

**Análisis taxonómico y metataxonómico de cultivos bacterianos de
muestras de aguas asociadas a producción de hidrocarburos mediante el
análisis de secuencias del gen ARNr 16S**

Kevin Mauricio Vera Martínez

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Biología

Bucaramanga-Santander

2022

**Análisis taxonómico y metataxonómico de cultivos bacterianos de
muestras de aguas asociadas a producción de hidrocarburos mediante el
análisis de secuencias del gen ARNr 16S**

Kevin Mauricio Vera Martínez

Trabajo de grado presentado para optar por el título de Biólogo

Edinson Andrés Puentes Cala

Director del proyecto

Jorge Hernández Torres

Co-director del proyecto

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Biología

Bucaramanga-Santander

2022

*“Tener conocimiento no es suficiente, tenemos que aplicarlo. Tener voluntad no basta hay
que implementarla”*

Johann Wolfgang Goethe

Agradecimientos

A la Universidad Industrial de Santander, por permitirme la culminación de esta meta, como egresado de una de las mejores instituciones de educación superior de Colombia.

A mis tutores de trabajo de grado, Jorge Hernandez y Edinson Puentes, por su acompañamiento y apoyo en el desarrollo del proyecto y por todos sus consejos y recomendaciones.

A cada uno de los docentes de la Escuela de Biología, sus enseñanzas y orientación hicieron que pudiera optar por el título de Biólogo.

A mi madre, Martha Martínez Madera y al resto de mi familia por su apoyo y motivación incondicional.

A todas las personas que de alguna manera contribuyeron en mi formación académica y ayudaron en este proceso.

Resumen

Título: Análisis taxonómico y metataxonómico de cultivos bacterianos de muestras de aguas asociadas a producción de hidrocarburos mediante el análisis de secuencias del gen ARNr 16S

Autor: Vera Martínez Kevin Mauricio

Palabras Clave: ARNr 16S, Biorremediación, Bacteria, Análisis Taxonómico

Descripción:

Las bacterias son los seres vivos más abundantes del planeta, pudiendo ocupar nichos acuáticos, terrestres y con condiciones ambientales extremas. Dada esta característica, sus caracteres genotípicos y fenotípicos han diversificado mostrando una gran variedad de metabolismos, pudiendo usar un sinnúmero de compuestos químicos como fuente de energía.

La presencia de estos organismos en ambientes industriales y perturbados por el hombre puede representar, en muchos casos, una ventaja medioambiental para mitigar el daño antropogénico sobre el ecosistema.

La biorremediación, es una de estas ventajas que permite el uso de estos organismos o su maquinaria enzimática para realizar procesos de saneamiento ambiental. Se ha documentado que varios géneros bacterianos poseen la maquinaria celular necesaria para degradar compuestos hidrocarbonados y varios tipos de polímeros naturales y artificiales que pueden ser categorizados como contaminantes.

En este estudio se muestrearon tres puntos de aguas asociadas a producción petrolera y por medio de técnicas de microbiología tradicional se aislaron cepas bacterianas que pudieran degradar petróleo y polímeros como la carboximetilcelulosa y el polietileno de baja densidad (LDPE), como también comprobar su crecimiento en presencia de metales pesados para así, de acuerdo a su gen ARNr 16S determinar la composición taxonómica de las muestras y documentar posibles cepas bacterianas candidatas a ser usadas en procesos de biorremediación.

Summary

Title: Taxonomic and metataxonomic analysis of bacterial cultures from water samples associated with hydrocarbon production by sequence analysis of the 16S rRNA gene

Author: Vera Martinez Kevin Mauricio

Keywords: 16S rRNA, Bioremediation, Bacteria, Taxonomic Analysis

Description:

Bacteria are the most abundant living beings on the planet, being able to occupy aquatic, terrestrial and extreme environmental conditions. Given this characteristic, its genotypic and phenotypic characters have diversified, showing a great variety of metabolisms, being able to use countless chemical compounds as an energy source. The presence of these organisms in industrial and human-disturbed environments can represent, in many cases, an environmental advantage to mitigate anthropogenic damage to the ecosystem.

Bioremediation is one of these advantages that allows the use of these organisms or their enzymatic machinery to carry out environmental sanitation processes. It has been documented that several bacterial genera possess the necessary cellular machinery to degrade hydrocarbon compounds and various types of natural and artificial polymers that can be categorized as contaminants.

In this study, three points of water associated with oil production were sampled and through traditional microbiology techniques, bacterial strains that could degrade oil and polymers such as carboxymethylcellulose and low-density polyethylene (LDPE) were isolated, as well as verifying their growth in presence of heavy metals in order to determine the taxonomic composition of the samples according to their 16S rRNA gene and document possible candidate bacterial strains to be used in bioremediation processes.

Tabla de contenido

Introducción.....	9
1. Objetivos.....	14
1.1 Objetivo general.....	14
1.2 Objetivos específicos	14
2. Lista de tablas	15
3. Lista de figuras	16
4. Marco teórico.....	17
4.1 Ciencias biológicas y tratamiento industrial de desechos.....	17
4.2 Biorremediación bacteriana y el petróleo	18
4.3 Biorremediación bacteriana y el polietileno	19
4.4 Biorremediación y la tolerancia bacteriana a la presencia de metales pesados	21
4.5 Caracterización de especies bacterianas biorremediadoras a través de la biología molecular	22
5. Metodología.....	24
5.1 Caracterización microbiológica dependiente de cultivo	24
5.1.1 <i>Determinación de actividad celulolítica</i>	26
5.1.2 <i>Determinación de actividad degradante de polietileno</i>	27
5.1.3 <i>Determinación de actividad de producción de biosurfactantes</i>	27
5.1.4 <i>Determinación de tolerancia a metales pesados</i>	29

5.2 Caracterización independiente de cultivo	30
5.2.1 Extracción de material genético	30
5.2.2 Secuenciación.....	31
5.2.3 Análisis in silico de datos de secuenciación de tipo Illumina.....	32
5.2.4 Análisis in silico de datos de secuenciación por nanoporos.....	32
6. Resultados.....	33
6.1 Caracterizaciones dependientes de cultivo	33
6.1.1 Aislamiento de bacterias con actividad celulítica.....	34
6.1.2 Aislamiento bacteriano específico para degradación de polietileno de baja densidad (LDPE).....	35
6.1.3 Aislamiento bacteriano específico para producción de biosurfactantes frente a la presencia de crudo	36
6.1.4 Aislamiento bacteriano específico para potenciales cepas tolerantes a la presencia de metales pesados	40
6.2 Caracterizaciones independientes de cultivo	41
6.2.1 Análisis in silico de la secuenciación de ADN metagenómico y de aislamientos bacterianos a través de la tecnología Illumina y Nanopore, respectivamente.	43
8. Conclusiones.....	50
Referencias	51

Introducción

El petróleo es un compuesto natural, constituido principalmente por agentes alifáticos, aromáticos y heterocíclicos y, en menor cantidad, por especies químicas que incluyen oxígeno, nitrógeno y azufre. Al ser considerado una de las principales fuentes de energía alrededor del mundo, muchos países han adoptado a la petroquímica como pilar económico para su desarrollo (Plohl *et al.*, 2002). Generalmente, las reservas de hidrocarburos de petróleo se encuentran en estratos de roca sedimentaria y de consistencia porosa, como por ejemplo la piedra caliza o el esquisto fisurado y su composición depende mayormente del tipo de formación oleica, su localización en el subsuelo y variantes de presión, temperatura y materia orgánica componente (Alexander, 1994). Frecuentemente se pueden encontrar trazas de metales como níquel, hierro, aluminio, vanadio y cobre. Dichos compuestos, y otros metales pesados como cromo y zinc, pueden encontrarse en concentraciones por arriba de las 10 partes por millón (ppm) en desechos de procesamiento de crudo tratados en tierra (Atlas, 1975). Los oleoductos y tanques de almacenamiento de hidrocarburos representan una estancia temporal en el circuito de procesamiento y producción de la industria petroquímica. Su mantenimiento en muchas ocasiones puede representar grandes gastos económicos y también graves afectaciones al medio ambiente, generando grandes cantidades de material poluto. Este proceso de limpieza acarrea el uso de materiales con acción tensoactiva que permitan mantener el crudo en una sola fase y que, acompañado con grandes cantidades de agua, la limpieza y mantenimiento puedan ser efectivos (Ayotamuno *et al.*, 2007). La toxicidad del crudo y sus derivados depende de muchos factores y puede variar ampliamente, en ambientes polutos con crudo, su densidad, concentración y composición juegan un rol importante y determinante al evaluar el daño producido, ya que muchas veces, sus efectos

son inmediatos en los animales y plantas de dicho hábitat (Baker, 1970). Sin embargo, la susceptibilidad de los organismos vivos en estos ambientes varía entre especies y no solo afecta a organismos complejos, sino que también se ven afectadas las poblaciones microbianas residentes. Los efectos del petróleo en las poblaciones microbianas tienen ciertos determinantes que pudiesen clasificarse como acciones dañinas o benéficas para estas comunidades. Se ha documentado que ciertas poblaciones de microorganismos con ciertos géneros taxonómicos han incrementado su número ya que logran aprovechar componentes del petróleo como fuente de nutrientes y que en conjunto con otros factores medioambientales propician un nicho idóneo para su crecimiento. Adicionalmente, se ha registrado también que algunos de estos compuestos tienen acción bacteriostática (Atlas, 1975; Larkia *et al.*, 2005).

La respuesta bacteriana a contaminantes orgánicos ha sido ampliamente estudiada durante años. Se ha comprobado que algunos géneros tienen un rango específico para metabolizar compuestos hidrocarbonados y que, por otro lado, otros que poseen la capacidad de metabolizar más de un compuesto orgánico como fuente de energía haciendo que se necesitan conjuntos poblacionales distintos con amplias capacidades metabólicas en procesos de biodegradación y biorremediación (Farinazleen *et al.*, 2004; Chikere y Chijioke-Osuji, 2006). Igualmente se ha encontrado que si bien es de esperarse que los organismos aislados en ambientes polutos con petróleo tengan la misma capacidad enzimática que aquellos que son aislados en ambientes industriales, dicha premisa no siempre se cumple, ya que dicha suposición depende de la comunidad bacteriana en sí y qué tan comúnmente está expuesta a dicho agente (Adenipekum y Fasida., 2005). Estudios realizados en diferentes ambientes contaminados revelan que hay comunidades bacterianas que muestran un alto rango de

degradación de hidrocarburos y que algunas de ellas no tenían historial previo de dicha actividad metabólica (Leahy y Colwell, 1990).

Este proceso de degradación tiene en cuenta dos características importantes, su naturaleza química y su cantidad presente en el ambiente. Dicho proceso permite que estos hidrocarburos puedan ser hidrolizados en agentes químicos cuya disposición sea más manejable o bien puedan dárseles otro uso dentro de la industria (Varjani., 2017; Wang *et al.*, 2019). Actualmente hay otros métodos de disposición de estos hidrocarburos que implican su hidrolisis de manera química o física pero no siempre sus productos finales pueden ser aprovechables, ya que incluso, muchas veces pueden ser más contaminantes que el propio hidrocarburo (Bhattacharya *et al.*, 2015). Es por lo que el tratamiento de estos hidrocarburos mediante acción biológica representa uno de los más grandes hitos en la industria petrolera, representando ahorros económicos notables y también, a la vez que constituyen la opción más amigable con el medio ambiente (Lappin-Scott *et al.*, 2014). La bioprospección, como se le conoce al conjunto de técnicas que buscan el aprovechamiento de entes biológicos y sustancias químicas producidas por ellos, ha dado pasos agigantados en los últimos años y en conjunto con la biorremediación le han proporcionado a la industria en general una opción asequible para disponer de desechos contaminantes y que junto con técnicas biotecnológicas han desplazado muchos procedimientos considerados actualmente obsoletos para muchos procesos industriales (Pérez Silva *et al.*, 2006; Fritsche y Hofrichter, 2008).

Las bacterias son el grupo de microorganismos mayormente empleados en procesos de bioprospección y su clasificación tanto en características metabólicas como genéticas son vitales para su uso biotecnológico, es por lo que el análisis del gen ribosomal ARNr 16S ha

tenido una importancia notable como sistema de clasificación vigente y preciso, ya que guiándose solo por caracteres fenotípicos no se obtiene una clasificación concluyente (Olsen y Woese, 1993; Neefs *et al.*, 1990). La amplificación del gen ARNr 16S y su secuenciación hacen parte de dicho proceso de genotipado, empezando con el cultivo de células bacterianas aisladas y su posterior extracción de material genético. No obstante, se han diseñado cebadores específicos para las “regiones hipervariables” (V1-V9) del ARNr 16S en bacterias lo que ha permitido, a través de ensayos de PCR, la distinción hasta nivel de género de distintos cultivos celulares de un mismo punto de muestreo (Stackebrandt y Goebel, 1994; Chakravorty *et al.*, 2007; Kumar. 2020).

El Campo La Cira–Infantas, municipio de Barrancabermeja (Santander), es conocido nacionalmente como el primero y más antiguo del territorio colombiano. Pese al constante mantenimiento, no ha estado exento de derrames de hidrocarburos y crudo al suelo circundante (*Exxon Mobil Corporation*. 2003-2016). El presente trabajo de grado se enfocó en la identificación de los grupos bacterianos presentes en muestras de tres puntos cruciales en la infraestructura de los pozos petrolíferos del Campo La Cira–Infantas. Usando técnicas dependientes de cultivo como la inoculación en medios enriquecidos con las diferentes fuentes de energía suministradas (carboximetilcelulosa CMC, polietileno de baja densidad LDPE, crudo de tipo pesado) y paralelamente su exposición a metales pesados en el medio se aislaron las cepas candidatas con actividad activa frente a cada una de las fuentes de energía suministradas; junto a esto se dispuso de una prueba de carácter cuantitativo con tintura de rojo Congo para determinar la actividad celolítica del cultivo y pruebas cualitativas de crecimiento presente o ausente frente a las otras fuentes de energía y la presencia de metales pesados. Posterior a esto, las pruebas no dependientes de cultivo como

la amplificación y secuenciación del gen ribosomal ARNr 16S y análisis *in silico* de las secuencias obtenidas se pudo determinar la composición taxonómica de dicho ambiente y así representarla gráficamente.

1. Objetivos

1.1 Objetivo general

Determinar la composición taxonómica de los microbiomas y microorganismos aislados de aguas de producción petrolera del campo La Cira-Infantas.

