

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas**



***AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS  
ANTÁRTICAS CAPACES DE METABOLIZAR FENANTRENO  
EN PRESENCIA DE METALES PESADOS***

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de  
Magíster en Bioquímica área de especialización Bioquímica Ambiental y  
Memoria para optar al Título de Bioquímico por:**

**Alejandro Alberto Gran Scheuch**

**Directores de tesis:**

**Dr. José Manuel Pérez Donoso**

**Dr. Edwar Rosamel Fuentes Pérez**

Santiago-Chile

Marzo 2015

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**INFORME DE APROBACIÓN**  
**TESIS DE MAGISTER**

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por el candidato

**ALEJANDRO ALBERTO GRAN SCHEUCH**

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización Bioquímica Ambiental y Título de Bioquímico, en el examen público rendido el día 30 de marzo del 2015.

**Directores de Tesis:**

Dr. José Pérez Donoso

\_\_\_\_\_

Dr. Edwar Fuentes Pérez

\_\_\_\_\_

**Comisión evaluadora de Tesis:**

Dr. Davor Cotoras Tadic

\_\_\_\_\_

Dr. Carlos Santiviago Cid

\_\_\_\_\_

Dr. Francisco Chávez Espinoza

\_\_\_\_\_

A mis padres Fernando y Cecilia,  
A mi corazón Mel.

## AGRADECIMIENTOS

A José, por confiar en mí y darme la libertad y flexibilidad para poder realizar una tesis alejada a la línea de investigación del laboratorio. Por la paciencia durante este tiempo. Por los consejos y retos que me ayudaron a finalizar este trabajo, a madurar científicamente, fijarme metas altas y adquirir un gusto especial por la investigación. Y principalmente, por fomentarme a mirar la ciencia desde un punto de vista apasionado y puro.

A Edwar, por inculcar en mí un gran interés por la Química Analítica. Por entregarme la oportunidad de desarrollar parte de este trabajo en su laboratorio cuando había llegado a una piedra de tope. Pero por sobre todo por su sencillez, excelente disposición y ejemplo de ser un gran científico, docente y mejor persona.

A la comisión, por su completa disposición al coordinar las fechas de presentación, aun considerando el acotado tiempo y la premura. Por sus sugerencias durante la defensa y el escrito, que me ayudaron a mejorar este trabajo de manera significativa.

A mis compañeros del laboratorio, por la entretención diaria, las conversaciones matutinas, discusiones deportivas, políticas y claro, científicas. Principalmente, por la buena onda de todos los del NanoLab. A GOD, por ser obviamente el mejor grupo, comprometido y divertido. Y a todos aquellos que enriquecieron esta tesis: Nicolás, Vicente, Juan Pablo, Bernardo, Catherine, Bruna, Bastián, Felipe y Luis. Que contribuyeron directa e indirectamente a esta tesis, discutiendo detalladamente los experimentos o dándole otra vuelta de tuerca durante los seminarios de laboratorio.

A mis amigos de la carrera , Eduardo, Alfonso, Vicente, Nicolás, Gonzalo, Nicolás, Matías, Diego, Mabe y Daniel por los 5 años de amistad, buena onda, carretes, conversaciones, jornadas de estudio, alegrías, las tardes jugando taca-taca y claro las emociones compartidas de los Gene Gunners que nos enseñó a tolerar la frustración

y sentirle un gusto especial a las victorias. En general, a todos, por hacer estos largos años de la carrera mucho más gratos y divertidos.

A mis suegros Fabián y Gema, que durante estos años me han considerado como uno más, que faltó poco para pasarme por la libreta de familia. Por haberme acompañado y sentirse siempre orgullosos de mí. A Cristián por la buena onda, y a Javiera y Nachita, por ser excelentes cuñadas, el cariño, las tardes de película y considerarme como su hermano...aunque no sea su hermano.

A Mel, mi corazón preciosa, quien me acompañó en todas, los buenos momentos y los más complicados. Por ayudarme siempre de manera desinteresada y sentirse siempre orgullosa de mí, por alentarme a seguir adelante y aconsejarme en los momentos más difíciles. Sinceramente, porque gracias a ti y tú ayuda logré terminar esta tesis, siempre has sido mi motor. Gracias, gracias, muchas gracias.

Finalmente, a mi familia, por su apoyo, que hicieron que estos años de estudio sean más fáciles. A mis padres Cecilia y Fernando, por su esfuerzo y compromiso por la educación de sus hijos, gracias a ellos, todos mis hermanos y yo somos profesionales pero más importante, buenas personas. A mis hermanos Fernando, Cecilia, Ignacio y Gerardo. Y mis cuñadas Paula, Francisca y Pía. A mis sobrinas lindas Trinidad y Amparito, que es la ser más exquisita de este planeta. Por estar siempre cuando los he necesitado, por las alegrías y juegos, los almuerzos, onces y comidas, donde lo más importante siempre ha sido estar juntos.

Gracias

## **FINANCIAMIENTO**

Esta tesis fue desarrollada en el Laboratorio de Bionanotecnología y Microbiología del Centro de Bioinformática y Biología Integrativa (CBIB) de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Andrés Bello, en el Laboratorio de Química Analítica de Contaminantes Orgánicos y Elementos Traza de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile y en el Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la Base Profesor Julio Escudero en Antártica. El trabajo fue financiado por el proyecto FONDECYT 11110077, INACH T\_19-11 e INACH MT-05\_13. Además, para la realización del programa de estudios se contó con el financiamiento del PCHA/Beca Magíster en Chile de CONICYT.

## TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	iv
FINANCIAMIENTO.....	vi
TABLA DE CONTENIDO.....	vii
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	ix
ÍNDICE DE TABLAS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
RESUMEN.....	xii
SUMMARY.....	xvi
INTRODUCCIÓN.....	1
Antártica.....	1
El efecto del hombre.....	2
Hidrocarburos aromáticos policíclicos.....	5
Fenantreno.....	7
Estrategias de biodegradación.....	8
HIPÓTESIS.....	14
OBJETIVO GENERAL.....	14
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
MATERIALES.....	15
MÉTODOS.....	17
1.    Métodos de análisis químico y biológico de suelos.....	17
2.    Métodos microbiológicos.....	19
RESULTADOS.....	26
1. Caracterización química y biológica de muestras de suelos antárticos expuestos y sin exponer a diésel.....	26
Selección de las muestras de suelo.....	26
Determinación del pH de los suelos.....	26
Cuantificación de HAP en suelo.....	27
Cuantificación de cadmio, cromo y plomo en suelos.....	28

