de familias de genes según el nivel 2 de la ortología de KEGG, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre suelos contaminados y no contaminados con asfaltenos en el día 52 de tratamiento, representadas en la Figura 5. En respuesta a los asfaltenos, se produjo una mayor proporción de transcritos pertenecientes a genes involucrados en procesos de replicación y reparación, transducción de señales y transportes de membrana. En todos los sets de datos analizados se identificó una mayor proporción de transcritos pertenecientes al metabolismo de carbohidratos y aminoácidos, sin embargo, no se identificaron diferencias estadísticamente significativas. Por otra parte, es importante destacar la expresión significativamente mayor de genes involucrados en procesos de transporte de membrana, dado que podría indicar un mecanismo utilizado por el consorcio microbiano para poder acceder al contaminante y poder obtener un beneficio energético a partir de este.

Figura 5

Gráfico de barras de error de las familias de genes según el nivel 2 de la ortología KEGG

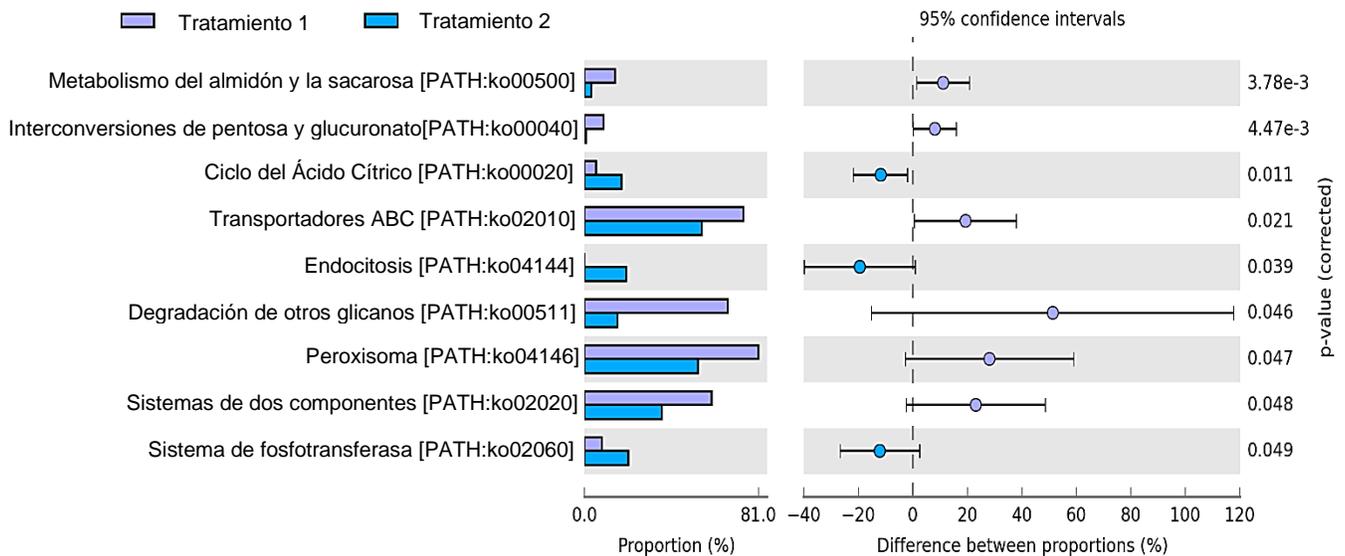


Nota, Se presentan **las diferencias significativas entre suelos contaminados y no contaminados con asfaltenos al día 52 de tratamiento.** Tratamiento 1: Suelo contaminado con asfaltenos. Tratamiento 2: Suelo no contaminado con asfaltenos.

Mediante el análisis de abundancia de rutas metabólicas se identificaron diferencias estadísticamente significativas entre sets de datos provenientes de suelos contaminados y no contaminados con asfaltenos, obtenidos el día 52 de tratamiento (Figura 6). Se evidencia Los resultados sugieren una expresión significativamente mayor de rutas de degradación de otros glicanos y del metabolismo del almidón y la sacarosa, además de respuestas de tipo funcional como la expresión del peroxisoma, sistemas de dos componentes y transportadores de tipo ABC. Estos resultados podrían indicar que, en términos del metabolismo microbiano, la presencia de los asfaltenos en el suelo induce la expresión de enzimas involucradas en la utilización de compuestos hidrocarbonados con el fin de transformar, de forma análoga, los asfaltenos y así obtener un beneficio energético a partir de estos.

Figura 6

Gráfico de barras de error de las familias de genes según el nivel 3 de la ortología KEGG entre suelos contaminados y no contaminados con asfaltenos al día 52 de tratamiento.



En adición, es importante resaltar que se encontró una sobreexpresión de genes relacionados con el peroxisoma en presencia de los asfaltenos, que, si bien no corresponde a un proceso metabólico propiamente dicho, la función de este organelo resulta ser de gran importancia en el proceso de biodegradación. Se ha reportado que los peroxisomas se encuentran involucrados en procesos de oxidación de compuestos aromáticos y hetero-cíclicos y diferentes procesos catabólicos (Rottensteiner & Theodoulou, 2006).

El comportamiento de los principales perfiles de expresión génica mostró que existe una respuesta positiva de tipo funcional y metabólico en presencia de los asfaltenos como única fuente de carbono. Estos resultados concuerdan con los obtenidos mediante el seguimiento analítico de los ensayos de biodegradación, debido que la respuesta del consorcio microbiano en presencia de asfaltenos indica que la presencia del contaminante otorga un beneficio energético que estimula la expresión de rutas metabólicas con el fin de realizar el proceso de transformación de los asfaltenos. Esto se confirma al obtenerse una significativamente mayor de CO₂ en los reactores contaminados con asfaltenos como producto final del proceso de transformación microbiana del contaminante. Dichos resultados eran esperados dado que, en presencia del contaminante, es necesaria no sólo una maquinaria enzimática capaz de metabolizar la molécula de asfalto, sino que también son indispensables los procesos celulares y funcionales que contribuyen en la adaptación y manejo del estrés que podría generar la presencia de los asfaltenos sobre las bacterias del consorcio microbiano. Este tipo de comportamiento ha sido reportado en la literatura previamente, dado que, seguido al proceso de contaminación del suelo, las comunidades microbianas deben adaptarse a su nuevo entorno con el fin de sobrevivir a al incremento drástico en la concentración de carbono, por ende, las comunidades microbianas optan por utilizar su

energía en para supervivencia más que para crecimiento y productividad (Smith et al., 2013). No se identificaron cambios estadísticamente significativos entre los sets de datos obtenidos el día 6 de incubación entre suelos contaminados y no contaminados con asfaltenos. Este es un resultado esperado dado que, resulta ser el momento inicial en el cual el consorcio microbiano inicia el proceso de respuesta y activación metabólica por la presencia del contaminante. Si bien, se identificó la expresión de genes involucrados en el metabolismo de carbohidratos y del nitrógeno, la diferencia de expresión con respecto al control no resultó ser significativa en ese determinado momento del proceso.