1.2 Objetivos específicos

- Identificar molecularmente, en lo posible a nivel de género, aislados y amplificados de ADN metagenómico de aguas de producción petrolera del campo La Cira-Infantas mediante amplificación y secuenciación del gen ARNr 16S.
- Realizar análisis filogenético con las secuencias de cepas aisladas de diferentes medios de cultivo obtenidas mediante secuenciación en conjunto con secuencias obtenidas de bases de datos internacionales.
- Evaluar la tolerancia de los microorganismos en medios suplementados con celulosa, polietileno, petróleo crudo y metales pesados (Pb^{+2} , Zn^{+2} y Cu^{+2}).
- Comprobar la capacidad de las cepas para degradar polímeros naturales y sintéticos y producir biosurfactantes.

2. Lista de tablas

Tabla 1. Medio mínimo en sales M9 según estipulado por Miller (1972).

Tabla 2. Medio Reasoner's 2A según Reasoners y Geldreich (1985).

Tabla 3. Medio de enriquecimiento J26 modificado según Chaudhary y Kim (2019).

Tabla 4. Metales pesados añadidos a R2A para la evaluación de bacterias metalotolerantes.

Tabla 5. Cebadores universales para amplificación del gen ARNr 16S en procariontes.

Tabla 6. Cepas bacterianas obtenidas por aislamientos en serie de acuerdo con sus capacidades metabólicas.

Tabla 7. Registro fotográfico del proceso de selección de cepas candidatas para actividad metabólica frente a la presencia de celulosa.

Tabla 8. Registro fotográfico del proceso de selección de cepas candidatas para actividad metabólica frente a la presencia de polietileno de baja densidad (LDPE).

Tabla 9. Registro fotográfico del proceso de selección de cepas candidatas para actividad metabólica frente a la presencia de crudo.

Tabla 10. Registro fotográfico y comparativo de la prueba de colapso de gota aplicada a las cepas candidatas para producción de biosurfactante.

Tabla 11. Registro fotográfico y comparativo de la prueba de emulsificación aplicada a las cepas candidatas para producción de biosurfactante.

Tabla 12. Registro fotográfico y comparativo de la prueba de propagación de aceite aplicada a las cepas candidatas para producción de biosurfactante.

Tabla 13. Registro fotográfico del proceso de selección de cepas candidatas para actividad metabólica frente a la presencia de metales pesados.

Tabla 14. Concentraciones de ADN metagenómico de los puntos de muestreo del campo La Cira-Infantas.

Tabla 15. Concentraciones de ADN extraído de las cepas aisladas y secuenciadas por medio de secuenciación por nanoporos.

Tabla 16. Diagrama de barras de abundancias relativas para varias categorías taxonómicas encontradas en las muestras “Out. K. 3411 LCI3” y “Piscinas IN LCI 3”.

3. Lista de figuras

Figura 1. Muestras de agua de producción petrolera recolectadas.

Figura 2. Fotografía de la PCR de los amplicones del par de cebadores U519F-U785R en el recuadro azul y en el recuadro negro los resultados de la PCR 8F-907R. El marcador de peso molecular 100 pb se encuentra en el recuadro rojo.

Figura 3. Curvas de rarefacción de las secuencias metagenómicas de aguas de producción petrolera.

Figura 4. Árbol consenso de máxima verosimilitud con soporte de Bootstrap usando el modelo GTR+G.

4. Marco teórico

4.1 Ciencias biológicas y tratamiento industrial de desechos

Microorganismos procariontes, eucariontes, hongos y hasta plantas están ganando terreno en el área del saneamiento ambiental dadas sus capacidades metabólicas. Es por lo que se ha definido como biorremediación a todo proceso biotecnológico que emplee organismos vivos o a sus agentes metabólicos derivados como herramienta principal para la recuperación del medio ambiente contaminado y restaurarlo a su estado natural de equilibrio ecológico (Tausz y Donath, 1930). Ejemplificando la acción de estos organismos en el medio ambiente se puede mencionar la degradación bacteriana de hidrocarburos contaminantes en ambientes terrestres y acuáticos. Este proceso está ganando terreno en la industria y aplicándose a políticas internacionales de tratamiento de ambientes contaminados desplazando a metodologías fisicoquímicas antiguamente empleadas. También se ha usado la intervención bacteriana en la degradación de plásticos y también la rápida asimilación de metales pesados en el ambiente disminuyendo su toxicidad (Aislabie *et al.*, 2006; Gudiña *et al.*, 2013). El uso de la biorremediación como metodología de saneamiento ambiental presenta muchas ventajas respecto a estrategias físicas o químicas, entre las que se encuentran la no producción de compuestos significativamente tóxicos, la baja demanda energética, el bajo costo, la complementación directa o indirecta con otras estrategias de saneamiento y su baja perturbación al medio ambiente. Pese a estas ventajas, la biorremediación representa periodos de tratamiento prolongados y en muchos casos no se logra una eliminación completa del material contaminante debido a su porción recalcitrante que queda en el ambiente haciendo necesaria una estrategia complementaria (Aislabie *et al.*, 2006; Cébron, 2015).

4.2 Biorremediación bacteriana y el petróleo

El rol de las bacterias en la industria petroquímica tiene enormes aplicaciones y roles, abarcando campos en la producción de gas hasta saneamiento de crudo en ambientes contaminados (Gudiña *et al.*, 2013). Hoy día, las bacterias pueden ser manipuladas y aprovechadas en la industria petroquímica, ya sea para la degradación de petróleo en ambientes polutos, zonas de explotación abandonadas o sin uso e incluso para la bioconversión del petróleo (Gudiña *et al.*, 2013; Rashedi *et al.*, 2012). No es desconocido que los derivados del petróleo son una de las mayores fuentes de polución, lo cual genera un grave desequilibrio medio ambiental y que, por lo tanto, requiere una intervención inmediata. Es en este sentido que el uso de microorganismos y su amplia diversidad metabólica se presentan como una alternativa (Perfumo *et al.*, 2010). Usualmente se piensa que todas las clases de petróleo son susceptibles a la degradación mediada por bacterias bajo ciertos condicionamientos; sin embargo, desde mediados de los años setenta, se ha visto que dicha actividad metabólica varía según el ambiente donde se colectan estas poblaciones bacterianas, viéndose un incremento considerable en ambientes mayormente industriales como refinerías de crudo, plantas de purificación de gasolina, tanques de contención, entre otros (Kolotilova, 2011). Entre las afectaciones a especies acuáticas, se encuentra la incorporación de estos contaminantes orgánicos en sus tejidos de peces y otros organismos. Al ser ingeridos por sus depredadores y también por el ser humano, dichos contaminantes representan una alteración considerable de la salud registrándose casos severos de envenenamiento e incluso aumentando la incidencia de ciertos tipos de cáncer (Bautista y Rahman., 2016). La limpieza y recolección de los derrames de petróleo es considerablemente difícil y depende de factores como el tipo de petróleo (que puede variar desde el crudo ligero hasta el crudo extrapesado), la composición fisicoquímica del agua donde se vertió ya que

podría intervenir considerablemente en las actividades de evaporación y biorremediación, entre otros. La remoción física de crudo de incidentes de contaminación es costosa y la opción por agentes químicos es partidario de reacciones que producen compuestos aún más polutos y su eliminación se dificulta cuantiosamente (Jensen *et al.*, 1998). Sin embargo, la opción biológica la biorremediación, se ha configurado como una opción económica y de relativamente fácil obtención para efectuar dichos procesos de saneamiento ambiental, especies bacterianas del phylum Fusobacteria han demostrado un gran potencial para su empleo en posibles derrames de petróleo en ambientes marinos debido a su asombrosa habilidad de colonizar y degradar petróleo de mediana viscosidad en superficies acuosas (Gutiérrez *et al.*, 2016), otras especies del género *Alcanivorax* y *Methylocella* han mostrado potencial biotecnológico para su uso en procesos de biorremediación (Kasai *et al.*, 2002).

4.3 Biorremediación bacteriana y el polietileno

Debido a su simplicidad al fabricarse y su bajo precio, el polietileno es el polímero más simple y el plástico más ampliamente usado alrededor del mundo, produciéndose en una cantidad de ochenta millones de toneladas al año. Su creación se da mediante la polimerización, usualmente lineal de cadenas de etileno mediante diferentes procesos según su naturaleza química y catalizadores usados. Químicamente se trata de un material considerado inerte (Geyer *et al.*, 2017). Dada su alta durabilidad y su estructura química, este compuesto es altamente resistente a procesos naturales de degradación. Por ejemplo, el polietileno de baja densidad puede tomar hasta 150 años para descomponerse en su totalidad, resultando como consecuencia la acumulación exponencial de grandes volúmenes de plástico en el planeta (Jambeck *et al.*, 2015). Pese a los esfuerzos por su reciclaje, sobre todo en países desarrollados, el polietileno sigue acumulándose en ambientes terrestres y marinos,

especialmente en forma de microplásticos, ya que estos pueden ser fácilmente asimilables por muchas especies que los acumulan sin metabolizarse en sus tejidos desencadenando un envenenamiento lento para muchas especies, incluyendo al ser humano (Hammer *et al.*, 2012). Entre otras estrategias de manejo ambiental como el reciclaje, las ciencias biológicas han ganado terreno en el campo industrial, especialmente en el campo de la disposición final de desechos y el polietileno no ha sido una excepción, gracias a técnicas biotecnológicas y de la mano de campos como la microbiología, bioingeniería e incluso zoocría se han logrado identificar especies microbianas e incluso animales que exitosamente han logrado descomponer y metabolizar el polietileno de baja densidad y usarlo para sus procesos biológicos,. Tal es el caso de *Pseudomonas fluorescens*, que puede degradar el polietileno encontrado en bolsas plásticas en unas pocas semanas, haciéndolo un proceso eficiente en comparación con metodologías más industrializadas (Mukherjee *et al.*, 2017). Otros ejemplos microbianos de degradación de polietileno que siguen estando en estudio incluyen a *Brevibacillus borstelensis* cepa 707, aislada en una muestra de suelo, puede usar el polietileno de baja densidad como su única fuente de carbono y que junto a una incubación constante de unos 50°C logró una alta tasa de degradación de este material (Hadad *et al.*, 2005). Se observó también que la eficiencia de esta reacción se favorece en gran medida si el biorreactor que contenía a esta especie era expuesto a radiación ultravioleta. Sorprendentemente, en el año 2014 se descubrió que en varias bolsas de plástico en varios vertederos de basura de China había pequeños agujeros cuya explicación no era del todo clara, al realizar una búsqueda exhaustiva se evidencio que en dichos vertederos había presencia de varias colonias de *Plodia interpunctella* o polilla hindú de la harina. Al diseccionar los intestinos de estos insectos se identificaron varias poblaciones bacterianas que no solo ayudaban a la polilla a digerir el plástico como fuente de alimento, sino que las

actividades bacterianas de estas comunidades intestinales pudieron disminuir la masa del polietileno en un 10% y en conjunto a la actividad enzimática de estas bacterias las cadenas poliméricas de este plástico se vieron degradadas hasta en un 13% (Yang *et al.*, 2014).

4.4 Biorremediación y la tolerancia bacteriana a la presencia de metales pesados

El incremento de la concentración de metales pesados en la biósfera ha sido un efecto adverso de la industrialización. Ello ha comprometido la calidad del agua y los suelos en múltiples ambientes, amenazando a poblaciones animales y humanas por su tendencia a bioacumularse en los tejidos y, en ocasiones, a su carácter teratogénico. Dado su impacto en la salud pública, el desarrollo de alternativas sostenibles enfoca sus esfuerzos en hacer una remoción biológica de estos agentes, ya que otras alternativas han resultado poco eficientes y de alto precio (Verma y Sharma, 2017). La transformación de metales pesados mediada por microorganismos se da mediante reacciones químicas de óxidoreducción y alquilación-desalquilación. Lo anterior, se traduce en cambios en su solubilidad, movilidad o toxicidad de los elementos. El hecho de que muchas de estas reacciones no tengan una función metabólica conocida, sugiere que éstas evolucionaron probablemente como un mecanismo de atenuación de la toxicidad (Michalak *et al.*, 2013). Existen descritos, al menos, tres mecanismos bioquímicos con potencial uso en biorremediación (Volke Sepulveda y Rosa Perez, 2005). El primero de ellos es la precipitación reductora, la cual por teoría establece que la movilidad y toxicidad de un metal pesado pueden disminuirse si se reduce a un estado redox más bajo. Dicha reducción puede darse cuando el organismo usa al metal pesado como aceptor de electrones. Este fenómeno ha sido ampliamente observado en bacterias sulfooxidantes (BSO) y bacterias sulfatoreductoras (BSR) ya que han logrado reducir exitosamente Cr^{+6} y U^{+6} en suelos contaminados facilitando su recolección (Volke Sepulveda

y Rosa Perez, 2005). Un segundo mecanismo es la biomineralización, en la cual precipitados metálicos insolubles se forman interactuando con productos del metabolismo bacteriano y así formar minerales de azufre, hidróxidos, fosfatos y carbonatos. Un ejemplo de este tipo de reacciones se ha observado en el uso de bacterias heterótrofas anaerobias que, cultivadas en sustratos orgánicos como etanol, acetatos, butiratos, celulosa (Barkay y Schaefer, 2001). En varias comunidades de bacterias sulfatoreductoras se ha estudiado la formación de sulfuros metálicos insolubles que pueden contener Cu, Hg, Cd, As, Se y Pb (Volke Sepulveda y Rosa Perez, 2005; Barkay y Schaefer, 2001). Finalmente, el tercer mecanismo candidato es la biolixiviación que se basa en la solubilización de metales pesados a partir de matrices sólidas (Volke Sepulveda y Rosa Perez, 2005). En este caso, se utilizan principalmente bacterias acidófilas con metabolismo oxidativo basado en iones de hierro y azufre para crear conformaciones de sulfuros o férricos en conjunto con metales pesados (Fonti *et al.*, 2016).