Determinación de la actividad biológica total de los suelos.....	29
Determinación del número de heterótrofos en los suelos.....	30
2. Aislamiento y caracterización de bacterias degradadoras de fenantreno resistentes a metales.....	31
Enriquecimiento de suelos.....	31
Selección de microorganismos a partir de suelos antárticos.....	32
Identificación de microorganismos.....	33
Caracterización microbiológica de los aislados seleccionados.....	34
Caracterización microbiológica.....	35
Resistencia a estrés oxidativo.....	36
Cinética de crecimiento con fenantreno y diesel como única fuente de carbono.....	39
Efecto de los metales pesados en el crecimiento y degradación de fenantreno.....	40
Cinética de crecimiento en presencia de cadmio.....	41
Cinética de degradación de fenantreno.....	42
Ensayo de bioaumentación con <i>P.flavescens</i> D43FB.....	43
3. Dilucidar procesos asociados a la degradación de fenantreno.....	43
Presencia de dioxigenasas.....	44
Quimiotaxis.....	45
Producción de biosurfactantes.....	46
Formación de biopelícula y adhesión a fenantreno.....	47
DISCUSIÓN.....	50
Caracterización de suelos antárticos.....	50
Contaminación de HAP y metales pesados.....	50
Análisis biológico de los suelos.....	51
Caracterización de aislados antárticos.....	52
Método de selección.....	52
Identificación de aislados degradadores de fenantreno.....	53
Efecto del cadmio.....	54
Degradación de fenantreno y procesos asociados.....	55



CONCLUSIONES.....	58
BIBLIOGRAFÍA.....	59

## ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 1. Mapa del territorio antártico.....	1
Figura 2. Zonas contaminadas en Isla Rey Jorge, Antártica .....	13
Figura 3. Los 16 HAPs de interés para la EPA.....	15
Figura 4. Molécula de fenantreno C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> .....	17
Figura 5. Esquema de las distintas rutas de metabolismo del fenantreno descritas en bacterias degradadoras.....	10
Figura 6. Esquema de bacteria degradadora de HAPs creciendo cerca de suelo con fenantreno adsorbido.....	11
Figura 7. Zona de muestreo.....	26
Figura 8. Determinación del pH en muestras de suelo Antártico.....	27
Figura 9. Concentración de HAP en suelo.....	28
Figura 10. Cuantificación de metales pesados de suelo Antártico.....	29
Figura 11. Determinación de actividad biológica total.....	30
Figura 12. Determinación de unidades formadoras de colonia por gramo de suelo.....	31
Figura 13. Enriquecimiento de suelos.....	32
Figura 14. Metabolización de fenantreno.....	33
Figura 15. Esquema resumen de selección de microorganismos.....	33
Figura 16. Tinción de Gram.....	35
Figura 17. Temperatura óptima de crecimiento.....	35
Figura 18. Tiempo mínimo de exposición a luz UV que inhibe el crecimiento.....	37
Figura 19. Presencia de catalasa.....	38
Figura 20. Cinética pseudo enzimática de peroxidasa.....	39
Figura 21. Cinética de crecimiento con hidrocarburos como única fuente de carbono.....	40
Figura 22. Efecto del cadmio en el crecimiento con fenantreno como única fuente de carbono.....	42

Figura 23. Degradación de fenantreno en presencia de Cd <sup>2+</sup> .....	42
Figura 24. Bioaumentación de terrario con <i>P.flavescens</i> D43FB.....	43
Figura 25. Purificación de plásmidos.....	44
Figura 26. Ensayo de motilidad.....	45
Figura 27. Ensayo de quimiotaxis.....	46
Figura 28. Evaluación de producción de biosurfactantes.....	47
Figura 29. Ensayo de formación de biopelícula.....	48
Figura 30. Adhesión a cristales de fenantreno.....	48
Figura 31. SEM de bacteria adherida a cristales de fenantreno.....	49
Figura. 32. Conversión de concentración de fenantreno a hidrocarburo total.....	50
Figura 33. Árbol filogenético.....	53
Figura 34. Esquema resumen de la estrategia de degradación de fenantreno propuesto para <i>Pseudomonas flavescens</i> D43FB.....	57

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Microorganismos degradadores de HAPs.....	7
Tabla 2. Reactivos utilizados.....	15
Tabla 3. Caracterización de aislados bacterianos.....	34
Tabla 4. Ensayos bioquímicos y crecimiento con distintas fuentes de carbono.....	36
Tabla 5. Caracterización resistencia a estrés oxidativo.....	39
Tabla 6. MIC de metales pesados de las cepas aisladas.....	41
Tabla 7. Niveles de contaminación según Norma Chilena, Holandesa y Mexicana.....	51

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\lambda$	Longitud de onda
<b>ABT</b>	Actividad biológica total.
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico.
<b>API</b>	Índice de perfil analítico.
<b>Cd</b>	Cadmio.
<b>CoA</b>	Acetil coenzima A.
<b>Cr</b>	Cromo.
<b>dNTP</b>	Desoxirribonucleótido.
<b>D.O.<sub>600nm</sub></b>	Densidad óptica a 600 nm.
<b>ECA</b>	Expedición Científica Antártica.
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiamino tetraacético.
<b>EPA</b>	Agencia de protección ambiental.
<b>HAP</b>	Hidrocarburo aromático policíclico.
<b>LB</b>	Luria broth.
<b>MIC</b>	Concentración inhibitoria mínima.
<b>MIT</b>	Tiempo inhibitorio mínimo.
<b>NADH</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido (forma reducida).
<b>NADPH</b>	Nicotinamida adenina dinucleótidofosfato (forma reducida).
<b>PARAFAC</b>	Análisis paralelo de factores.
<b>Pb</b>	Plomo.
<b>R2A</b>	Reasoner's 2A.
<b>ROS</b>	Especie reactiva de oxígeno.
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato sódico.
<b>TPF</b>	Trifenil formazan.
<b>TTC</b>	Cloruro de 2, 3, 5-trifeniltetrazolium.
<b>UFC</b>	Unidades formadoras de colonia.
<b>U-PLS/RBL</b>	Mínimos cuadrados parciales desdoblados con bilinearización de residuos.

## RESUMEN

### **Aislamiento y caracterización de bacterias antárticas capaces de metabolizar fenantreno en presencia de metales pesados**

La Antártica es el continente más austral de la tierra, contiene cerca del 80% de las reservas de agua dulce del planeta y presenta una serie de condiciones extremas, como bajas temperaturas y alta radiación ultravioleta. A pesar de esto, el hombre ha sido capaz de sobrevivir en la región y realizar actividades científicas y de explotación durante más de 80 años. Como consecuencia, las distintas zonas habitadas han sufrido contaminación, principalmente asociada a diesel. Este compuesto es nocivo, ya que presenta una gran cantidad de moléculas orgánicas como hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) y compuestos inorgánicos como metales pesados (Cd, Cr y Pb). La descontaminación de HAPs se puede llevar a cabo mediante procesos físicos, químicos y biológicos. Los procesos biológicos representan una opción ecológica, económica y segura, que involucra una menor alteración de los suelos y en consecuencia constituye una excelente alternativa para la descontaminación del territorio Antártico. A la fecha, se ha reportado un gran número de bacterias capaces de degradar HAPs. Sin embargo, debido al Tratado Antártico no está permitido ingresar microorganismos o ADN foráneo al continente, por lo que se hace vital encontrar bacterias nativas que puedan ser usadas en la biorremediación de diesel en Antártica. Debido a su mayor solubilidad en agua, menor toxicidad para el humano y similitud estructural con otros HAPs, el compuesto que se utiliza como modelo para aislar y estudiar microorganismos degradadores de HAPs es el fenantreno.