4.3 Análisis de expresión génica diferencial entre reactores contaminados y no contaminados con asfaltenos

Se llevó a cabo un multiensamblaje de los sets de datos obtenidos de cada una de las réplicas biológicas con el fin de incrementar la cobertura de secuenciación. Los sets de datos resultantes del día 52 de incubación se utilizaron para llevar a cabo el análisis de expresión génica diferencial. Para este análisis únicamente se tuvo en cuenta los sets de datos obtenidos mediante la extracción de ARN tardío, dado que, teniendo en cuenta el comportamiento de los perfiles transcriptómicos del día 6, se decidió continuar únicamente con los datos del día 52 de incubación. Los resultados obtenidos mostraron que dentro de los principales transcritos expresados diferencialmente en suelos contaminados con asfaltenos (con valores de $p < 0.05$) (Tabla 3), se encuentran los relacionados al metabolismo de nucleótidos, metabolismo de carbohidratos, metabolismo de aminoácidos, transporte y catabolismo y transporte de membrana.

Tabla 3.

Principales cambios en la expresión génica atribuibles a la biodegradación de asfaltenos

Familia de genes (nivel 2 de la ortología KEGG)	Ruta metabólica (nivel 3 de ortología KEGG)	Genes con expresión negativa		Genes con expresión positiva	
		Gen y enzima codificante	Fold-change	Gen y enzima codificante	Fold-change
Metabolismo de nucleótidos	Metabolismo de purinas			guaA; GMP synthase (glutamine-hydrolysing) [EC:6.3.5.2]	3,41
Metabolismo energético	Fosforilación oxidativa			qoxB; cytochrome aa3-600 menaquinol oxidase subunit I [EC:1.10.3.12]	2,12
Metabolismo de carbohidratos	Metabolismo del piruvato	pflD; formate C-acetyltransferase [EC:2.3.1.54]	-1,71	ackA; acetate kinase [EC:2.7.2.1]	1,85
	Metabolismo de sucrosa y almidón			otsA; trehalose 6-phosphate synthase [EC:2.4.1.15]	1,85
	Interconversiones de pentosa y glucuronato			araB; L-ribulokinase [EC:2.7.1.16]	1,70
	Glucólisis/Gluconeogénesis	pdhC; pyruvate dehydrogenase E2 component [EC:2.3.1.12]	-2,57	celF; 6-phospho-beta-glucosidase [EC:3.2.1.86]	1,30
Metabolismo de aminoácidos	Metabolismo de glicina, serina y treonina	DLD; dihydrolipoamide dehydrogenase [EC:1.8.1.4] asd; aspartate-semialdehyde dehydrogenase [EC:1.2.1.11]	-4,29	lysC; aspartate kinase [EC:2.7.2.4]	2,42
	Metabolismo de alanina, aspartato y glutamato			asnB; asparagine synthase (glutamine-hydrolysing) [EC:6.3.5.4]	2,28
	Degradación de valina, leucina e isoleucina	ilvI; acetolactate synthase I/II/III large subunit [EC:2.2.1.6]	-1,71	ilvE; branched-chain amino acid aminotransferase [EC:2.6.1.42] leuC; 3-isopropylmalate/(R)-2-methylmalate dehydratase large subunit [EC:4.2.1.33 4.2.1.35]	1,99

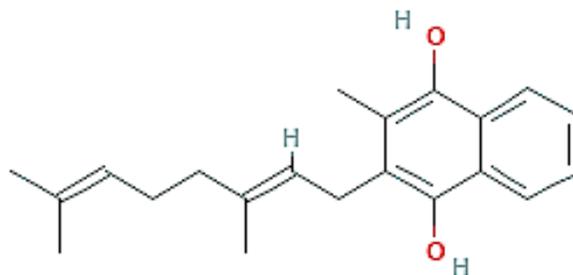
Familia de genes (nivel 2 de la ortogología KEGG)	Ruta metabólica (nivel 3 de ortogología KEGG)	Genes con expresión negativa		Genes con expresión positiva	
		Gen y enzima codificante	Fold-change	Gen y enzima codificante	Fold-change
	Degradación de lisina			sucA; 2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component [EC:1.2.4.2]	1,99
	Metabolismo de Arginina y prolina	argI; ornithine carbamoyltransferase [EC:2.1.3.3]	-2,24	proA; glutamate-5-semialdehyde dehydrogenase [EC:1.2.1.41]	1,80
Metabolismo lipídico	Metabolismo de glicerofosfolípidos	ugpQ; glycerophosphoryl diester phosphodiesterase [EC:3.1.4.46] cls; cardiolipin synthase [EC:2.7.8.-], glpD; glycerol-3-phosphate dehydrogenase [EC:1.1.5.3]	-2,04		
Transporte y catabolismo	Peroxisoma			fadD; long-chain acyl-CoA synthetase [EC:6.2.1.3]	1,99
Transporte de membrana	Transportadores ABC [PATH:ko02010]			ABC.PE.P; peptide/nickel transport system permease protein cbiO; cobalt/nickel transport system ATP-binding protein ABC-2.AB.A; antibiotic transport system ATP-binding protein	1,13
Transducción de señales	Sistema de dos componentes [PATH:ko02020]			glnA; glutamine synthetase [EC:6.3.1.2] kdpA; K+-transporting ATPase ATPase A chain [EC:3.6.3.12]	2,13

Se identificó un incremento en la expresión del gen *guaA* en los suelos contaminados con asfaltenos, el cual codifica para la enzima GMP sintasa. Se considera que el gen *guaA* es crucial para la biosíntesis de *novo* de GMP. Se caracteriza por catalizar la unión de un dominio de glutaminasa N-terminal a la L-glutamina y generar amoníaco, el cual se transfiere mediante un túnel protector del sustrato al dominio ATP-pirofosfatasa. Las purinas son indispensables en los organismos, pueden actuar como componentes básicos de la herencia (ADN y ARN), en la obtención de energía y metabolismo (ATP y GTP), transducción de señales (cAMP) e incorporarse en coenzimas (NAD⁺, NADP⁺ y coenzimas A) (Liu et al., 2022). La importancia de la generación de GMP de *novo* radica en que, durante la proliferación celular, la generación de GMP no suele satisfacer la demanda de purinas, por lo tanto, el contar con dicha maquinaria enzimática le confiere una ventaja metabólica al consorcio microbiano para mantener la viabilidad a través del tiempo durante los ensayos de biodegradación de asfaltenos. Estos resultados se correlacionan con lo mencionado por autores previamente, dado que, con el fin de asegurar la supervivencia, las comunidades microbianas optan por la obtención alternativa de energía en ambientes con altas concentraciones de carbono.

Desde el punto de vista energético, se encontró una sobreexpresión del gen *qoxB* en presencia de los asfaltenos, el cual codifica para la enzima citocromo aa3-600 menaquinol oxidasa. El menaquinol (Figura 7), es un compuesto orgánico de tipo alcohol, que contiene dos anillos aromáticos. Es importante resaltar la similitud estructural entre el menaquinol con los posibles fragmentos que pueden ser resultantes de la transformación de la molécula de asfaltano.

