

**Evaluación de la expresión de genes involucrados en la degradación de hidrocarburos
pesados utilizando un consorcio microbiano**

Christian Alfonso Arenas Sepúlveda

Trabajo de Grado para Optar al Título de Magister en Microbiología

Director

German Alexis Zafra Sierra

Doctor en Ciencias en Biotecnología

Codirector

Wilfredo Valdivieso Quintero

Magister en Ciencias Básicas Biomédicas

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Salud

Escuela de Microbiología

Maestría en Microbiología

Bucaramanga

2026

Agradecimientos

Culminar este trabajo de grado representa no solo la consolidación de una etapa académica, sino también el resultado de un proceso lleno de aprendizajes, desafíos, crecimiento personal y profesional. Este logro no habría sido posible sin el acompañamiento, apoyo y guía de muchas personas.

En primer lugar, agradezco profundamente a mi madre y a mi hermana, pilares fundamentales en mi vida, mamá, por ser mi fuerza inquebrantable, por tu ejemplo de perseverancia, tu amor infinito y tu fe constante en mí. Tu apoyo, tanto emocional como práctico, ha sido esencial para superar los momentos difíciles y celebrar los logros con mayor gratitud. A mi hermana, gracias por tus palabras de ánimo y por recordarme siempre que no estoy solo en este recorrido. Ustedes dos han sido mi hogar en los días de duda y mi impulso en los momentos de esfuerzo.

A mis profesores, quienes con su dedicación y compromiso sembraron en mí la pasión por la ciencia y la investigación. Cada clase, cada orientación, y cada conversación fuera del aula fue una oportunidad para crecer, cuestionar y aprender. Agradezco especialmente a quienes me acompañaron más de cerca durante el desarrollo de esta tesis, por su disposición, su guía académica y por compartir generosamente su conocimiento. Extiendo mi gratitud también a los auxiliares de laboratorio, quienes con su experiencia, paciencia y apoyo técnico fueron una pieza clave para llevar a cabo los experimentos. Su colaboración y disposición hicieron posible el desarrollo práctico de este trabajo, muchas veces en circunstancias complejas que requirieron compromiso y vocación. Este logro no es solo mío, es también de quienes creyeron en mí, me ofrecieron su mano en los momentos de incertidumbre, y celebraron conmigo cada paso dado. A todos ustedes, gracias por ser parte de esta historia, por enseñarme el valor de la constancia, el trabajo en equipo y la humildad ante el conocimiento.

Tabla de contenido

	Pág
Introducción	11
1. Objetivos.....	14
1.1 Objetivo general.....	14
1.2 Objetivos Específicos.....	14
2. Marco conceptual y estado del arte.....	15
2.1 Generalidades del petróleo.....	15
2.2 Fracción asfáltica del petróleo	15
2.3 Biorremediación de matrices impactadas con hidrocarburos	16
2.4 Degradación microbiana de hidrocarburos de alto peso molecular	17
2.5 Estudios de expresión génica	20
2.6 Estado del arte.....	21
3. Metodología	23
3.1 Consorcio bacteriano degradador de hidrocarburos pesados.....	23
3.2 Pruebas de biodegradación de hidrocarburos pesados.....	24
3.3 Medición de la actividad microbiana durante la biodegradación	25
3.4 Extracción y cuantificación de hidrocarburos pesados.....	26
3.5 Diseño y evaluación de iniciadores para RT-qPCR.....	27
3.6 Extracción de ARN total a partir del medio líquido	28
3.7 Cuantificación de la expresión de genes mediante RT-qPCR	28
3.8 Análisis Estadístico.....	29
4. Resultados y discusión.....	30

4.1 Crecimiento y actividad del consorcio bacteriano durante la degradación de hidrocarburos pesados en medio líquido.....	30
4.2 Degradación de hidrocarburos pesados por el consorcio bacteriano en medio líquido	33
4.3 Evaluación de la expresión de genes involucrados en la degradación de hidrocarburos pesados	35
4.4 Cambios estructurales en los hidrocarburos después de la biodegradación	47
5. Conclusiones	53
6. Recomendaciones	55
Referencias Bibliográficas	56

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1 Ensayos de biodegradación de hidrocarburos pesados en medio líquido	25
Tabla 2 Iniciadores diseñados en este trabajo para la evaluación de la expresión de genes degradadores de hidrocarburos mediante RT-qPCR.....	36

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. Producción de CO ₂ durante la degradación de crudo pesado y asfaltenos en medio líquido durante 52 días. A) Producción instantánea (diaria) de CO ₂ . B) Producción acumulada de CO ₂ . El Tratamiento 3 se utilizó como control de crecimiento sin contaminante	31
Figura 2. Remoción de hidrocarburos pesados en medio líquido después del tratamiento con el consorcio microbiano. Se muestra el promedio de los hidrocarburos residuales (remanentes), y de los hidrocarburos removidos (degradados) en el medio.	34
Figura 3. Niveles de expresión del gen <i>benA</i> de <i>Stutzerimonas stutzeri</i> PH5 y <i>Rhodococcus qingshengii</i> PH3D durante la degradación de asfaltenos (A) y petróleo crudo pesado (B) en medio líquido. Range: Fold Change	38
Figura 4. Niveles de expresión del gen <i>catA</i> de <i>Stutzerimonas stutzeri</i> PH5 y <i>Rhodococcus qingshengii</i> PH3D durante la degradación de asfaltenos (A) y petróleo crudo pesado (B) en medio líquido. Range: <i>fold-change</i>	41
Figura 5. Niveles de expresión del gen <i>kdpA</i> de <i>Stutzerimonas stutzeri</i> PH5 y <i>Rhodococcus qingshengii</i> PH3D durante la degradación de asfaltenos (A) y petróleo crudo pesado (B) en medio líquido. Range: <i>fold-change</i>	44
Figura 6. Espectros infrarrojos obtenidos por FTIR-ATR a partir de los asfaltenos antes y después del tratamiento con el consorcio microbiano.	48
Figura 7. Papel de los genes <i>benA</i> y <i>catA</i> en la degradación de intermediarios metabólicos de los asfaltenos. Tomado de Xiang y otros, 2020.....	51

Glosario

Asfalteno: fracción pesada y compleja del petróleo, insoluble en n-heptano, rica en carbono, azufre y metales.

Bacterias: microorganismos unicelulares que pueden degradar contaminantes como los hidrocarburos.

Bioaugmentación: técnica de biorremediación que consiste en añadir microorganismos especializados para acelerar la degradación de contaminantes.

Bioestimulación: estrategia que estimula el crecimiento de microorganismos nativos mediante el suministro de nutrientes o condiciones favorables.

Biorremediación: uso de organismos vivos, como bacterias u hongos, para eliminar o reducir contaminantes del medio ambiente.

Compuestos: sustancias formadas por dos o más elementos químicos unidos en proporciones fijas.

Contaminación: presencia de sustancias nocivas en el ambiente que afectan negativamente a los seres vivos y al equilibrio ecológico.

Contaminante hidrocarburos: sustancias derivadas del petróleo que pueden contaminar suelos y aguas, como gasolina, diésel o aceites.

Crudo pesado: tipo de petróleo con alta densidad y viscosidad, difícil de refinar y con alto contenido de asfaltenos y metales.

Expresión génica: proceso mediante el cual la información de un gen se traduce en un producto funcional, como una proteína.

FTIR (Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier): técnica analítica usada para identificar grupos funcionales en compuestos mediante la absorción de radiación infrarroja.

Genes: segmentos de ADN que contienen la información necesaria para la síntesis de proteínas y funciones celulares.

Oligonucleótidos: cortas cadenas de nucleótidos, utilizadas comúnmente como iniciadores en técnicas de biología molecular como la PCR.

Peso molecular: masa de una molécula expresada en unidades de masa atómica, que influye en sus propiedades físicas y químicas.

Resumen

Título: Evaluación de la Expresión de Genes Involucrados en la Degradación de Hidrocarburos Pesados Utilizando un Consorcio Microbiano*

Autor: Christian Alfonso Arenas Sepulveda**

Palabras Clave: Asfalteno, Biorremediación, Genes

Descripción: La industria petrolera genera impactos ambientales, especialmente en suelo y agua. La biorremediación usando consorcios microbianos es útil para la degradación de contaminantes como los asfaltenos, fracción compleja del petróleo crudo, pero hasta la fecha las rutas metabólicas específicas involucradas en el proceso continúan siendo desconocidas. Este trabajo se desarrolló con el objetivo de evaluar los niveles de expresión de genes involucrados en la degradación de petróleo crudo pesado y asfaltenos en medio líquido utilizando un consorcio microbiano previamente caracterizado. Se utilizó un consorcio bacteriano conformado por *Rhodococcus qingshengii* y *Stutzerimonas stutzeri* para evaluar la biodegradación de crudo pesado y asfaltenos en medio líquido durante 52 días, aplicándoles mediante bioaugmentación en biorreactores con medio M9, midiendo CO₂ como indicador de actividad microbiana, se cuantificaron los hidrocarburos residuales y se analizaron cambios estructurales mediante FTIR. Además, se evaluó la expresión génica de los genes *benA*, *catA* y *kdpA* mediante RT-qPCR. Se registró un crecimiento sostenido del consorcio y producción de CO₂, con adaptaciones metabólicas evidenciadas por la expresión diferencial de los genes *benA*, *catA* y *kdpA*, asociados a la degradación de compuestos aromáticos y a la respuesta al estrés osmótico. La eficiencia de remoción de los hidrocarburos superó el 50%, y el análisis por FTIR-ATR reveló transformaciones químicas en los asfaltenos, indicando oxidación y pérdida de estructuras aromáticas. *Stutzerimonas stutzeri* mostró una expresión temprana de los genes *benA* y *catA*, útil en fases iniciales del proceso, mientras que *Rhodococcus qingshengii* expresó sostenidamente estos genes, adaptándose a compuestos más recalcitrantes en etapas tardías. El gen *kdpA* reflejó estrategias complementarias frente al estrés ambiental. La combinación de ambas cepas resultó eficaz en el proceso de biorremediación, validándose además estudios previos sobre la expresión de genes clave implicados en la mineralización de hidrocarburos pesados.

* Trabajo de Grado

** Facultad de Salud. Escuela de Microbiologías. Maestría en Microbiología. Director: German Alexis Zafra Sierra. Doctor en Ciencias en Biotecnología. Codirector: Wilfredo Valdivieso Quintero. Magister en Ciencias básicas biomédicas

Abstract.

Title: Evaluation of Gene Expression Involved in the Degradation of Heavy Hydrocarbons Using a Microbial Consortium*

Author: Christian Alfonso Arenas Sepulveda**

Keywords: Asphaltene, Bioremediation, Genes

Description: The oil industry generates environmental impacts, especially on soil and water. Bioremediation using microbial consortia is useful for the degradation of contaminants such as asphaltenes, a complex fraction of crude oil, but to date, the specific metabolic pathways involved in the process remain unknown. This work was developed with the objective of evaluating the expression levels of genes involved in the degradation of heavy crude oil and asphaltenes in a liquid medium using a previously characterized microbial consortium. A bacterial consortium consisting of *Rhodococcus qingshengii* and *Stutzerimonas stutzeri* was used to evaluate the biodegradation of heavy crude oil and asphaltenes in a liquid medium for 52 days, applying bioaugmentation in bioreactors with M9 medium, measuring CO₂ as an indicator of microbial activity, quantifying residual hydrocarbons, and analyzing structural changes using FTIR. In addition, gene expression of the *benA*, *catA*, and *kdpA* genes was evaluated by RT-qPCR. Sustained consortium growth and CO₂ production were recorded, with metabolic adaptations evidenced by the differential expression of the *benA*, *catA*, and *kdpA* genes, associated with the degradation of aromatic compounds and the response to osmotic stress. Hydrocarbon removal efficiency exceeded 50%, and FTIR-ATR analysis revealed chemical transformations in asphaltenes, indicating oxidation and loss of aromatic structures. *Stutzeri* showed early expression of the *benA* and *catA* genes, useful in the initial phases of the process, while *Rhodococcus qingshengii* steadily expressed these genes, adapting to more recalcitrant compounds at later stages. The *kdpA* gene reflected complementary strategies to respond to environmental stress. The combination of both strains proved effective in the bioremediation process, also validating previous studies on the expression of key genes involved in the mineralization of heavy hydrocarbons.

*Thesis Project

**Faculty of Health Sciences. School of Microbiology. Master's in Microbiology.

Advisor: Dr German Alexis Zafra Sierra, PhD in Biotechnology

Co-advisor: Wilfredo Valdivieso Quinteor MSc in Biomedical Basic Sciences

Introducción

La industria del petróleo representa no solo un importante eje económico a nivel nacional, sino que infortunadamente ha sido el causante de un impacto ambiental significativo debido a los múltiples accidentes ambientales ocasionados por derrames de petróleo durante su almacenamiento, transporte o refinación. La contaminación por petróleo crudo ha sido una de las principales preocupaciones ambientales durante más de dos décadas a nivel mundial, siendo un constante desafío debido al aumento de los productos derivados del petróleo en todo el mundo (Atagana, 2009). Adicionalmente, las industrias petroleras también se enfrentan a la precipitación de los compuestos de petróleo crudo de mayor peso molecular, como por ejemplo los asfáltenos, debido a que estos son no refinables y tienden a precipitarse durante los procesos de extracción, refinación, transporte y almacenamiento del crudo (Fernández, y otros, 2012). La ocurrencia de derrames de petróleo y sus derivados ha sido variable durante los últimos años en Colombia. Para el año 2016 un total de 201,5 barriles de petróleo fueron derramados en aguas y suelos, para el año 2017 estos derrames disminuyeron a un total de 50,72 barriles, en el año 2018 se produjo un aumento considerable debido a que un total de 710,2 barriles producidos fueron derramados, de los cuales alrededor de 530 barriles pertenecían al incidente ambiental del pozo la Lizama, y finalmente para el año 2019 se produjo una disminución para un total de 141,9 barriles producidos (Ecopetrol, 2019).

Los asfaltenos constituyen la fracción más pesada y polar del petróleo crudo (Gudiña y Teixeira, 2017). La concentración de asfaltenos en los petróleos crudos livianos puede llegar a ser menor al 1%, mientras que, en el petróleo crudo pesado puede superar el 20% del peso total, dificultando

así su producción y manejo (Adebiyi, 2021; Hernández-López, y otros, 2015). La estructura molecular de los asfaltenos se caracteriza por una alta complejidad y se constituye de estructuras aromáticas heterocíclicas, unidas a cadenas alifáticas de hidrocarburos, que poseen además heteroátomos de nitrógeno, azufre y oxígeno, así como metales pesados (Vanadio, Hierro y Níquel) (Tavassoli, y otros, 2012; Uribe-Álvarez, y otros 2011). A pesar de que los asfaltenos son compuestos de muy alto peso molecular y de lo cuáles se desconoce mucha información sobre sus mecanismos de degradación, se ha estudiado la capacidad de algunos microorganismos para degradarlos parcial o totalmente. Por ejemplo, aislados de los géneros *Corynebacterium*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Staphylococcus*, *Garciaella*, *Pestalotiopsis* y *Pseudomonas* pueden usarlos como fuente de carbono y son potenciales degradadores de estos (Song, y otros, 2018). La degradación de asfaltenos es un proceso lento que puede condicionar el éxito de un proceso de biorremediación. Por ejemplo, en un estudio realizado por Song, y otros (2018), el hongo *Neosartorya fisheri* creció durante 11 semanas en un medio con asfaltenos puros como única fuente de carbono y energía, consiguiendo metabolizar un 15.5% del mismo. También se ha reportado la degradación parcial de asfaltenos por parte de consorcios microbianos conformados por *Pseudomonas* spp, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus*, *Bacillus cereus* y *Bacillus firmus* (Tavassoli, y otros, 2012), reafirmando que la degradación de los asfaltenos es un proceso lento y que hasta el momento se desconocen los mecanismos y las rutas metabólicas específicamente implicadas en este proceso.