En base a lo expuesto, se planteó la hipótesis: “La presencia de hidrocarburos aromáticos policíclicos y metales pesados en suelos antárticos ha favorecido el desarrollo de bacterias degradadoras de fenantreno resistentes a metales”. El objetivo general de este trabajo fue aislar y caracterizar bacterias antárticas resistentes a metales pesados (Cd, Cr y Pb) y evaluar su capacidad de metabolizar fenantreno. Para esto se utilizó muestras de suelo antártico obtenido de distintas zonas expuestas y no expuestas a diesel, las cuales fueron caracterizadas química y biológicamente. Además, se aisló y caracterizó bacterias degradadoras de fenantreno resistentes a metales y se estudiaron los procesos asociados a la degradación de fenantreno.

Durante este trabajo de tesis se utilizó muestras de suelo obtenidas de la 49° Expedición Científica Antártico (ECA 49°): 4 muestras de suelos no expuestos a diesel (A0, B4, C3 y C8) y 4 muestras de suelos expuestos a diesel (D3, D4, E2 y E4). El análisis del suelo determinó la presencia de HAPs en los suelos expuestos a diesel, en promedio 1000 veces más concentrado que en los suelos sin exposición. Además, en los suelos D3 y D4 (suelos expuestos a diesel) se observó una mayor concentración de cadmio y plomo total en comparación a todas las muestras, sobre los 30 y 600 mg Kg<sup>-1</sup>, respectivamente. Respecto a la caracterización biológica, el suelo expuesto a diesel D4 presentó mayor actividad biológica y número de heterótrofos, relacionado directamente al contenido de HAP (el suelo D4 presentó la mayor concentración del hidrocarburo, ~30 mg Kg<sup>-1</sup>).

De los 8 suelos se aisló 350 microorganismos, de los cuales 53 fueron capaces de degradar fenantreno. Mediante un *screening* desarrollado durante esta tesis basado en espectroscopía de fluorescencia total asociada a calibración multivariada, se seleccionó 3 aislados por su alto nivel de degradación. Estos microorganismos se caracterizaron, en particular la cepa D43FB (identificada como *Pseudomonas flavescens*) resiste 25 mg L<sup>-1</sup> de Cd<sup>+2</sup> y 5 mg L<sup>-1</sup> de Cr<sup>+6</sup>. Además, tras 7 de incubación es capaz de degradar hasta un 80% de fenantreno en medio M9 con el hidrocarburo como única fuente de carbono. Al agregar 0.025, 0.05 y 0.5 mg L<sup>-1</sup> de Cd<sup>+2</sup> el porcentaje de degradación es 60, 26 y 25 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. Además, en un proceso de bioaumentación de suelos degrada aproximadamente un 75% de los hidrocarburos presentes en el terrario. Por otro lado, a este aislado se asoció su capacidad de degradar fenantreno a la facultad de formar biopelículas y adherirse a cristales de este compuesto, junto con descartar la liberación de biosurfactante o la quimiotaxis. Siendo una excelente alternativa para más ensayos de biorremediación de suelos.

El trabajo planteado tiene profundas implicaciones para estudios en biorremediación y potencialmente podría representar una alternativa de descontaminación de ecosistemas antárticos aprovechando los bio recursos propios de la Antártica. La proyección de este trabajo está asociada a dilucidar completamente los procesos asociados a la degradación de *Pseudomonas flavescens* D43FB y continuar ensayos de biorremediación en terrarios, y así eventualmente terminar la investigación en un proceso *in situ* en Antártica.

## SUMMARY

### **Isolation and characterization of antarctic bacteria capable of metabolize phenanthrene in the presence of heavy metals**

Antarctica is the southernmost continent on earth, contains ~80% of the planet's fresh water and presents a series of extreme conditions such as low temperatures and high ultraviolet radiation. Despite this, the man has been able to survive in the region doing scientific and operational activities for over 80 years. Consequently, various inhabited areas have been contaminated mainly with diesel. This compound is harmful, because it is composed by organic molecules such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and heavy metals (Cd, Cr and Pb). Decontamination of PAHs can be accomplished by physical, chemical and biological processes. Biological processes represent an ecological, economical and safe option that involves a minor alteration of the soil and thus is an excellent alternative for the decontamination of the Antarctic territory. To date, a large number of bacteria capable of degrading PAHs has been reported, however due to the Antarctic treaty is prohibited to enter foreign DNA and microorganisms to the mainland, so it is vital to find native bacteria that can be used in diesel bioremediation. Due to its higher solubility in water, lower toxicity to humans and structural similarities to other PAHs, the compound used as a model to isolate and study PAH degraders is phenanthrene. Based on the above, in this thesis the following hypothesis was proposed: "The presence of polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals in Antarctic soils has favored the development of phenanthrene degrading bacteria resistant to heavy metals". The overall objective of this work was to isolate and characterize Antarctic bacteria resistant to heavy metals (Cd, Cr and Pb) and assess their ability to metabolize phenanthrene. To accomplish this, Antarctic soils obtained from different areas exposed to diesel were characterized chemically and biologically. Also, phenanthrene degrading bacteria resistant to heavy metals were isolated and characterized, and the degradation mechanisms involved were studied.

Soil samples were obtained during the 49<sup>th</sup> expedition to the Antarctic continent (ECA 49), 4 soils none exposed to diesel (A0, B4, C3 and C8) and 4 soils exposed to diesel (D3, D4, E2 and E4). Soil analysis determined the presence of tri-aromatic polycyclic hydrocarbons in soil exposed to diesel, on average 1000 times more concentrated than in soils with no

exposure. Moreover, D3 and D4 soils (exposed to diesel) display a greater cadmium concentration and total lead when compared to all samples,  $\sim 30$  and  $600 \text{ mg Kg}^{-1}$ , respectively. Regarding the biological characterization, soil exposed to diesel D4, display greater biological activity and heterotrophes, a result that was directly related to PAH content (D4 soil display the highest concentration of hydrocarbons,  $\sim 30 \text{ mg Kg}^{-1}$ ). This relationship was confirmed by a soil enrichment test with phenanthrene, where it was observed that phenanthrene acts as a supplement in soils exposed to diesel.

350 environmental microorganisms were isolated from the 8 Antarctic soils, 53 of them were able to degrade phenanthrene. Three of them were selected for their high capacity to degrade the hydrocarbon. These isolates were selected through a screening developed during this thesis, based on total fluorescence spectroscopy associated to second order multivariate calibration. Selected isolates were characterized and the resistance to heavy metals was determined. In particular, strain D43FB (corresponding to *Pseudomonas flavescens*) resists  $25 \text{ mg L}^{-1}$  of  $\text{Cd}^{+2}$  and  $5 \text{ mg L}^{-1}$  of  $\text{Cr}^{+6}$ . After 7 days, this bacterium was able to degrade  $\sim 80\%$  of phenanthrene in M9 medium with the hydrocarbon as a sole carbon source. By adding  $0.025$ ,  $0.05$  and  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  of  $\text{Cd}^{+2}$  this value decreases to  $60$ ,  $26$  and  $25 \text{ mg L}^{-1}$ , respectively. Moreover, in a bioaugmentation assay of soil the isolate is capable of degrading  $\sim 75\%$  of PAH present in the terrarium. In the other hand, the capacity of this microorganism to degrade phenanthrene was associated with their ability to form biofilm and adhere to phenanthrene crystals.