Figura 7

Estructura química del Menaquinol.



Nota. Adaptado de: National Library of Medicine.

Se conoce que la degradación de hidrocarburos complejos inicia mediante reacciones que suceden en la periferia de la estructura química, para así, hacer susceptibles los anillos aromáticos a su posterior oxidación (Pérez-Pantoja et al., 2016). Por lo tanto, es posible que durante la degradación de asfaltenos, se generen fragmentos análogos al menaquinol para ser aprovechados por el metabolismo energético del consorcio microbiano. La enzima citocromo aa3-600 menaquinol oxidasa cataliza la reacción de oxidación de dos electrones del menaquinol y la reducción de cuatro electrones de O_2 a $2H_2O$ (Yi et al., 2010).

Desde el punto de vista metabólico, los principales transcritos sobreexpresados en presencia de asfaltenos correspondieron a genes clasificados dentro de las rutas metabólicas del metabolismo de aminoácidos y metabolismo de carbohidratos. Entre ellos, predominaron las enzimas de tipo cinasa, deshidrogenasa y aminotransferasas, consideradas como enzimas clave en diferentes procesos de biodegradación. Se evidencia un predominio de genes del metabolismo de aminoácidos. La estructura química de los aminoácidos representa cierta analogía con algunos

intermediarios en la degradación de hidrocarburos, además de ser, en su mayoría, compuestos nitrogenados en su estructura. Esta similitud estructural podría conllevar a la utilización y, por ende, transformación del hidrocarburo por parte de la maquinaria enzimática del metabolismo de los aminoácidos, lo cual, en consecuencia, conlleva a su respectiva sobreexpresión en los suelos contaminados con asfaltenos. Por otra parte, se resalta la expresión positiva del gen *ackA*, el cual codifica para una enzima de tipo Acetato Cinasa. Dicha enzima se caracteriza por participar en la activación del Acetil-CoA para ser posteriormente utilizado por una enzima de tipo deshidrogenasa (Timmis, 2010). Entre las rutas metabólicas de transporte y metabolismo, fue posible identificar una sobreexpresión del gen *fadD*, el cual codifica para la enzima Acil-CoA sintetasa de cadena larga. Dicha enzima juega un papel fundamental en el metabolismo intermediario al catalizar la formación de Acil-CoA. Este proceso es indispensable para realizar la activación de ácidos grasos de cadena larga para servir como sustrato en el proceso de β -oxidación para la obtención de energía y biosíntesis de fosfolípidos (Weimar et al., 2002).

Desde el punto de vista funcional, la expresión de transportadores ABC y sistemas de dos componentes fue predominante. De dicha expresión de genes, es importante resaltar la expresión de transportadores ABC tanto de minerales, iones orgánicos y cationes metálicos (Figura 9). La molécula de asfaltenos se caracteriza por contener cierta proporción de heteroátomos de nitrógeno, azufre, oxígeno y metales pesados (Kshirsagar et al., 2020). En el presente trabajo, para la contaminación de suelos se utilizó una muestra de asfaltenos puros la cual contenía una composición de níquel e 406 ppm y Vanadio de 1601 ppm, y una proporción de Nitrógeno del 1.5% y Azufre 4.5%. Por otra parte, se presentó una sobreexpresión del gen *glnA*, el cual codifica para la enzima Glutamina Sintetasa, clave en la ruta metabólica del nitrógeno de los

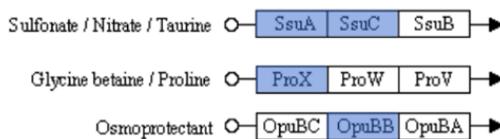
microorganismos (Yin et al., 2022). El producto de la traducción del gen *glnA* corresponde al 97% de la actividad total de la enzima Glutamina Sintetasa y, ha sido demostrado que su expresión se encuentra vinculada con la deficiencia de nitrógeno en el medio extracelular (Reyes et al., 1997). La limitación en las concentraciones de nitrógeno en ambientes contaminados con hidrocarburos es conocida, dado que, un incremento en cadenas hidrocarbonadas afecta la proporción de nitrógeno disponible para los microorganismos. Se ha reportado que, una limitación en la disponibilidad de nitrógeno en el medio extracelular conlleva a la disminución de la eficiencia de biodegradación, dado que afecta considerablemente los mecanismos de adsorción celular (Borges et al., 2008). En contraste con el comportamiento de la expresión génica de *glnA* por parte del consorcio microbiano, sugiere un posible mecanismo de protección celular frente a las condiciones de baja disponibilidad de nitrógeno que induce el estrés oxidativo microbiano.

Figura 8

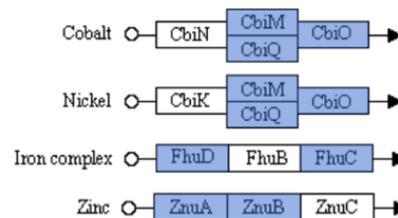
Expresión de genes que codifican para transportadores ABC por parte del consorcio microbiano en el día 52 de tratamiento.

Transportadores ABC expresados

Transportadores de minerales e iones orgánicos



Transportadores de cationes metálicas



Nota. Obtenido mediante la herramienta KEGG *mapper*. Los cuadros de color azul representan los genes que se encuentran expresados en dicho momento.

En la Figura 8 se observa que al día 52 de tratamiento, se induce una sobreexpresión de genes codificantes para diferentes subunidades de los transportadores ABC, de los cuales se destacan aquellos encargados del transporte de metales pesados como el níquel (Se observan resaltados de color azul). La actividad de los microorganismos en el suelo se ve afectada de forma negativa por la concentración elevada de metales pesados. Por otra parte, los genes de transportadores de tipo ABC están frecuentemente presentes en grupos de genes asociados con el catabolismo de compuestos aromáticos (Sierra-García et al., 2014). Los microorganismos han desarrollado diferentes mecanismos de resistencia y tolerancia para cada tipo de metal pesado. Su funcionamiento se basa en la expulsión del citoplasma celular dichos metales con el fin de evadir su toxicidad (W.-Y. Song et al., 2014).