Teniendo en cuenta lo anterior, existe un vacío en el conocimiento respecto a las rutas metabólicas implicadas en el proceso de biodegradación de las fracciones asfálticas. Por esto se requiere de enfoques y técnicas de laboratorio que permitan obtener más información sobre las rutas o genes expresados durante el proceso de biorremediación. Estudios previos desarrollados en

el grupo de investigación GIBIM de la Universidad Industrial de Santander han mostrado que durante la biodegradación de los asfaltenos probablemente están involucradas algunas rutas metabólicas bacterianas, por ejemplo, el metabolismo del nitrógeno, el metabolismo de los ácidos grasos, el transporte activo de membrana, la motilidad celular y el *quorum sensing*. La sobreexpresión o represión de la expresión de algunos genes pertenecientes a estas rutas metabólicas probablemente juegan un papel clave en el proceso (Parada, 2022). Por lo anterior, en este trabajo se evaluó a escala de laboratorio de un proceso de biodegradación de hidrocarburos pesados utilizando un consorcio bacteriano degradador previamente caracterizado, con el fin de medir los niveles de expresión de genes candidatos que han sido seleccionados con base en trabajos previos por estar involucrados en la degradación de los hidrocarburos pesados. De esta manera se busca relacionar los cambios en la expresión génica con los cambios en la composición molecular de las fracciones de petróleo crudo pesado y asfaltenos a través del tiempo. Por lo anterior se planteó la siguiente pregunta de investigación: ¿Qué relación tienen los cambios en la expresión de genes de un consorcio bacteriano degradador con los cambios en la composición molecular de las fracciones de petróleo crudo pesado y asfaltenos a través del tiempo?

1. Objetivos

1.1 Objetivo general

- Evaluar los niveles de expresión de genes involucrados en la degradación de petróleo crudo pesado y asfaltenos en medio líquido utilizando un consorcio microbiano previamente caracterizado.

1.2 Objetivos Específicos

- Determinar los niveles de expresión de genes involucrados en la degradación de petróleo crudo pesado y asfaltenos en medio líquido.
- Correlacionar las diferencias en los niveles de expresión génica con los cambios en la composición molecular de las fracciones de asfaltenos.

2. Marco conceptual y estado del arte

2.1 Generalidades del petróleo

El petróleo es un líquido viscoso constituido de diferentes tipos de hidrocarburos, principalmente de origen fósil, que se encuentra dentro de las formaciones geológicas de la tierra (Harman, 2013). Es una mezcla de compuestos de hidrocarburos gaseosos, líquidos y sólidos que se encuentran en los depósitos de rocas sedimentarias de todo el mundo y también contiene pequeñas cantidades de compuestos que contienen nitrógeno, oxígeno y azufre, así como pequeñas cantidades de constituyentes metálicos (Speight, 2006). El petróleo está constituido por cuatro fracciones de hidrocarburos: 1) fracción de hidrocarburos alifáticos, lineales, con 18 a 35 átomos de carbono, 2) hidrocarburos aromáticos, compuestos por anillos cíclicos de benceno, naftaleno o fenantreno, 3) las resinas, compuestas por 4 a 87 anillos bencénicos en presencia de algunos heteroátomos, y 4) los asfaltenos, que son compuestos altamente condensados y los de mayor peso molecular y toxicidad (Speight, 2006).

2.2 Fracción asfáltica del petróleo

Los asfaltenos son la fracción de petróleo más pesada, más densa, más polar y activa en la superficie generalmente definida por ser insolubles en alcanos como n-pentano o n-heptano, pero solubles en solventes aromáticos tales como tolueno, benceno o piridina. Las fracciones de asfaltenos están compuestas por azufre, oxígeno, nitrógeno y algunas pequeñas cantidades de metales como son hierro, níquel y vanadio, anillos aromáticos, estructuras acíclicas y heterocíclicas, que se unen a los hidrocarburos (Pourfakhrael, otros, 2018). Tienen una composición de entre 100 a 300 átomos de carbono, con estructuras aromáticas y alifáticas con enlaces covalentes con azufre, nitrógeno, oxígeno formando estructuras heterocíclicas (Song, y

otros, 2018). Los asfaltenos constituyen la fracción más pesada y polar del petróleo crudo (Gudiña y Teixeira, 2017). La concentración de asfaltenos en los petróleos crudos livianos puede llegar a ser menor al 1%, mientras que, en el petróleo crudo pesado puede superar el 20% del peso total, dificultando así su producción y manejo (Adebisi, 2021; Hernández-López, y otros, 2015). El peso molecular de los asfaltenos ha sido un tema debatido durante más de dos décadas, pero se ha resuelto esencialmente ya que múltiples técnicas han encontrado consistentemente que el peso molecular de los asfaltenos es inferior a 1 kDa (McKenna, 2009; Hernández-Lopez y otros 20115). como consecuencia de su alto peso molecular, se genera una resistencia para la biodegradación biológica ya que los microorganismos tienden a ser incapaces de internalizarlo, o incluso de tolerarlo.

2.3 Biorremediación de matrices impactadas con hidrocarburos

La biorremediación se define como el proceso mediante el cual los microorganismos presentes en un determinado sitio inducen la degradación de un contaminante, mediante técnicas aplicadas *in situ* o *ex situ* tales como la bioaumentación y la bioestimulación. La eficiencia de la biodegradación depende de las características del hábitat, del contaminante y de los microorganismos; por tanto, es de gran importancia tener en cuenta cada uno de estos factores a la hora de diseñar y aplicar la estrategia (Atlas, 1995). La biorremediación es una técnica que ha sido utilizada durante décadas para tratar la contaminación por hidrocarburos en ecosistemas terrestres y acuáticos (Varjani, 2017).

La bioaumentación es la adición de microorganismos a una matriz contaminada, y es aplicada frecuentemente en procesos de remediación *in situ* (Sardrood, y otros, 2013). Las opciones más utilizadas para la bioaumentación son la adición de una cepa bacteriana pura y

tolerante al contaminante, o la adición de un consorcio microbiano degradador previamente adaptado. La selección de los microorganismos debe basarse en el potencial metabólico de estos y en sus características fisiológicas, las cuales permitirán su viabilidad bajo las condiciones ambientales a las que serán sometidos (Tyagi, y otros, 2011). Por otro parte, la bioestimulación hace referencia a la estimulación de las poblaciones microbianas nativas del suelo o del agua que se encuentre contaminada. Esta técnica puede aplicarse durante procesos de bioremediación *in situ* o *ex situ* (Sardrood, y otros, 2013). Una matriz contaminada con hidrocarburos usualmente presenta un exceso de carbono, mientras que elementos como nitrógeno y fósforo se encuentran en bajas concentraciones para mantener un balance de nutrientes (C:N:P), lo que limita el proceso de biodegradación (García, y otros, 2011). Por ello, la bioestimulación adiciona nutrientes limitantes u oxígeno al suelo con el fin de mejorar la tasa de biodegradación de los contaminantes en el sitio afectado (Tyagi, y otros, 2011).

2.4 Degradación microbiana de hidrocarburos de alto peso molecular

Los hidrocarburos del petróleo pueden ser degradados mediante diferentes mecanismos, tales como la oxidación terminal, oxidación sub-terminal, β - oxidación y ω -oxidación (Varjani, 2017). Sin embargo, las rutas metabólicas para la degradación de cada una de las fracciones del petróleo varían entre sí debido a sus diferencias estructurales (Xue, y otros, 2015). En este orden de ideas, la biodegradabilidad de los hidrocarburos del petróleo disminuye de la siguiente forma: n-alcanos > alcanos ramificados > alquenos ramificados > aromáticos de bajo peso molecular > monoaromáticos > alcanos cíclicos > hidrocarburos aromáticos policíclicos >> asfaltenos (Tyagi, y otros, 2011). La biodegradación, como proceso natural, puede darse de forma lenta dependiendo

de las características fisicoquímicas del petróleo, es decir, el petróleo crudo liviano se biodegrada más rápido de que los crudos pesados (Varjani, 2017a).

Durante el proceso de biodegradación, los microorganismos utilizan los hidrocarburos del petróleo como fuente de carbono y energía y, por lo tanto, es un proceso energéticamente favorable (Varjani, 2017a). Más de 100 géneros bacterianos han sido descritos en la literatura por su capacidad de degradar hidrocarburos del petróleo, de los cuales se destacan *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alkanindiges*, *Alteromonas*, *Arthrobacter*, *Burkholderia*, *Dietzia*, *Enterobacter*, *Kocuria*, *Marinobacter*, *Mycobacterium*, *Pandoraea*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Streptobacillus*, *Streptococcus*, y *Rhodococcus*, entre otros (Xue, y otros, 2018). Una gran diversidad de especies bacterianas y fúngicas han sido evaluadas por poseer el potencial metabólico necesario para la degradación de compuestos recalcitrantes y de alto peso molecular derivados del petróleo (Tyagi, y otros, 2011). Por ejemplo, *Acinetobacter* sp. degrada los n-alcános de cadena larga (C13–C44) debido a que produce de una monooxigenasa AlmA que se une a la flavina y promueve la degradación bajo condiciones aerobias. Además, especies de *Pseudomonas*, *Rhodococcus* y *Mycobacterium* tienen la capacidad de degradar varios compuestos orgánicos de alto peso molecular al producir múltiples enzimas monooxigenasas y dioxigenasas que desempeñan un papel clave en la oxidación de hidrocarburos.

Durante la biodegradación de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), enzimas tales como las dioxigenasas, lacasas y peroxidasas son de gran importancia para la ruptura de los anillos aromáticos presentes en compleja estructura (Timmis, 2010; Zafra, y otros, 2015). Sin embargo, a pesar de que se han documentado gran cantidad de estudios con información de las

rutas metabólicas de hidrocarburos saturados y aromáticos, existe poca información sobre los mecanismos metabólicos específicos que llevan a la biodegradación de los asfaltenos (Nzila y Musa, 2021). Aunque diferentes estudios han corroborado la capacidad de las bacterias para degradar diferentes hidrocarburos, los cultivos bacterianos puros se limitan a degradar una gama estrecha de hidrocarburos, mientras que los consorcios microbianos pueden regular condiciones ambientales complejas y ofrecer múltiples enzimas para degradar mezclas de hidrocarburos complejos, lo que indica que, cuando se trata de la biorremediación de contaminación por petróleo los consorcios microbianos brindan un enfoque más efectivo. El uso de consorcios microbianos en la biodegradación de hidrocarburos pesados ha demostrado ser una estrategia eficaz y sostenible para la recuperación de suelos contaminados. Estos consorcios, formados por comunidades de bacterias, hongos y otros microorganismos, trabajan de manera sinérgica para degradar compuestos complejos como los PHAs presentes en el petróleo y sus derivados (Benavides, 2011). A diferencia de las cepas individuales, los consorcios microbianos pueden abordar una amplia gama de contaminantes gracias a la complementariedad de sus rutas metabólicas. Por ejemplo, un estudio realizado en Hyderabad, India, identificó la cepa *Rhodococcus indonesiensis* SARSH11, capaz de degradar hasta el 90% de hidrocarburos en suelos contaminados, además de producir biosurfactantes que aumentan la biodisponibilidad de los contaminantes para otros microorganismos. (Zaman y otros, 2025).

La construcción de consorcios microbianos puede realizarse mediante enfoques “bottom-up”, seleccionando cepas con funciones metabólicas complementarias, o “top-down”, enriqueciendo comunidades microbianas nativas adaptadas a condiciones específicas. Estos consorcios ofrecen ventajas como mayor estabilidad frente a fluctuaciones ambientales y una degradación más eficiente de contaminantes complejos. (Calderón-Pazos, y otros, 2023) (Cao y

otros, 2022). En América Latina, la biorremediación mediante consorcios microbianos se presenta como una solución viable tanto económica como ambientalmente, especialmente en regiones con alta contaminación por actividades petroleras. (Lladó, 2012).

2.5 Estudios de expresión génica

La expresión génica es un proceso mediante el cual la información de un gen es aprovechada para la síntesis de un producto funcional. Estrictamente el término abarca desde la activación del gen hasta que la proteína madura se localiza en el lugar adecuado y realiza su función (Hernández, y otros, 1994); en otros casos, tales como los genes no codificantes de proteínas, el producto génico es un ARN funcional (ARNm, ARNr o ARNt). En todos los organismos vivos las células regulan sus actividades activando o desactivando la expresión de sus genes y esta expresión es generalmente proporcional al número de copias de ARN mensajero de un gen determinado. Este hecho es crucial si se trata de identificar la presencia de productos celulares específicos ya que el ARNm es traducido en los ribosomas para formar proteínas. Por lo tanto, es posible obtener datos relativos a la producción de elementos biológicos si la expresión de los genes de una célula se conoce (McPherson, y otros, 1991).

Los métodos de estudio de la expresión génica se basan en su capacidad para detectar ARNm específicos, y durante mucho tiempo el *Northern blot* fue la técnica más utilizada para detectar moléculas de ARN. Actualmente se utilizan técnicas mucho más precisas para el estudio de la expresión génica, tales como la RT-qPCR o la secuenciación masiva. Las estrategias basadas en la secuenciación masiva proporcionan enormes cantidades de datos y son muy útiles para estudios de transcriptómica comparada, mientras que la RT-qPCR es más específica y adecuada

para el estudio de genes concretos (Andres, 2011). El método de RT-qPCR consiste en una extracción del ARN, seguida de la síntesis de una cadena de ADNc a partir del ARNm utilizando una transcriptasa inversa y de una PCR en la que el producto amplificado puede detectarse en tiempo real dado que la señal de fluorescencia es proporcional a la cantidad de ADNc producida en cada ciclo. La importancia de analizar y caracterizar los transcritos asociados con los procesos de biorremediación radica en la gran cantidad de información que puede proporcionar sobre los procesos microbianos implicados, lo cual puede proporcionar una mejor comprensión sobre aquellos mecanismos metabólicos relacionados, como el planteado en el presente trabajo de investigación.