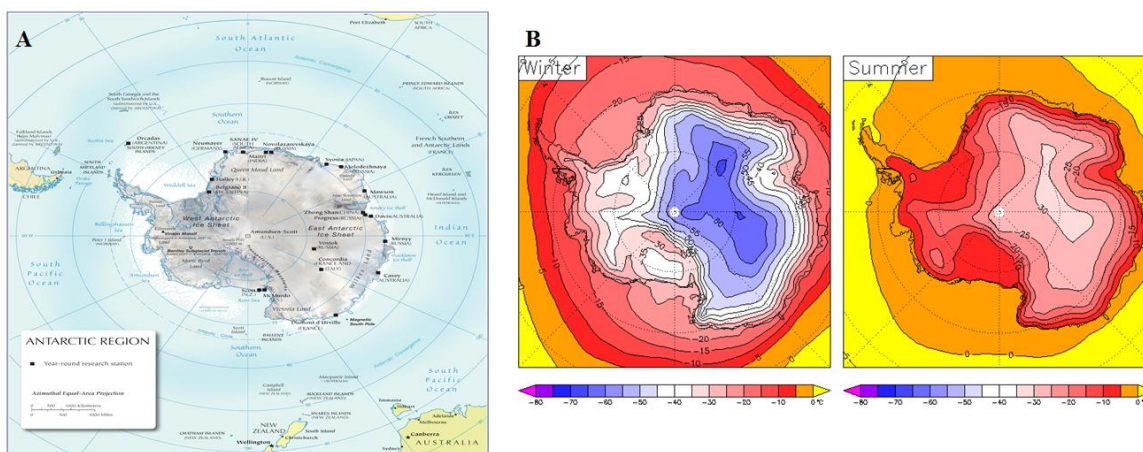
The proposed work has profound implications for bioremediation studies and potentially could represent an alternative for the decontamination of Antarctic ecosystems. The projection of this work is linked to fully elucidate the mechanism of degradation of *Pseudomonas flavescens* D43FB and continue testing bioremediation in terrariums, and so eventually complete the investigation with an *in situ* process in Antarctica.

# INTRODUCCIÓN

## Antártica

La Antártica es el cuarto continente más grande del planeta con alrededor de 14.000.000 km<sup>2</sup> de superficie y está ubicado en el polo sur del planeta, específicamente al sur del paralelo 60°. Su extremo norte se encuentra a sólo 1.000 km de Chile, mientras que las costas más cercanas de África, Tasmania, Australia y Nueva Zelanda se encuentran mucho más alejadas (**Fig. 1A**). La Antártica alberga alrededor del 80% del agua dulce del planeta siendo de gran interés para países como Chile, Alemania, Argentina, Japón, Estados Unidos, China, Noruega, Rusia, Uruguay y Reino Unido, entre otros que han establecido bases en el continente. La temperatura promedio en la superficie del continente Antártico es inferior a los 0°C, llegando en algunas regiones a -90°C (**Fig. 1B**).

Adicionalmente, la Antártica ha estado expuesta a altos niveles de radiación ultravioleta debido al agujero en la capa de ozono en esta región de la estratósfera. Estas condiciones generaron una selección que permitió la proliferación de bacterias tolerantes a bajas temperaturas y daño oxidativo mediado por especies reactivas de oxígeno (ROS) (Margesin, 2007). Estas características ambientales y geográficas hacen que los microorganismos presentes en el continente Antártico sean únicos y constituyan un tesoro genético/molecular escasamente explorado a la fecha.



**Figura 1. Mapa del territorio antártico. (A)** Mapa del continente Antártico y costas más cercanas. **(B)** Mapa de temperatura en Antártica en invierno (winter) y verano (summer).



En el continente antártico existe gran cantidad de recursos naturales, como yacimientos de carbón (los Montes Transantárticos contienen lo que podría ser el manto carbonífero más grande del mundo) y reservas de hierro, oro, cromo, antimonio, uranio, molibdeno y petróleo (Zumberge, 1979). Sin embargo, hasta el momento su explotación no ha suscitado gran interés debido al gran costo económico y potencial daño ecológico para el frágil medio ambiente local. Además, las condiciones climáticas, las capas de hielo y las restricciones acordadas en distintos tratados internacionales como el “Tratado Antártico de 1960” y el Tratado de 1991, impiden la explotación minera (Parties, 1991). El Tratado Antártico de 1960 tiene como finalidad limitar las actividades en la Antártica exclusivamente para fines pacíficos, específicamente científicos. Establece el intercambio de información, personal científico, observaciones y resultados sobre las actividades realizadas por los países signatarios. Sin embargo, no se pacta la renuncia a la reclamación geográfica y los estados reclamantes pueden continuar negociando entre sí sus diferencias territoriales, pero no pueden ampliarlas (Parties, 1960).

Este punto es de real importancia, ya que significa que las diversas naciones con interés por la Antártica deben realizar continuamente actividades que les permitan mantener la “soberanía” del país, especialmente aquellas asociadas a investigación científica. En este contexto, la investigación científica representa una forma de establecer presencia en el continente y además descubrir las riquezas que éste presenta. Las bases Chilenas permanentes en el continente Antártico son Capitán Arturo Prat, General Bernardo O’Higgins y Presidente Eduardo Frei Montalva. Entre las tres hay una población promedio de 50 personas en invierno y 100 personas en verano. Lamentablemente, el frío y la radiación UV no son los únicos factores adversos que se deben afrontar en la Antártica, durante las últimas décadas la contaminación antropogénica de metales y petróleo se ha convertido en una preocupación en algunas bases (Santos, 2005; Saul, 2005 y Kennicutt, 1992).

### **El efecto del hombre**

Una de las principales preocupaciones ambientales en la Antártica son los niveles de contaminación por petróleo de origen antropogénico. Debido a las históricas e intensas actividades realizadas por el hombre, existe una contaminación crónica por hidrocarburos

fundamentalmente en las cercanías de las bases. El petróleo es y será el combustible de mayor uso en el continente, específicamente en la Isla Rey Jorge donde por más de medio siglo barcos petroleros han transportado miles de litros de gasóleo (diesel) (**Fig. 2**). Han existido derrames al suelo y al mar, esencialmente por el traspaso de los navíos a las bases y por derrames en los tanques de almacenamiento de diesel. Durante años se han usado contenedores para almacenar el combustible y es común observar filtraciones o acumulaciones de diesel derramado en sus cercanías. Además, estos depósitos de petróleo se han ido deteriorando con el tiempo, liberando al suelo no sólo este hidrocarburo, sino también metales pesados de sus propias paredes.

Un caso reciente de contaminación sucedió durante el año 2009 en las cercanías de Bahía Fildes en la Isla Rey Jorge. En la base Rusa Bellinghausen, a dos kilómetros de Villa las Estrellas (Base Presidente Eduardo Frei Montalva), se derramaron cerca de mil litros de gasóleo al mar, generando una “mancha oleosa” de más de 100 metros que provocó enormes daños a la flora y fauna del lugar.