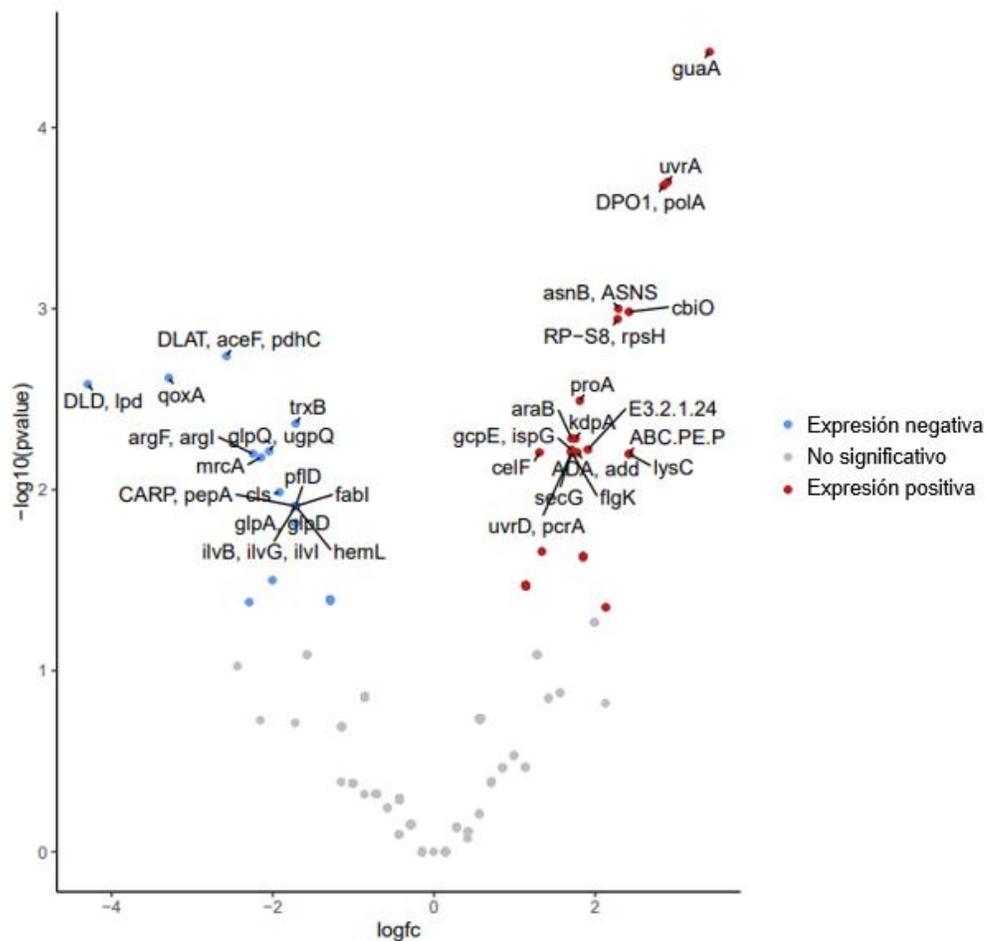
Juntos, estos resultados sugieren que el metabolismo de carbohidratos, el metabolismo energético y el metabolismo de aminoácidos podrían tener un papel fundamental en la degradación de asfaltenos. En la Figura 9 es posible evaluar de forma gráfica el comportamiento de los transcritos expresados de forma diferencial en presencia de asfaltenos como única fuente de carbono al finalizar los ensayos de biodegradación realizados. En este, se grafía el cálculo de *fold-change* con el fin de evaluar el cambio en la expresión génica inducida por el crecimiento del consorcio microbiano en presencia de asfaltenos como única fuente de carbono, y la probabilidad de error en llamada de base, que evalúa la precisión de las secuencias.

La mayor limitante que han presentado los estudios de biodegradación de asfaltenos hasta la fecha es la ausencia de una muestra de asfaltenos puros para el desarrollo metodológico de cada uno (Nzila & Musa, 2021). En el presente trabajo, fue posible trabajar con una muestra de

asfaltenos puros extraídas a partir de petróleo crudo pesado, razón por la cual, los mecanismos metabólicos utilizados por el consorcio microbiano durante los ensayos de biodegradación son atribuibles únicamente a la presencia del contaminante.

De manera adicional fue posible identificar que, además de las rutas metabólicas y genes específicos que se activan durante la degradación de los asfaltenos, las rutas que componen el **Figura 9**

Gráfico de tipo Volcano plot que representa gráficamente la expresión génica diferencial por parte del consorcio microbiano en presencia de suelos contaminados con asfaltenos.

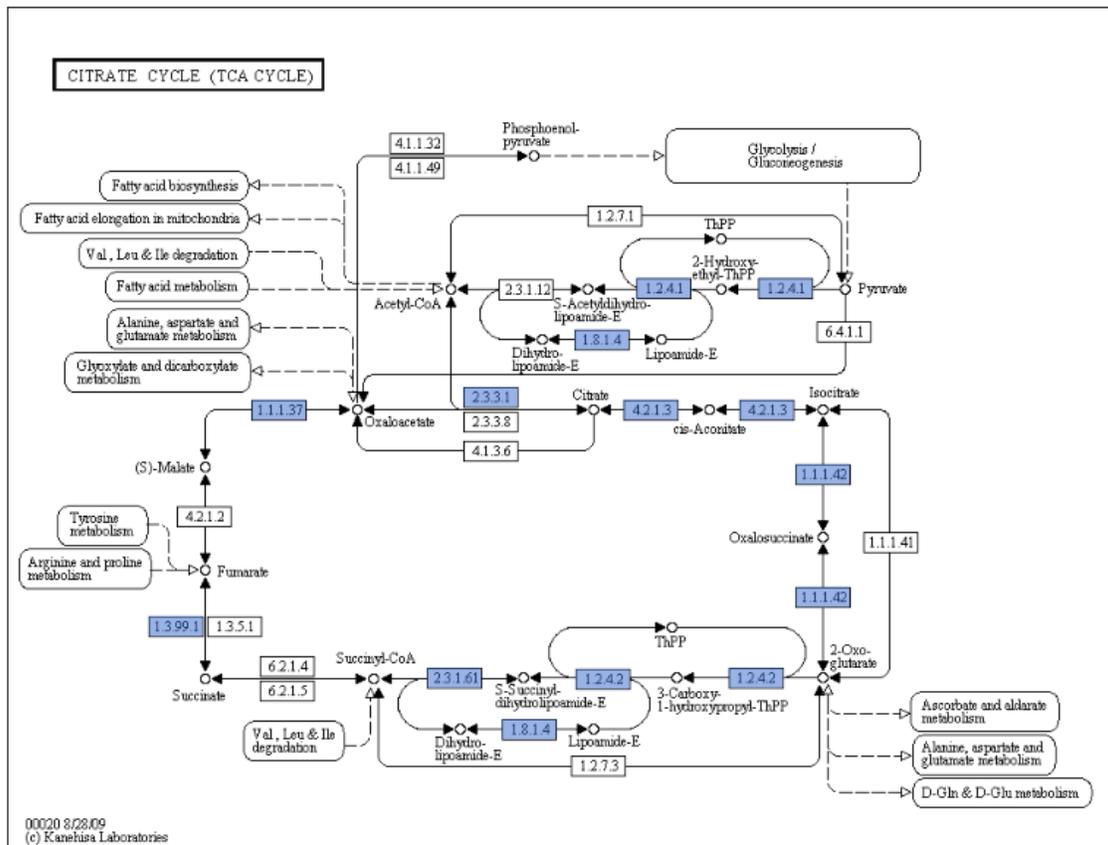


Nota: \log_{fc} : Cálculo de *Fold-change*. $-\log_{10}(pvalue)$: probabilidad de error de llamada de base.

metabolismo central microbiano (Glucólisis y ciclo de Krebs, entre otros) se encuentran también sobreexpresadas y en funcionamiento para la producción de energía (figuras 10 y 11), lo cual confirma que la biodegradación de los asfaltenos por parte del consorcio bacteriano degradador conduce a una mineralización aerobia en donde el CO₂ es uno de los metabolitos finales.