2.6 Estado del arte

Diferentes autores han realizado aproximaciones teóricas sobre los posibles mecanismos de biodegradación de los asfaltenos con base en la estructura química que poseen y extrapolando algunos de los procesos de degradación de hidrocarburos de alto peso molecular ya conocidos. Algunos estudios indican que para aumentar la biodegradación de asfaltenos se deben utilizar distintos procedimientos, tales como la aplicación de solventes polares o fotooxidación, generando una fragmentación inicial de la estructura del asfalteno (Pineda-Flores y Mesta-Howard, 2001). La biotransformación de los PAHs parece estar relacionada con las rutas metabólicas de degradación de asfaltenos (Hernández-López, y otros, 2015). Por otra parte, la combinación de eventos como la fragmentación, adición de sustratos cometabólicos (alcanos, propano, succinato) y consorcios microbianos adaptados al petróleo como única fuente de carbono y energía, brinda la posibilidad que las estructuras sean susceptibles a la degradación (Pineda-Flores y Mesta-Howard, 2001).

Queda claro que el uso de mezclas de microorganismos para la biodegradación de las fracciones más pesadas del petróleo es benéfico debido a la acción sinérgica y complementaria de sus metabolismos individuales, lo que permitiría degradar moléculas altamente complejas en pasos sucesivos. Diferentes estudios han reportado el uso de estas mezclas para la degradación parcial o total de los asfaltenos. Por ejemplo, en 2010 se reportó que la bioaugmentación con microorganismos tales como *Aspergillus terreus* y *Paecilomyces* spp. mejoró la remoción de hidrocarburos aromáticos y asfálticos en suelos durante 31 días de tratamiento, partiendo de valores iniciales cercanos a 35.000 mg kg⁻¹, los hidrocarburos aromáticos disminuyeron a 20.000 mg kg⁻¹ y los asfaltenos disminuyeron de 20.000 mg kg⁻¹ a cerca de 11.000 mg kg⁻¹ (Dussan, y otros, 2010). En el 2012, *Garciaella petrolearia* fue reportada como la responsable de la reducción de la viscosidad al fragmentar el asfalto en fracciones más pequeñas (Lavania, y otros, 2012); ese mismo año se identificaron microorganismos tales como *Pseudomonas* spp, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus*, *Bacillus cereus* y *Bacillus firmus* capaces de degradar los asfaltenos en porcentajes superiores al 40%, tanto de forma individual como en consorcio (Travassoli, y otros, 2012). Para el 2014 fueron reportadas algunas bacterias con capacidad de usar los asfaltenos como única fuente de carbono, tales como *Corynebacterium* sp., *Bacillus* sp., *Brevibacillus* sp., *Staphylococcus* sp., *Pestalotiopsis* sp., y *Pseudomonas* sp. (Yanto y Tachibana, 2014). En 2018 se encontró que mezclas de aislados de *Parvibaculum* sp., *Alcanivorax* sp., *Hyphomonas* sp., *Flavobacterium* sp. y *Reyranella* tenían la capacidad de degradar asfaltenos en agua contaminada (Song, y otros, 2018). Por otra parte, y como antecedentes directos del grupo de investigación GIBIM de la Universidad Industrial de Santander, se demostró la capacidad de un consorcio microbiano de constituido por *Rhodococcus corynebacterioides* 18S, *Paenibacillus cellulositrophicus* 21S, *Corynebacterium cellulans* AB3, *Rhodococcus gingshengii* PH3D y *Stutzerimonas stutzeri* PH5

para la biorremediación de suelos impactados con petróleo crudo pesado y extrapesado debido a su elevada tolerancia y capacidad para mineralizar asfaltenos directamente en suelos (Navas-Cáceres, y otros, 2023). Así mismo, el desarrollo de estudios con enfoques “ómicos” dentro del grupo de investigación GIBIM ha permitido un acercamiento para mejorar la comprensión sobre los mecanismos moleculares implicados en la biodegradación de asfaltenos. Hallazgos recientes utilizando un abordaje metatranscriptómico sugieren que el crecimiento del mismo consorcio bacteriano en presencia de asfaltenos como única fuente de carbono produce cambios significativos en la expresión de genes relacionados principalmente con el metabolismo de carbohidratos, nitrógeno y lípidos, además de que algunos genes involucrados en los mecanismos de quimiotaxis, motilidad celular y transporte de membrana presentan una expresión significativamente mayor en presencia de asfaltenos (Parada, 2022).

3. Metodología

3.1 Consorcio bacteriano degradador de hidrocarburos pesados

Para el desarrollo del presente trabajo se utilizó un consorcio bacteriano degradador de petróleo crudo pesado y asfaltenos, previamente aislado y caracterizado en el grupo de investigación GIBIM. El consorcio se encuentra conformado por los aislados bacterianos *Rhodococcus gingshengii* PH3D y *Stutzerimonas stutzeri* PH5. Estos aislados se caracterizan por tolerar hasta 60,000 mg kg⁻¹ de asfaltenos y usarlos como única fuente de carbono (Navas-Cáceres, y otros, 2023). Los microorganismos se cultivaron y mantuvieron en medio MBS (g/L: 0.3 g de NaCl; 0.6 g de (NH₄)₂SO₄; 0.75 g de K₂HPO₄; 0.25 g de KH₂PO₄; 0.15 g de MgSO₄·7H₂O; 0.6 g de KNO₃; 0.125 g de extracto de levadura; 15 gr de agar) suplementado con asfaltenos a una

concentración final de 0.2% (p/v). Los microorganismos se encuentran depositados en la colección biológica LMMA-UIS, de la Universidad Industrial de Santander.

3.2 Pruebas de biodegradación de hidrocarburos pesados

Se llevaron a cabo ensayos de biodegradación de petróleo crudo pesado y asfaltenos en medio líquido mediante el uso de biorreactores a escala de laboratorio. El proceso involucró la estrategia de bioaumentación, mediante la inoculación del consorcio bacteriano degradador descrito previamente. Para la realización de los ensayos se utilizó un medio líquido M9 (Na_2HPO_4 12,8 g/L, KH_2PO_4 3 g/L, NaCl 0,5 g/L, NH_4Cl 1g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dihidratado, $\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y extracto de levadura 125 mg/L) contaminado con petróleo crudo pesado o con asfaltenos. Los sistemas de cultivo consistieron en biorreactores de vidrio de 100 ml, conteniendo 49.5 mL de medio de cultivo líquido M9, los cuales fueron contaminados con 50 mg de petróleo crudo pesado Lizama con gravedad API de aproximadamente 17.8 (saturados: 38%, aromáticos: 20%, resinas: 21%, asfaltenos: 11%) y una muestra de asfaltenos puros extraídos por precipitación con n-heptano a partir del petróleo crudo pesado Castilla (C: 84 %, H: 8 %, N: 1.5 %, S: 4.5 %, O: 1.5 %, H/C: 1.14, Ni: 406 ppm, Va: 1,601 ppm, PM: 2,000 daltons), para alcanzar una concentración final de $1,000 \text{ mg L}^{-1}$. Cada sistema se inoculó con 2×10^7 UFC de cada aislado del consorcio y se selló herméticamente con septas de caucho que permitieron tomar muestras de gas mediante un sistema de agujas estériles. Los sistemas se incubaron a 30°C durante 52 días, con agitación constante a 150 rpm, aplicando aireación con aire estéril cada 48 horas durante 10 minutos. La tabla 1 resume las condiciones y tratamientos utilizados durante los ensayos de biodegradación. Se utilizaron controles de degradación abiótica para asegurar que la degradación

de los asfaltenos estuviera causada por la biodegradación, así como para compensar las pérdidas de adsorción. Todos los ensayos se llevaron a cabo por triplicado.

Tabla 1

Ensayos de biodegradación de hidrocarburos pesados en medio líquido

Tratamientos	Descripción	Composición del medio
1 (M9+Asf+BioA)	Bioaumentación del medio con el consorcio microbiano	Medio M9, contaminado con 1,000 mg L ⁻¹ de asfaltenos
2 (M9+Cdo+BioA)	Bioaumentación del medio con el consorcio microbiano	Medio M9, contaminado con 1,000 mg L ⁻¹ de petróleo crudo pesado
3 (M9-BioA)	Bioaumentación del medio con el consorcio microbiano (control de crecimiento)	Medio M9 sin hidrocarburos
4 (M9+Asf+BioA)	Medio no inoculado (control de degradación abiótica)	Medio M9, contaminado con 1,000 mg L ⁻¹ de asfaltenos
5 (M9+Cdo+BioA)	Medio no inoculado (control de degradación abiótica)	Medio M9, contaminado con 1,000 mg L ⁻¹ de petróleo crudo pesado

3.3 Medición de la actividad microbiana durante la biodegradación

La actividad microbiana durante los ensayos de biodegradación fue estimada mediante la cuantificación de la producción de CO₂ cada 48 horas para cada uno de los tratamientos. Para esto, se construyó un sistema de aireación constituido por una bomba de aire al vacío, acoplada a una trampa de KOH encargada de capturar el CO₂ atmosférico, una trampa de agua destilada estéril y filtros de 0,22 μm para mantener la esterilidad del sistema. El CO₂ liberado durante la respiración aeróbica fue cuantificado directamente mediante un detector de CO₂ AZ 7752 (AZ Instruments Corp.), equipado con un sensor infrarojo no dispersivo, y sus resultados se expresaron en mg L⁻¹ de CO₂.

3.4 Extracción y cuantificación de hidrocarburos pesados

La extracción del petróleo crudo pesado y los asfaltenos se llevó a cabo mediante el método de agitación-centrifugación, el cual se basa en la extracción de hidrocarburos no volátiles del petróleo a partir de muestras sólidas mediante solventes y agitación (Fernández Linares, y otros, 2006). Para llevar a cabo dicho proceso, al contenido total de cada uno de los reactores (50 ml) se adicionó 1 g de Na_2SO_4 anhidro, y posteriormente se adicionó 15 ml del solvente extractor (tolueno y metanol en relación 2:1 v/v). Se agitó vigorosamente en vortex durante 1 min y se centrifugó por 10.000 rpm durante 10 minutos. La fase orgánica, conteniendo los hidrocarburos residuales, se almacenó en frascos de vidrio para su posterior cuantificación. El proceso de cuantificación de la biodegradación de hidrocarburos se llevó a cabo por un método gravimétrico (Fernández Linares, y otros, 2006). Dicho método se fundamentó en la evaporación del solvente extractor conteniendo los hidrocarburos residuales después del proceso de biodegradación. El método consistió en pesar el recipiente vacío, previo a la adición del solvente con el extracto orgánico, para ser llevado a peso constante. Una vez pesado el recipiente vacío, se añadió el solvente con el extracto orgánico y se dejó evaporar totalmente a 45°C hasta sequedad. El recipiente se pesó nuevamente, y la diferencia de peso correspondió al contenido total de hidrocarburos residuales asfaltenos en la muestra, y expresada en % de remoción, de acuerdo con el método estándar ASTM D6560 (ASTM, 2022).

Los cambios en la estructura química de los asfaltenos después del proceso de biodegradación fueron evaluados mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier con Reflectancia Total Atenuada (FTIR-ATR). Para ello se analizaron muestras del asfalteno original, así como de los asfaltenos residuales una vez transcurridos de los 52 días de degradación. La adquisición de los espectros se realizó en un espectrómetro Nicolet™ iS50 FTIR (Thermo-

Scientific), con un rango de adquisición de 4000-400 cm^{-1} . Estos análisis fueron llevados a cabo por el laboratorio de espectroscopía de la UIS. El análisis de espectro FTIR-ATR y la identificación de los grupos funcionales se basó en la comparación con la base de datos OMNIC, y la identificación de los compuestos mediante comparación con la base de datos IR-Sadtler Polymers, Hummel-Wiley (WILEY).

3.5 Diseño y evaluación de iniciadores para RT-qPCR

Se diseñaron oligonucleótidos específicos que sirvieran como iniciadores para la amplificación de los transcritos de los genes, *benA* (benzoato-1,2-dioxigenasa), *catA* (catecol-1,2-dioxigenasa), y *kdpA* (subunidad A de ATPasa transportadora de K^+) tanto de *S. stutzeri* como de *R. qingshengii*, los cuales habían sido identificados previamente como posibles moduladores del proceso de degradación de asfaltenos (Parada, 2022). Se usaron secuencias de ADN reportadas en la base de datos del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) con las cuales se realizaron alineamientos múltiples para identificar regiones conservadas dentro de los genes, y estas se utilizaron con el programa Primer3 Plus (Untergasser, y otros, 2012) y OligoCalc (Kibbe, 2007). Para el diseño de los oligonucleótidos se tuvo en cuenta un tamaño no mayor a 24 nucleótidos, una T_m de 60°C y un gancho tipo GC en el extremo 3'. Se buscó que los productos de amplificación no fueran mayores de 200 pb para facilitar la evaluación de la expresión génica. Se evaluó la formación de homodímeros y heterodímeros utilizando el programa Multiple Primer Analyzer (Thermo Fisher). Los oligonucleótidos fueron evaluados utilizando ADN genómico de cada uno de los microorganismos utilizados en el consorcio para identificar la capacidad de unión de los iniciadores y la especificidad de la amplificación por secuenciación de los productos de PCR.

3.6 Extracción de ARN total a partir del medio líquido

Para la extracción y purificación de ARN total bacteriano se utilizó el protocolo de extracción con Trizol. La extracción se realizó en 4 momentos del proceso de biodegradación: día 0, día 15 (semana 2), día 30 (semana 4) y día 52 (semana 7). En un vial de 1.5 ml, se tomaron 500 μ l de cada uno de los reactores, se agregó 700 μ l de Trizol LS Reagent, y se agitó de manera continua en un vortex entre 15 y 30 minutos para facilitar la lisis celular. Luego se añadieron 200 μ l de cloroformo y se agitó la mezcla durante 30 segundos para inducir la separación de fases, incubando la mezcla a 30°C por 15 minutos y centrifugándola después a 13500 rpm por 20 minutos a 4°C. Esto produjo una fase inferior roja, una intermedia blanca y una fase acuosa superior que contenía el ARN, la cual fue transferida cuidadosamente a un nuevo tubo sin extraer residuos de las fases intermedia o inferior. Posteriormente, se añadieron 350 μ l de isopropanol al 100% por cada 700 μ L de Trizol y se mezcla mediante inversión, observando la formación de una malla. La muestra se incubó por 10 minutos a 30°C y se centrifugó a 14000g por 10 minutos a 4°C; tras retirar el sobrenadante, se añadió 700 μ L de etanol al 75% por cada 700 μ L de Trizol, agitando la mezcla en vortex por 15 segundos y centrifugándola por 5 minutos a 7500g a 4°C, retirando nuevamente el sobrenadante sin eliminar el pellet. Este proceso de lavado se repitió dos veces más para asegurar la pureza del ARN. Finalmente, se dejó evaporar el etanol residual, se resuspendió el pellet en agua libre de nucleasas, y se realizó la cuantificación del ARN en un nanofotómetro IMPLEN NP80.

