

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES**

**ESCUELA DE POSGRADO**



**TESIS DE MAESTRO EN CIENCIAS  
CON MENCIÓN EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR**

**CARACTERIZACIÓN GENÓMICA Y PROTEÓMICA DE  
BACTERIAS COSTERAS NATIVAS DEGRADADORAS DE  
HIDROCARBUROS DE PETRÓLEO**

**Br. FRANCIS JESÚS MORE CALERO**

**TUMBES, PERÚ**

**2019**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES**

**ESCUELA DE POSGRADO**



**TESIS DE MAESTRO EN CIENCIAS  
CON MENCIÓN EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR**

**CARACTERIZACIÓN GENÓMICA Y PROTEÓMICA DE  
BACTERIAS COSTERAS NATIVAS DEGRADADORAS DE  
HIDROCARBUROS DE PETRÓLEO**

**Br. FRANCIS JESÚS MORE CALERO**

**TUMBES, PERÚ**

**2019**

## DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

Yo, Francis Jesús More Calero, declaro que los resultados reportados en esta tesis son producto de mi trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a su concepción y análisis. Asimismo, declaro que hasta donde yo sé, no contiene material previamente publicado o escrito por otra persona excepto, donde se reconoce como tal a través de citas y con propósitos exclusivos de ilustración o comparación. En este sentido, afirmo que cualquier información presentada sin citar a un tercero es de mi propia autoría. Declaro, finalmente, que la redacción de esta tesis es producto de mi propio trabajo con la dirección y apoyo de mis asesores de tesis y mi jurado calificador, en cuanto a la concepción y al estilo de la presentación o a la expresión escrita.

---

Br. Francis Jesús More Calero

# ACTA DE REVISIÓN Y DEFENSA DE TESIS

## RESPONSABLES

Br. FRANCIS JESÚS MORE CALERO

-----  
EJECUTOR

Ph, D. DE.ERIC LOUIS MIALHE MATONNIER

-----  
ASESOR

Mg Sc. MELITZA DE LOURDES CORNEJO LA TORRE

-----  
COASESORA

## JURADO DICTAMINADOR

Dr. CARLOS A. DEZA NAVARRETE

-----  
PRESIDENTE

Dr. RAMÓN GARCÍA SEMINARIO

-----  
SECRETARIO

Ph. D. VIRNA A. CEDEÑO ESCOBAR

-----  
VOCAL

## **AFILIACIÓN INSTITUCIONAL DE LOS AUTORES**

### **Metagenomic and proteomic characterization of native coastal bacteria degrading petroleum hydrocarbons**

### **Caracterización metagenómica y proteómica de bacterias costeras nativas degradadoras de hidrocarburos de petróleo**

More<sup>1,2\*</sup>, F. J., Castillo<sup>2</sup>, R. T., Cornejo<sup>3</sup>, M. L., Mialhe<sup>2</sup>, E. L.

<sup>1</sup> Universidad Nacional de Tumbes (UNT), Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ingeniería Pesquera, Tumbes, Perú.

<sup>2</sup> INCA'BIOTEC S.A.C., Laboratorio de Biotecnología Molecular, Tumbes, Perú.

<sup>3</sup> Cooperativa de trabajadores BIOTECOOP, Departamento de Biotecnología Ambiental, Tumbes, Perú.

\* Autor para correspondencia

#### **E-mails:**

Francis More Calero: francisjmorecalero@gmail.com

Rosita Castillo Rogel: rositat.castillorogel@gmail.com

Melitza Cornejo La Torre: melitzacornejo01@gmail.com

Eric MialheMattonier: ericmialhe@yahoo.fr

#### **Información sobre los autores:**

MFJ: Ejecutor, obtención, análisis y redacción. CRT: Obtención de resultados y revisión. CML: Revisión crítica y gestor. MEL: Revisión crítica y gestor.

El presente estudio fue posible gracias al financiamiento del programa de Maestría en Biotecnología Molecular, Convenio N° 000190-2015-FONDECYT y de la Universidad Nacional de Tumbes.

## RESUMEN

Este estudio se llevó a cabo en dos áreas costeras contaminadas con hidrocarburos de petróleo. La microbiota bacteriana de las muestras de suelo contaminado se caracterizó por técnicas independientes de cultivo mediante análisis metagenómico dirigido a ARNr 16S. Además, las bacterias se aislaron e identificaron mediante la secuenciación parcial del ARNr 16S. Las bacterias aisladas que mostraron resistencia al petróleo se caracterizaron por espectrometría de masas MALDI TOF-TOF de shotgun proteómica, considerando en particular las proteínas celulares. La metagenómica de la microbiota bacteriana reveló la presencia de bacterias genéticamente conocidas como degradadoras de hidrocarburos de petróleo como *Marinobacter*, *Halomonas*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y *Sphingomonas*. Se identificaron molecularmente 46 aislamientos bacterianos de ambas áreas contaminadas, siendo los más representativos los géneros: *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Halomonas*, *Stenotrophomonas*. La capacidad de las bacterias para degradar los hidrocarburos presentes en el diésel fue evaluada *in vitro*, siendo *Acinetobacter*spp. y *Serratia marcescens*, las cepas más eficientes para la degradación. Finalmente, mediante análisis proteómico se identificó las enzimas alcohol y aldehído deshidrogenasas, monooxigenasa, 2-nitropropano dioxigenasa, que participan en la degradación de los hidrocarburos del petróleo.

**Palabras clave:** hidrocarburos, ARNr 16S, espectrometría de masas, metagenómica.



## ABSTRACT

This study was carried out in two coastal areas contaminated with petroleum hydrocarbons. The bacterial microbiota of contaminated soil samples was characterized by independent culture techniques by metagenomic analysis directed at 16S rRNA. In addition, the bacteria were isolated and identified by partial sequencing of the 16S rRNA. The isolated bacteria that showed resistance to oil were characterized by MALDI TOF-TOF mass spectrometry of shotgun proteomics, considering in particular the cellular proteins. The metagenomics of the bacterial microbiota revealed the presence of bacteria genetically known as degraders of petroleum hydrocarbons such as *Marinobacter*, *Halomonas*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* and *Sphingomonas*. Molecularly identified 46 bacterial isolates from both contaminated areas, being the most representative genera: *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Halomonas*, *Stenotrophomonas*. The capacity of the bacteria to degrade the hydrocarbons present in the diésel was evaluated *in vitro*, being *Acinetobacter* spp. and *Serratia marcescens*, the most efficient strains for degradation. Proteomic analysis identified the enzymes alcohol and aldehyde dehydrogenases, monooxygenase, 2-nitropropane dioxygenase, which are involved in the degradation of petroleum hydrocarbons.

**Keywords:** hydrocarbons, 16S rRNA, mass spectrometry, metagenomic.