Figura 10

Expresión de genes relacionados con la ruta metabólica de Ácido Cítrico como posible mecanismo energético involucrado en la degradación de asfaltenos.



Nota. Los cuadros de color azul corresponden a los genes expresados por parte del consorcio microbiano, los cuales codifican para enzimas clave en la ruta metabólica relacionada.

4.3 Mecanismos metabólicos implicados en la degradación de los asfaltenos en suelo

Algunos autores han realizado aproximaciones teóricas de los posibles mecanismos de biodegradación de asfaltenos, teniendo en cuenta la estructura química que presentan y los procesos de degradación de hidrocarburos de alto peso molecular conocidos. Se propone que, para incrementar la eficiencia en la degradación de asfaltenos es necesario aplicar procedimientos distintos a los microbianos, por ejemplo, la aplicación de solventes polares o procesos de fotooxidación, de tal forma que se genere una fragmentación de la estructura del asfalteno (Pineda-Flores & Mesta-Howard, 2001). La biotransformación de los compuestos aromáticos altamente hidrofóbicos puede estar relacionada y dar indicios sobre las rutas metabólicas implicadas directamente de la degradación de los asfaltenos (Hernández-López et al., 2015). La combinación de eventos tales como la fragmentación, la adición de sustratos cometabólicos (alcanos, propano, succinato) y consorcios microbianos adaptados al petróleo como única fuente de carbono y energía, brinda la posibilidad de que las estructuras más pequeñas obtenidas luego de la fragmentación sean susceptibles a la degradación (Pineda-Flores & Mesta-Howard, 2001). Estas aproximaciones continúan siendo la base del entendimiento sobre los posibles mecanismos metabólicos implicados en la degradación de asfaltenos, debido a que aún no se han reportado estudios que evalúen la veracidad de estas hipótesis teóricas de manera experimental. Sin embargo, hasta la fecha, no existe información alguna sobre los mecanismos específicos de degradación (por ejemplo, enzimas o mecanismos fisiológicos) involucrados directamente en la biodegradación de los asfaltenos.

Como resultado de este trabajo y con base en los datos obtenidos a partir de la actividad microbiana del consorcio degradador en el suelo, las tasas de biodegradación de los asfaltenos, las características bioquímicas propias del consorcio microbiano y el análisis de expresión génica

diferencial durante el proceso de biodegradación, es posible proponer una serie de eventos que deben tener lugar para que las moléculas asfálticas puedan ser mineralizadas en el suelo, siendo este el primer reporte experimental sobre los posibles mecanismos activos durante un proceso de biodegradación de asfaltenos en suelo, evaluados mediante técnicas transcriptómicas.

En primer lugar, y teniendo en cuenta la biodegradabilidad de los hidrocarburos según su tamaño y complejidad, el proceso iniciaría por un fraccionamiento inicial de los asfaltenos mediante la transformación de los hidrocarburos saturados asociados que funcionan como puentes dentro de la molécula, seguido de una oxidación de los anillos aromáticos resultantes en la estructura (Nzila & Musa, 2021). Sin embargo, en el presente trabajo se identificó que, además de ser necesaria una maquinaria metabólica, es indispensable contar con mecanismos de adaptación fisiológicos que les permita mantener su viabilidad durante el proceso de biodegradación. Los mecanismos fisiológicos asociados a la tolerancia y la adaptación estarían asociados principalmente con la sobreexpresión de los transportadores de tipo ABC, particularmente de aquellos que transportan metales tales como el níquel y el cobalto (transportadores ABC.PE.P y *cbiO*), de antibióticos (ABC-2.AB.A), y del sistema de dos componentes (glutamina sintasa *glnA* y ATPasa transportadora de K^+ *kdpA*), claves para el sensado de elementos químicos fuera de la célula, del sistema de osmoprotección asociado a la expresión del gen de la trehalosa 6-fosfato sintasa (*otsA*) y de quimiotaxis bacteriana (*motA*) (). (Chen et al., 2022; Hu et al., 2022)

Una vez adaptados los microorganismos, la degradación parcial de los asfaltenos iniciaría mediante la expresión de genes codificantes de deshidrogenasas (glutamato-5-semialdehído deshidrogenasa), sintasas (GMP sintasa /hidrólisis de glutamina) y deshidratasas (3-isopropylmalate deshidratasa) involucradas en la degradación de aminoácidos cortos y de cadena lineal (glutamina, lisina, leucina, alanina, aspartato). También participarían genes codificantes de

enzimas involucradas en el metabolismo de grasas/aceites (triacilglicerol lipasa), así como de enzimas con el potencial de romper anillos aromáticos, tales como la menaquinol oxidasa (*qoxB*), enzimas involucradas en la degradación de aminoácidos aromáticos tales como la 4-hidroxifenilacetato 3-monooxigenasa (*hpaB*) y la catalasa peroxidasa (*katG*), así como de degradación del geraniol (E1.3.99 deshidrogenasa), entre otros. La actividad combinada de dichas enzimas promovería un cambio estructural lento en las moléculas asfálticas mediante la ruptura de los puentes alifáticos de los asfaltenos y la degradación de compuestos aromáticos simples, transformándolas desde compuestos pesados hasta fragmentos utilizables por los diferentes microorganismos tolerantes presentes en los suelos. A la par de la generación de los diferentes intermediarios metabólicos de menor peso molecular, éstos podrían ser utilizados por las rutas metabólicas centrales de los microorganismos tales como glucólisis, ciclo de Krebs, beta oxidación y fosforilación oxidativa, además del peroxisoma (Acyl-CoA sintetasas de cadena larga) como fuente de carbono y energía.

5. Conclusiones

Los resultados sugieren que se produjo una mineralización eficiente de los asfaltenos durante los ensayos de biodegradación por parte del consorcio microbiana, con una producción de CO₂ asociada a los procesos metabólicos activos por parte del consorcio microbiano en suelos contaminados con asfaltenos, y con una eficiencia de degradación de 86% después de 52 días de tratamiento.

Las principales diferencias en los patrones de expresión génica durante todo el proceso de degradación de asfaltenos en suelo por parte el consorcio microbiano consistió en cambios significativos en la expresión de genes relacionados con el metabolismo de los carbohidratos, aminoácidos, metabolismo para la generación de energía energético y catabólico.

Los mecanismos de adaptación fisiológica y de tolerancia del consorcio microbiano son necesarios para que se produzca el proceso de biodegradación de los asfaltenos, y se relacionan con una sobreexpresión de los transportadores de tipo ABC encargados del transporte del níquel y el cobalto, del sistema de dos componentes, del sistema de osmoprotección asociado al gen de la trehalosa 6-fosfato sintasa y de genes asociados a la quimiotaxis bacteriana.