3.7 Cuantificación de la expresión de genes mediante RT-qPCR

Los ensayos de expresión génica se llevaron a cabo utilizando un equipo de qPCR CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (BIO-RAD), usando el Kit iTaq Universal SYBR Green

One-Step Ref. 1725151 (BIO-RAD). Para los ensayos de RT-qPCR se definieron parámetros tales como el número de ciclos (40), tiempo y temperatura para la reacción de la transcriptasa (50°C por 10 minutos), desnaturalización (95°C por 1 minuto) y *annealing* (60°C por 30 segundos) para cada una de las reacciones. Se estimó la eficiencia de la amplificación utilizando diluciones seriadas del ARN molde. Para cada par de oligonucleótidos se estimó la temperatura de disociación para identificar posibles amplificaciones inespecíficas. Para realizar la estimación del cambio en la expresión génica se utilizó el abordaje basado en expresión relativa utilizando el algoritmo $2^{-\Delta\Delta C_t}$, para lo cual previamente se realizó el análisis de la estabilidad de genes normalizadores bajo las condiciones experimentales. Se seleccionó el gen con menor variabilidad entre grupos y tratamientos para establecer la normalización de la expresión del sistema. Los resultados se expresaron como el cambio en la expresión de los genes en número de veces con respecto al gen normalizador (*fold-change*; FC) y se estableció la significancia estadística de las posibles diferencias encontradas en la expresión de los genes y grupos de tratamiento utilizando el programa CFX Maestro Software (BIO-RAD).

3.8 Análisis Estadístico

Con el fin de determinar diferencias significativas en la producción de CO₂ y en los niveles de expresión génica asociados al proceso de degradación de hidrocarburos pesados (crudo y asfaltenos), se aplicó un Análisis de Varianza de una vía (ANOVA) para comparar los promedios obtenidos entre los diferentes tratamientos bacterianos y tiempos de evaluación. Al encontrarse diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en alguno de los factores analizados, se aplicó la prueba post hoc de Tukey HSD (Honestly Significant Difference), que permite realizar

comparaciones múltiples entre pares de medias, identificando con precisión qué tratamientos presentaron diferencias significativas entre sí, sin incrementar el riesgo de error tipo I.

4. Resultados y discusión

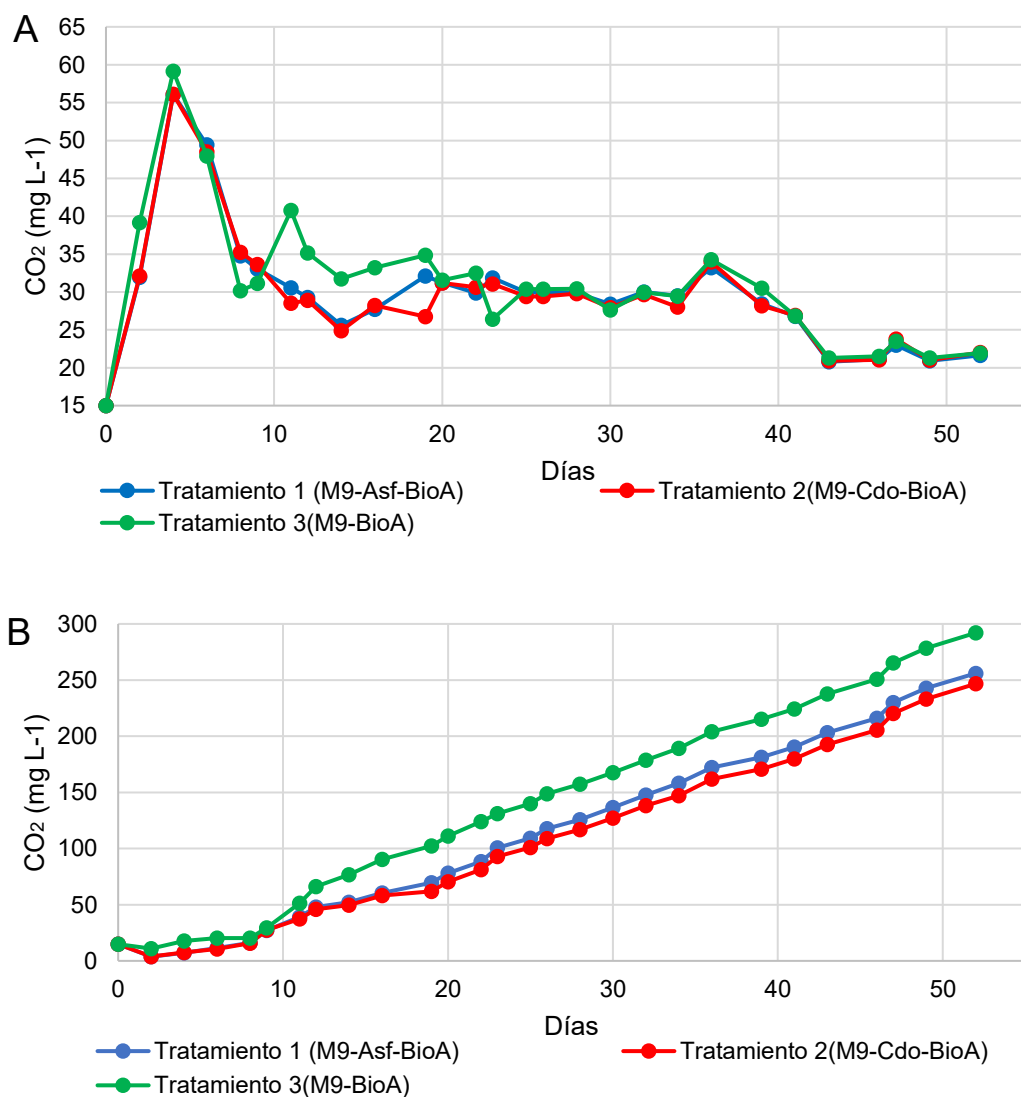
4.1 Crecimiento y actividad del consorcio bacteriano durante la degradación de hidrocarburos pesados en medio líquido

Todos los reactores inoculados con el consorcio microbiano mostraron una producción constante de CO₂ hasta el día 52, sin importar el contenido del medio de cultivo (Figura 1). Desde el inicio del proceso y hasta el día 2 se observó una fase corta de latencia en la que la producción de CO₂ fue significativamente más baja en los medios que contenían asfalteno (tratamiento 1) o crudo pesado (tratamiento 2) que en el control sin hidrocarburos (tratamiento 3), lo que sugiere una etapa de adaptación fisiológica y metabólica de las bacterias a las condiciones del medio con hidrocarburos pesados. Este patrón de crecimiento es característico en procesos de biodegradación de compuestos recalcitrantes, tales como los hidrocarburos pesados, donde las bacterias requieren tiempo para inducir la expresión de genes degradativos y generar enzimas especializadas, y puede estar relacionado con la inducción y activación de rutas metabólicas específicas necesarias para la degradación de hidrocarburos complejos como los asfaltenos y el crudo. Este comportamiento también es consistente con estudios en los que bacterias del género *Rhodococcus* requieren un tiempo inicial para ajustar su maquinaria metabólica y expresar enzimas especializadas para la degradación de hidrocarburos (Petrushin, y otros 2021). La producción de CO₂ aumentó progresivamente hasta alcanzar un máximo en el día 4, indicando una fase logarítmica de

crecimiento activa, y su producción máxima se obtuvo entre los días 4 y 6 del proceso de biodegradación, para todos los tratamientos.

Figura 1.

Producción de CO₂ durante la degradación de crudo pesado y asfaltenos en medio líquido durante 52 días. A) Producción instantánea (diaria) de CO₂. B) Producción acumulada de CO₂. El Tratamiento 3 se utilizó como control de crecimiento sin contaminante.



Particularmente, el control de crecimiento sin hidrocarburos (tratamiento 3) alcanzó el mayor valor de CO₂ durante esta fase (60 mg L⁻¹), indicando una alta actividad metabólica de las bacterias debido a la utilización del extracto de levadura presente en el medio M9 como fuente de carbono y energía, mientras que los medios que contenían asfaltenos (tratamiento 1) y petróleo crudo pesado (tratamiento y 2) mostraron niveles de CO₂ comparables, pero ligeramente inferiores (figura 1A), indicando que aunque la presencia de los hidrocarburos pesados influye negativamente en el crecimiento de las bacterias, en este punto existe una mineralización eficiente de los compuestos orgánicos presentes en el medio. Estudios como el de Martínez-Cano, y otros, (2019) enfatizan el papel del extracto de levadura como adyuvante en la biodegradación, ya que aporta micronutrientes esenciales para la síntesis de enzimas degradativas. Esto se reflejó en el control de crecimiento sin hidrocarburos, que mostró la mayor producción de CO₂ en este estudio debido al metabolismo basal de las bacterias en ausencia de hidrocarburos complejos (Martínez-Cano, y otros, 2019).

En general, después del día 6 se presentó una disminución marcada en la producción de CO₂, indicando que los compuestos más biodegradables del medio se han agotado, y la mayor acumulación de CO₂ se detectó en el tratamiento 3 (control de crecimiento sin hidrocarburos) (280 mg L⁻¹) al día 30), que es consistente con la ausencia de hidrocarburos complejos en el medio que permite a las bacterias utilizar de manera eficiente los compuestos más accesibles del medio M9. Desde el día 20 hasta el 39, la producción de CO₂ se mantuvo relativamente constante y no tuvo diferencias entre los tratamientos, y desde el día 41 se produjo un descenso en la producción de CO₂ hasta los niveles más bajos durante el proceso (aproximadamente 21 mg L⁻¹). Al analizar la producción acumulada de CO₂, se pudo observar un comportamiento consistente con la producción

diaria, en donde el tratamiento 3 (sin hidrocarburos) acumuló la mayor cantidad de CO₂ (292.05 mg L⁻¹ en 52 días), seguido del tratamiento 1 (medio con asfaltenos) (256 mg L⁻¹ en 52 días) y por el tratamiento 3 (medio con crudo pesado) (246.7 mg L⁻¹ en 52 días). Las diferencias no fueron significativas entre los tratamientos con hidrocarburos pesados, lo cual indica una adaptación similar del consorcio tanto al asfalteno como al petróleo crudo pesado. Estudios previos han reportado comportamientos similares en consorcios bacterianos adaptados a ambientes contaminados con petróleo, como por ejemplo el consorcio conformado por *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y *Bacillus*, que exhibieron fases de crecimiento retardadas seguidas de una aceleración una vez inducidos los sistemas catabólicos necesarios (Das y Chandran, 2011). En conjunto, los resultados mostraron un crecimiento sostenido durante 52 días por parte de *R. qingshengii* PH3D y *S. stutzeri* PH5, así como una producción de CO₂ consistente con la mineralización de los hidrocarburos pesados en el medio líquido.

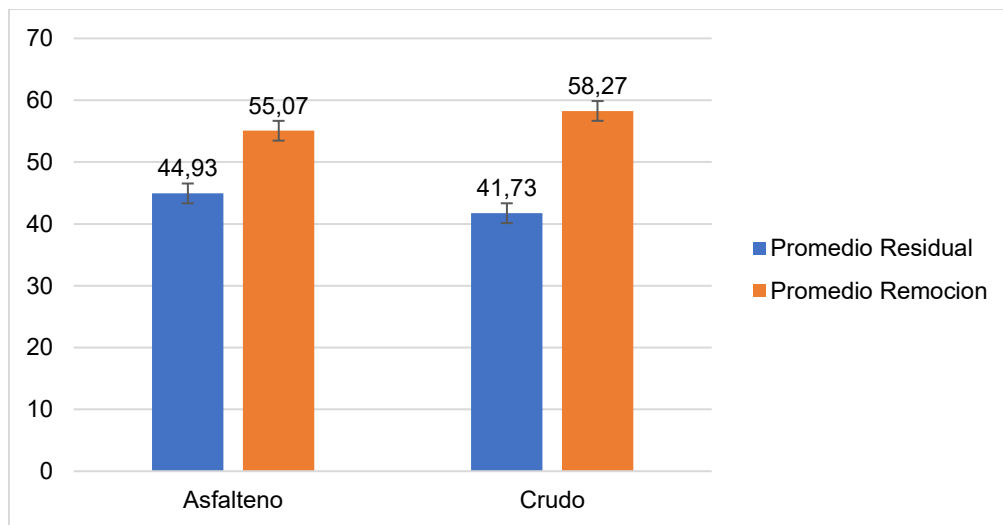
4.2 Degradación de hidrocarburos pesados por el consorcio bacteriano en medio líquido

La biodegradación de hidrocarburos pesados, tales como los asfaltenos y el crudo pesado, representa un desafío importante en la biorremediación de matrices ambientales debido a su complejidad estructural y baja biodisponibilidad. Los resultados de los ensayos de biodegradación mostraron porcentajes de remoción superiores al 50% para los dos hidrocarburos pesados (figura 2), lo que resalta la alta eficiencia del consorcio microbiano en el proceso de degradación. Específicamente, los porcentajes de remoción de asfaltenos oscilaron entre el 43% y 62% (promedio de 55%), mientras que para el crudo pesado los valores estuvieron entre 57% y 63% (promedio de 58,3%). *S. stutzeri* ha sido ampliamente documentada por su habilidad para producir biosurfactantes y aumentar la biodisponibilidad de hidrocarburos aromáticos y alifáticos. Estos

compuestos tensioactivos reducen la tensión superficial entre el contaminante y el medio acuoso, facilitando la solubilización de los hidrocarburos y permitiendo su acceso a los sistemas enzimáticos de degradación microbiana (Solyanikova, y otros, 2022).

Figura 2.

Remoción de hidrocarburos pesados en medio líquido después del tratamiento con el consorcio microbiano. Se muestra el promedio de los hidrocarburos residuales (remanentes), y de los hidrocarburos removidos (degradados) en el medio.



Por otro lado, *R. qingshengii* posee una robusta maquinaria enzimática para la degradación de compuestos de alto peso molecular, tales como los presentes en el petróleo crudo y los asfaltenos. Según Inminova y otros (2022), esta especie expresa enzimas tales como monooxigenasas y dioxigenasas que catalizan la apertura de anillos aromáticos y la transformación de compuestos complejos en metabolitos más simples. Recientemente, se resaltaron genes

relacionados con la degradación de hidrocarburos en esta bacteria, incluyendo al de la catecol-2,3-dioxigenasa (*catA*), que desempeñan un papel clave en la degradación de compuestos aromáticos (Petrushin, y otros, 2021). Además, Osorio-Acero, y otros, (2023) observaron un incremento en la abundancia relativa de *catA* durante la degradación de asfaltenos por parte de *R. qingshengii* en diferentes sistemas experimentales. Los resultados de degradación encontrados en este estudio están de acuerdo con lo reportado por Navas-Cáceres, y otros, (2023), quienes observaron una remoción de hasta el 83% de asfaltenos en suelos contaminados utilizando un consorcio bacteriano que incluía las cepas PH5 y PH3D, pero también algunas otras bacterias degradadoras. La eficiencia observada podría atribuirse a la sinergia metabólica entre ambas especies bacterianas. Esto reafirma que la introducción de consorcios especializados mejora la velocidad y el grado de mineralización de contaminantes recalcitrantes en matrices ambientales complejas. En conjunto, los datos respaldan la hipótesis de que la combinación de *S. stutzeri* PH5 y *R. qingshengii* PH3D constituye una estrategia eficaz para la remediación de sitios contaminados por hidrocarburos pesados. Su empleo puede representar una alternativa ecológica y económicamente viable frente a métodos fisicoquímicos tradicionales, especialmente en ecosistemas vulnerables o de difícil acceso.