4.5 Caracterización de especies bacterianas biorremediadoras a través de la biología molecular

Dada la estructura de las células procarióticas, su identificación a partir de características morfológicas es limitada. Por ello, se requiere caracterizar los perfiles metabólicos y moleculares para su clasificación (Hood, 2012). Por su parte, la caracterización de microbiomas de ambientes específicos requiere un diagnóstico molecular basado en el aislamiento y extracción de material genético para así secuenciarlo y someterlo a análisis bioinformáticos (Saiki *et al.*, 1988; Pekin *et al.*, 2011; Behjati y Tarpey, 2013). Esta metodología permite obtener tanto la clasificación taxonómica de los individuos que habitan dicho hábitat como su abundancia relativa dentro de la población (Berg *et al.*, 2020). Gracias a las técnicas de biología molecular y en conjunto con técnicas microbiológicas de cultivo se pueden aislar células bacterianas de interés para posteriormente estudiar su composición

genética con el fin de esclarecer su relación filogenética respecto a otras especies en cuestión (Dahm, 2008). En células procariotas es común usar el ARNr 16S; que es codificado por el gen *rrs*, como cronometro molecular para estudios taxonómicos y filogenéticos (Olsen y Woese, 1993). Metodológicamente, la identificación bacteriana por medio del análisis de ARNr 16S consiste en tres pasos bien definidos: a) Extracción y amplificación del gen a partir de la muestra apropiada, b) determinación de la secuencia nucleotídica del amplicón y c) análisis *in silico* de la secuencia obtenida (Janda y Abbot, 2007). De entre los métodos más populares de secuenciación actuales, hay un grupo que se denomina “de alto rendimiento”, estos tipos de secuenciaciones incluye métodos de lectura corta o de próxima generación y de lectura larga o de tercera generación, en cuanto a su uso, se destinan principalmente a la secuenciación de exomas, perfiles transcriptómicos, interacciones ADN-proteína, epigenómica, entre otros (De Magalhães, 2010). Por otra parte, la secuenciación de ultra alto rendimiento puede ejecutar paralelamente hasta 500.000 operaciones de secuenciación por síntesis permitiendo secuenciar; por ejemplo, un genoma humano completo en un solo día (Fox *et al.*, 2009), una de estas metodologías de alto rendimiento es la llamada secuenciación por síntesis, bajo la tecnología de Illumina, esta se fundamenta en el bloqueo reversible de nucleótidos marcados con fluoróforos que impiden reversiblemente la elongación de la cadena, así pues, tras la detección de la incorporación de dicho fluoróforo y su posterior eliminación, se posibilita continuar con un nuevo ciclo de adición de un nuevo nucleótido (Garrigues, 2017). Por otra parte, la tecnología de nanoporos, un enfoque de tercera generación permite la secuenciación de material genético sin la necesidad de amplificación de PCR o marcaje químico de la muestra, siendo estas sus principales ventajas, además de ofrecer costos relativamente bajos, versatilidad del equipo a usar y capacidad de procesar resultados en tiempo real (Brinkerhoff, 2021). La secuenciación por nanoporos han

tenido auge en las ciencias ambientales por medio del empleo del eDNA (environmental DNA) para monitoreo ambiental en la epidemiología de cultivos, esto gracias a la portabilidad de sus equipos, especialmente MinION, el cual se dio a conocer por estudios sobre virología de plantas y prevalencia de especies (Kennedy *et al.*, 2020).

5. Metodología

Las muestras acuosas utilizadas en el presente estudio fueron recolectadas de un tanque de almacenamiento de crudo (OUT-K-3411), la línea de entrada a las piscinas de oxidación (IN LCI-3) y a la línea de entrada de fluidos de una celda de flotación (3621-LCI3A) del campo petrolero La Cira-Infantas en Barrancabermeja, Santander (*Exxon Mobil Corporation*, 2003-2016). El muestreo inició con un purgado de los puntos de drenaje en cada punto para garantizar la remoción de material líquido estancado y obtener así una muestra representativa del sistema. Consecutivamente, se recolectaron entre 700 y 800 mL de líquido acuoso en recipientes estériles. Las muestras fueron sujetas a análisis microbiológicos dependientes e independientes de cultivo.

5.1 Caracterización microbiológica dependiente de cultivo

Cinco (5) mililitros de cada muestra fueron inoculados en medios de cultivo basales suplementados con diferentes sustratos dirigidos al enriquecimiento microorganismos de crecimiento lento, denominados “*k-strategists*”. La matriz de medios incluyó a los medios M9 (**Tabla 1**) (Miller, 1972), R2A (**Tabla 2**) (Reasoners y Geldreich, 1985; Sandle, 2004) y J26 (**Tabla 3**) (Chaudhary & Kim, 2019). Luego de 14 días de incubación a temperatura ambiente, se realizó un repique en medios frescos con el objeto de agotar eventuales nutrientes provenientes de la muestra original. Luego de 14 días de incubación adicionales, se realizó un tamizaje en la misma matriz de medios con la adición de agar para otórgales

una consistencia sólida, estimando así las capacidades metabólicas potenciales de los aislamientos (Song *et al.*, 2017).

Tabla 1. Medio mínimo en sales M9 según estipulado por Miller (1972).

Medio mínimo en sales M9				
	Compuesto		Concentración	Cantidad en gr/L
Solución stock 1. Solución base a 10X*	Fosfato dipotásico (K ₂ HPO ₄)		60,5 mM	10,54
	KH ₂ PO ₄		39,5 mM	5,37
	NaCl		8,55 mM	0,5
Solución 2. Suplemento a 100X	NH ₄ Cl		1 M	53,5
Solución 3. Suplemento a 100X	MgSO ₄ x 7H ₂ O		100 mM	24,65
Solución 4. Suplemento a 100X	CaCl ₂ x 2H ₂ O		30 mM	4,4
Solución 5. Elementos traza a 100X**	EDTA (C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈)		13,4 mM	5
	FeCl ₂ x 6H ₂ O		31,1 mM	0,83
	ZnSO ₄ x 7H ₂ O		0,62 mM	0,178
	CuSO ₄ x 5H ₂ O		76 µM	0,019
	H ₃ BO ₃		162 µM	0,01
	Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O		165 µM	0,0399
	KI		60 µM	0,00996
Solución 6. Suplemento de extracto de levadura a 100X	Extracto de levadura		10 gr/L	10
*pH ± 7,0 antes de esterilización con autoclave a 120°C por 20 minutos				
** Disminuir pH a ± 5,0 antes de esterilización por autoclave				

Tabla 2. Medio Reasoner's 2A según Reasoners y Geldreich (1985).

Medio Reasoner's 2A (R2A)	
Compuesto	Cantidad en gr/L
Extracto de levadura	0,5
Peptona	0,5
Caseína sódica	0,5
Glucosa (C₆H₁₂O₆)	0,5
Almidón soluble	0,5
Piruvato de sodio (C₃H₃NaO₃)	0,3
Fosfato dipotásico (K₂HPO₄)	30
Sulfato de magnesio anhídrido (MgSO₄ anhídrido)	2,4
pH ± 7,2 antes de esterilizar en autoclave a 120°C por 20 minutos	

Tabla 3. Medio de enriquecimiento J26 modificado según Chaudhary y Kim (2019).

Medio de enriquecimiento J26	
Componente	Cantidad en gr/L
Glucosa (C₆H₁₂O₆)	0,5
Almidón soluble	10
Sulfato de magnesio heptahidratado (MgSO₄ x 7H₂O)	0,05
Carbonato de calcio (CaCO₃)	0,02
Fosfato dipotásico (K₂HPO₄)	2,0
Nitrato de potasio (KNO₃)	2,0
Cloruro de hierro (II) (FeCl₂)	0.0078
Esterilizar en autoclave a 120°C por 20 minutos	

5.1.1 Determinación de actividad celulolítica

El enriquecimiento de células bacterianas con capacidad celulolítica se llevó a cabo utilizando el medio M9 suplementado con 2 g/l de carboximetilcelulosa (CMC) como única

fuelle de carbono. Una vez realizados los dos cultivos sucesivos de enriquecimiento en medio líquido, se realizaron siembras masivas en medio sólido M9 con CMC (20 g/l agar-agar). Para dichas siembras se realizaron diluciones 1/100, 1/1,000 y 1/10,000 del segundo enriquecimiento. A partir de dichas diluciones se inocularon 100 µl sobre las placas de agar. Luego de 5 días de incubación a temperatura ambiente, las colonias con capacidad celulolítica fueron identificadas mediante la adición de 10 ml de una solución acuosa de rojo Congo (1 mg/ml) por 20 minutos. Luego del remover la solución de rojo Congo se cubrió la superficie de las placas con una solución 1 M de NaCl (Dantur *et al.*, 2015). Las colonias rodeadas de un halo claro fueron transferidas para su aislamiento. La presencia nuevamente del halo claro en las colonias aisladas luego del revelado fue asumida como la confirmación de la capacidad celulolítica en los aislados.

5.1.2 Determinación de actividad degradante de polietileno

Simultáneamente, a partir de las muestras se realizó el enriquecimiento de bacterias con capacidad aparente de degradar polietileno de baja densidad (LDPE, por sus siglas en inglés) (Kyaw *et al.*, 2012). Para ello, se suplementó el medio M9 con 1 g/l de gránulos de LDPE de 500µm de diámetro como única fuente de carbono y energía. Las colonias presentes en las placas de agar sobre las que se realizó el aislamiento fueron catalogadas como potenciales degradadoras del polímero sintético.

5.1.3 Determinación de actividad de producción de biosurfactantes

El enriquecimiento de microorganismos con potencial producción de moléculas con características tensioactivas se realizó suplementando el medio mínimo en sales M9 con 1% v/v de petróleo crudo de tipo pesado, que de acuerdo con la escala hidrométrica aplicada por el Instituto Americano del Petróleo (API por sus siglas en inglés) (Pérez Silva *et al.*)

corresponde a índices API inferiores a 20°. Los parámetros de incubación se mantuvieron bajo los mismos parámetros de las determinaciones inmediatamente anteriores.

Una vez seleccionadas las colonias candidatas para esta característica metabólica, se inocularon en medio LB. Luego de una incubación 37°C durante 24 horas, se alicuotó 1 ml de muestra en medio M9 líquido contenido en tubos de microcentrífuga de 2 ml y se incubó a temperatura ambiente y con una agitación de 200 rpm durante 5 días (Cazals *et al.*, 2020). Consecutivamente, se transfirió nuevamente 1 ml a un tubo nuevo con el fin de separar los biosurfactantes presentes, sometiéndolos a una incubación de 10 minutos a 4°C, después de esto se centrifugó a 3900 rpm durante una hora obteniéndose un sobrenadante libre de células que contenía biosurfactante (Rani *et al.*, 2020). Para ratificar el potencial biosurfactante de la molécula obtenida de los cultivos candidatos se dispusieron tres pruebas distintas según Rani y colaboradores (2020) mezclando características cualitativas y cuantitativas descritas a continuación:

- Ensayo de colapso de gota: En un portaobjetos se colocaron 2 µl de crudo tipo pesado. Posteriormente, se adicionaron 5 µl del sobrenadante. Pasados 10 minutos se evaluó cada gota de crudo, considerándose como positiva la presencia de biosurfactantes cuando la gota se aplana totalmente sobre la superficie de la lámina, y negativos cuando dicha gota no pierde su geometría redondeada. Se realizó en conjunto un control (-) con agua destilada y control (+) con SDS al 0,10%.
- Ensayo de propagación de aceite: En placas de Petri se depositaron 20 ml aproximadamente de agua destilada en conjunto con 20 µl de crudo de tipo pesado pipeteados sobre la superficie del agua. Consecutivamente, se pipeteo añadió una gota de 10 µl del sobrenadante de cada cultivo sobre la superficie con crudo. Pasados 30

minutos, se comparó el diámetro del halo formado con el de los controles positivo y negativos descritos en el ensayo anterior.

- **Índice de emulsificación:** En tubos de ensayo de 10 de ml se añadieron 2 ml de sobrenadante y 2 ml de petróleo crudo. Se aplicó agitación en vórtex durante 2 minutos y se dejó reposar durante 24 horas. De allí se calculó el índice de emulsificación como la relación entre la altura de la capa emulsificada dividida entre la altura total y expresada como porcentaje. Se mantuvieron los controles de los ensayos anteriores.

5.1.4 Determinación de tolerancia a metales pesados

Finalmente, la última fase del aislamiento de bacterias “*k-strategists*” con potencial biotecnológico por sus capacidades metabólicas consistió en la evaluación de la tolerancia bacteriana la presencia de metales pesados en el medio R2A. Los metales evaluados fueron plomo (Pb), zinc (Zn) y cobre (Cu) (Nong *et al.*, 2019). El enriquecimiento de bacterias tolerantes a metales pesados se realizó mediante el incremento sucesivo de las concentraciones de éstos en cada repique (**Tabla 4**).

Tabla 4. Metales pesados añadidos a R2A para la evaluación de bacterias metalotolerantes.

Metal pesado	Concentración final		
Pb (NO₃)₂	1mM	2mM	2mM
	0,5ml	1 ml	1,5ml
(ZnSO₄ x 7H₂O)	Concentración final		
	5mM	10mM	15mM
	0,5ml	1 ml	1,5ml
CuSO₄ x 5H₂O	Concentración final		
	5mM	10mM	15mM
	0,5ml	1 ml	1,5ml

Habiendo finalizado esta fase, se procedió a un tamizaje en medio R2A solido sin presencia de metales tomándose una muestra de la última parte del ciclo de enriquecimiento en medios líquidos. Al haber finalizado todos estos procesos de selección aleatoria de las cepas candidatas para cada perfil metabólico se hicieron repiques seriados en medios LB sólidos.

5.2 Caracterización independiente de cultivo

Teniendo en cuenta la naturaleza de la muestra, se procesaron de acuerdo con lo estipulado por el laboratorio de Biocorrosión y Biotecnología de la Corporación para la Investigación de la Corrosión (CIC) en sus instructivos para manipulación y procesamiento de muestras de aguas de producción petrolera, esto con el fin de determinar la composición metataxonómica de la muestra por medio de la extracción y amplificación del gen ARNr 16S.

5.2.1 Extracción de material genético

Al ser de naturaleza liquida, las muestras de aguas de producción petrolera se filtraron usando una membrana estéril de 0,45 μm de tamaño de poro y 47 mm de diámetro. Una vez filtrado el material en suspensión, la membrana se troceó en piezas de aproximadamente 0,25 cm^2 . La lisis del material se hizo por medios físicos y químicos y la obtención del material genético se hizo según el kit de extracción DNeasy® PowerSoil® (100) (Qiagen, 2013-22). Los cebadores para la PCR fueron 8F-907 R (Eden *et al.*, 1991; Ben-Dov *et al.*, 2006; James *et al.*, 2010) y 519F-785R (Gao *et al.*, 2010; Mao *et al.*, 2012). Los dos pares de cebadores son de carácter universal para el gen ARNr 16S y tuvieron las mismas condiciones de amplificación que fueron dispuestas así: Fase 1: ciclo de 3 min a 95°C; Fase 2: 35 ciclos iniciado con 30 s a 95°C, seguido de otros 30 s a 52°C y finalizando con 1 min a 72°C; Fase 3: ciclo de 5 min a 72°C para después bajar su temperatura hasta llegar a los 20°C. Este ejercicio se hizo con la ayuda del termociclador MiniAmp™ Plus Thermal Cycler

(ThermoFisher Scientific, 2006-2022). Una vez terminadas las PCR probando cada par de cebadores, la concentración y calidad de la extracción del material genético se determinaron por medio de espectrofotometría de absorción molecular VIS-UV usando el equipo de espectrofotometría NanoPhotometer® NP80 (Implen NanoPhotometers, 2018). Finalizado este proceso, las muestras se almacenaron las muestras a -20°C para posteriores análisis, este ensayo se hizo con fines meramente informativos acerca de la cantidad de material genético ambiental de origen procariota en cada punto de muestreo.