**Figura 2. Zonas contaminadas en Isla Rey Jorge, Antártica.** (A) Fotografía de derrame de estanque de diesel en base China. (B) Fotografías de reservorios de combustible rusos abandonados. (C) Fotografía de derrame de diesel en base militar chilena de la FACH.

El diesel se obtiene del petróleo crudo, está compuesto principalmente por hidrocarburos alcanos (parafinas) y es preferentemente utilizado en motores diesel y maquinarias pesadas por su menor costo. Los inconvenientes del petróleo y de sus subproductos como el diesel radican en que su combustión genera gases tóxicos como  $\text{CO}_2$ ,  $\text{NO}_x$  y  $\text{SO}_x$ . Mientras el dióxido de carbono y los óxidos nitrosos son gases de efecto invernadero, los óxidos de azufre producen lluvia ácida. Otro gran problema del petróleo ocurre cuando es derramado al medio ambiente, generalmente como consecuencia de filtraciones desde pozos de extracción (pudiendo llegar a napas subterráneas), derrames por fallas en el transporte, y

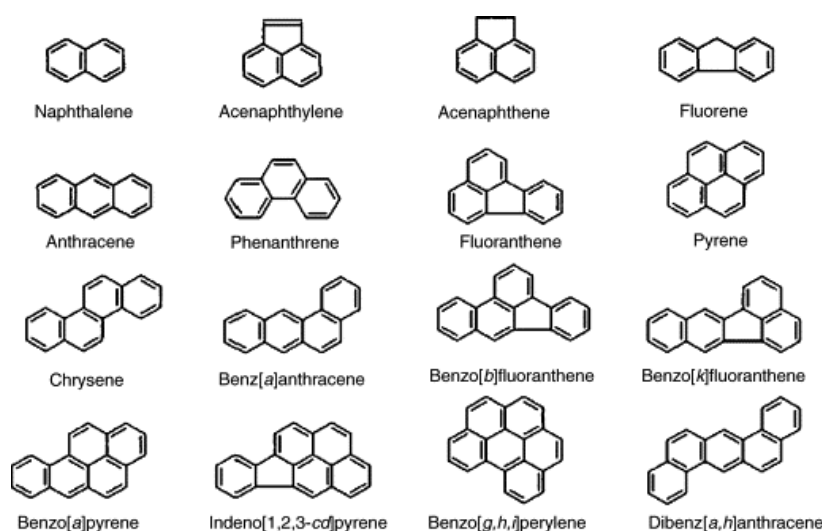
también producto de fugas naturales en el fondo del mar por filtraciones marinas (Kennicutt, 1992; Saul, 2005). Esta última contaminación es marginal en relación a la contaminación antropogénica.

No son pocos los casos de contaminación por petróleo que dañan de forma irreversible el medio ambiente. Se estima que un cuarto de galón de petróleo derramado contamina un millón de veces su volumen de agua de mar, creando un ambiente tóxico para la vida salvaje (Watson, 1985). El gasóleo es muy nocivo debido a su composición compleja, además de moléculas orgánicas contiene un porcentaje significativo de compuestos inorgánicos, entre ellos metales pesados (Calixto de Campos, 2002; Winther, 2010; Wang, 2003; Pulles, 2012 y Van der Most, 1992).

Los metales pesados presentan un alto impacto toxicológico. En microorganismos parte de su toxicidad se ha asociado a la generación de estrés oxidativo y en humanos pueden inducir el cáncer (Järup, 2003 y Türkdöğän, 2003). Está reportado que el diesel contiene altas concentraciones de cadmio, plomo y cromo, aproximadamente 5, 13 y 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Zhang, 2011; Denier van der Gon, 2009; Owamah, 2013; Adeniyi, 2001 y Sezgin, 2003). Además, se ha descrito la presencia de cobre, selenio, mercurio y zinc, los cuales son usados como aditivos o se encuentran como trazas producto del transporte, almacenamiento o extracción del hidrocarburo (Winther, 2010). Los metales y sus compuestos asociados, a diferencia de los contaminantes orgánicos, no pueden ser degradados o eliminados completamente y suelen acumularse hasta niveles perjudiciales, por lo que son de gran preocupación (Beyersmann, 2008). Respecto al diesel, no existe una composición exacta, ya que ésta depende del lugar desde donde fue extraído y no todos los pozos petrolíferos tienen el mismo petróleo crudo. Sin embargo, estudios indican que el gasóleo está compuesto por una gran cantidad de moléculas orgánicas, de las cuales ~30% corresponde a compuestos aromáticos, entre ellos hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) como fenantreno y naftaleno (cerca del 1%) (Pantoja, 1994). Los HAPs son los compuestos orgánicos más tóxicos del diesel y han sido descritos como agentes mutagénicos, teratogénicos y carcinogénicos (Armstrong, 2004; Boffeta, 1997).

## Hidrocarburos aromáticos policíclicos.

Los HAP son compuestos orgánicos altamente apolares constituidos por dos o más anillos aromáticos. Existen más de 100 HAPs y de ellos 16 son prioridad ambiental y toxicológica para la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA), entre ellos el fenantreno (**Fig. 3**). Aunque algunos factores como la toxicidad de los HAPs dependen de su estructura química, entre ellos comparten otras propiedades como su alto nivel recalcitrante ya que no se queman con facilidad y permanecen en el ambiente por mucho tiempo (Wilson, 1993).



**Figura 3. Los 16 HAPs de interés para la EPA.** Esquema de los 16 HAPs que la EPA catalogó como prioridad nacional.

En la mayoría de los microorganismos, los HAPs son tóxicos debido a la generación de estrés oxidativo. En este sentido, las bacterias son muy sensibles a bajas concentraciones de contaminantes y responden rápidamente a perturbaciones ambientales (González, 2011). Usualmente, en las comunidades microbianas expuestas crónicamente a HAPs tienden a dominar los organismos capaces de usar hidrocarburos como fuente de carbono y energía. Inclusive, en áreas sin exponer a HAPs hay fracciones de las comunidades microbianas compuestas por bacterias capaces de degradar hidrocarburos (SurrIDGE, 2009). Además, el gasóleo contiene metales pesados, los cuales son reconocidos como altamente tóxicos, además de generar estrés oxidativo en varios organismos (Van der Most, 1992 y Järup,

2003). Aunque se presentan naturalmente en la corteza terrestre, las actividades antropogénicas han introducido una gran cantidad de estos elementos al ambiente antártico.

El estudio de metales pesados en las bases es incipiente, por lo que la comprensión de los procesos de contaminación local relacionados con metales pesados en suelos y sedimentos es particularmente escasa. Estudios en la base Ferraz y King Sejong de la Isla Rey Jorge evidenciaron una alta presencia de cadmio, cromo y plomo, entre otros metales, probablemente provenientes de la contaminación por petróleo (Santos, 2005 y Choi, 2012). Algunas bacterias poseen capacidad para adsorber y transformar metales (Ej: reacciones RedOx), por lo que representan herramientas atractivas para biorremediar sitios contaminados. Específicamente, los metales pueden afectar a la bacteria provocando estrés oxidativo, lo que disminuye el crecimiento bacteriano al dañar membranas, proteínas, inhibiendo o inactivando enzimas y/o dañando el ADN (Thavamani, 2013, González, 2011 y Riis, 2002). Además, pueden afectar el metabolismo de la bacteria como se ha reportado en la degradación de HAPs por microorganismos en presencia de cromo (Ibarralozza, 2011).