Los mecanismos metabólicos específicos asociados a la degradación de los asfaltenos corresponden a una combinación de mecanismos que actúan en conjunto y que llevan a la mineralización, los cuales consisten en la degradación de aminoácidos cortos y de cadena lineal, el metabolismo de grasas y aceites, así como de enzimas de tipo peroxidasas, monooxigenasa,

dehidrogenasas y catalasa con el potencial de romper anillos aromáticos, seguido de rutas metabólicas centrales tales como la glucólisis, el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa, los cuales permiten al consorcio microbiano usar a los asfaltenos como única fuente de carbono y energía.

6. Recomendaciones

Con el fin de completar el presente estudio, se hace necesaria la evaluación de la expresión génica en diferentes momentos del proceso, de tal forma se permita obtener la mayor cobertura de información y seguir el proceso de biodegradación a través del tiempo. Adicional a esto, sería indispensable evaluar en simultáneo, la transformación de la molécula de asfalto con el fin de correlacionar la actividad metabólica y los posibles metabolitos intermediarios producidos.

Se recomienda continuar la evaluación de los mecanismos metabólicos y fisiológicos de biodegradación de asfaltos mediante técnicas ómicas complementarias, con el fin de establecer de forma específica las rutas metabólicas y genes asociados a la degradación.

Referencias Bibliográficas

- Adebiyi, F. M. (2021). An insight into asphaltene precipitation, deposition and management stratagems in petroleum industry. *Journal of Pipeline Science and Engineering*, 1(4), 419–427. <https://doi.org/10.1016/j.jpse.2021.08.006>
- Afgan, E., Nekrutenko, A., Grüning, B. A., Blankenberg, D., Goecks, J., Schatz, M. C., Ostrovsky, A. E., Mahmoud, A., Lonie, A. J., Syme, A., Fouilloux, A., Bretaudeau, A., Nekrutenko, A., Kumar, A., Eschenlauer, A. C., Desanto, A. D., Guerler, A., Serrano-Solano, B., Batut, B., ... Briggs, P. J. (2022). The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2022 update. *Nucleic Acids Research*, 50(W1), W345–W351. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAC247>
- Al-Zaban, M. I., AlHarbi, M. A., & Mahmoud, M. A. (2021). Hydrocarbon biodegradation and transcriptome responses of cellulase, peroxidase, and laccase encoding genes inhabiting rhizospheric fungal isolates. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(4), 2083–2090. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.01.009>
- Ali, H. R., El-Gendy, N. S., Moustafa, Y. M., Roushdy, M. I., & Hashem, A. I. (2012). Degradation of Asphaltenic Fraction by Locally Isolated Halotolerant Bacterial Strains. *ISRN Soil Science*, 2012, 1–11. <https://doi.org/10.5402/2012/435485>
- Bala, S., Garg, D., Thirumalesh, B. V., Sharma, M., Sridhar, K., Inbaraj, B. S., & Tripathi, M. (2022). Recent Strategies for Bioremediation of Emerging Pollutants: A Review for a Green and Sustainable Environment. *Toxics* 2022, Vol. 10, Page 484, 10(8), 484. <https://doi.org/10.3390/TOXICS10080484>
- Borges, M. T., Nascimento, A. G., Rocha, U. N., & Tótola, M. R. (2008). Nitrogen starvation

- affects bacterial adhesion to soil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39(3), 457–463.
<https://doi.org/10.1590/S1517-83822008000300009>
- Chen, T., Li, Z., Liu, J., & Liang, C. (2022). Cloning, expression and function analysis of trehalose-6-phosphate synthase gene from *Marsupenaeus japonicus*. *Gene*, 808, 145971.
<https://doi.org/10.1016/J.GENE.2021.145971>
- Dussán, J., Vives-Florez, M., Sarria, V., Sánchez, O., Delgado, L., Hernández, S., & González, A. (2010). Aproximaciones biológicas y fisicoquímicas en el tratamiento de contaminantes: un resumen del aporte de la Universidad de los Andes. *Revista de Ingeniería*, 30, 100–111.
- Ecopetrol S.A. (2020). *Reporte integrado de gestión sostenible*.
<https://www.ecopetrol.com.co/wps/portal/>
- Fernández, C., Labrador, H., Mendoza, K., Aponte, L., Medina, L., & Izzeddin, N. (2012). Biodegradación de compuestos recalcitrantes procedentes de un crudo extrapesado aplicando técnicas de biorremediación. *Revista Técnica de La Facultad de Ingeniería Universidad Del Zulia*, 35(3), 215–223.
- Fernández Linares, L. C., Rojas Avelizapa, N. G., Roldán Carrillo, T. G., Ramírez Islas, M. E., Zegarra Martínez, H. G., Uribe Hernández, R., Reyéz Ávila, R. J., Flores Hernández, D., & Arce Ortega, J. M. (2006). Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación. In *Biblioteca Digital (CIGA) de la SEMARNAT* (p. 180).
- Fulekar, M. H. (2017). Microbial degradation of petrochemical waste-polycyclic aromatic hydrocarbons. *Bioresources and Bioprocessing*, 4(1). <https://doi.org/10.1186/s40643-017-0158-4>
- García, E., Roldán, F., & Garzón, L. (2011). Evaluation of biostimulation (nutrients) in hydrocarbons contaminated soils by respirometry. *Acta Biologica Colombiana*, 16(1), 195–

208.

Ghazali, F. M., Rahman, R. N. Z. A., Salleh, A. B., & Basri, M. (2004). Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 54(1). <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2004.02.002>

Giovanella, P., Vieira, G. A. L., Ramos Otero, I. V., Pais Pellizzer, E., de Jesus Fontes, B., & Sette, L. D. (2020). Metal and organic pollutants bioremediation by extremophile microorganisms. *Journal of Hazardous Materials*, 382(August 2019), 121024. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121024>

Gudiña, E. J., & Teixeira, J. A. (2017). HC-0C-03: Biological treatments to improve the quality of heavy crude oils. In *Environmental Footprints and Eco-Design of Products and Processes* (pp. 337–351). Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-0201-4_10

Harman, J. (2013). *Petróleo*. INDEPAZ.