4.3 Evaluación de la expresión de genes involucrados en la degradación de hidrocarburos pesados

Estudios previos desarrollados por el grupo de investigación GIBIM permitieron aislar y caracterizar un consorcio bacteriano con capacidad para degradar asfaltenos y crudos pesados, así como obtener información sobre los perfiles transcriptómicos de dichos microorganismos durante un proceso de biodegradación en suelos contaminados (Parada, 2022). Aunque se identificaron

preliminarmente algunas rutas metabólicas y genes potencialmente implicados en el proceso, no se disponía aún de una validación experimental sobre los niveles de expresión de dichos genes. La aplicación de la técnica de RT-qPCR se propuso como una herramienta clave para validar los resultados transcriptómicos previos y cuantificar los niveles de expresión génica durante el proceso de biodegradación de crudo pesado y asfaltenos en suelos contaminados, con el fin de confirmar o descartar su participación en el mecanismo específico de degradación de estas fracciones, el cual aún no ha sido completamente esclarecido. Para ello, se diseñaron 16 iniciadores para la evaluación de la expresión de tres genes funcionales (*catA*, *benA* y *kdpA*) y un gen normalizador, tanto para *S. stutzeri* como para *R. qingshengii* (8 genes en total). La especificidad de los oligonucleótidos fue validada a nivel experimental para asegurar que la amplificación obtenida correspondiera a la de los genes evaluados. La tabla 2 muestra las características de los iniciadores y sus secuencias.

Tabla 2

Iniciadores diseñados en este trabajo para la evaluación de la expresión de genes degradadores de hidrocarburos mediante RT-qPCR. (FW: Iniciador Forward. RV: Iniciador Reverse).

Microorganismo	Gen	Tamaño amplificación (pb)	Secuencia del iniciador (5' - 3')	Tm (°C)	% GC
<i>Stutzerimonas stutzeri</i>	<i>catA</i>	169	Fw ATAGCCGTTCTCGTCGG	62.0	58.8
			Rv CCACTGTGATGTTCCCTGC	60.9	55.6
	<i>benA</i>	148	Fw TCTACTGCTCTGGACTCGC	61.5	57.9
			Rv ATCAGGTACAGGTTCGGG	60.5	55.6
	<i>kdpA</i>	150	Fw ACAACCTGATGATCGCG	61.5	52.9
			Rv AACAGCGTCACGAACAGA	61.3	50.0

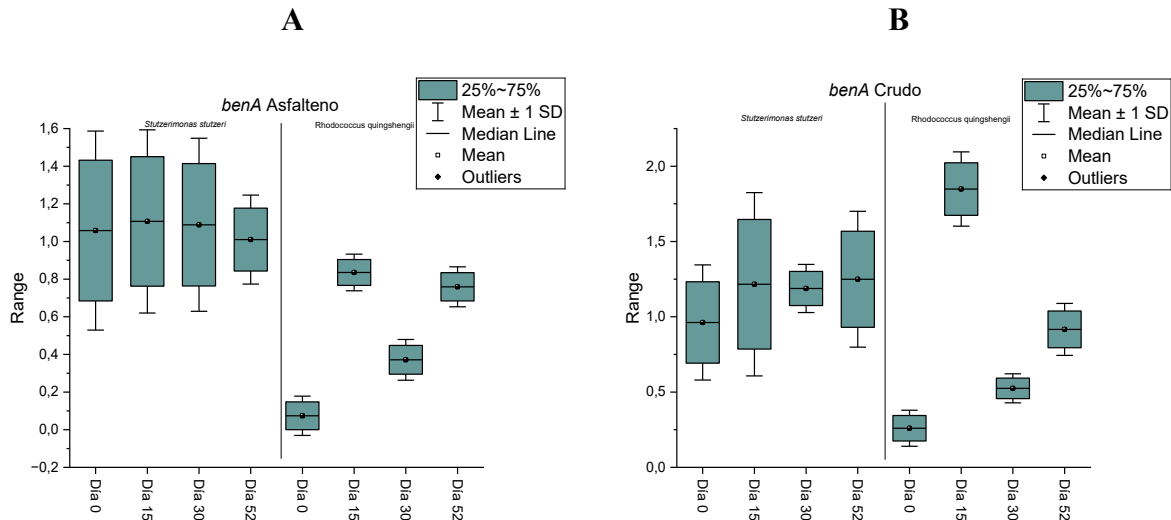
	<i>gmk</i>	120	Fw	TAGTGGCTCATCTCGCTG	60.9	55.6
	(normalizador)		Rv	ATCGATCTTCATCCTGCC	60.7	50.0
<i>Rhodococcus</i>	<i>catA</i>	183	Fw	GTACTCGGGGTAGGTGATG	60.0	57.9
<i>qingshengii</i>			Rv	AGGACCACATGACCACTTC	60.6	52.6
	<i>benA</i>	159	Fw	GTAGGTGTAGGTGGATGCAC	60.0	55.0
			Rv	GCGGTTGAGAACTATCG	61.5	55.6
	<i>kdpA</i>	180	Fw	CATTGCCTTGATAACCGG	62.0	50.0
			Rv	ATTGATCGCAGTGTTTCGTC	61.9	47.4
	<i>gyrB</i>	102	Fw	CAAGCTCAAGTGGCAGAAG	61.9	52.6
	(normalizador)		Rv	GTTGATCTTCTTGCCGGA	61.9	50.0

4.3.1 Expresión del gen *benA* durante la biodegradación de hidrocarburos pesados

El gen *benA* codifica para la enzima benzoato-1,2-dioxigenasa (EC:1.14.12.10), tanto en *S. stutzeri* como en *R. qingshengii*, y está involucrado en las rutas de degradación de compuestos aromáticos complejos como los presentes en los asfaltenos y petróleo crudo pesado. La benzoato-1,2-dioxigenasa cataliza la conversión del ácido benzoico, proveniente de la oxidación inicial de los hidrocarburos aromáticos, en ácido 1,2-dihidro-1,2-dihidroxibenzoico (DHB), un compuesto clave para la posterior formación del catecol. Los niveles de expresión de *benA* presentaron diferencias significativas entre *S. stutzeri* PH5 y *R. qingshengii* PH3D durante el período de degradación 52 días (figura 3).

Figura 3.

Niveles de expresión del gen benA de Stutzerimonas stutzeri PH5 y Rhodococcus qingshengii PH3D durante la degradación de asfaltenos. (A) y petróleo crudo pesado (B) en medio líquido. Range: Fold Change



En primer lugar, el gen *benA* de *S. stutzeri* PH5 mostró una expresión inicial relativamente similar a la del gen normalizador durante la degradación de los asfaltenos, con valores de *fold-change* (FC) cercanos a 1, manteniéndose estable durante los 52 días del proceso de degradación, aunque con una leve disminución hacia el día 52 (figura 3A). *S. stutzeri* PH5 también expresó el gen *benA* de manera constante durante todo el proceso de degradación del petróleo crudo pesado (figura 3B), aunque con un aumento significativo desde el día 15 hasta el día 52. Estos comportamientos sugieren que *S. stutzeri* PH5 expresa el gen *benA* durante todas las etapas del proceso de biodegradación, ya sea de asfaltenos o de petróleo crudo pesado, y que su expresión se modula positivamente a través del tiempo, especialmente en presencia de petróleo crudo pesado. Esto se relacionaría con un aprovechamiento eficiente los compuestos alifáticos y aromáticos de bajo peso molecular presentes en las primeras etapas del proceso de degradación. Por otra parte,

benA podría mantener su expresión debido a su carácter inducible y a que probablemente está involucrado a lo largo de todo el proceso de degradación (Das y Chandran, 2011). Este comportamiento sugiere una rápida activación de las rutas metabólicas involucradas en la degradación inicial de compuestos más accesibles del crudo. La leve+ disminución en los niveles de expresión a partir del día 30 podría atribuirse al agotamiento del sustrato o a la acumulación de productos intermedios que causan una inhibición del microorganismo, tal como se ha observado en otros estudios de degradación de hidrocarburos (Das y Chandran, 2011).

En contraste, la expresión del gen *benA* de *R. qingshengii* PH3D tuvo un comportamiento notablemente diferente al de *S. stutzeri* PH5 durante la degradación del crudo pesado y de los asfaltenos (figura 3). La expresión de *benA* prácticamente no se detectó en el momento inicial del proceso (día 0, FC cercano a 0), aumentó al día 15, disminuyó al día 30 y nuevamente aumentó al día 52. Este patrón de expresión fue similar durante la degradación de asfaltenos y de crudo pesado, aunque en este último los niveles de expresión fueron comparativamente mayores a los obtenidos en los reactores que contenían asfaltenos. El nivel máximo de expresión de *benA* de *R. qingshengii* PH3D se obtuvo al día 15 en presencia de petróleo crudo pesado, aumentando casi al doble (FC de 1.8, $p=0.0001$ vs día 0) comparado con el gen normalizador. Sin embargo, a excepción de este día de muestreo, en todos los demás los niveles de expresión fueron inferiores a los del gen de referencia, indicando una disminución significativa de la expresión del gen atribuible a la presencia de los hidrocarburos pesados. Este patrón de expresión intermitente podría indicar una regulación de metabólica gradual y dependiente de intermediarios metabólicos, en la que de *R. qingshengii* PH3D podría estar adaptándose a medida que transcurre el proceso para degradar compuestos más recalcitrantes en diferentes etapas de este. Estudios previos han mostrado que, además de poseer

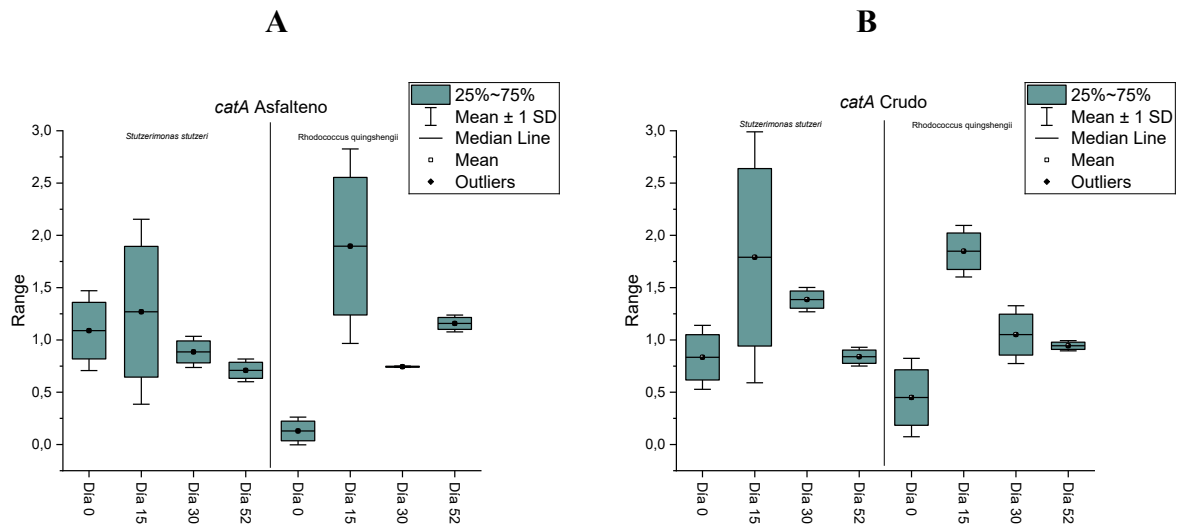
el potencial para degradar hidrocarburos complejos y pesados (Iminova, y otros, 2022), *R. qingshengii* PH3D posee y expresa diferencialmente los genes *benA*, junto con *catA*, *catB* y otras rutas aromáticas, particularmente en condiciones microaerobias (Juárez, y otros, 2023). Teniendo en cuenta lo anterior, los resultados sugieren que las variaciones en los niveles de oxígeno, y la variación en las cantidades de ácido benzoico y probablemente otros intermediarios metabólicos son determinantes importantes de la expresión de *benA*. El aumento progresivo de expresión de *benA* de *S. stutzeri* PH5 y la expresión intermitente de *benA* de *R. qingshengii* PH3D, sugiere que ambas bacterias desempeñan roles complementarios durante la degradación del crudo. Esto abre la posibilidad de utilizar consorcios microbianos que combinen las capacidades de ambas cepas para maximizar la eficiencia del proceso de biodegradación en escenarios reales, como lo sugieren estudios sobre interacciones microbianas en biorremediación (Widdel y Rabusd, 2021).

4.3.2 Expresión del gen *catA* durante la biodegradación de hidrocarburos pesados

El gen *catA* codifica para la enzima catecol 1,2 dioxigenasa (EC:1.13.11.1), tanto en *S. stutzeri* PH5, como en *R. qingshengii* PH3D. Dicha enzima está involucrada en la degradación de hidrocarburos aromáticos como los presentes en los asfaltenos y crudos pesados, partiendo el anillo aromático del catecol y transformándolo en *cis,cis*-muconato, el cual es un compuesto lineal. Los resultados obtenidos mostraron que la expresión del gen *catA* presentó patrones diferenciales entre *S. stutzeri* PH5 y *R. qingshengii* PH3D durante el proceso de biodegradación a lo largo de los 52 días. Estas diferencias fueron más evidentes en los tratamientos que contenían asfaltenos (figura 4A) y podrían estar relacionadas con las estrategias metabólicas particulares de cada bacteria, así como con su capacidad para adaptarse a las condiciones del medio y al tipo de sustrato disponible.

Figura 4.

Niveles de expresión del gen catA de Stutzerimonas stutzeri PH5 y Rhodococcus qingshengii PH3D durante la degradación de asfaltenos (A) y petróleo crudo pesado (B) en medio líquido. Range: fold-change



Como se puede observar en la figura 4A, durante la degradación de los asfaltenos, *S. stutzeri* PH5 mostró un aumento moderado de la expresión de *catA* pasando de un FC cercano a 1 en el día 0, a aproximadamente 1.25 en día 15, y volviendo a 0.9 en día 30, para luego caer levemente a 0.75 en el día 52. La expresión de *catA* de *S. stutzeri* PH5 durante la degradación del crudo pesado fue basal, y disminuyó a medida que avanzaba el proceso de degradación, lo cual sugiere una inducción temprana de la expresión del gen, seguida por una regulación negativa o adaptación. Por otra parte, *R. qingshengii* PH3D presentó un incremento más marcado de la expresión desde aproximadamente 0.1 FC en el día 0, a aproximadamente 1.9 en el día 15 ($p=0.0001$) y sostenido sobre 2.5 en el día 30, para descender al día 30 a 0.75 y aumentar a 1,2 al día 52. Esto indicaría una inducción de la expresión asociada a las etapas iniciales del proceso de degradación, probablemente asociada a su capacidad de degradar compuestos aromáticos en los

asfaltenos. Estudios previos han demostrado que genes relacionados con la degradación de hidrocarburos presentan una activación rápida en presencia de compuestos tóxicos, lo cual puede estar asociado con la necesidad de detoxificación o de adaptación al ambiente de hidrocarburos (Martínez, y otros, 2015; González-López, y otros, 2018). El aumento en la expresión de *catA* durante los primeros días del proceso de degradación podría estar relacionado con su papel en el metabolismo de anillos aromáticos, una función que se activa en presencia de compuestos como los asfaltenos, ricos en estructuras aromáticas (Rodríguez-Blanco, y otros, 2019).