Tabla 5. Cebadores universales para amplificación del gen ARNr 16S en procariontes.

Cebador	Secuencia
8F	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG
907R	CCG TCA ATT CCT TTR AGT TT
519F	CAG CMG CCG CGG TAA
785R	TAC NVG GGT ATC TAA TCC

5.2.2 Secuenciación

La secuenciación metataxonómica se llevó a cabo mediante Illumina MiSeq PE250 utilizando los cebadores 341F–805R y 515F–806R dirigidos específicamente a la amplificación de las regiones V3 y V4 del gen ARNr 16S bacteriano (Liu *et al.*, 2020). Por su parte, la identificación de los microorganismos aislados se llevó a cabo mediante el kit 16S Barcoding Kit 1-24 (SQK-16S024) con la ayuda conjunta del equipo MC1K de Oxford Nanopore Technologies Inc. El mencionado kit utiliza los cebadores 27F, 1492R, amplificando casi la totalidad del gen ARNr 16S (Kawai *et al.*, 2022).

5.2.3 Análisis *in silico* de datos de secuenciación de tipo *Illumina*

El proceso de secuenciación por síntesis usando la plataforma de *Illumina* proveyó archivos en formato FASTQ que fueron procesados usando el programa Qiime2 (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) en su versión 2021.8 (Bolyen *et al.*, 2019). Las lecturas fueron filtradas por calidad utilizando VSEARCH (Rognes *et al.*, 2016). Posteriormente, se seleccionaron lecturas no menores a 400 pb y se removieron lecturas repetitivas, secuencias no pareadas o quiméricas con Deblur (Amir *et al.*, 2017). Para la clasificación taxonómica en Unidades Taxonómicas Operacionales (OTU por sus siglas en inglés) se aplicó un agrupamiento *de novo* con un porcentaje de identidad del 99%, utilizando VSEARCH con la base de datos Greengenes (McDonald *et al.*, 2012). Adicional a esto, Qiime2 permitió obtener una curva de rarefacción para confirmar la profundidad de las secuencias estudiadas (Crawford *et al.*, 2009). A continuación, con la ayuda del lenguaje de programación R (R Core Team, 2018). Mediante RStudio (RStudio Team, 2020) se ejecutó el paquete Phyloseq (McMurdie y Holmes, 2013) obteniendo “barplots” que sirvieron como guía gráfica de la composición taxonómica de cada una de las muestras. Las categorías taxonómicas elegidas a graficar fueron filo, orden, familia y género.

5.2.4 Análisis *in silico* de datos de secuenciación por nanoporos

Los aislados obtenidos para los diferentes cultivos fueron sometidos a secuenciación por nanoporos. Las lecturas de secuencia fueron clasificados preliminarmente a través de la herramienta Epi2me (Heikema *et al.*, 2020). Complementariamente, se calcularon secuencias consenso de cada aislado utilizando BugSeq (Portik *et al.*, 2022). Dichos consensos fueron analizados usando NCBI BLAST (Altschul *et al.*, 1990). Para la construcción de un árbol filogenético de máxima verosimilitud con soporte de Bootstrap se utilizó MEGA v11 (Tamura *et al.*, 2021) con el modelo de sustitución nucleotídica previamente seleccionado a

través de JModelTest v 2.1.10 (Nei y Kumar, 2000; Posada, 2008). La elección de este modelo se hizo en base al valor mínimo calculado del criterio de información de Akaike (Akaike, 1974; 1985; 1998; Aho et al., 2014). Las secuencias alineadas de microorganismos filogenéticamente cercanos a cada aislamiento fueron obtenidas del NCBI (Geer *et al.*, 2010; Tatusova *et al.*, 2016).

6. Resultados

6.1 Caracterizaciones dependientes de cultivo

Se recolectaron muestras acuosas de tres puntos del sistema de agua de producción petrolera del campo La Cira-Infantas en inmediaciones del distrito de Barrancabermeja (**Figura 1**). En conjunto, los medios de cultivo de M9 suplementado con petróleo crudo, LDPE y CMC, el medio R2A suplementado con metales pesados y el medio J26 permitieron el aislamiento de 40 cepas (**Tabla 6**)

Figura 1. Muestras de agua de producción petrolera recolectadas.



1

¹ Las muestras fueron recolectadas por el personal técnico del laboratorio de Biocorrosión y Biotecnología de la Corporación para la Investigación en Corrosión.

Tabla 6. Cepas bacterianas obtenidas por aislamientos en serie de acuerdo con sus capacidades metabólicas.

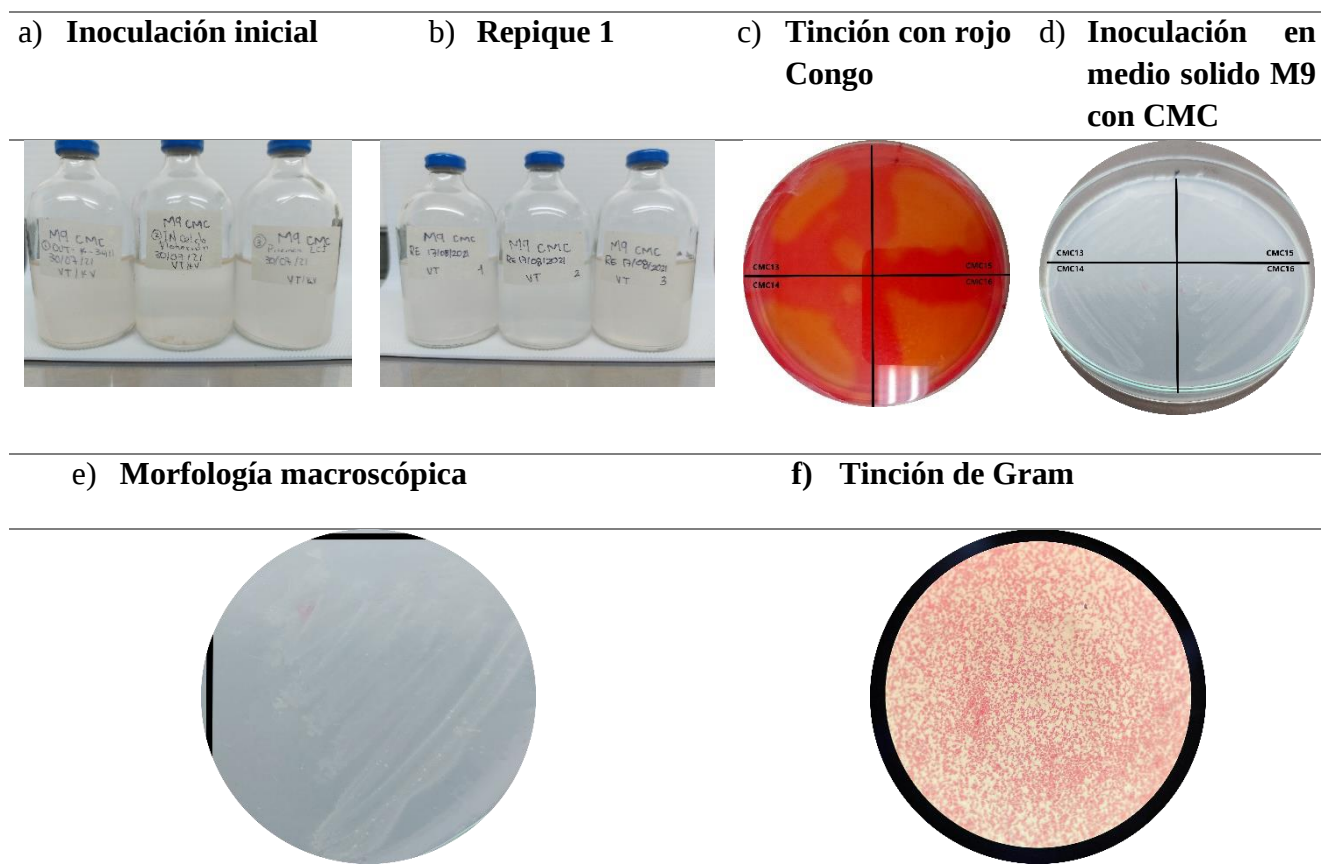
Medios de cultivo M9				R2A			J26	
Suplemento	Crudo	CMC	LDPE	Pb	Zn	Cu	Control	-
Cepas	4	4	4	4	4	8	4	8 ²
aisladas								

6.1.1 Aislamiento de bacterias con actividad celulítica

La obtención de aislados con capacidad de usar la celulosa como fuente de carbono se hizo a partir de los cultivos de enriquecimiento suplementados con carboximetilcelulosa (CMC). La presencia de turbidez luego de 14 días de incubación a temperatura ambiente indicó la presencia crecimiento bacteriano (**Tabla 7, a**). El desarrollo de turbidez fue sensiblemente mayor en el punto 2. El segundo cultivo de enriquecimiento también reveló la presencia de turbidez (**Tabla 7, b**). El aislamiento sobre placas de M9 sólido suplementado con CMC reveló en su mayoría colonias blancas, de bordes lisos y bien definidos (**Tabla 7, d, e**). La presencia de un halo claro alrededor de los aislamientos CMC 13, CMC 14, CMC 15 y CMC 16, luego del revelado con rojo Congo, indicaron la actividad celulolítica en estos organismos (**Tabla 7, c**). Microscópicamente se observaron células bacilares de longitud corta y de tinción Gram negativa en todos los aislados (**Tabla 7, f**).

² Teniendo presente los objetivos del presente trabajo, las cepas aisladas en medio J26 no se tuvieron en cuenta para la secuenciación del gen ARNr 16S, ya que el propósito de este medio fue recuperar poblaciones bacterianas incultivables en otros medios.

Tabla 7. Registro fotográfico del proceso de selección de cepas candidatas para actividad metabólica frente a la presencia de celulosa.



6.1.2 Aislamiento bacteriano específico para degradación de polietileno de baja densidad (LDPE)

El enriquecimiento de microorganismos en los cultivos líquidos de M9 suplementado con LDPE (**Tabla 8 a, b**), resultó en el aislamiento de colonias pequeñas blanquecinas iridiscentes sobre las placas de agar (**Tabla 8 c, d**). Debido a que su tamaño dificultó la diferenciación de los aislados, se seleccionaron cuatro colonias de manera aleatoria y se denominaron PE1, PE2, PE3 y PE4. Microscópicamente, se observaron células bacilares medianas en PE1; cortas en PE2 y PE3, y alargadas en PE. La tinción reveló la presencia de

bacterias Gram negativas, exceptuando PE4 que mostraron una tinción Gram positiva. Esta última evidenció bacilos en grupos de dos (diplobacilos) y esporulados (**Tabla 8, e**).

6.1.3 Aislamiento bacteriano específico para producción de biosurfactantes frente a la presencia de crudo

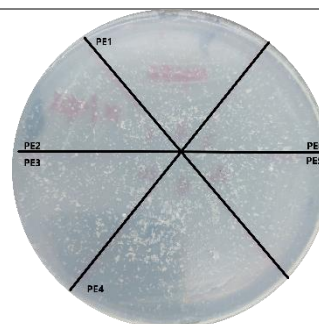
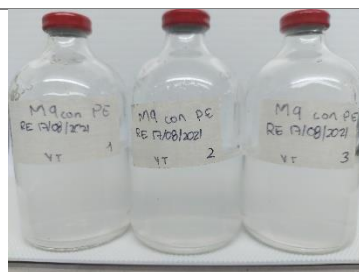
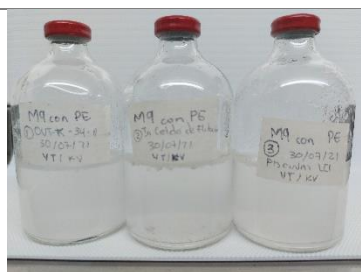
Los medios M9 líquidos suplementos de crudo, la turbidez propia del crecimiento bacteriano se acompañó de la formación de masas coagulares y/o coloidales de crudo flotando en la superficie de la fase líquida del medio M9 y la conformación de material sólido oscuro en suspensión en la columna acuosa. Habiéndose tamizado la muestra en medio M9 sólido, la colonia se identificó como de crecimiento puntiforme, de bordes ondulados y sin elevación aparente (**Tabla 9 c, d**). Microscópicamente las cepas seleccionadas fueron Gram negativas bacilares cortas, redondas y algunas elongadas (**Tabla 9, e**). Las cepas seleccionadas se denominaron CRUDO1, CRUDO 3, CRUDO 5, CRUDO9. Es de resaltar que el crecimiento de los microorganismos en los medios sólidos se fue, en todos los casos, considerablemente superior al ser incubados a 37°C.

Tabla 8. Registro fotográfico del proceso de selección de cepas candidatas para actividad metabólica frente a la presencia de polietileno de baja densidad (LDPE)

a) **Inoculación inicial**

b) **Repique 1**

c) **Inoculación en medio sólido M9 con LDPE**



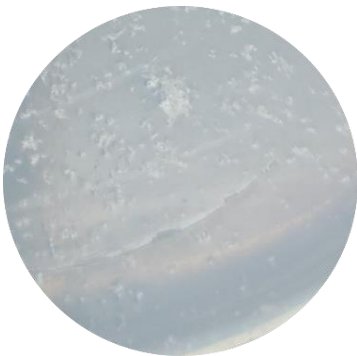
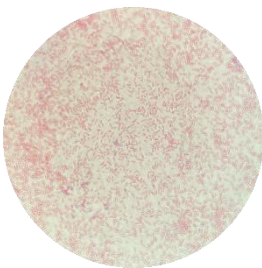
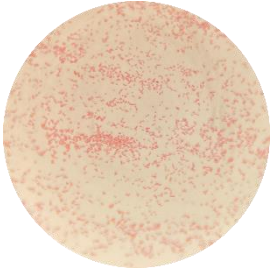
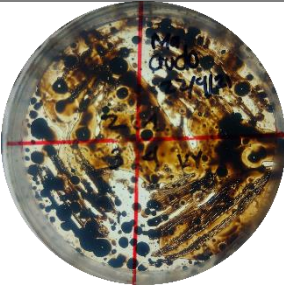
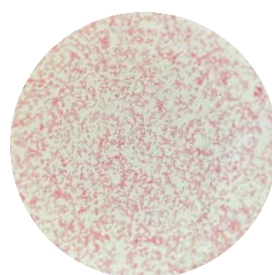
d) Morfología macroscópica	e) Tinción de Gram	
		
	Bacilos medianos	Bacilos cortos
	Gram (-)	Gram (-)

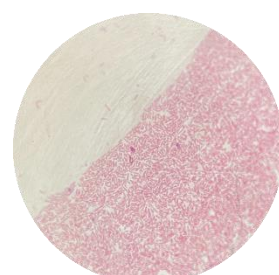
Tabla 9. Registro fotográfico del proceso de selección de cepas candidatas para actividad metabólica frente a la presencia de crudo.

a) Inoculación inicial	b) Repique 1	c) Inoculación en medio solido M9 con crudo
		
d) Morfología macroscópica	e) Tinción de Gram	



Bacilos cortos Gram

(-)



Bacilos medianos

Gram (-)

Al ejecutarse los tres ensayos para la evaluación de surfactantes, se verificó que la única cepa con dicha característica fue CRUDO9, marcando positivo en los tres ensayos (**Tabla 10, 11, 12**). Si bien las otras cepas aisladas pudieron crecer en presencia de crudo hay una posibilidad de que no posean la maquinaria metabólica para procesarlo a través de la producción activa de biosurfactante o al menos moléculas similares con actividad tensoactiva.