Hasanvand, M. Z., Montazer, M., Salehzadeh, M., Amiri, M., & Fathinasab, M. (2018). A literature review of asphaltene entity, precipitation, and deposition, introducing recently models of deposition in the well column. *Journal of Oil, Gas and Petrochemical Sciences*, 1(2), 83–89. <https://doi.org/10.30881/jogps.00016>

Hernández-López, E. L., Ayala, M., & Vazquez-Duhalt, R. (2015). Microbial and Enzymatic Biotransformations of Asphaltenes. *Petroleum Science and Technology*, 33(9), 1017–1029. <https://doi.org/10.1080/10916466.2015.1014960>

Hernández-López, E. Lorena, Perezgasga, L., Huerta-Saquero, A., Mouriño-Pérez, R., & Vazquez-Duhalt, R. (2016). Biotransformation of petroleum asphaltenes and high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Neosartorya fischeri*. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(11), 10773–10784. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6277-1>

- Hernández Macedo, M. L. (2020). Sección II : Industrial and Environmental Biotechnology Mini Review Biotecnología ambiental : desafíos y perspectivas en la aplicación de tecnologías combinadas para mejorar la remediación y la generación Environmental Biotechnology : Challenges and perspe. *Revista Peruana de Biología*, 27(1), 43–48.
- Hu, H., Santiveri, M., Wadhwa, N., Berg, H. C., Erhardt, M., & Taylor, N. M. I. (2022). Structural basis of torque generation in the bi-directional bacterial flagellar motor. *Trends in Biochemical Sciences*, 47(2), 160–172. <https://doi.org/10.1016/J.TIBS.2021.06.005>
- Iraji, S., & Ayatollahi, S. (2019). Experimental investigation on asphaltene biodegradability using microorganism: cell surface properties' approach. *Journal of Petroleum Exploration and Production Technology*, 9(2), 1413–1422. <https://doi.org/10.1007/s13202-018-0537-1>
- Jabbar, N. M., Alardhi, S. M., Mohammed, A. K., Salih, I. K., & Albayati, T. M. (2022). Challenges in the implementation of bioremediation processes in petroleum-contaminated soils: A review. *Environmental Nanotechnology, Monitoring and Management*, 18(April), 100694. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2022.100694>
- Jahromi, H., Fazaelpoor, M. H., Ayatollahi, S., & Niazi, A. (2014). Asphaltenes biodegradation under shaking and static conditions. *Fuel*, 117(PART A), 230–235. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2013.09.085>
- Kanehisa, M., Sato, Y., Kawashima, M., Furumichi, M., & Tanabe, M. (2016). KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D457–D462. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1070>
- Kirkwood, K. M., Ebert, S., Foght, J. M., Fedorak, P. M., & Gray, M. R. (2005). Bacterial biodegradation of aliphatic sulfides under aerobic carbon- or sulfur-limited growth conditions. In *Journal of Applied Microbiology* (Vol. 99, Issue 6, pp. 1444–1454).

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02723.x>

- Kshirsagar, S. D., Mattam, A. J., Jose, S., Ramachandrarao, B., & Velankar, H. R. (2020). Heavy hydrocarbons as selective substrates for isolation of asphaltene degraders: A substrate-based bacterial isolation strategy for petroleum hydrocarbon biodegradation. *Environmental Technology and Innovation*, *19*, 100832. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.100832>
- Lavania, M., Cheema, S., Sarma, P. M., Mandal, A. K., & Lal, B. (2012). Biodegradation of asphalt by *Garciaella petrolearia* TERIG02 for viscosity reduction of heavy oil. *Biodegradation*, *23*(1), 15–24. <https://doi.org/10.1007/s10532-011-9482-0>
- Liu, M. Y., Sun, L. X., Qian, H., Zhang, Y. R., Zhu, X. M., Li, L., Liang, S., Lu, J. P., Lin, F. C., & Liu, X. H. (2022). De Novo Purine Nucleotide Biosynthesis Pathway Is Required for Development and Pathogenicity in *Magnaporthe oryzae*. *Journal of Fungi*, *8*(9). <https://doi.org/10.3390/jof8090915>
- Malagón, J. (2016). La competitividad del sector de hidrocarburos en las diferentes regiones de Colombia. *Programa de Las Naciones Unidas Para El Desarrollo PNUD*.
- Martínez, A. (2018). *Estudio sobre el impacto de la actividad petrolera en las regiones productoras de Colombia. Caracterización departamental de Santander: Vol. N° 66*. Fededesarrollo. <http://repositorio.unan.edu.ni/2986/1/5624.pdf>
- Mesa, S. L., Orjuela, J. M., Ortega Ramírez, A. T., & Sandoval, J.-A. (2018). Revisión del panorama actual del manejo de agua de producción en la industria petrolera colombiana. *Gestión y Ambiente*, *21*(1), 87–98. <https://doi.org/10.15446/ga.v21n1.69792>
- Meyer, F., Paarmann, D., D'Souza, M., Olson, R., Glass, E. M., Kubal, M., Paczian, T., Rodriguez, A., Stevens, R., Wilke, A., Wilkening, J., & Edwards, R. A. (2008). The metagenomics RAST server - A public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of

- metagenomes. *BMC Bioinformatics*, 9, 1–8. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-386>
- Michael-Igolima, U., Abbey, S. J., & Ifelebuegu, A. O. (2022). A systematic review on the effectiveness of remediation methods for oil contaminated soils. *Environmental Advances*, 9, 100319. <https://doi.org/10.1016/J.ENVADV.2022.100319>
- Mullins, O. C., Martínez-Haya, B., & Marshall, A. G. (2008). Contrasting Perspective on Asphaltene Molecular Weight. This Comment vs the Overview of A. A. Herod, K. D. Bartle, and R. Kandiyoti. *Energy and Fuels*, 22(3), 1765–1773. <https://doi.org/10.1021/EF700714Z>
- Munshi, A., & Sharma, V. (2018). Omics and Edible Vaccines. *Omics Technologies and Bio-Engineering: Volume 2: Towards Improving Quality of Life*, 129–141. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815870-8.00008-5>
- Navas-Cáceres, O. (2021). *Análisis de la biorremediación de suelos contaminados con asfaltenos y petróleo crudo pesado utilizando un consorcio microbiano* [Universidad Industrial de Santander]. <http://www.ufrgs.br/actavet/31-1/artigo552.pdf>
- Nzila, A., & Musa, M. M. (2021). Current Knowledge and Future Challenges on Bacterial Degradation of the Highly Complex Petroleum Products Asphaltenes and Resins. *Frontiers in Environmental Science*, 9(November), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2021.779644>
- Ossai, I. C., Ahmed, A., Hassan, A., & Hamid, F. S. (2020). Remediation of soil and water contaminated with petroleum hydrocarbon: A review. *Environmental Technology and Innovation*, 17. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2019.100526>
- Parks, D. (2014). *STAMP User's Guide v2*. 28.
- Parks, D. H., Tyson, G. W., Hugenholtz, P., & Beiko, R. G. (2014). STAMP: Statistical analysis of taxonomic and functional profiles. *Bioinformatics*, 30(21), 3123–3124. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu494>