Durante la degradación del petróleo crudo pesado, *S. stutzeri* PH5 mostró una expresión temprana basal de *catA* al día 0 (FC de 0.8), aumentando significativamente al día 15 (FC de 2.5, $p= 0.001$), para luego disminuir a aproximadamente 1.4 en el día 30 y a 0.85 en el día 52, siguiendo un patrón de inducción y adaptación. Por su parte, *R. qingshengii* PH3D presentó un patrón de expresión similar al observado en *S. stutzeri* PH5, con un aumento de la expresión desde 0.5 FC al día 0 hasta 1.8 FC al día 15 ($p= 0.035$), disminuyendo a aproximadamente 1 a los días 30 y 52. Los picos de expresión de *catA* observados al día 15 son consistentes con los que se presentaron durante la degradación de los asfaltenos, especialmente por parte de *R. qingshengii* PH3D, y estarían asociados a mecanismos de activación rápida de rutas metabólicas asociadas con la degradación de hidrocarburos aromáticos en las etapas iniciales e intermedias. Estudios previos han demostrado que genes relacionados con la degradación de hidrocarburos presentan una activación rápida en presencia de compuestos tóxicos, lo cual puede estar asociado con la necesidad de detoxificación o de adaptación al ambiente de hidrocarburos (Martínez, y otros, 2015; González-López, y otros, 2018). La disminución de la expresión de *catA* en ambas bacterias hacia el día 52 podría deberse a varios factores, tales como la acumulación de productos intermedios tóxicos, la disminución de la disponibilidad del crudo pesado o asfaltenos, desviación de los flujos metabólicos hacia rutas

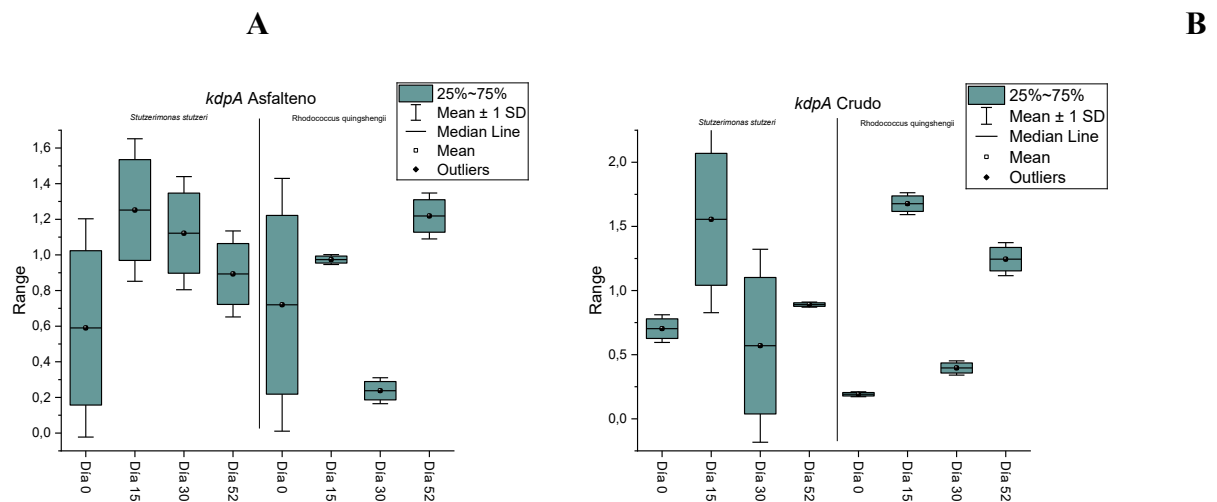
alternativas, variaciones en los niveles de oxígeno, o la disminución de la actividad enzimática debido a las condiciones experimentales (Das y Chandran, 2011; Johnsen y Karlson, 2007). Esto resalta la importancia de optimizar las condiciones ambientales, como la disponibilidad de oxígeno y nutrientes, para mejorar la eficiencia del proceso de biodegradación. Desde el punto de vista práctico, estos resultados tienen implicaciones importantes para aplicaciones de biorremediación. *S. stutzeri* PH5 podría ser útil en las etapas iniciales de degradación de crudo pesado, donde es crucial un rápido consumo de los compuestos más complejos. Por otro lado, *R. qingshengii* PH3D, con su capacidad de mantener una expresión más estable, sería ideal para procesos a largo plazo o para la degradación de compuestos menos recalcitrantes que persisten en las últimas etapas del tratamiento.

4.3.3 Expresión del gen *kdpA* durante la biodegradación de hidrocarburos pesados

La acumulación y absorción de K^+ se encuentran entre las primeras respuestas de los microorganismos ante el estrés osmótico producido en ambientes tóxicos y salinos. La expresión del gen *kdpA*, que codifica para la subunidad A de la ATPasa transportadora de potasio y hace parte del sistema Kdp-ATPasa que regula el balance osmótico celular, es esencial para mantener la viabilidad celular en ambientes hostiles (Ayangbenro, y otros, 2024) y probablemente desempeña un papel clave en la adaptación de las bacterias frente a condiciones adversas durante la degradación de asfaltenos o del crudo pesado. Estudios previos han reportado que la activación de genes bacterianos relacionados con el transporte de potasio, incluyendo *kdpA*, es esencial para mantener la homeostasis osmótica y energética en condiciones adversas (Epstein, 2003).

Figura 5.

Niveles de expresión del gen *kdpA* de *Stutzerimonas stutzeri* PH5 y *Rhodococcus qingshengii* PH3D durante la degradación de asfaltenos (A) y petróleo crudo pesado (B) en medio líquido. Range: fold-change.



En este estudio, se observaron diferencias significativas en la expresión de *kdpA* entre *S. stutzeri* PH5 y *R. qingshengii* PH3D, lo que evidencia respuestas adaptativas complementarias a los mecanismos metabólicos de degradación tanto de los asfaltenos, como del petróleo crudo pesado (figura 5). Durante la degradación de los asfaltenos, *S. stutzeri* PH5 mostró un aumento gradual de la expresión de *kdpA* con respecto al gen de referencia, desde niveles bajos en el día 0 (0.6 FC), aumentando a 1.2 en el día 15 y manteniéndose entre 1.1 y 0.9 en los días 30 y 52, indicando una expresión moderada, pero sostenida a través del tiempo (figura 5A). Por otra parte, *R. qingshengii* PH3D presentó un patrón de expresión diferente, con una expresión baja en el día 0 (0.7 FC), un leve aumento en el día 15 (1 FC), una marcada disminución al día 30 (0.2 FC) y un aumento significativo ($p=0.035$) en el día 52 (1.2 FC). Teniendo en cuenta que los compuestos

asfálticos pueden alterar la tensión osmótica local, la expresión constante de *kdpA* por parte de *S. stutzeri* PH5 durante todo el proceso de degradación sugiere una respuesta inmediata y prolongada para preservar la homeostasis iónica. En contraste, los resultados sugieren que *R. qingshengii* PH3D requiere más tiempo y probablemente de la participación de otros mecanismos para tolerar los asfaltos y activar efectivamente el sistema *kdpA*, para luego regresar hacia niveles basales de expresión.

En cuanto a la degradación del petróleo crudo pesado, aunque al día cero la expresión de *kdpA* fue baja (0.6 FC), *S. stutzeri* PH5 reaccionó con un pico temprano de expresión en el día 15 (1.2 FC), posiblemente como una respuesta osmótica rápida, para luego disminuir a los días 30 y 52. Este comportamiento sugiere que *S. stutzeri* activa rápidamente sus mecanismos de respuesta frente al estrés osmótico generado por la presencia de asfaltos, lo que es consistente con su rol en la degradación de compuestos accesibles en las etapas iniciales del proceso. Sin embargo, la disminución de la expresión de *kdpA* después del día 15 sugiere que la actividad metabólica de *S. stutzeri* se reduce a medida que disminuye la biodisponibilidad de compuestos accesibles o que se acumulan productos tóxicos, tal como lo plantean Das y Chandran (2011). Por otra parte, *R. qingshengii* PH3D no activó el gen *kdpA* al inicio, sino que presentó aumentos significativos en la expresión del gen a los días 15 y 52, de manera similar a lo observado con la expresión de los genes *benA* y *catA*. La sobreexpresión de estos genes en las etapas intermedias y tardías del proceso de degradación del crudo pesado sugiere que *R. qingshengii* requiere de una adaptación más compleja y prolongada, quizá vinculada a la disponibilidad de potasio o activación del sistema sensor KdpD/E después de activar otros mecanismos de supervivencia, o de la activación de rutas complementarias (por ejemplo, compatibilidad osmótica mediante solutos compatibles tales como

la trehalosa, ectoína, prolina) antes de activar el sistema Kdp. Supervivencia (Freeman y cols, 2013). En *Rhodococcus* y otras actinobacterias, se ha reportado que la activación de mecanismos osmoprotectores puede demandar mayor tiempo, relacionándose con cambios en el metabolismo membranal, acumulación de solutos compatibles, y la activación de segundos mensajeros tales como c-di-AMP (Ballal , y otros, 2007; Bhowmick, y otros, 2023).

La tendencia a la estabilización observada en el tiempo 30 y en el tiempo 52 para todos los genes evaluados se correlaciona con estudios de adaptaciones prolongadas en bacterias expuestas a ambientes tóxicos. Según López-García, y otros (2017), la exposición continua a compuestos hidrocarbonados induce una respuesta de adaptación que se entiende como la reducción de la variabilidad de la expresión génica con el tiempo. Esto implica que la célula bacteriana optimiza su respuesta al entorno tóxico, disminuyendo el esfuerzo energético dedicado a la defensa y estabilizando la expresión de genes de respuesta inicial. En este sentido, la estabilización de *benA*, *catA* y *kdpA* en etapas avanzadas del proceso de biodegradación podría reflejar la capacidad de las bacterias para regular su metabolismo una vez que la fase de estrés agudo ha sido superada.

La diferencia en la expresión de *kdpA* entre las dos bacterias sugiere roles complementarios en el proceso de degradación. *S. stutzeri* PH5 parece responder mejor ante el estrés osmótico durante las etapas iniciales del proceso de biodegradación, donde la respuesta rápida al estrés es crucial para la utilización de compuestos más accesibles y biodegradables del crudo pesado y asfalto. Por otro lado, *R. qingshengii* PH3D responde mejor ante el estrés en las etapas finales, donde las condiciones ambientales se vuelven más desafiantes debido a la presencia de compuestos más recalcitrantes y al agotamiento de los nutrientes. Esta complementariedad resalta la

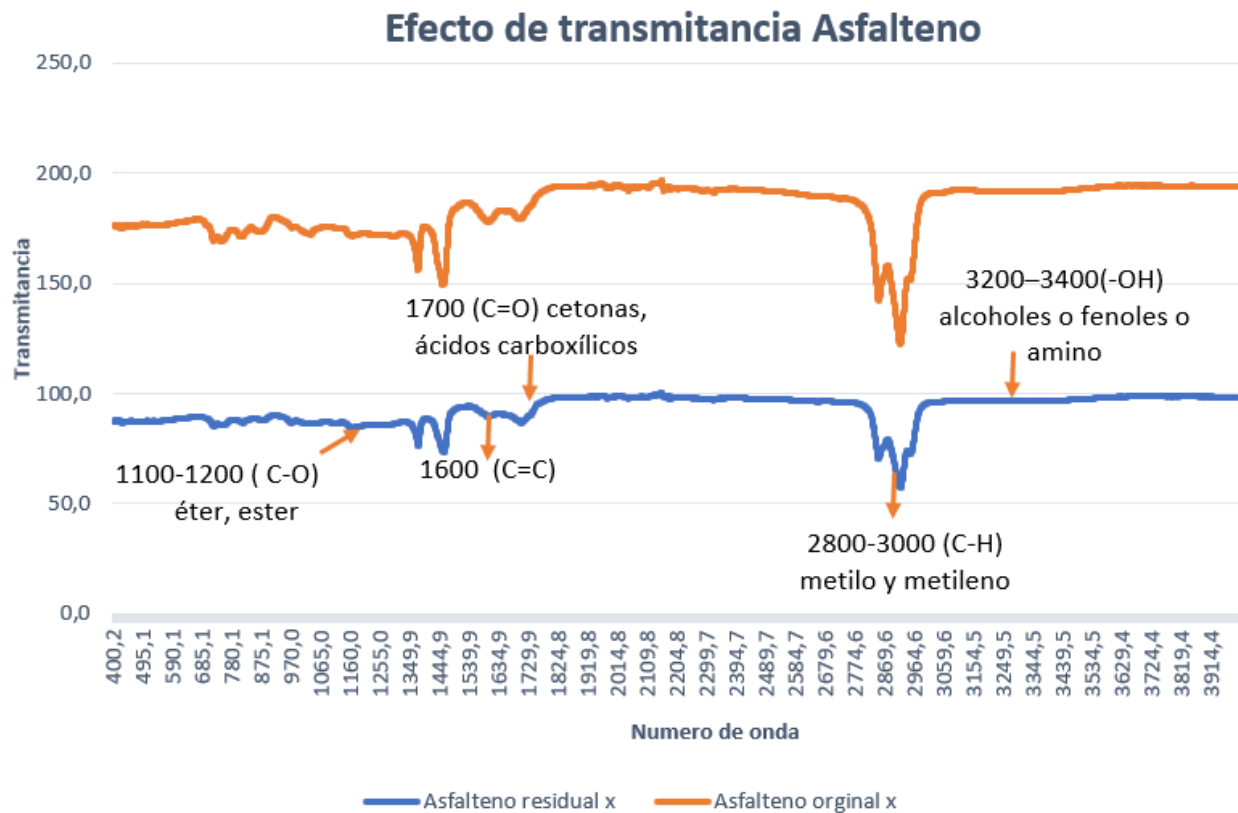
importancia de utilizar consorcios microbianos para maximizar la eficiencia en la biorremediación de crudo pesado, como sugieren Widdel y Rabus (2001).

4.4 Cambios estructurales en los hidrocarburos después de la biodegradación

Se analizaron los cambios estructurales sufridos por los asfaltenos después del tratamiento de biodegradación por parte del consorcio microbiano. Para ello, se obtuvieron espectros por FTIR-ATR que reflejaron una complejidad de la composición química de los asfaltenos, antes y después del tratamiento (figura 6), los cuales cubrieron un amplio rango de números de onda, desde aproximadamente 300 hasta 3800 cm^{-1} . Estos abarcaron tanto la región de huella digital (menos de 1500 cm^{-1}), como las regiones más generales para identificar enlaces funcionales. En general, las bandas observadas en los espectros antes y después de tratamiento indican una predominancia de estructuras aromáticas con sustituyentes polares como carbonilos, éteres y fenoles, junto con una menor proporción de grupos alifáticos. Estas características son consistentes con la naturaleza de los asfaltenos como fracciones pesadas del petróleo, ricas en heteroátomos y estructuras de alta polaridad.