Tabla 10. Registro fotográfico y comparativo de la prueba de colapso de gota aplicada a las cepas candidatas para producción de biosurfactante.

Prueba de gota colapsada



Control (+) SDS 0,1% Control (-) Medio M9

Control (-) dH₂O

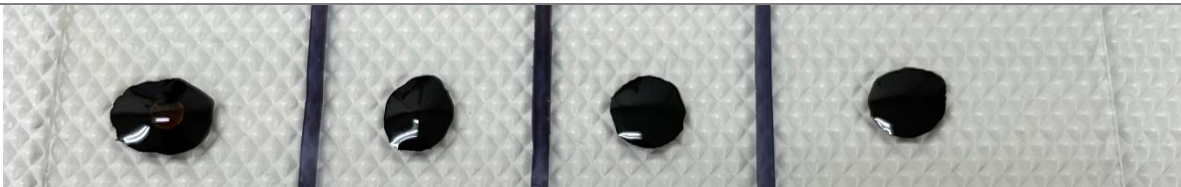
			
CRUDO9 (+)	CRUDO5 (-)	CRUDO3 (-)	CRUDO1 (-)

Tabla 11. Registro fotográfico y comparativo de la prueba de emulsificación aplicada a las cepas candidatas para producción de biosurfactante.

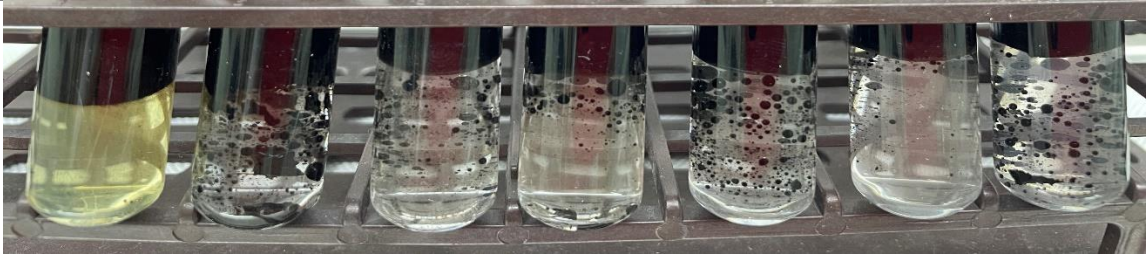
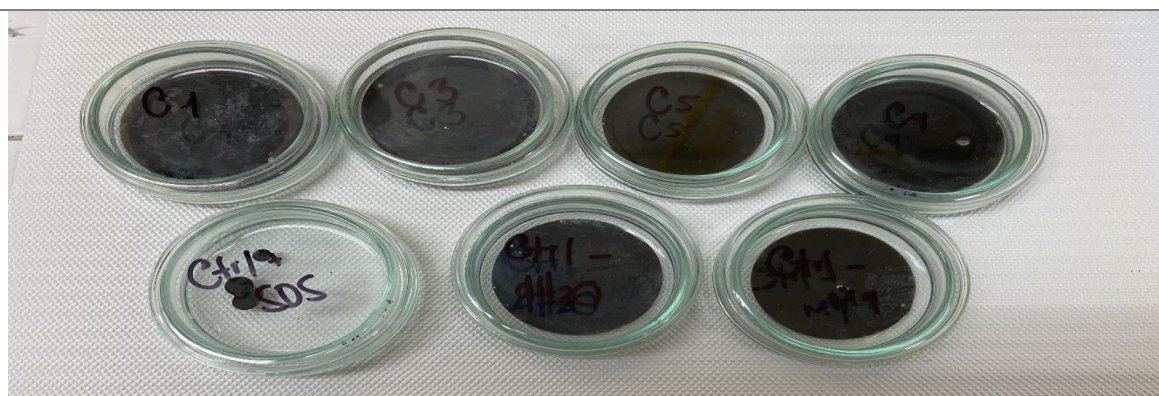
Prueba de emulsificación						
						
Control (+) SDS 0,1%	Control (-) Medio M9	Control (-) dH₂O	CRUDO1	CRUDO3	CRUDO5	CRUDO9

Tabla 12. Registro fotográfico y comparativo de la prueba de propagación de aceite aplicada a las cepas candidatas para producción de biosurfactante.

Prueba de propagación de aceite			
CRUDO1	CRUDO3	CRUDO5	CRUDO9



Control (+) SDS
0,1%

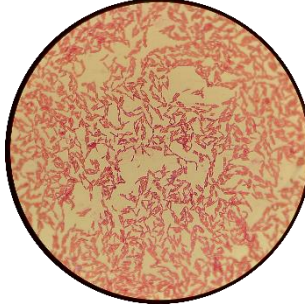
Control (-) dH₂O

Control (-) Medio
M9

6.1.4 Aislamiento bacteriano específico para potenciales cepas tolerantes a la presencia de metales pesados

Habiéndose finalizado la fase de repiques en medios líquidos se observó la formación de precipitados en todos los repiques, destacándose en los viales enriquecidos con plomo, donde la formación de precipitado granular de color gris oscuro fue bastante prominente (**Tabla 13 a, b, c**). Otro suceso importante que destacar fue la formación de estructuras fusiformes, globosas y esponjosas de color negro en el vial que contenía 10 mM de ZnSO₄, se presumieron como estructuras fúngicas para lo cual se adiciono 0.5 ml de anfotericina B antes de hacer su siembra en medios sólidos. Nuevamente, ahora en medios sólidos y sin presencia de metales, se logró aislar 9 cepas diferentes extraídas de los medios solidos inmediatamente anteriores. Estas colonias se destacaron por ser de color blanco, con bordes definidos y lisos, cremosas y poco translucidas (**Tabla 13 d**). Microscópicamente fueron catalogadas como bacilos Gram negativos en su mayoría, exceptuando unas pocas Gram positivas (**Tabla 13 e**).

Tabla 13. Registro fotográfico del proceso de selección de cepas candidatas para actividad metabólica frente a la presencia de metales pesados.

a) Inoculación inicial	b) Repique 1	c) Repique 2
		
d) Morfología macroscópica		
		
e) Tinción de Gram		
		
Bacilos largos Gram (+)	Bacilos medianos Gram (-)	Bacilos gruesos, Gram (-)

6.2 Caracterizaciones independientes de cultivo

Paralelamente a la caracterización dependiente de cultivo, estas muestras fueron procesadas aplicando técnicas bioquímicas de extracción de ADN, PCR y finalmente electroforesis que ayudó a corroborar la calidad y cantidad del material genético de los tres diferentes puntos

de muestreo. Ejecutándose de manera sincrónica, después de terminar el proceso de electroforesis se observó que la PCR tradicional usando los cebadores 8F-907R no permitieron una buena calidad de amplificación, contrario a lo visto en el uso de los cebadores 519F-785R (**Figura 2**). Las concentraciones de ADN metagenómico mostraron que el punto con mayor concentración fue “Piscinas IN LCI3” (**Tabla 14**) y en cuanto a las cepas secuenciadas, más de la mitad de ellas tuvieron concentraciones por encima de los 100 ng/μL (**Tabla 15**)

Tabla 14. Concentraciones de ADN metagenómico de los puntos de muestreo del campo La Cira-Infantas.

Punto de muestreo	Concentración de ADN [ng/μl]
Out. K. 3411 LCI3	2,6
IN Celda de flotación 3621 LCI 3	3,5
Piscinas IN LCI 3	13,6

Figura 2. Fotografía de la PCR de los amplicones del par de cebadores U519F-U785R en el recuadro azul y en el recuadro negro los resultados de la PCR 8F-907R. El marcador de peso molecular 100 pb se encuentra en el recuadro rojo.

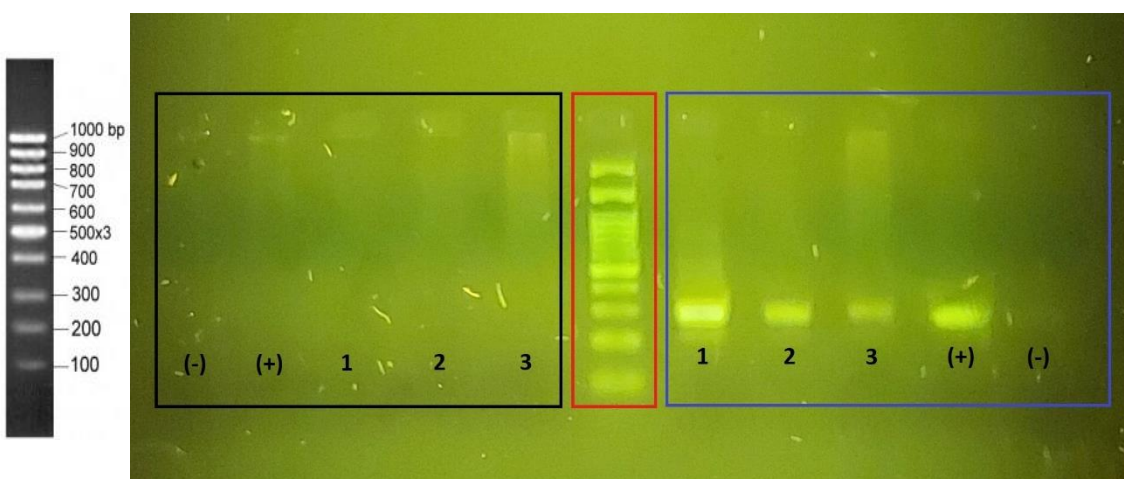


Tabla 15. Concentraciones de ADN extraído de las cepas aisladas y secuenciadas por medio de secuenciación por nanoporos.

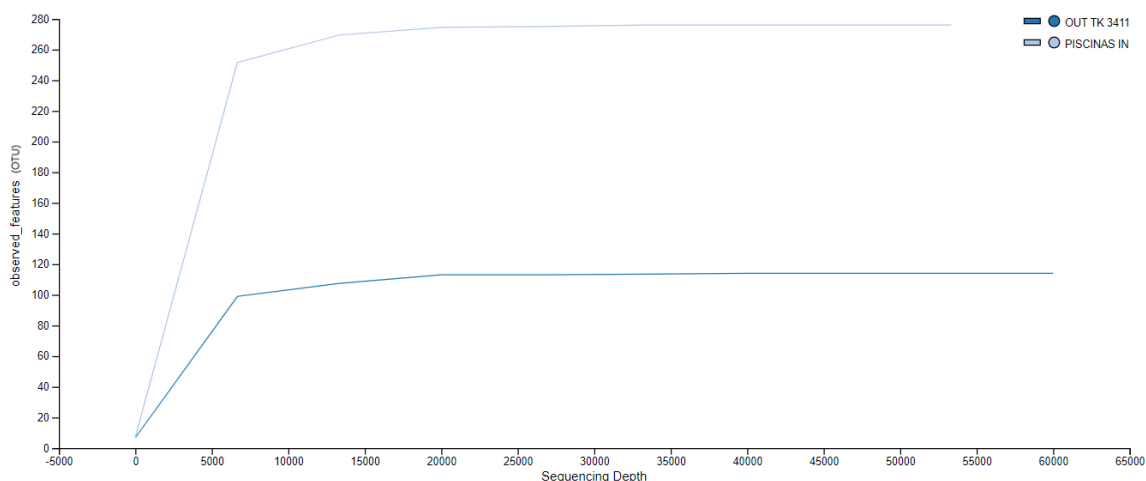
Cepa aislada	Concentración de ADN [ng/μL]	Barcode (Seq. Por nanoporos)
CMC 4-16	596,85	No secuenciada
CMC 2-16	610,95	No secuenciada
PE1	961,65	1
PE4	158,35	No secuenciada
CRUDO1	155,60	2
CRUDO3	19,4	3
CRUDO5	366,15	4
CRUDO9	318,75	No secuenciada
Zn1	193,05	5
Zn3	34,850	6
Pb5	102,75	7
Pb7	26,80	8
Pb8	351,65	No secuenciada
Cu11	188,95	9
Cu10	228,55	10
Cu13	18,45	11
Cu12	10.1	12

6.2.1 Análisis *in silico* de la secuenciación de ADN metagenómico y de aislamientos bacterianos a través de la tecnología Illumina y Nanopore, respectivamente.

Para el análisis de los datos se inició con la generación de una curva de rarefacción (**Figura 3**), observándose que las curvas para los sitios “Out. K. 3411 LCI3” y “Piscinas IN LCI 3” crecieron de manera exponencial llegando al punto de saturación. Lo anterior es indicativo de que la profundidad de la secuenciación fue óptima y por lo tanto capturó la mayor diversidad bacteriológica de la muestra, según lo estandarizado por Hughes y Hellman (2005). Con el fin de comparar las riquezas taxonómicas observadas en el esfuerzo de muestreo; este último interpretándose como la profundidad de la secuenciación del metagenoma, las curvas graficadas tienden a comportarse como asíntotas con un crecimiento

pronunciado. La muestra restante no se incluyó en este análisis dado que su grado de pureza no era el suficiente para un análisis concluyente.