Es entonces de gran complejidad la contaminación por diesel, ya que tiene un doble factor de toxicidad dado por sus constituyentes inorgánicos como metales pesados y por otra parte por los compuestos orgánicos (Türkdoğan, 2003 y Ling, 2004). Por el uso del diesel en la Antártica es urgente determinar los niveles reales de contaminación, los efectos de este en el ambiente y en base a esta información plantear estrategias que permitan descontaminar aquellas zonas expuestas, principalmente en las bases donde la población está en constante interacción con estos contaminantes. En este sentido, existen tres procesos principales para la descontaminación de HAPs: i) transferencia, donde no existe alteración de la estructura, sólo relocalización del contaminante, ii) secuestro, donde se reubica los HAPs en contenedores para almacenamiento a largo plazo sin alterar la estructura de éstos y iii) degradación, donde se altera la estructura de los anillos de los HAPs de manera química o biológica (Wick, 2011).

El tratamiento biológico de suelos contaminados se basa en la degradación metabólica de HAPs por organismos. Es una opción eficiente, económica y adaptable, en la que se degradan los contaminantes de manera segura y es menos dañina para los suelos (Wick, 2002). A la fecha, se han descrito algunos géneros de microorganismos como potenciales

degradadores de diesel, tales como *Acidovorax*, *Alcaligenes*, *Anthrobacter*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus* y *Sphingomonas* (Wick, 2011) (**Tabla 1**).

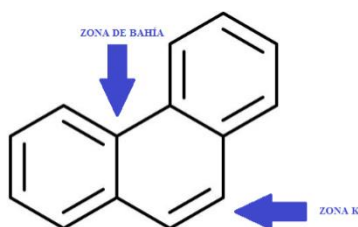
Genero	Hidrocarburo aromático policíclico reportado que degrada							
	Antraceno	Benceno	Benzo[a]pireno	Fenantreno	Fluoreno	Fluoranteno	Naftaleno	Pireno
<i>Acidovorax</i>	X			X				
<i>Alcaligenes</i>				X	X	X		
<i>Anthrobacter</i>		X		X			X	
<i>Mycobacterium</i>			X	X				X
<i>Pseudomonas</i>			X	X	X	X		
<i>Rhodococcus</i>			X					X
<i>Sphingomonas</i>	X			X		X		

**Tabla 1. Microorganismos degradadores de HAPs.** La tabla indica géneros bacterianos capaces de utilizar HAPs como única fuente de carbono (adaptado de Wick, 2011).

A la fecha, el modelo más utilizado para el aislamiento y estudio de cepas que degraden HAPs consiste en usar fenantreno como única fuente de carbono (Seo, 2009).

### Fenantreno

El fenantreno es uno de los HAPs de mayor concentración en el diesel, está constituido por una fusión de tres anillos de benceno y corresponde a un hidrocarburo policíclico aromático de bajo peso molecular ( $178 \text{ g mol}^{-1}$ ) (**Fig. 4**).



**Figura 4. Molécula de fenantreno  $C_{14}H_{10}$ .** El fenantreno es un HAP de 3 de anillos aromáticos compuesto de 14 carbonos. Presenta 2 estructuras clásicas de HAPs de mayor tamaño, la zona K y la zona de bahía. Su solubilidad es  $1.6 \text{ mg L}^{-1}$ . Presenta una presión de vapor de  $0.00012 \text{ hPa}$  ( $20^\circ\text{C}$ ).

Junto al naftaleno, es uno de los HAPs con mayor solubilidad en agua, es isómero del antraceno y es reconocido como componente muy tóxico para los organismos acuáticos y bastante nocivo para el medio ambiente (Djomo, 2004). La toxicidad del fenantreno está relacionada principalmente con la generación de estrés oxidativo en varios organismos produciendo ROS, principalmente radical hidroxilo ( $\text{OH}\cdot$ ), el cual debido a su alta reactividad genera múltiples efectos nocivos en la célula (Yin, 2007). En este sentido, las

bacterias capaces de degradar fenantreno tienen mecanismos de defensa contra el estrés oxidativo que adicionalmente les permiten disminuir los efectos dañinos de los hidrocarburos (Peng, 2008). El efecto del fenantreno se relaciona con el resto de los HAPs, donde su biotransformación se basa en la oxidación de un anillo aromático, generalmente mediada por citocromos, NADH y oxígeno (Seo, 2009). El fenantreno al igual que varios HAPs es capaz de formar un grupo diol-epóxido responsable del carácter cancerígeno de estos compuestos (Grover, 1970).

A pesar de la gran similitud estructural, el fenantreno presenta mayor solubilidad y menor toxicidad para humanos que otros HAPs (Di Toro, 2007). Sumado a esto, la degradación de fenantreno puede ser seguida cualitativamente por un cambio de coloración del medio de cultivo. En consecuencia, el fenantreno representa un sustrato ideal para predecir microorganismos que posean la capacidad de degradar hidrocarburos policíclicos. A la fecha se ha descrito numerosas bacterias degradadoras de HAPs, incluso algunas pueden utilizarlos como única fuente de carbono. En particular, las vías catabólicas del naftaleno, fenantreno y antraceno se han investigado con mayor profundidad (Peng, 2008). En términos generales, los mecanismos de biodegradación requieren la presencia de oxígeno molecular para iniciar el ataque enzimático de los anillos (Cerniglia, 1984).