Figura 6.

Espectros infrarrojos obtenidos por FTIR-ATR a partir de los asfaltenos antes y después del tratamiento con el consorcio microbiano.



Al comparar los espectros antes y después del tratamiento con el consorcio, se pudieron identificar algunos cambios estructurales como resultado de la actividad microbiana. Al realizar la búsqueda en la base de datos WILEY, no se encontró un compuesto coincidente al 100% con el espectro del asfalteno utilizado para los ensayos de biodegradación, extraído del petróleo crudo pesado Castilla. Sin embargo, el espectro del compuesto “HUX #5035; Blown Asphalt”, presentó un HQI (Hit Quality Index) de 91,13, siendo el compuesto más cercano al asfalteno original. Por otra parte, tampoco se encontró un compuesto coincidente al 100% con el espectro del asfalteno residual después del tratamiento con el consorcio, aunque el compuesto “HUX #5034; Hard hydrocarbon”

presentó un HQI de 90,60 y fue el más similar al asfalteno original. Si bien ninguno de los dos compuestos asignados correspondió al 100% con el asfalteno antes y después del tratamiento, las diferencias en la asignación en la base de datos hacen suponer que el asfalteno residual presenta diferencias estructurales con respecto al original. En este sentido, tanto HUX #5035, como HUX #5034, corresponden a asfaltenos parcialmente oxidados (asfaltos soplados), pero con diferencias en la presencia y abundancia de grupos funcionales tales como carbonilos (C=O), hidroxilos (O-H), carboxilos (C-O), éteres y ésteres, entre otros, que podrían ser consecuencia de la actividad del consorcio.

Al analizar los espectros del asfalteno original y del residual, se pueden distinguir principalmente dos zonas donde se produce la mayor absorción (o menor transmitancia) de la radiación, que están alrededor de los números de onda 1,350-1,400 y 2,850-3,100 cm^{-1} . Estos valores de número de onda pueden relacionarse con vibraciones moleculares específicas, tales como enlaces C-H, C=O, o grupos funcionales específicos (figura 6). Dentro de estas zonas, las diferencias entre ambos espectros se concentran principalmente en cuatro regiones:

1) un pico ancho en la región 3,400–3,200 cm^{-1} (vibraciones O-H o N-H) indica la presencia de grupos hidroxilo (-OH) (como en alcoholes o fenoles) o amino (-NH). Los picos en esta región absorben más en el asfalteno residual que en el original, lo cual puede estar relacionado con la aparición de compuestos polares tales como fenoles, o aminas primarias y secundarias. Silverstein y otros. (2014) señalan que estos grupos funcionales son comunes en materiales de origen orgánico con heteroátomos.

2) Por otra parte, en el asfalteno residual también se presenta una mayor absorción en la región 3,000–2,800 cm^{-1} (C-H de alcanos), cuyos picos estrechos corresponden a las vibraciones de

tensión de enlaces C-H de grupos alifáticos metilo (-CH₃) y metileno (-CH₂). De acuerdo con Smith (2011), las bandas en esta región del espectro son características de los hidrocarburos saturados. Aunque la fracción predominante dentro de la estructura de los asfaltenos es la poliaromática, también presentan colas de fracciones alifáticas que en ocasiones sirven como puentes entre los núcleos aromáticos y cuya ruptura permitiría la fragmentación de los asfaltenos, facilitando su posterior degradación. Los resultados sugieren que la actividad del consorcio promueve la formación de este tipo de estructuras alifáticas principalmente a 2,951 cm⁻¹ (tensión asimétrica de los -CH₃, -CH₂), lo cual facilitaría la degradación y mineralización de los asfaltenos.

3) El asfalteno residual presenta mayor absorción que el original a 1,708 cm⁻¹ (C=O), indicando vibraciones de tensión de enlaces dobles (C=O) en grupos carbonilo, tales como cetonas, ésteres y ácidos carboxílicos, que puede estar relacionada con eventos de oxidación enzimática y con la aparición de grupos funcionales polares. Por otra parte, el asfalteno residual presenta una menor absorción a 1,600 cm⁻¹, que corresponde a vibraciones de enlaces doble (C=C) en anillos aromáticos, que es la estructura predominante en los asfaltenos. Kandiyoti y otros. (2006) afirman que estas bandas son fundamentales para identificar la naturaleza aromática de los asfaltenos, y su menor absorción en el asfalteno tratado con el consorcio indicaría una menor proporción de estos compuestos con respecto al asfalteno original.

4) El asfalteno residual absorbe más que el original en la región entre 1,200–1,100 cm⁻¹, específicamente a 1,164 cm⁻¹ (tensión del C-O), correspondiente a vibraciones de enlace C-O en compuestos fenólicos, ésteres, éteres o ácidos carboxílicos. Esto indica la aparición de compuestos oxigenados, típicos en materiales de alta polaridad (Silverstein y otros, 2014), tales como el ácido el ácido benzoico y sus derivados oxigenados.

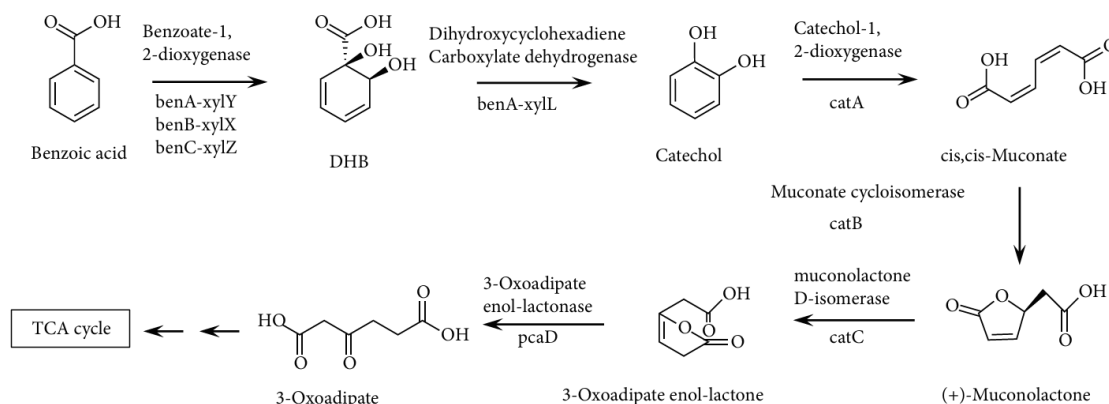
4.5 Correlación de los niveles de expresión génica con los cambios en la composición molecular de las fracciones de asfaltenos

Como se mencionó previamente, la expresión de los genes *catA* y *benA* aumentó a medida que transcurrió el proceso de biodegradación tanto del petróleo crudo pesado como de los asfaltenos, lo cual demuestra su participación directa en el proceso de mineralización de los hidrocarburos pesados. Para el caso específico de los asfaltenos, la expresión de *catA* fue mayor en *R. qingshengii* que en *S. stutzeri*, mientras que la expresión de *benA* siempre fue mayor en *S. stutzeri* que en *R. qingshengii*. Los productos de la expresión de los genes *catA* (catecol 1,2-dioxigenasa) y *benA* (benzoato 1,2-dioxigenasa) intervienen en momentos diferentes de la degradación de los intermediarios del metabolismo de los asfaltenos, pero ambos contribuyen a la formación de compuestos oxigenados tales como el ácido 1,2-dihidro-1,2-dihidroxibenzoico (DHB) (*cis*-diol del ácido benzoico; compuesto aromático oxidado) y el ácido *cis,cis* mucónico (ácido dicarboxílico lineal) (Haritash y Kaushik, 2009; Xiang y otros, 2020) (figura 7).

Figura 7.

Papel de los genes benA y catA en la degradación de intermediarios metabólicos de los asfaltenos.

Tomado de Xiang y otros, 2020.



Severino, y otros, (2021) compararon fracciones de asfaltenos con diferentes grados de biodegradación, observando un aumento en las bandas FTIR de tensión de O-H ($\approx 3,345 \text{ cm}^{-1}$), tensión del C=O ($\approx 1,700 \text{ cm}^{-1}$) y tensión del C–O/C–O–C ($\approx 1,100\text{--}1,150 \text{ cm}^{-1}$), evidenciando la formación de ácidos carboxílicos y alcoholes durante la biodegradación. Los resultados de este estudio muestran resultados similares, ya que las estructuras tanto del DHB (compuesto aromático oxidado), como del ácido *cis,cis* mucónico (ácido dicarboxílico lineal) son compatibles con los picos observados en el espectro del asfalteno después de su tratamiento con el consorcio microbiano. Para el DHB ($\text{C}_6\text{H}_4\text{-1,2-(OH)}_2$), esto se puede observar específicamente en las bandas observadas a $3,317 \text{ cm}^{-1}$ (tensión O-H) y $1,164 \text{ cm}^{-1}$ (tensión del C-O), mientras que, para el ácido *cis,cis* mucónico ($\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_4$) es compatible con las bandas observadas a $1,708 \text{ cm}^{-1}$ (tensión del C=O) y en la región de la huella digital. Si bien es cierto que las estructuras de estos compuestos podrían verse reflejadas en las regiones del espectro del asfalteno residual, la ruta metabólica a la que pertenecen los genes evaluados conduce finalmente a la mineralización de los compuestos aromáticos a través del ciclo de Krebs (Haritash y Kaushik, 2009), por lo que no es posible afirmar con certeza que los intermediarios producidos por la expresión de *benA* y *catA* estén presentes allí. Por otra parte, las diferencias entre los dos espectros podrían explicarse también a la expresión de genes distintos a los evaluados en este trabajo y que han sido reportados previamente (Parada, 2022), pero cuya expresión diferencial no se había validado hasta la realización de este trabajo. A partir de los espectros obtenidos por FTIR se puede deducir que la expresión de los genes *benA* y *catA* probablemente contribuye a que se presenten diferencias entre los espectros y a la mineralización de los asfaltenos, y se también se validó que los genes *benA*, *catA* y *kdpA* se sobreexpresan durante diferentes etapas de la degradación de los hidrocarburos pesados.

5. Conclusiones

El consorcio microbiano conformado por *Stutzerimonas stutzeri* PH5 y *Rhodococcus qingshengii* PH3D mostró una alta eficiencia (55 - 58 %) para degradar asfaltenos y petróleo crudo pesado en medio líquido, generando además cantidades significativas de CO₂ como subproducto metabólico, indicativo de la mineralización de los hidrocarburos. La combinación de las capacidades metabólicas de las dos bacterias permitió una degradación sinérgica y sostenida a través del tiempo de los hidrocarburos, lo que las convierte en una opción viable para la remediación de aguas y otras matrices contaminadas con hidrocarburos pesados y resalta su potencial como herramienta biotecnológica en procesos aplicados de biorremediación.

Los patrones de expresión de los genes *benA* y *catA* mostraron diferencias significativas entre *Stutzerimonas stutzeri* PH5 y *Rhodococcus qingshengii* PH3D durante la biodegradación de hidrocarburos pesados. En general, *S. stutzeri* PH5 mantuvo una expresión continua y modulada de *benA*, lo que sugiere una participación constante a lo largo de todo el proceso de degradación. En contraste, *R. qingshengii* PH3D presentó una expresión intermitente, posiblemente regulada por metabolitos intermedios y condiciones microambientales. Estos hallazgos indican que ambas bacterias poseen rutas metabólicas complementarias y podrían utilizarse en consorcio para maximizar la eficiencia de biodegradación en ambientes contaminados con crudo o asfaltenos.

Los patrones de expresión de los genes evaluados durante la degradación de los asfaltenos y el petróleo crudo pesado también son consistentes con respuestas adaptativas observadas en bacterias sometidas a estrés por hidrocarburos, particularmente de tolerancia ante el estrés

osmótico por parte del gen *kdpA*. Esto indica que la activación de los mecanismos de adaptación fisiológica y de tolerancia de las dos bacterias es necesaria para que se produzca el proceso de biodegradación de los hidrocarburos pesados de manera eficiente.

Los asfaltenos sufrieron cambios estructurales evidentes como resultado de la degradación por parte del consorcio microbiano. Entre las transformaciones más relevantes se identificó una disminución en la intensidad de las bandas asociadas a grupos alifáticos y aromáticos, lo cual sugiere una fragmentación de las cadenas hidrocarbonadas y la pérdida de estructuras aromáticas policíclicas condensadas. A su vez, se observó un aumento en la señal de grupos funcionales oxigenados, tales como carbonilos, hidroxilos y enlaces C–O, lo que indica una oxidación parcial del material, probablemente mediada por rutas enzimáticas específicas del consorcio.

Los cambios moleculares producidos en los asfaltenos se correlacionaron con la expresión diferencial de los genes implicados en la degradación de hidrocarburos, ya que los productos y subproductos derivados de la actividad de las enzimas codificadas por *benA* y *catA* (benzoato 1,2-dioxigenasa y catecol 1,2-dioxigenasa, respectivamente) son compatibles con las bandas observadas en el espectro del asfalteno residual, lo cual refuerza la hipótesis de una transformación activa y progresiva hacia compuestos oxigenados más simples, susceptibles de ser mineralizados a través de rutas metabólicas centrales tales como la beta-oxidación y el ciclo de Krebs.

6. Recomendaciones

Con el fin de completar el presente estudio, se recomienda reevaluar y considerar la inclusión de otros genes que podrían estar involucrados en las rutas metabólicas de degradación, con el fin de ampliar la comprensión de los mecanismos moleculares implicados en este proceso, también sería indispensable continuar la evaluación en simultaneo de los cambios estructurales de las moléculas de asfaltenos, con el objetivo de correlacionar la actividad metabólica con los cambios estructurales.