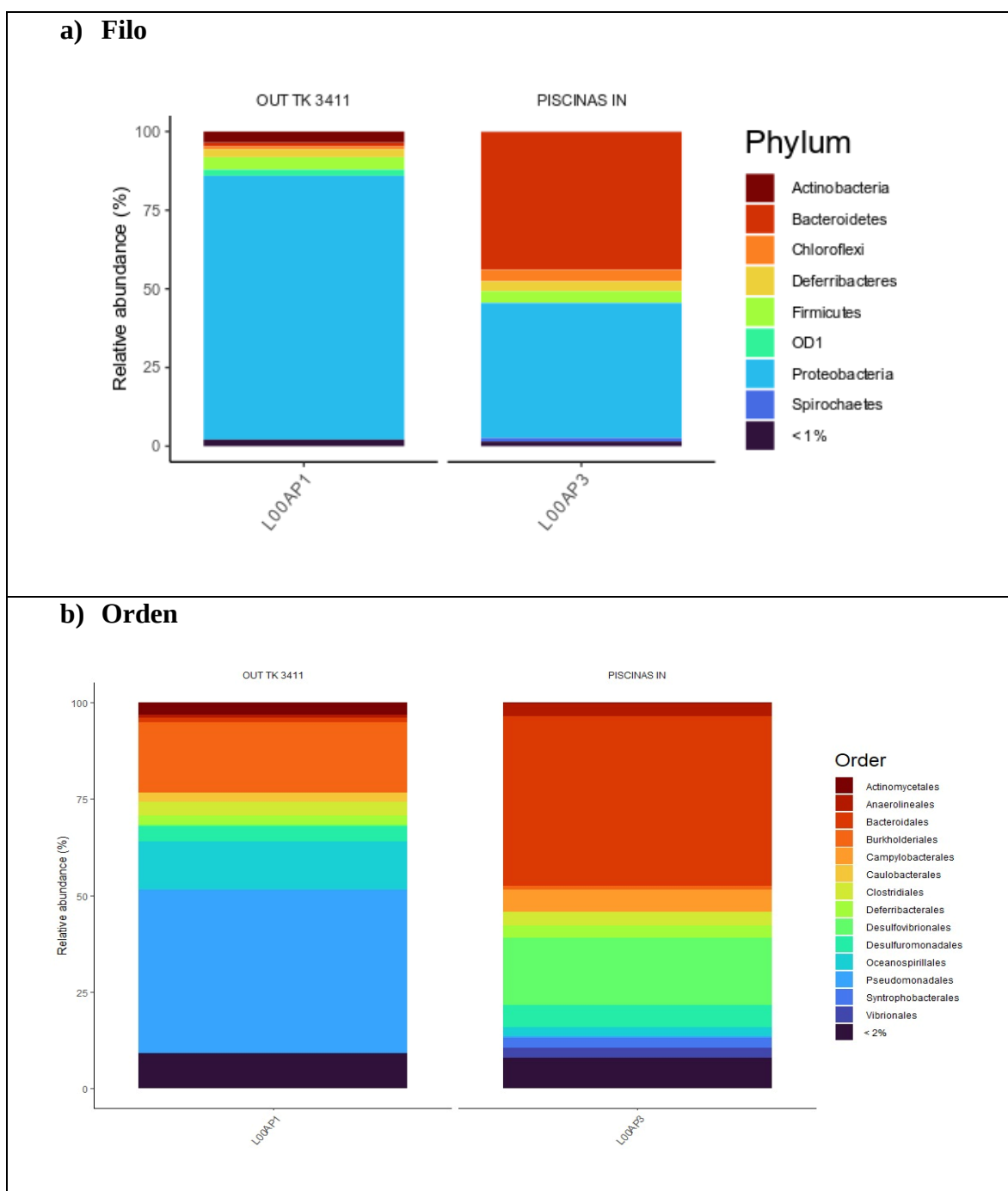
Figura 3. Curvas de rarefacción de las secuencias metagenómicas de aguas de producción petrolera

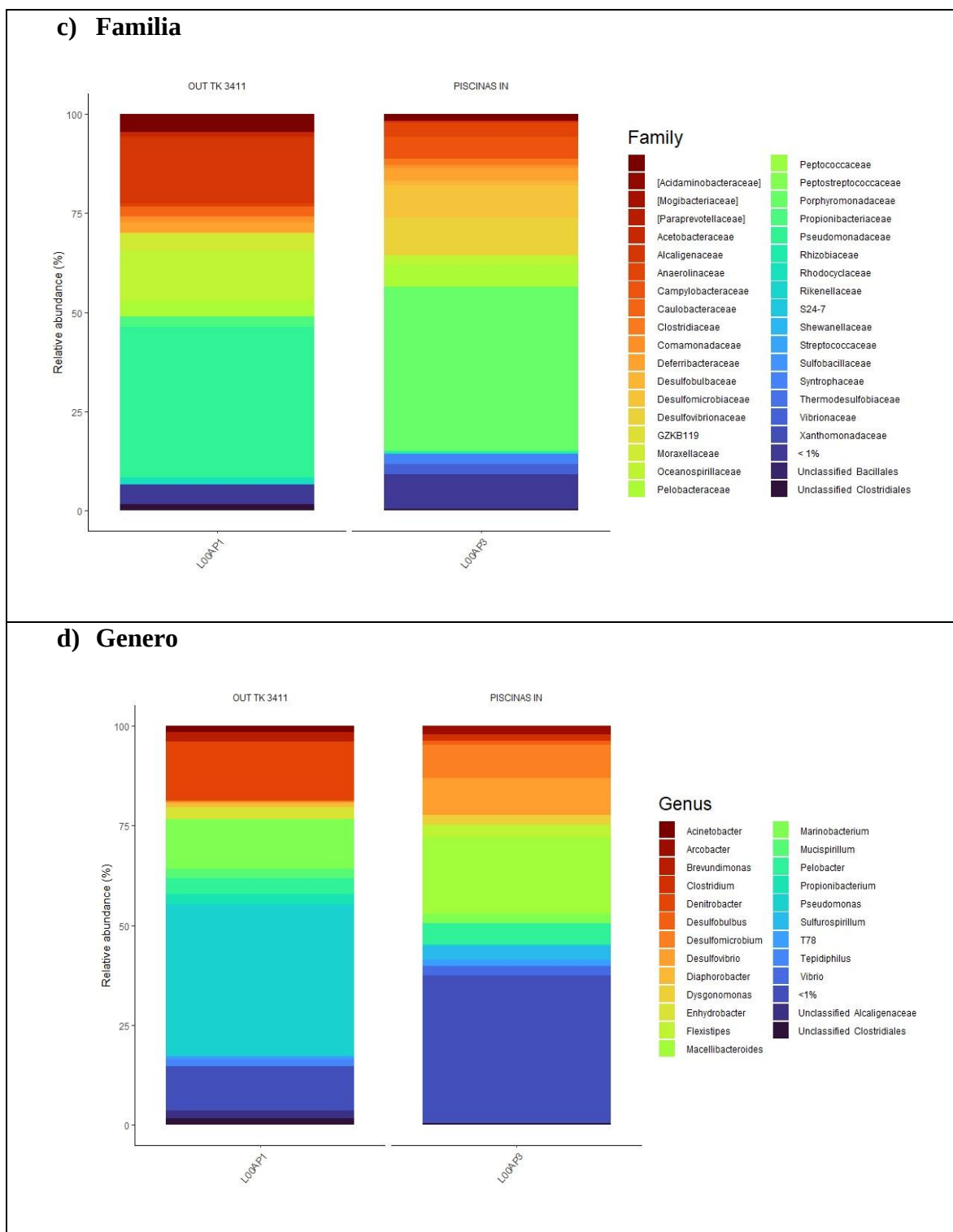


A continuación, se colapsaron las secuencias poco abundantes en una sola categoría con el objeto de facilitar la visualización composicional de los taxones encontrados en las muestras evaluadas (**Tabla 16**). Gracias a estas graficas se evidenció que en la muestra “Out. K. 3411 LCI3” Proteobacteria es el filo predominante con una abundancia relativa de más de 75% (**Tabla 16 a**), a nivel de orden fue Pseudomonadales (**Tabla 16 b**), en cuanto a familia fue Pseudomonadaceae en conjunto con Peptostreptococcaceae (**Tabla 16 c**) y en la categoría de genero se hallaron representantes de *Pseudomonas*, *Marinobacterium* y *Clostridium* (**Tabla 16 c**). En contraste, la muestra “Piscinas IN LCI 3”, los filo Proteobacteria y Bacteroidetes conforman una dominancia de similares proporciones (**Tabla 16 a**), seguido del orden Bacteroidales (**Tabla 16 b**) y en donde también se constató la presencia mayoritaria de representantes de la familia Porphyromonadaceae (**Tabla 16 c**) y finalmente en cuanto a

genero se agruparon varios de ellos en la misma categoría, entendiéndose así que las secuencias evaluadas eran poco significativas (**Tabla 16 d**).

Tabla 16. Diagrama de barras de abundancias relativas para varias categorías taxonómicas encontradas en las muestras “Out. K. 3411 LCI3” y “Piscinas IN LCI 3”.

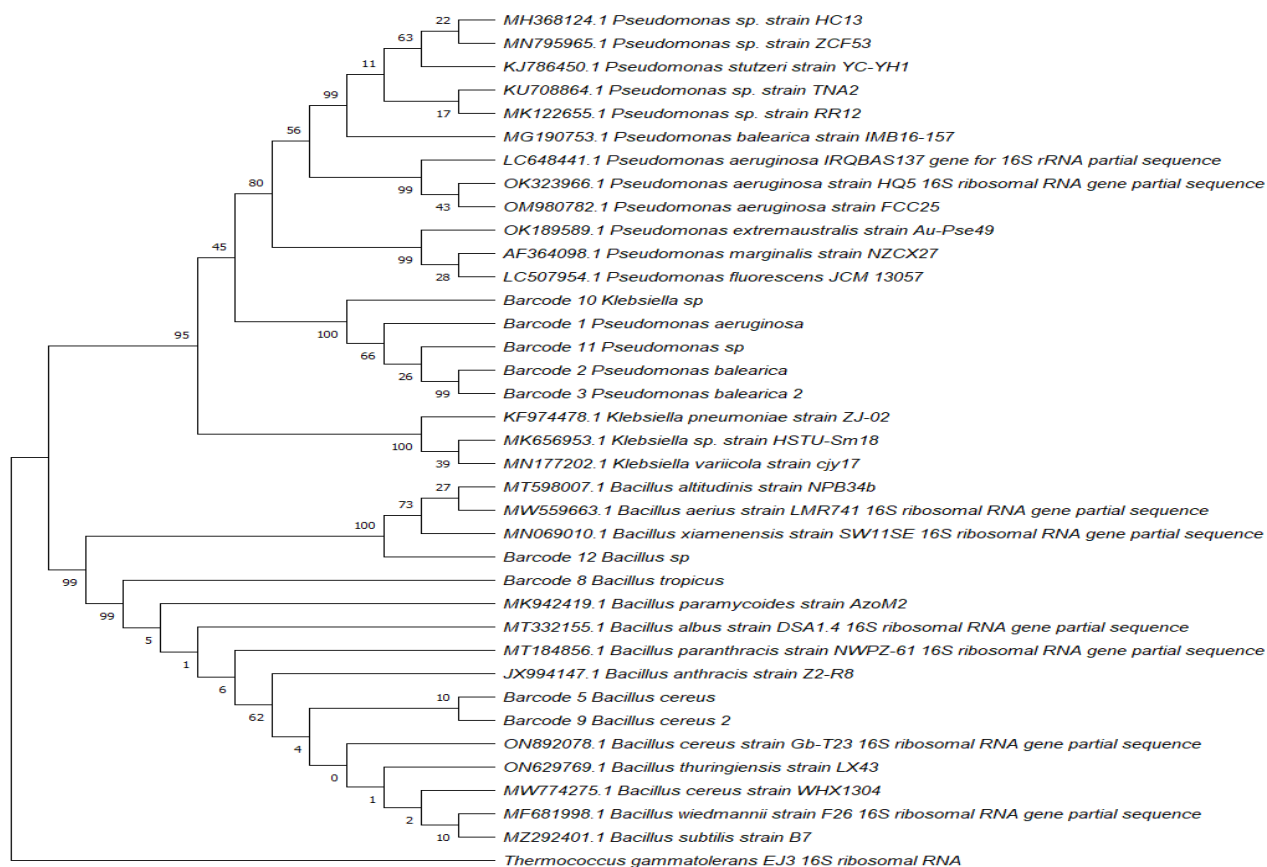




Finalmente, mediante JModelTest (Posada, 2008), el modelo seleccionado fue GTR o modelo generalizado reversible en el tiempo (Tavaré, 1986), adicionalmente el programa

sugirió que se aplicase una distribución gamma que comprende un patrón de ocurrencias totalmente aleatorias con tasas conocidas (Park y Bera, 2009). El árbol filogenético obtenido a partir del anterior modelo y en conjunto con las secuencias obtenidas de la base de datos del NCBI (Geer *et al.*, 2010; Tatusova *et al.*, 2016) y las secuencias de las cepas aisladas con sus respectivo barcode (**Tabla 15**) mostraron tres linajes representativos compuestos por representantes de los géneros *Klebsiella* y *Pseudomonas* (este último incluyendo los barcodes 1, 11, 2 y 3) formando una hermandad entre ellos, exceptuando la controvertida posición del barcode 10, que si bien según las lecturas de su secuenciación corresponde al género *Klebsiella*, este más emparentado con secuencias del género *Pseudomonas*. Por otra parte, está el linaje representado por secuencias pertenecientes al género *Bacillus* donde se agrupan los barcodes 12, 8, 5 y 9.

Figura 4. Árbol consenso de máxima verosimilitud con soporte de Bootstrap usando el modelo GTR+G.



7. Discusión

El presente estudio permitió la evaluación de la diversidad bacteriana de tres sitios de muestreo en el Campo La Cira-Infantas en inmediaciones del distrito de Barrancabermeja, Santander. De acuerdo con Wang y colaboradores (2020), microbiológicamente las bacterias Gram negativas tienden a predominar sobre las Gram positivas en ambientes petroindustriales, ejemplificándose con los aislados extraídos de la matriz de medios suplementados con carboximetilcelulosa (CMC) (**Tabla 7 f**), donde todas las cepas fueron Gram negativas, esto pudiese relacionarse con el hecho de que el filo Proteobacteria posee una destacable presencia en ambas muestras (**Tabla 16 a**), este clado se caracteriza por el hecho de que más del 90% de sus integrantes se tiñen de rosado en la tinción de Gram aunque hay muy pocas excepciones registradas en la literatura (Bennett *et al.*, 2019). Morfológicamente, las formas bacilares predominaron en todos los cultivos, esta forma es característica de varios ordenes como Pseudomonadales, Desulfovibrionales, Bacteriodales (**Tabla 16 b**), entre otros, sin embargo, es importante tener en cuenta que la morfología bacteriana no está relacionada con su tinción de Gram, ya que hay amplios registros de bacilos Gram positivos como el caso del género *Bacillus* (Barton, 2005). La diversidad bacteriana encontrada en los sitios de muestreo es mediamente equiparable con estudios hechos en otras locaciones. Como aquí se documentó los filo predominantes fueron Proteobacteria y Bacteriodetes, categorías taxonomías que son bastante comunes en ambientes industriales, sin embargo, los filo Firmicutes, Betaproteobacteria y Gamaproteobacteria también tienden a ser bastante representativos tanto en muestras de suelo como de agua extraídos de ambientes petroindustriales (Silva *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2020). Es notable destacar que teniendo en cuenta las diversidades

relativas (**Tabla 16**) en las muestras trabajadas en este estudio se componen de células con su metabolismo quimioorganotrófico (Wexler, 2007). Géneros como *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Bacillus* y *Streptomyces* han sido bien documentados por englobar especies con características degradadoras de celulosa y LDPE (Florez *et al.*, 2016; Acuña Molina, 2017), siendo la primera característica comprobada al exponer la colonia al rojo Congo y así determinar cuantitativamente que tan profundo fue el halo de aclaramiento observado como sucedió con las cepas CMC 15 y 16. En cuanto a la degradación de LDPE, basta con determinar cualitativamente el crecimiento de la colonia sobre este, en caso tal de que se quiera obtener un resultado más cuantitativo se requieren otro tipo de pruebas para medir el porcentaje de polietileno degradado del medio como lo sustenta Usha y colaboradores (2011) siendo esta determinación un tanto más precisa (Chamas *et al.*, 2020).