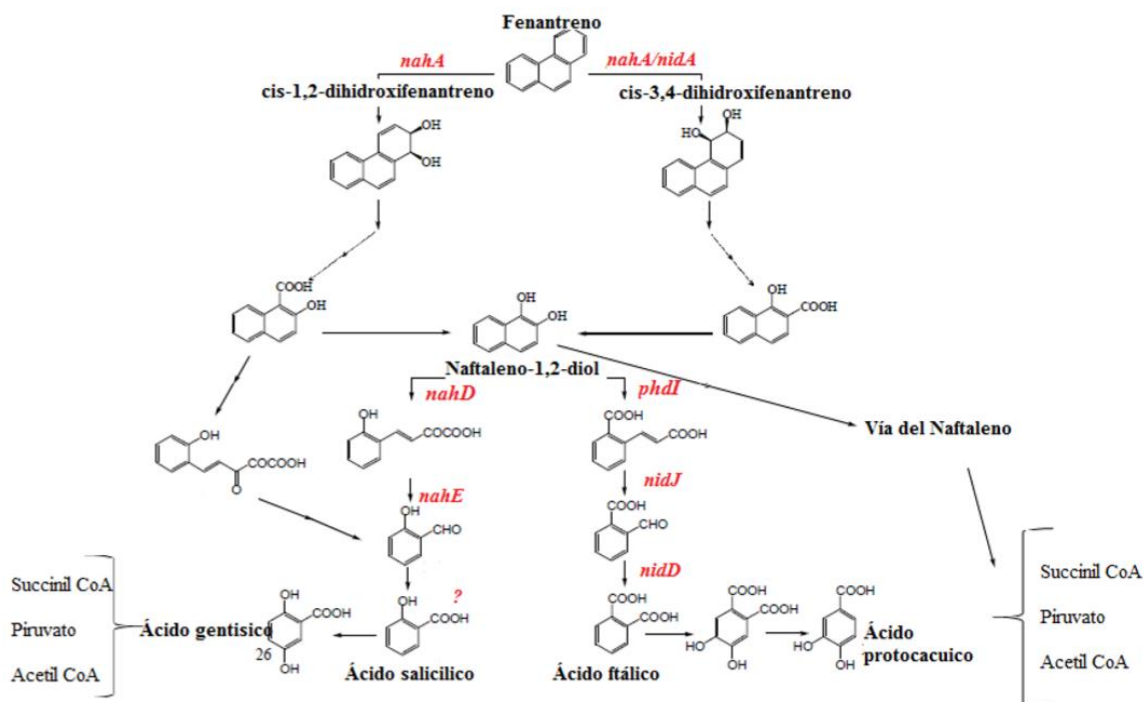
### **Estrategias de biodegradación**

Entre los mecanismos de degradación del fenantreno existen algunas rutas metabólicas conservadas. El primer paso es catalizado por la enzima dioxigenasa y corresponde a la oxidación de arenos para generar cis-dihidrodiolés (Cerniglia, 1984). Estos intermediarios dihidroxilados son escindidos por *ring-cleaving dioxygenases* a través de las vías de orto o meta escisión, que generan intermediarios centrales como ácido salicílico o ftálico, los cuales son degradados a moléculas más simples como piruvato, acetaldehído, succinato y/o acetil coenzima A (Seo, 2009). El sistema naftaleno dioxigenasa es particularmente útil para la oxidación de HAPs bi y tri cíclicos como naftaleno, fenantreno y antraceno (Peng, 2008). Este es un sistema enzimático de varios componentes que incluye generalmente una NADH oxidorreductasa, una ferredoxina y una oxigenasa (Resnick, 1994). Específicamente, estas enzimas se componen de dos o tres proteínas solubles que interactúan para formar una cadena de transporte de electrones que los transfiere desde los

nucleótidos reducidos (NAD(P)H) a través de flavina y centros redox Rieske [2Fe-2S] a una dioxigenasa terminal. Las dioxigenasas oxidan los hidrocarburos aromáticos y compuestos relacionados a cis-areno dioles. Estas enzimas utilizan un núcleo de hierro no hemo mononuclear para catalizar la adición de dióxígeno a sus respectivos sustratos. El sitio activo de estas enzimas está ubicado en la subunidad alfa.

Por otra parte, los genes catabólicos del naftaleno (*nah*) se organizan en dos operones: i) el operón *nal* que codifica las enzimas de la ruta que participan en la conversión de fenantreno a salicilato y ii) el operón *sal* que codifica las enzimas de la ruta que participan en la conversión de salicilato a piruvato y acetil coenzima A (Yen, 1982). En *Pseudomonas* han sido reportadas varias secuencias nucleotídicas de la ruta de degradación del fenantreno hasta salicilato, codificadas por los genes *ndo*, *nah*, *pah* y *dox* (Peng, 2008). Respecto a la degradación de este intermediario, en *P. putida* G7 y *P. stutzeri* AN10, se determinaron 11 genes organizados en el operón *nahGTHINLOMKJY*. Interesantemente, *nahY* no es un gen catabólico sino un gen relacionado con quimiotaxis (Boronin, 2010). Otra cepa degradadora es *Burkholderia* RPO007, que presenta una variación en la organización génica y similitud de secuencias en comparación con otros genes de catabolismo de HAPs (Laurie, 1999). También se han descrito cepas de *Sphingomonas* que degradan fenantreno a través de esta vía común descrita en otras bacterias Gram negativo (Pinyakong, 2003) (**Fig. 5**). En particular, una de estas cepas de *Sphingomonas* presenta un gran plásmido responsable de sus capacidades degradadoras de compuestos xenobióticos (Kim, 1996). La catabolización de dihidrodioles usualmente converge en el intermediario naftaleno-1,2-diol, a través de la dioxigenación de las posiciones 1,2; 3,4 ó 9,10 del fenantreno. Existen rutas predominantes sobre otras, como en *Burkholderia* sp. C3 donde la acción dioxigenasa en la posición 3,4 es dominante desde los primeros días de incubación con fenantreno. Ríto abajo de la ruta, el naftaleno-1,2-diol se puede degradar por escisiones en las posiciones orto o meta del anillo, generando ácido salicílico y ftálico, respectivamente. Por ejemplo *Burkholderia* sp. C3 presenta preferencia por la escisión orto, y por el contrario, la cepa *Arthrobacter* sp. P1-1 degrada fenantreno a través de la escisión meta de los dihidrodioles (Seo, 2009).

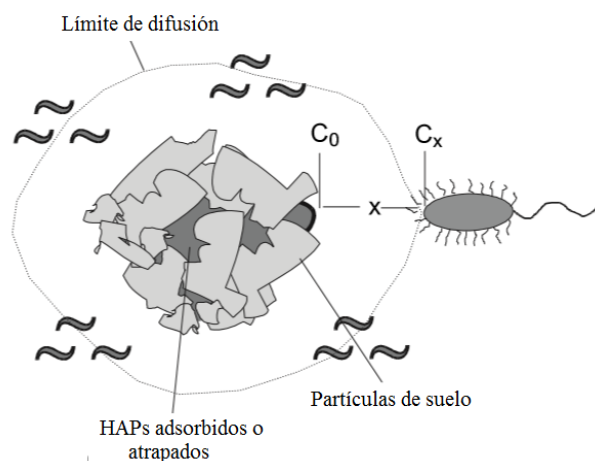




**Figura 5. Esquema de las distintas rutas de metabolismo del fenantreno descritas en bacterias degradadoras** (Seo, 2009; Peng, 2008, Seo, 2007, modificado). El fenantreno es sustrato de la enzima dioxigenasa, generando cis-1,2- dihidroxifenantreno y cis-3,4-dihidroxifenantreno por la enzima 1,2-dioxigenasa o 3,4-dioxigenasa, respectivamente. En ambos casos siguen una serie de reacciones enzimáticas que convergen en el metabolito naftaleno-1,2-diol. Desde este intermediario se ha descrito 3 rutas distintas; i) la vía del naftaleno, ii) orto escisión del anillo hasta la formación de ácido salicílico, y iii) meta escisión del anillo para llegar a ácido ftálico. En los tres casos, es posible generar metabolitos centrales como succinil CoA, piruvato y acetil CoA.