Referencias Bibliográficas

- Adebiyi, F. M. (2021). An insight into asphaltene precipitation, deposition and management stratagems in petroleum industry. *ELSEVIER*, 304, 419–427. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2021.121317>
- Andres, R. C. (2011). Estudio de la variación en los niveles de transcripción de genes de enzimas degradadoras de lignina en cultivos sólidos y sumergidos de *Pleurotus ostreatus* [Tesis de maestría, Universidad Pública de Navarra].
- Atagana, H. I. (2009). Bioremediation of co-contamination of crude oil and heavy metals in soil by phytoremediation using *Chromolaena odorata* (L.) King & H.E. Robinson. *Water, Air, & Soil Pollution*, 197(1–4), 261–271. <https://doi.org/10.1007/s11270-008-9806-5>
- Atlas, R. M. (1995). Bioremediation of petroleum pollutants. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 35(1–3), 317–327. [https://doi.org/10.1016/0964-8305\(95\)00033-6](https://doi.org/10.1016/0964-8305(95)00033-6)
- Ayangbenro, A. S., Olanrewaju, O. S., Amoo, A. E., & et al. (2024). *Pseudomonas koreensis* AB36 from a gold mine: Genomic insights into adaptation to extreme conditions and potential plant growth promotion. *Biologia*, 79, 3677–3694. <https://doi.org/10.1007/s11756-024-01799-y>
- Ballal, A., Basu, B., & Apte, S. K. (2007). The Kdp-ATPase system and its regulation. *Journal of Biosciences*, 32(3), 559–568. <https://doi.org/10.1007/s12038-007-0055-7>
- Becker, J., Kuhl, M., Kohlstedt, M., & et al. (2018). Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for the production of cis, cis-muconic acid from lignin. *Microbial Cell Factories*, 17, 115. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0963-2>

- Bhattacharya, D., Sarma, P. M., Krishnan, S., Mishra, S., & Lal, B. (2021). Asphaltene biotransformation for heavy oil upgradation. *AMB Express*, 11(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13568-021-01247-3>
- Bhowmick, S., Shenouda, M. L., & Tschowri, N. (2023). Osmotic stress responses and the biology of the second messenger c-di-AMP in *Streptomyces*. *microLife*, 4, uqad020. <https://doi.org/10.1093/femsml/uqad020>
- Cao, Z., Yan, W., Ding, M., & Yuan, Y. (2022). Microbial consortia for bioremediation: Mechanisms and applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10, Article 1051233. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.1051233>
- Das, N., & Chandran, P. (2011). Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: An overview. *Biotechnology Research International*, 2011, 941810. <https://doi.org/10.4061/2011/941810>
- Dussan, J., Vives-Florez, M., Sarria, V., Sánchez, O., Delgado, L., & Hernández, S. (2010). Aproximaciones biológicas y fisicoquímicas en el tratamiento de contaminantes. *Revista de Ingeniería: Un resumen del aporte de la Universidad de los Andes*, (31), 100–111.
- Ecopetrol. (2019). Reporte integral de gestión sostenible (pp. 1–712). <https://www.ecopetrol.com.co>
- Epstein, W. (2003). The roles and regulation of potassium in bacteria. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 75, 293–320. [https://doi.org/10.1016/S0079-6603\(03\)75008-7](https://doi.org/10.1016/S0079-6603(03)75008-7)
- Fernández-Linares, L. C., Rojas-Avellizapa, N. G., Roldán-Carrillo, T. G., Ramírez-Islas, M. E., Zegarra-Martínez, H. G., Uribe-Hernández, R., & Arce-Ortega, J. M. (2006). Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados (1ª ed.).

Instituto Mexicano del Petróleo; Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales; Instituto Nacional de Ecología.

Fernández, C., Labrador, H., Mendoza, K., Aponte, L., Medina, L., & Izzeddin, N. (2012). Recalcitrant compound biodegradation coming from crude extra-heavy applying technical ones of bioremediation. *Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería de la Universidad del Zulia*, 35(3), 215–223.

Freeman, Z. N., Dorus, S., & Waterfield, N. R. (2013). The KdpD/KdpE two-component system: Integrating K⁺ homeostasis and virulence. *PLoS Pathogens*, 9(3), e1003201. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003201>

García, E., Roldán, F., & Garzón, L. (2011). Evaluación de la bioestimulación (nutrientes) en suelos contaminados con hidrocarburos utilizando respirometría. *Acta Biológica Colombiana*, 16(2), 195–208.

Gudiña, E. J., & Teixeira, J. A. (2017). HC-0C-03: Biological treatments to improve the quality of heavy crude oil. En A. Singh, S. K. Srivastava, & R. K. Rathoure (Eds.), *Environmental microbiology and biotechnology* (pp. 337–351). Springer Science+Business Media Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-1866-4_15

Guibert, L. M. (2014). Biodegradación de hidrocarburos alifáticos en sedimentos marinos subantárticos: Estudios poblacionales y metagenómicos [Tesis doctoral, Universidad Nacional de Rosario].

Haritash, A. K., & Kaushik, C. P. (2009). Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): A review. *Journal of Hazardous Materials*, 169(1–3), 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.03.137>

Harman, J. (2013). *Petróleo*. Bogotá, Colombia: INDEPAZ.

- Head, I. M., Jones, D. M., & Röling, W. F. M. (2006). Marine microorganisms make a meal of oil. *Nature Reviews Microbiology*, 4(3), 173–182. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1348>
- Hernández-López, E. L., Ayala, M., & Vázquez-Duhalt, R. (2015). Microbial and enzymatic biotransformations of asphaltenes. *Petroleum Science and Technology*, 33(9), 1017–1029. <https://doi.org/10.1080/10916466.2015.1025926>
- Hernández-López, E. L., Perezgasga, L., Huerta-Saquero, A., Mouriño-Pérez, R., & Vázquez-Duhalt, R. (2016). Biotransformation of petroleum asphaltenes and high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Neosartorya fischeri*. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(17), 17567–17576. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6934-6>
- Hernández, A., Martín, P., Torres, A., & Sánchez, E. (1994). Análisis del RNA: Estudio de la expresión génica. *Biología Molecular y Nefrología*, 6(2), 145–162.
- Iminova, L., Delean, Y., Frantsuzova, E., Bogun, A., Zvonarev, A., Suzina, N., Anbumani, S., & Solyanikova, I. (2022). Physiological and biochemical characterization and genome analysis of *Rhodococcus qingshengii* strain 7B capable of crude oil degradation and plant stimulation. *Biotechnology Reports*, 35, e00741. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2022.e00741>
- Juárez, K., Reza, L., Bretón-Deval, L., Morales-Guzmán, D., Trejo-Hernández, M. R., García-Guevara, F., & Lara, P. (2023). Microaerobic degradation of crude oil and long chain alkanes by a new *Rhodococcus* strain from Gulf of Mexico. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 39(10), 264. <https://doi.org/10.1007/s11274-023-03703-3>
- Kandiyoti, R., Herod, A. A., Bartle, K. D., & Morgan, T. J. (2006). *Solid fuels and heavy hydrocarbon liquids: Thermal characterisation and analysis*. Elsevier.
- Kibbe, W. A. (2007). OligoCalc: An online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Research*, 35(suppl_2), W43–W46. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm234>

- Laezi, K., Kis, A., Horváth, B., Maróti, G., Botond, H., Perei, K., & Rákhely, G. (2015). Metabolic responses of *Rhodococcus erythropolis* PR4 grown on diesel oil and various hydrocarbons. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(22), 9745–9759. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6732-z>
- Lavanaia, M., Cheema, S., Sarma, P. M., Mandal, A. K., & Lal, B. (2012). Biodegradation of asphalt by *Garciaella petrolearia* TERIG02 for viscosity reduction of heavy oil. *Biodegradation*, 23(1), 15–24. <https://doi.org/10.1007/s10532-011-9476-0>
- Li, F., Hu, X., Li, J., & et al. (2023). Purification, structural characterization, antioxidant and emulsifying capabilities of exopolysaccharide produced by *Rhodococcus qingshengii* QDR4-2. *Journal of Polymers and the Environment*, 31, 64–80. <https://doi.org/10.1007/s10924-022-02590-0>
- López-García, P., Ramos, J., & Vázquez, A. (2017). Adaptation mechanisms of bacterial populations in high-toxicity hydrocarbon environments. *Journal of Microbial Adaptation*, 45(2), 213–220.
- López-Ramírez, J., Rodríguez, L., & Torres, A. (2020). Gene response to osmotic stress in hydrocarbon-degrading bacteria. *Microbial Stress Journal*, 52(4), 365–372.
- Luo, Y., Teng, C., Wang, Z., & Xu, J. (2009). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Rhodococcus* species: Genetic and biochemical mechanisms. *Journal of Hazardous Materials*, 162(2–3), 1407–1413. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.06.045>
- Martín, M., Bianchini, L., & Tani, A. (2012). *Rhodococcus* spp.: Versatile bacteria with unique metabolic capabilities. *Microbial Biotechnology*, 5(3), 314–326. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2011.00328.x>
- McKenna, A. M. (2009). Detailed characterization of heavy crude oils and asphaltenes by ultrahigh resolution Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry [Doctoral dissertation,

Florida State University]. Florida State University Libraries.

https://purl.flvc.org/fsu/fd/FSU_migr_etd-0811

McPherson, M. J., Quirke, P., & Taylor, G. R. (1991). *PCR: A practical approach*. Oxford University Press.

Navas-Cáceres, O. D., Parada, M., & Zafra, G. (2023). Development of a highly tolerant bacterial consortium for asphaltene biodegradation in soils. *Environmental Science and Pollution Research*, 30, 123439–123451. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-26735-2>

Nzila, A., & Musa, M. M. (2021). Current knowledge and future challenges on bacterial degradation of the highly complex petroleum products asphaltenes and resins. *Frontiers in Environmental Science*, 9, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2021.699040> Osorio-Acero, J. N.,

Osorio-Márquez, J. D., & Agualimpia-Valderrama, B. E. (2023). Evaluación de cambios en la abundancia del gen codificante para la enzima catecol-2,3-dioxigenasa (*catA*) durante el proceso de biodegradación de asfaltenos en un sistema in vitro [Tesis de pregrado, Universidad de Santander].

Parada, M. (2022). Degradación microbiana de asfaltenos en suelo: Un enfoque metatranscriptómico. En III Encuentro Internacional de Ciencias de la Salud y I Congreso Internacional de Investigación: Salud, Vida y Bienestar (Bucaramanga, Colombia).

Petrushin, I. S., Markova, Y. A., Karepova, M. S., Zaytseva, Y. V., & Belovezhets, L. A. (2021). Complete genome sequence of *Rhodococcus qingshengii* strain VKM Ac-2784D, isolated from *Elytrigia repens* rhizosphere. *Microbiology Resource Announcements*, 10(11), e00107-21. <https://doi.org/10.1128/MRA.00107-21>

- Pineda-Flores, G., & Mesta-Howard, A. M. (2001). Petroleum asphaltenes: Generated problematic and possible biodegradation mechanisms. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 43(3), 143–150.
- Pourfakhraei, E., Badraghi, J., Mamashli, F., Nazari, M., & Saboury, A. A. (2018). Biodegradation of asphaltene and petroleum compounds by a highly potent *Daedaleopsis* sp. *Journal of Basic Microbiology*, 58(7), 609–622. <https://doi.org/10.1002/jobm.201800017>
- Rodríguez-Blanco, A., Méndez, S., & Pérez, R. (2019). The role of aromatic ring-degrading genes in bacteria exposed to petroleum-based compounds. *Environmental Biochemistry*, 15(6), 421–430.
- Sardrood, B. P., Goltapeh, E. M., & Varma, A. (2013). An introduction to bioremediation. In E. M. Goltapeh, A. Varma, & K. Rai (Eds.), *Fungi as bioremediators* (pp. 3–27). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-33811-3_1
- Severino, H. G. de S., Pinto, C. B. D., Spigolon, A. L. D., Mello, C. S. B. de, Silva, T. F. da, & Leal, K. Z. (2021). Evaluation of the chemical composition and structure of asphaltenes from three offshore Brazilian biodegraded heavy oils. *Química Nova*, 44(4), 391–401. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170697>
- Silverstein, R. M., Webster, F. X., Kiemle, D. J., & Bryce, D. L. (2014). *Spectrometric identification of organic compounds* (8th ed.). Wiley.
- Smith, B. C. (2011). *Infrared spectral interpretation: A systematic approach*. CRC Press.
- Socrates, G. (2001). *Infrared and Raman characteristic group frequencies: Tables and charts* (3rd ed.). Wiley.
- Solyanikova, I. P., Iminova, L., Delegan, Y., Frantsuzova, E., Bogun, A., Zvonarev, A., Suzina, N., Anbumani, S., & Solyanikova, I. (2022). Physiological and biochemical characterization and

genome analysis of *Rhodococcus qingshengii* strain 7B capable of crude oil degradation and plant stimulation. *Biotechnology Reports*, 35, e00741. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2022.e00741>

Song, S. F., Wang, J. W., Yan, Y. C., An, L. Y., Zhang, F., Wang, L., & Wu, X. L. (2018). Shifts of the indigenous microbial communities from reservoir production water in crude oil- and asphaltene-degrading microcosms. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 128, 18–29. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.11.010>

Speight, J. G. (2006). *The chemistry and technology of petroleum* (4th ed.). CRC Press.

Timmis, K. N. (Ed.). (2010). *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology* (Vol. 1). Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-77587-4>

Travassoli, T., Mousavi, S. M., Hojaosadati, S. A., & Salehizadeh, H. (2012). Asphaltene biodegradation using microorganisms isolated from oil samples. *Fuel*, 93, 142–148. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2011.09.031>

Tyagi, M., da Fonseca, M. M. R., & de Carvalho, C. C. C. R. (2011). Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. *Biodegradation*, 22(2), 231–241. <https://doi.org/10.1007/s10532-010-9394-4>

Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., & Rozen, S. G. (2012). Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, 40(15), e115. <https://doi.org/10.1093/nar/gks596>

Uribe-Álvarez, C., Ayala, M., Perezgasga, L., Naranjo, L., Urbina, H., & Vázquez-Duhalt, R. (2011). First evidence of mineralization of petroleum asphaltene by a strain of *Neosartorya fischeri*. *Microbial Biotechnology*, 4(5), 663–672. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2011.00273.x>

- Varjani, S. J. (2017). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. *Bioresource Technology*, 223, 277–286. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.037>
- Widdel, F., & Rabus, R. (2001). Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology*, 12(3), 259–276. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(00\)00207-3](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(00)00207-3)
- Xiang, W., Wei, X., Tang, H., Li, L., & Huang, R. (2020). Complete genome sequence and biodegradation characteristics of benzoic acid-degrading bacterium *Pseudomonas* sp. SCB32. *BioMed Research International*, 2020, 6146104. <https://doi.org/10.1155/2020/6146104>
- Xue, J., Yu, Y., Bai, Y., Wang, L., & Wu, Y. (2015). Marine oil-degrading microorganisms and biodegradation process of petroleum hydrocarbon in marine environments: A review. *Current Microbiology*, 71(2), 220–228. <https://doi.org/10.1007/s00284-015-0825-5>
- Yanto, D. H. Y., & Tachibana, S. (2014). Enhanced biodegradation of asphalt in the presence of Tween surfactants, Mn^{2+} and H_2O_2 by *Pestalotiopsis* sp. in liquid medium and soil. *Biodegradation*, 25(1), 105–113. <https://doi.org/10.1007/s10532-013-9642-6>
- Zafra, G., & Cores Espinosa, D. V. (2015). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Trichoderma* species: A mini review. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(23), 19426–19433. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5214-3>
- Zaman, S. A. U., Bhrdwaj, A., Nayarisseri, A., Khazanehdari, K. A., & Bhuyan, R. (2025). Isolation and characterization of novel hydrocarbon-degrading bacteria from oil polluted soil near Nacharam, Hyderabad, India. *Scientific Reports*, 15, Article 17219. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-01081-4>

Zhironkin, S., & Cehlar, M. (2021). Analysis of the problem of environmental pollution in oil fields, as well as ways of utilization of oil production waste. *E3S Web of Conferences*, 278, 03012. International Innovative Mining Symposium. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202127803012>