Para que una cepa sea tenida en cuenta por su capacidad de producción de biosurfactantes debe resultar positivo en las pruebas aplicadas anteriormente (Rani *et al.*, 2020). Con esto en mente, la única cepa que cumplía con dichos requisitos fue la denominada “CRUDO9”. Esta cepa mostró notoriamente un resultado representativo en la prueba de colapso de gota y desplazamiento de aceite, las cuales se clasifican como determinantes para esta característica y la prueba de índice de emulsificación debe entenderse como una prueba complementaria (Lara-Severino *et al.*, 2017). Taxonómicamente los géneros que se han documentado con este perfil son *Bacillus*, *Streptomyces*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Rhodococcus* y *Micrococcus* (Rani *et al.*, 2020). De acuerdo con Piotrowska-Seget (2005) la mayoría de los aislamientos bacterianos con cepas metalotolerantes fueron extraídos de minas donde se explotan estos metales. Su tinción de Gram mostró ser negativa en la mayoría de los casos y géneros como *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Ralstonia*, *Burkholderia*,

Comamonas, *Variovorax*, *Methylobacterium* y *Flavobacterium* muestran gran prevalencia. Sin embargo, se ha documentado que bacterias Gram positivas como *Bacillus* y *Corynebacterium* y otros Firmicutes pueden tener capacidades para tolerar estos metales (Piotrowska *et al.*, 2005; Sinegani y Younessi, 2017). Finalmente, el árbol consenso de máxima verosimilitud bajo el modelo GTR+G, constató que hay dos clústeres representativos, Gram positivas y Gram negativas, siendo el primero compuesto por todas las secuencias con similitudes al género *Bacillus* y en contraparte el segundo se compone por secuencias que engloban dos géneros: *Klebsiella* y *Pseudomonas*. La anterior premisa se compara con la filogenia más actualizada de Firmicutes (correspondiente con el clúster de las Gram positivas como *Bacillus*) y Proteobacteria (clúster de las Gram negativas como *Klebsiella* y *Pseudomonas*) (Ciccarelli *et al.*, 2006; Mendler *et al.*, 2019; Hassler *et al.*, 2022). No obstante, el Barcode 10, que se sabe que pertenece al género *Klebsiella*, presenta una marcada parafilia, representando un posible linaje separado de este último género y más emparentado con *Pseudomonas*, sugiriendo así que su ARNr 16S no contenga las suficientes variaciones para separarse de su género asignado y englobarse en otro, en la literatura se ha documentado que el genoma puede contener “zonas grises” que hacen que cierto individuo siga conectado a un nivel taxonómico a pesar de presentar similitudes con otra categoría taxonómica haciendo que su análisis filogenético pueda ser controvertido (Roux *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2020).

8. Conclusiones

El presente estudio representó una aproximación del microbioma local de ambientes de la industria petroquímica evaluando su potencial biotecnológico e incentivando así el diseño de metodologías de biorremediación amigables con el medio ambiente y que no represente

grandes inversiones económicas para su implementación. Gracias a la secuenciación del gen ARNr 16S y análisis *in silico* del mismo se pudo constatar que, taxonómicamente predominan los filo Proteobacteria y Bacteroidetes, equiparándose con lo registrado por Peng y colaboradores (2015). Adicionalmente, por medio de técnicas dependientes de cultivo se observó que la morfología de las cepas fueron predominantemente bacilos con tinción de Gram negativa. Al ser aisladas de ambientes industriales, las cepas mostraron capacidad para degradar polímeros naturales como los hidrocarburos y sintéticos como la carboximetilcelulosa (CMC) y polietileno de baja densidad (LDPE) y tener capacidad de resistir la presencia de metales pesados en el medio, estas actividades se constataron gracias a pruebas de carácter cuantitativo y cualitativo, respectivamente, aplicadas al finalizar el proceso de aislamiento a través de medios de cultivo suplementados con cada uno de los agentes químicos mencionados con anterioridad. Finalmente, por medio del análisis filogenético de las cepas aisladas, a las cuales se les pudo comprobar su actividad degradadora de polímeros y metaloresistencia se agrupan en dos clústeres: bacterias Gram positivas, representadas por el género *Bacillus* y los barcodes 5, 8, 9 y 12; por otra parte, están las bacterias Gram negativas, abarcando los géneros *Klebsiella* y *Pseudomonas* en conjunto con los barcodes 1, 2, 3, 10 y 11.

Referencias

- Acuña Molina, N. R. (2017). Revisión Bibliográfica sobre los Microorganismos Biodegradadores de Polietileno de Baja Densidad LDPE y sus Efectos en el Material.
- Adenipekun, C. O., & Fasida, I. O. (2005). Bioremediation of Oil Polluted Soil by *Lentinus subnudus*, Nigerian White Rot Fungus. *African Journal of Biotechnology*, 4(8).

- Aho, K., Derryberry, D., & Peterson, T. (2014). Model selection for ecologists: the worldviews of AIC and BIC. *Ecology*, 95(3), 631-636.
- Aislabie, J., Saul, D. J., Foght, J. M. (2006). Bioremediation of hydrocarbon-contaminated polar soils. *Extremophiles* 10 (3): 171-179. ISSN 1431-0651.
- Akaike, H. (1974). A new look at the statistical model identification. *IEEE transactions on automatic control*, 19(6), 716-723.
- Akaike, H. (1985). Prediction and entropy. In *Selected Papers of Hirotugu Akaike* (pp. 387-410). Springer, New York, NY.
- Akaike, H. (1998). Information theory and an extension of the maximum likelihood principle. In *Selected papers of hirotugu akaike* (pp. 199-213). Springer, New York, NY.
- Alexander, M. (1994). *Biodegradation and Bioremediation*. Academic Press.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215(3), 403-410.
- Amir, A., McDonald, D., Navas-Molina, J. A., Kopylova, E., Morton, J. T., Zech Xu, Z., ... & Knight, R. (2017). Deblur rapidly resolves single-nucleotide community sequence patterns. *MSystems*, 2(2), e00191-16.
- Atlas, R. M. (1975). Effects of Temperature and Crude Oil Composition on Petroleum Biodegradation. *Applied Microbiology*, 30(3): 396-403.
- Ayotamuno, M. J., Okparanma, R. N., Nweneka, E. K., Ogaji, S. O., & Probert, S. D. (2007). Bioremediation of Sludge Containing Hydrocarbon. *Applied Energy*, 84(9): 936-943.

- Baker, J. M. (1970). *Studies on Salt Marsh Communities: The Effects of a Single Oil Spillage*. (E. B. Colwell, Ed.) London: Institute of Petroleum.
- Barkay, T., Schaefer, J., (2001). Metal and radionuclide bioremediation: issues, considerations and potentials. *Current Opinion in Microbiology*. 4 (3): 318-323. doi:10.1016/S1369-5274(00)00210-1.
- Barton, L. (2005). *Structural and functional relationships in prokaryotes*. Springer Science & Business Media.
- Bautista, H., Rahman, K, M, M. (2016). Review On the Sundarbans Delta Oil Spill: Effects On Wildlife and Habitats. *International Research Journal*. 1 (43): 93 96. doi:10.18454/IRJ.2016.43.143
- Behjati, S., & Tarpey, P. S. (2013). What is next generation sequencing?. *Archives of Disease in Childhood-Education and Practice*, 98(6), 236-238.
- Ben-Dov, E., Shapiro, O. H., Siboni, N., & Kushmaro, A. (2006). Advantage of using inosine at the 3' termini of 16S rRNA gene universal primers for the study of microbial diversity. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(11), 6902-6906.
- Bennett, J. E., Dolin, R., & Blaser, M. J. (2019). *Mandell, douglas, and bennett's principles and practice of infectious diseases E-book*. Elsevier Health Sciences.
- Berg, G., Rybakova, D., Fischer, D., Cernava, T., Vergès, M. C. C., Charles, T., ... & Schlöter, M. (2020). Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome*, 8(1), 1-22.

- Bhattacharya M, Biswas D, Sana S, Datta S (2015). Biodegradation of waste lubricants by a newly isolated *Ochrobactrum* sp. C1. 3 Biotech 5. (5):807–817.
- Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., ... & Caporaso, J. G. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature biotechnology*, 37(8), 852-857.
- Brinkerhoff, H., Kang, A. S., Liu, J., Aksimentiev, A., & Dekker, C. (2021). Multiple rereads of single proteins at single–amino acid resolution using nanopores. *Science*, 374(6574), 1509-1513.
- Cazals, F., Huguenot, D., Crampon, M., Colombano, S., Betelu, S., Galopin, N., ... & Rossano, S. (2020). Production of biosurfactant using the endemic bacterial community of a PAHs contaminated soil, and its potential use for PAHs remobilization. *Science of the Total Environment*, 709, 136143.
- Cébron, A., Beguiristain, T., Bongoua-Devisme, J., Denonfoux, J., Faure, P., Lorgeoux, C., Ouvrard, S., Parisot, N. (2015). Impact of clay mineral, wood sawdust or root organic matter on the bacterial and fungal community structures in two aged PAH-contaminated soils. *Environmental Science and Pollution Research*. 22 (18): 13724-13738. ISSN 1614-7499. doi:10.1007/s11356-015-4117-3.
- Chakravorty, S., Helb, D., Burday, M., Connell, N., & Alland, D. (2007). A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *Journal of microbiological methods*, 69(2), 330-339.

- Chamas, A., Moon, H., Zheng, J., Qiu, Y., Tabassum, T., Jang, J. H., ... & Suh, S. (2020). Degradation rates of plastics in the environment. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 8(9), 3494-3511.
- Chaudhary, D. K., & Kim, J. (2019). Experimental Setup for a Diffusion Bioreactor to Isolate Unculturable Soil Bacteria. *Bio-protocol*. 9(19), e3388.
<https://doi.org/10.21769/BioProtoc.3388>
- Chikere, B. O., & Chijioke-Osuji, O. (2006). Microbial Diversity and Physicochemical Properties of a Crude Oil Polluted Soil. *Niger J. Microbiol*, 20: 1039-1046.
- Ciccarelli, F. D., Doerks, T., Von Mering, C., Creevey, C. J., Snel, B., & Bork, P. (2006). Toward automatic reconstruction of a highly resolved tree of life. *science*, 311(5765), 1283-1287.
- Crawford, P. A., Crowley, J. R., Sambandam, N., Muegge, B. D., Costello, E. K., Hamady, M., et al. (2009). Regulation of myocardial ketone body metabolism by the gut microbiota during nutrient deprivation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(27), 11276-11281.
- Dahm, R. (2008). Discovering DNA: Friedrich Miescher and the early years of nucleic acid research. *Human genetics*, 122(6), 565-581.
- Dantur, K. I., Enrique, R., Welin, B., & Castagnaro, A. P. (2015). Isolation of cellulolytic bacteria from the intestine of *Diatraea saccharalis* larvae and evaluation of their capacity to degrade sugarcane biomass. *AMB Express*, 5(1). <https://doi.org/10.1186/s13568-015-0101-z>
- De Magalhães, J. P., Finch, C. E., & Janssens, G. (2010). Next-generation sequencing in aging research: emerging applications, problems, pitfalls and possible solutions. *Ageing research reviews*, 9(3), 315-323.

- Eden, P. A., Schmidt, T. M., Blakemore, R. P., & Pace, N. R. (1991). Phylogenetic analysis of *Aquaspirillum magnetotacticum* using polymerase chain reaction-amplified 16S rRNA-specific DNA. *International journal of systematic and Evolutionary microbiology*, 41(2), 324-325.
- Exxon Mobil Corporation (2003-2016). La Tropical Oil Company y La concesión de Mares (1917-1951). Nuestra Historia. Recuperado de:
<https://web.archive.org/web/20161227180948/https://www.essomobil.com.co/es-co/tropical-oil-company>
- Fan, J., Huang, S., & Chorlton, S. D. (2021). BugSeq: a highly accurate cloud platform for long-read metagenomic analyses. *BMC bioinformatics*, 22(1), 1-12.
- Farinazleen, G., Raja, Z., Rahman, A., Abu, S., & Mahiran, B. (2004). Biodegradation of Hydrocarbon in Soil by Microbial Consrtium. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 54: 61-67.
- Florez, P. A. V., Guerra, D. A. C., & Rosero, S. E. V. (2016). Capacidad y diversidad de bacterias celulolíticas aisladas de tres hábitats tropicales en Boyacá, Colombia. *Acta Agronomica*, 65(4), 2–7. <https://doi.org/10.15446/acag.v65n4.50181>
- Fonti, V., Dell'Anno, A., Beolchini, F. (2016). Does bioleaching represent a biotechnological
- Fox, S., Filichkin, S., & Mockler, T. C. (2009). Applications of ultra-high-throughput sequencing. *Plant Systems Biology*, 79-108.
- Fritsche, W., Hofrichter, M (2008). Investigation of the bioremediation potential of aerobic zymogenous microorganisms in soil for crude oil biodegradation. *Biotechnology*. 11(2):144–149.