- Pérez-Pantoja, D., González, B., & Pieper, D. (2016). Aerobic Degradation of Hydrocarbons, Oils, and Lipids. In *Aerobic Utilization of Hydrocarbons, Oils, and Lipids, Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* (pp. 1–44). <https://doi.org/10.1007/978-3-319-39782-5>
- Pfeiffer, J. P., & Saal, R. N. J. (1940). Asphaltic bitumen as colloid system. *Journal of Physical Chemistry*, *44*(2), 139–149. https://doi.org/10.1021/J150398A001/ASSET/J150398A001.FP.PNG_V03
- Pineda-Flores, G., & Mesta-Howard, A. M. (2001). Petroleum asphaltenes: Generated problematic and possible biodegradation mechanisms. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, *43*(3), 143–150.
- Reyes, J. C., Muro-Pastor, M. I., & Florencio, F. J. (1997). Transcription of glutamine synthetase genes (glnA and glnN) from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 is differently regulated in response to nitrogen availability. *Journal of Bacteriology*, *179*(8), 2678–2689. <https://doi.org/10.1128/jb.179.8.2678-2689.1997>
- Rojas-Bahamón, M., Arbeláez-Campillo, D., & Olha, P. (2022). EL CONFLICTO SOCIOAMBIENTAL POR EXPLORACIÓN PETROLERA EN EL SUR DE COLOMBIA. *Revista Notas Históricas y Geográficas*, *28*(Enero-Junio), 184–196.
- Rottensteiner, H., & Theodoulou, F. L. (2006). The ins and outs of peroxisomes: Co-ordination of membrane transport and peroxisomal metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, *1763*(12), 1527–1540. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2006.08.012>
- Sardrood, B. P., Goltapeh, E. M., & Varma, A. (2013). An Introduction to Bioremediation. In *Fungi as bioremediators* (pp. 3–27). Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978->

3-642-33811-3

- Sharma, P., Singh, S. P., Iqbal, H. M. N., & Tong, Y. W. (2022). Omics approaches in bioremediation of environmental contaminants: An integrated approach for environmental safety and sustainability. *Environmental Research*, 211, 113102. <https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2022.113102>
- Sierra-García, I. N., Alvarez, J. C., De Vasconcellos, S. P., De Souza, A. P., Dos Santos Neto, E. V., & De Oliveira, V. M. (2014). New hydrocarbon degradation pathways in the microbial metagenome from brazilian petroleum reservoirs. *PLoS ONE*, 9(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090087>
- Smith, R. J., Jeffries, T. C., Adetutu, E. M., Fairweather, P. G., & Mitchell, J. G. (2013). Determining the metabolic footprints of hydrocarbon degradation using multivariate analysis. *PLoS ONE*, 8(11), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081910>
- Song, W.-Y., Park, J., Eisenach, C., Maeshima, M., Lee, Y., & Martinoia, E. (2014). *ABC Transporters and Heavy Metals*. 1–17. https://doi.org/10.1007/978-3-319-06511-3_1
- Song, W. F., Wang, J. W., Yan, Y. C., An, L. Y., Zhang, F., Wang, L., Xu, Y., Tian, M. Z., Nie, Y., & Wu, X. L. (2018). Shifts of the indigenous microbial communities from reservoir production water in crude oil- and asphaltene-degrading microcosms. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 132(April), 18–29. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2018.04.015>
- Stepanova, A. Y., Gladkov, E. A., Osipova, E. S., Gladkova, O. V., & Tereshonok, D. V. (2022). Bioremediation of Soil from Petroleum Contamination. *Processes*, 10(6), 1224. <https://doi.org/10.3390/pr10061224>
- Tavassoli, T., Mousavi, S. M., Shojaosadati, S. A., & Salehizadeh, H. (2012). Asphaltene

- biodegradation using microorganisms isolated from oil samples. *Fuel*, 93, 142–148. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2011.10.021>
- Thakur, B., Yadav, R., Fraissinet-Tachet, L., Marmeisse, R., & Sudhakara Reddy, M. (2018). Isolation of multi-metal tolerant ubiquitin fusion protein from metal polluted soil by metatranscriptomic approach. *Journal of Microbiological Methods*, 152(April), 119–125. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.08.001>
- Timmis, K. (Ed). (2010). *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* (Vol. 1). Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Trujillo Toro, M. A., & Ramírez Quirama, J. F. (2012). Biorremediación en suelos contaminados con hidrocarburos en Colombia. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 3(2), 37. <https://doi.org/10.22490/21456453.952>
- Tyagi, M., da Fonseca, M. M. R., & de Carvalho, C. C. C. R. (2011). Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. *Biodegradation*, 22(2), 231–241. <https://doi.org/10.1007/s10532-010-9394-4>
- Uribe-Alvarez, C., Ayala, M., Perezgasga, L., Naranjo, L., Urbina, H., & Vazquez-Duhalt, R. (2011). First evidence of mineralization of petroleum asphaltenes by a strain of *Neosartorya fischeri*. *Microbial Biotechnology*, 4(5), 663–672. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2011.00269.x>
- van der Walt, A. J., van Goethem, M. W., Ramond, J. B., Makhalanyane, T. P., Reva, O., & Cowan, D. A. (2017). Assembling metagenomes, one community at a time. *BMC Genomics*, 18(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3918-9>
- Varjani, S. J. (2017a). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. *Bioresource Technology*, 223, 277–286. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.037>

- Varjani, S. J. (2017b). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. *Bioresource Technology*, 223, 277–286. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.037>
- Viñas, M., & Solanas, A. (2005). Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos : caracterización microbiológica , química y ecotoxicológica hidrocarburos : caracterización microbiológica , química y ecotoxicológica. *Universitat de Barcelona*, 352. <http://www.tdx.cesca.es/TDX-0920105-085623/>
- Weimar, J. D., DiRusso, C. C., Delio, R., & Black, P. N. (2002). Functional Role of Fatty Acyl-Coenzyme A Synthetase in the Transmembrane Movement and Activation of Exogenous Long-chain Fatty Acids. *Journal of Biological Chemistry*, 277(33), 29369–29376. <https://doi.org/10.1074/jbc.m107022200>
- Xu, X., Liu, W., Tian, S., Wang, W., Qi, Q., Jiang, P., Gao, X., Li, F., Li, H., & Yu, H. (2018). Petroleum Hydrocarbon-Degrading Bacteria for the Remediation of Oil Pollution Under Aerobic Conditions: A Perspective Analysis. *Frontiers in Microbiology*, 9(December), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02885>
- Xue, J., Yu, Y., Bai, Y., Wang, L., & Wu, Y. (2015a). Marine Oil-Degrading Microorganisms and Biodegradation Process of Petroleum Hydrocarbon in Marine Environments: A Review. *Current Microbiology*, 71(2), 220–228. <https://doi.org/10.1007/s00284-015-0825-7>
- Xue, J., Yu, Y., Bai, Y., Wang, L., & Wu, Y. (2015b). Marine Oil-Degrading Microorganisms and Biodegradation Process of Petroleum Hydrocarbon in Marine Environments: A Review. *Current Microbiology*, 71(2), 220–228. <https://doi.org/10.1007/s00284-015-0825-7>
- Yi, S. M., Narasimhulu, K. V, Samoilova, R. I., Gennis, R. B., & Dikanov, S. A. (2010). Characterization of the Semiquinone Radical Stabilized by the Cytochrome aa 3-600 Menaquinol Oxidase of *Bacillus subtilis* * □ S. *Journal of Biological Chemistry*, 285, 18241–

18251. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.116186>

Yin, H., Yang, F., He, X., Du, X., Mu, P., & Ma, W. (2022). Advances in the functional study of glutamine synthetase in plant abiotic stress tolerance response. *Crop Journal*, 10(4), 917–923. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2022.01.003>

Zafra, G. (2015). *Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by Trichoderma species : a mini review*. 19426–19433. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5602-4>