- Fritsche, W., Hofrichter, M (2008). Investigation of the bioremediation potential of aerobic zymogenous microorganisms in soil for crude oil biodegradation. *Biotechnology*. 11(2):144–149.
- Gao, Z., Perez-Perez, G. I., Chen, Y., & Blaser, M. J. (2010). Quantitation of major human cutaneous bacterial and fungal populations. *Journal of clinical microbiology*, 48(10), 3575-3581
- Garrigues, F. (2017). NGS: Secuenciación de Segunda Generación. *Genética Médica Blog*.
- Geer, L. Y., Marchler-Bauer, A., Geer, R. C., Han, L., He, J., He, S., ... & Bryant, S. H. (2010). The NCBI biosystems database. *Nucleic acids research*, 38(suppl_1), D492-D496.
- Geyer, R., Jambeck, J. R., Law, K. L. (2017). Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science Advances*. 3 (7):
doi:10.1126/sciadv.1700782. PMC 5517107. PMID 28776036
- Gudiña, E. J., Pereira, J. F. B., Costa, R., Coutinho, J. A. P., Teixeira, J. A., Rodrigues, L. (2013) Biosurfactant-producing and oil-degrading *Bacillus subtilis* strains enhance oil recovery in laboratory sand-pack columns, *Journal of Hazardous Materials*. (261). 106-113, ISSN 0304-3894
- Gutierrez, T., Berry, D., Teske, A., Aitken, M. D. (2016). Enrichment of *Fusobacteria* in Sea Surface Oil Slicks from the Deepwater Horizon Oil Spill. *Microorganisms*. 4 (3): 24. doi:10.3390/microorganisms4030024. PMC 5039584. PMID 27681918
- Hadad, D., Geresh, S., Sivan, A. (2005). Biodegradation of polyethylene by the thermophilic bacterium *Brevibacillus borstelensis*. *Journal of Applied Microbiology*. 98 (5): 1093–1100. doi:10.1111/j.1365-2672.2005.02553. x. PMID 15836478. S2CID 2977246.

- Hammer, J., Kraak, M. H., Parsons, J. R. (2012). Plastics in the marine environment: the dark side of a modern gift. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. 220: 1–44. doi:10.1007/978-1-4614-3414-6_1. ISBN 978-1-4614-3413-9. PMID 22610295. S2CID 5842747.
- Hassler, H. B., Probert, B., Moore, C., Lawson, E., Jackson, R. W., Russell, B. T., & Richards, V. P. (2022). Phylogenies of the 16S rRNA gene and its hypervariable regions lack concordance with core genome phylogenies. *Microbiome*, 10(1), 1-18.
- Heikema, A. P., Horst-Kreft, D., Boers, S. A., Jansen, R., Hiltemann, S. D., de Koning, W., ... & Hays, J. P. (2020). Comparison of Illumina versus nanopore 16S rRNA gene sequencing of the human nasal microbiota. *Genes*, 11(9), 1105.
- Hood, L. (2012). Tackling the microbiome. *Science*, 336(6086), 1209-1209.
- Hughes, J. B., & Hellmann, J. J. (2005). The application of rarefaction techniques to molecular inventories of microbial diversity. *Methods in enzymology*, 397, 292-308.
- Jambeck, J. R., Geyer, R., Wilcox, C., Siegler, T. R., Perryman, M., Andrady, A., Narayan, R., Law, K. L. (2015). Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science*. 347 (6223): 768-771. Bibcode:2015Sci...347.768J. doi:10.1126/science.1260352. PMID 25678662. S2CID 206562155
- James, G. (2010). Universal bacterial identification by PCR and DNA sequencing of 16S rRNA gene. In *PCR for clinical microbiology* (pp. 209-214). Springer, Dordrecht.
- Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2007). 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *Journal of clinical microbiology*, 45(9), 2761-2764.

- Jensen, J. R., Halls, J. N., Michel, J. (1998). A Systems Approach to Environmental Sensitivity Index (ESI) Mapping for Oil Spill Contingency Planning and Response. *Photogrammetric Engineering & Remote Sensing*. 1003–1014.
- Kasai, Y., Kishira, H., Sasaki, T., Syutsubo, K., Watanabe, K. & Harayama, S. (2002), Predominant growth of *Alcanivorax* strains in oil-contaminated and nutrient-supplemented sea water. *Environmental Microbiology*, 4: 141-147. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2002.00275.x>
- Kawai, Y., Ozawa, N., Fukuda, T., Suzuki, N., & Mikata, K. (2022). Development of an efficient antimicrobial susceptibility testing method with species identification by Nanopore sequencing of 16S rRNA amplicons. *Plos one*, 17(2), e0262912.
- Kennedy, S. R., Prost, S., Overcast, I., Rominger, A. J., Gillespie, R. G., & Krehenwinkel, H. (2020). High-throughput sequencing for community analysis: the promise of DNA barcoding to uncover diversity, relatedness, abundances and interactions in spider communities. *Development Genes and Evolution*, 230(2), 185-201.
- Kolotilova, N. (2011). From the history of research into the processes of decomposition of petroleum hydrocarbons by microorganisms. *STJ. Environmental protection in the oil and gas sector*. 5:27-35.
- Kumar, Niraj. (2020). Application of 16 rRNA Gene of V3-V4 Region for Meta Barcoding of Bacterial Community in High Density Population of Eastern India. *Bioscience Biotechnology Research Communications*. 13. 1871-1878. [10.21786/bbrc/13.4/36](https://doi.org/10.21786/bbrc/13.4/36).

- Kyaw, B. M., Champakalakshmi, R., Sakharkar, M. K., Lim, C. S., & Sakharkar, K. R. (2012). Biodegradation of Low Density Polythene (LDPE) by *Pseudomonas* Species. *Indian journal of microbiology*, 52(3), 411–419. <https://doi.org/10.1007/s12088-012-0250-6>
- Lappin-Scott H, Burton S & Stoodley P. (2014). Revealing a world of biofilms — the pioneering research of Bill Costerton.. *Nature Reviews Microbiology*, 12: 781–787
- Larkia, N. J., Kulakov, L. A., & Allen, C. (2005). Biodegradation and *Rhodococcus*: Masters of Catabolic Versatility. *Curr. Opin. Biotechnol*, 16: 282-290.
- Leahy, J. G., & Colwell, R. R. (1990). Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment. *Microbiol Rev.*, 16: 305-315.
- Liu, P. Y., Wu, W. K., Chen, C. C., Panyod, S., Sheen, L. Y., & Wu, M. S. (2020). Evaluation of compatibility of 16S rRNA V3V4 and V4 amplicon libraries for clinical microbiome profiling. *BioRxiv*.
- Mao, D. P., Zhou, Q., Chen, C. Y., & Quan, Z. X. (2012). Coverage evaluation of universal bacterial primers using the metagenomic datasets. *BMC microbiology*, 12(1), 1-8.
- McDonald, D., Price, M. N., Goodrich, J., Nawrocki, E. P., DeSantis, T. Z., Probst, A., ... & Hugenholtz, P. (2012). An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. *The ISME journal*, 6(3), 610-618.
- McMurdie & Holmes (2013) phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE*. 8(4): e61217

- Mendler, K., Chen, H., Parks, D. H., Lobb, B., Hug, L. A., & Doxey, A. C. (2019). AnnoTree: visualization and exploration of a functionally annotated microbial tree of life. *Nucleic acids research*, 47(9), 4442-4448.
- Michalak, I., Chojnacka, K., Witek-Krowiak, A. (2013). State of the Art for the Biosorption Process—a Review. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 170 (6): 1389-1416. ISSN 0273-2289. PMC 3696181. PMID 23666641. doi:10.1007/s12010-013-0269-0.
- Miller, J. H. (1972). *Experiments in molecular genetics*. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Mukherjee, S., RoyChaudhuri, U. & Kundu, P. (2017). Bio-degradation of polyethylene via complete solubilisation by the action of *Pseudomonas fluorescens*, bio-surfactant produced by *Bacillus licheniformis* and anionic surfactant. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 93. 10.1002/jctb.5489.
- Neefs J. M, Van de Peer Y, Hendriks L, De Wachter R (1990). Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. *Nucleic Acids Research*. 18:2237-2330.
- Nei M. and Kumar S. (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.
- Nong, Q., Yuan, K., Li, Z., Chen, P., Huang, Y., Hu, L., ... & Chen, B. (2019). Bacterial resistance to lead: chemical basis and environmental relevance. *Journal of Environmental Sciences*, 85, 46-55.
- NP80. (2018). Implen NanoPhotometers. The Best in Spectrophotometers; Implen Inc. <https://www.implen.de/product-page/implen-nanophotometer-np80-microvolume-cuvette-spectrophotometer/>

- Olsen, G. J., & Woese, C. R. (1993). Ribosomal RNA: a key to phylogeny. *The FASEB journal*, 7(1), 113-123.
- Park, S. Y., & Bera, A. K. (2009). Maximum entropy autoregressive conditional heteroskedasticity model. *Journal of Econometrics*, 150(2), 219-230.
- Pekin, D., Skhiri, Y., Baret, J. C., Le Corre, D., Mazutis, L., Salem, C. B., ... & Taly, V. (2011). Quantitative and sensitive detection of rare mutations using droplet-based microfluidics. *Lab on a Chip*, 11(13), 2156-2166.
- Peng, M., Zi, X., & Wang, Q. (2015). Bacterial community diversity of oil-contaminated soils assessed by high throughput sequencing of 16S rRNA genes. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12(10), 12002-12015.
- Pérez Silva, R. M., Rodríguez, A. A., Oca G, M., Moreno, D. C. (2006). Biodegradation of Crude Oil by *Pseudomonas aeruginosa* at 18 strains. *Tecnología Química*. 26(1):70–77.
- Perfumo, A., Smyth, T. J. P., Marchant, R., Banat, I. M. (2010). Production and roles of Biosurfactants and Bioemulsifiers in accessing hydrophobic substrates. K.N. Timmis (ed). *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*. DOI 10.1007/978-3-540-77587_103.
- Piotrowska-Seget, Z., Cycoń, M., & Kozdroj, J. (2005). Metal-tolerant bacteria occurring in heavily polluted soil and mine spoil. *Applied Soil Ecology*, 28(3), 237-246.
- Plohl, K., Leskovsek, H., & Bricelj, M. (2002). Biological Degradation of Motor Oil in Water. *Acta Chim. Slovenica*, 49: 279-289.
- Portik, D. M., Brown, C. T., & Pierce-Ward, N. T. (2022). Evaluation of taxonomic profiling methods for long-read shotgun metagenomic sequencing datasets. *bioRxiv*.

- Posada, D. (2008). jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular biology and evolution*, 25(7), 1253-1256.
- Qiagen. (2013-22). DNeasy® PowerSoil® (100) Quick-Start Protocol. Recuperado de: <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/microbial-dna/dneasy-powersoil-pro-kit/>
- R Core Team (2018). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Rani, M., Weadge, J. T., & Jabaji, S. (2020). Isolation and characterization of biosurfactant-producing bacteria from oil well batteries with antimicrobial activities against food-borne and plant pathogens. *Frontiers in microbiology*, 11, 64.
- Rashedi, H., Fatemeh, Y., & Naghizadeh, S. (2012). Microbial Enhanced Oil Recovery. Open access pear reviewed chapter. DOI: 10.5772/34666.<http://www.intechopen.com>
- Reasoner D, J., Geldreich E. E. (1985). A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Applied and Environmental Microbiology*. 49 (1): 1–7. PMC 238333. PMID 3883894
- Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., & Mahé, F. (2016). VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ*, 4, e2584.
- Roux, C., Fraisse, C., Romiguier, J., Anciaux, Y., Galtier, N., & Bierne, N. (2016). Shedding light on the grey zone of speciation along a continuum of genomic divergence. *PLoS biology*, 14(12), e2000234.

- RStudio Team (2020). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., ... & Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839), 487-491.
- Sandle, T. (2004). An approach for the reporting of microbiological results from water systems. *PDA J Pharm Sci Technol.* 58 (4): 231–7. PMID 15368993
- Silva, T. R., Verde, L. C. L., Neto, E. S., & Oliveira, V. M. (2013). Diversity analyses of microbial communities in petroleum samples from Brazilian oil fields. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 81, 57-70.
- Sinegani, A. A. S., & Younessi, N. (2017). Antibiotic resistance of bacteria isolated from heavy metal-polluted soils with different land uses. *Journal of global antimicrobial resistance*, 10, 247-255.
- Song, H., Song, W., Kim, M., Tripathi, B. M., Kim, H., Jablonski, P., & Adams, J. M. (2017). Bacterial strategies along nutrient and time gradients, revealed by metagenomic analysis of laboratory microcosms. *FEMS Microbiology Ecology*, 1–13.
<https://doi.org/10.1093/femsec/fix114>
- Stackebrandt, E., & Goebel, B. M. (1994). Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 44(4), 846-849.

- Tamura K., Stecher G., and Kumar S. (2021). MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. Molecular Biology and Evolution
<https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>.
- Tatusova, T., DiCuccio, M., Badretdin, A., Chetvernin, V., Nawrocki, E. P., Zaslavsky, L., ... & Ostell, J. (2016). NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. *Nucleic acids research*, 44(14), 6614-6624.
- Tausz J., Donath P. Über die Oxydation des Wasserstoffs und der Kohlenwasserstoffe mittels Bakterien.. . 1930;190(3-6): 141-168. <https://doi.org/10.1515/bchm2.1930.190.3-6.141>
- Tavaré, S. (1986). Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences. *Lectures on mathematics in the life sciences*, 17(2), 57-86.
- ThermoFisher Scientific. (2006-2022). MiniAmp™ Plus Thermal Cycler Protocol. Recuperado de: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A37835>
- Usha, R., Sangeetha, T., & Palaniswamy, M. (2011). Screening of polyethylene degrading microorganisms from garbage soil. *Libyan Agric Res Cent J Int*, 2(4), 200-4.
- Varjani, S.J. (2017). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. *Bioresource Technology*. 223, 277–286.
- Verma, N., Sharma, R. (2017). Bioremediation of Toxic Heavy Metals: A Patent Review. *Recent Patents on Biotechnology*. 11 (3).
- Volke Sepúlveda, T., Rosa Pérez, D, A. (2005). Suelos contaminados por metales y metaloides: muestreo y alternativas para su remediación. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología. ISBN 968-817-492-0. OCLC 99997022.

- Wang D, Lin J, Lin J, Wang W, Li S (2019). Biodegradation of petroleum hydrocarbons by *Bacillus subtilis* BL-27, a strain with weak hydrophobicity. *Molecules* 33(18):3100–3109
- Wang, Q., Liang, J., Zhang, S., Yoza, B. A., Li, Q. X., Zhan, Y., ... & Chen, C. (2020). Characteristics of bacterial populations in an industrial scale petrochemical wastewater treatment plant: Composition, function and their association with environmental factors. *Environmental Research*, 189, 109939.
- Wang, X., Li, X., Yu, L., Huang, L., Xiu, J., Lin, W., & Zhang, Y. (2019). Characterizing the microbiome in petroleum reservoir flooded by different water sources. *Science of The Total Environment*, 653, 872-885.
- Wexler, H. M. (2007). *Bacteroides*: the good, the bad, and the nitty-gritty. *Clinical microbiology reviews*, 20(4), 593-621.
- Yang, J., Yang, Y., Wu, W. M., Zhao, J., & Jiang, L. (2014). Evidence of polyethylene biodegradation by bacterial strains from the guts of plastic-eating waxworms. *Environmental science & technology*, 48(23), 13776-13784.