La cinética de degradación de HAPs varía según su solubilidad en agua. Por ejemplo, en *Mycobacterium* sp. AP1 se observa una depleción total de fenantreno luego de 30 días. Sin embargo, esta cepa no es capaz de degradar significativamente pireno (HAP de alto peso molecular) en este mismo tiempo (Johnsen, 2005). El aumento de área superficial de fases líquidas no acuosas afecta negativamente la biodegradación debido a las restricciones cinéticas para el proceso de disolución. En este contexto, las bacterias han desarrollado estrategias para mitigar este fenómeno donde la solubilidad es una limitante en la gradiente de HAPs (Wick, 2002). Siguiendo la ley de Fick en este sistema, el flujo de HAPs es inversamente proporcional a la distancia entre la bacteria y los cristales de hidrocarburos, en *P. putida* y *Mycobacterium* esta distancia se disminuye con la formación de biopelículas

sobre los HAPs, siendo una forma eficiente de aumentar el flujo de los hidrocarburos a las células (**Fig. 6**). Esto se da por la pequeña distancia entre las células de la biopelícula y los HAPs, lo que favorece fuertemente la transferencia difusiva de masa de HAP a las células por el aumento de la gradiente de concentración acuosa (Johnsen, 2007).



**Figura 6. Esquema de bacteria degradadora de HAPs creciendo cerca de suelo con fenantreno adsorbido.**  $C_0$  corresponde a la concentración de HAP en la superficie de la partícula,  $C_x$  es la concentración en las células y  $x$  corresponde a la distancia de la trayectoria de difusión (Johnsen, 2007).

Otro método usado por las bacterias para aumentar el influjo de HAPs, independiente a la formación de biopelículas, corresponde a la adhesión a sólidos que contienen HAPs. En el caso de la cepa de *Mycobacterium* LB501T, este proceso depende de modificaciones de la membrana en respuesta a antraceno sólido, cambiando el perfil del ácido micólico lo que incrementa la adhesión a la superficie hidrofóbica (Wick, 2002). Al estudiar la adhesión a fenantreno y otros HAPs por cepas de *Sphingomonas*, *Mycobacterium* y *Nocardia* sp. se concluyó que la adhesión a cristales y la formación de biopelículas es un proceso asociado a la degradación ubicuo entre las bacterias degradadoras de estos compuestos para superar las limitaciones de transferencia de masa en condiciones de poca solubilidad y alta adsorbibilidad de HAPs (Johnsen, 2005). Otra estrategia de los microorganismos que favorece la degradación de fenantreno es la capacidad de producir y liberar bioemulsificadores o biosurfactantes. Los biosurfactantes son moléculas anfipáticas pequeñas, capaces de aumentar la solubilidad de algunos hidrocarburos. Los biosurfactantes forman micro emulsiones donde las micelas generan una interfase agua-

hidrocarburo que aumenta el área superficial de sustrato y el flujo metabólico del HAP, favoreciendo la biodisponibilidad del hidrocarburo (Peng, 2008). En otros términos, las micelas de biosurfactantes influyen en la solubilidad, la difusión y área superficial disponible, además de afectar la disolución y desorción de HAPs (Volkering, 1998). Específicamente, en *P. aeruginosa*, *Mycobacterium* y *Nocardia* se ha descrito la producción de biosurfactantes que aumentan la solubilidad y metabolismo de fenantreno. A la fecha no se ha descrito ninguna *Sphingomonas* que produzca biosurfactante, por lo que no se considera una estrategia esencial y conservada dentro de las bacterias (Johnsen, 2004). Por otro lado, se ha descrito que la presencia de algunos metales en concentraciones subletales podría aumentar la acción de los surfactantes sobre el fenantreno y otros HAPs (Santos, 2008).

Finalmente, la quimiotaxis es otra estrategia que favorece la biodegradación de fenantreno y otros HAPs. Esta estrategia ha sido descrita en *Pseudomonas*, *Mycobacterium* y *Sphingomonas*. En particular, el grupo de Coppotelli y cols. en el 2009 determinó que en *Sphingomonas* la motilidad ayuda a aumentar la biodisponibilidad de HAPs (Coppotelli, 2009). En *Pseudomonas* RKJ1 los genes encargados de la quimiotaxis de naftaleno se encuentran en plásmidos y algunos de estos genes son homólogos a genes encargados de la motilidad flagelar en otras bacterias. Además, se sabe que la proteína NahY actúa como quimiorreceptor (Boronin, 2001). Otro plásmido, pRKJ1, al ser transferido a *P. putida* KT2442 permitió la quimiotaxis y degradación de fenantreno por parte de esta cepa (Samanta, 1999). Se presume que esta característica hace que los HAPs estén más disponibles para las bacterias; sin embargo, el mecanismo molecular aún no ha sido dilucidado.

De este modo, la suma de las estrategias planteadas, más aquellas que posiblemente aún no han sido descritas, permiten la degradación de fenantreno por bacterias. Así, el correcto entendimiento de los mecanismos de degradación de HAPs es crucial para el desarrollo de procesos eficientes de biorremediación de suelos contaminados.

Por último, no basta sólo una adecuada selección de la fuente de carbono para obtener una cepa con potencial biotecnológico. Es de vital importancia el contexto ambiental en donde las cepas son aisladas. Los microorganismos usados en biorremediación normalmente se

desempeñan de mejor manera en condiciones similares a las de su sitio de origen, debido a variables como la temperatura, pH, nutrientes, humedad, biodiversidad y presencia de tóxicos como metales pesados. De este modo, la caracterización química y biológica de los suelos contaminados con petróleo es un paso fundamental que permitirá determinar las condiciones que favorecen la metabolización de contaminantes *in situ*, fenómeno que en el caso de Antártica resulta de especial interés por las características especiales del continente y debido a lo poco estudiado de la contaminación de estas zonas (Bamforth, 2005 y Margesin, 2007).

En el caso específico de la Antártica, las bajas temperaturas y la alta radiación UV del continente sugieren el uso de cepas nativas para la degradación de fenantreno. Adicionalmente, el tratado Antártico señala la imposibilidad de ingresar al continente microorganismos o ADN foráneo. En consecuencia, las cepas previamente caracterizadas no se pueden ocupar en un potencial tratamiento en Antártica. En este sentido, el escenario ideal es el uso de una cepa nativa aislada de zonas contaminadas con petróleo en la Antártica para favorecer un futuro proceso de bioremediación *in situ*.

## **HIPÓTESIS**

La presencia de hidrocarburos aromáticos policíclicos y metales pesados en suelos antárticos ha favorecido el desarrollo de bacterias degradadoras de fenantreno resistentes a metales.

### **OBJETIVO GENERAL**

Aislar y caracterizar bacterias antárticas resistentes a metales pesados (Cd, Cr y Pb) y evaluar su capacidad de metabolizar fenantreno.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- i. Caracterizar química y biológicamente muestras de suelos antárticos expuestos y sin exponer a diesel.
- ii. Aislar y caracterizar bacterias degradadoras de fenantreno resistentes a metales.
- iii. Dilucidar los procesos asociados a la degradación de fenantreno.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### MATERIALES

<b>Insumo</b>	<b>Proveedor</b>
Acetonitrilo	Merck
Hexano	Merck
Estándar de fenantreno	Sigma Aldrich
Estándar de benzapireno	Sigma Aldrich
Cloruro de cadmio	Sigma Aldrich
Dicromato de potasio	Sigma Aldrich
Acetato de plomo	MERCK
Cloruro de 2, 3, 5-trifeniltetrazolium	Winkler
Acetona	Merck
Extracto de levadura	BD
Peptona	BD
Casaminoácidos	BD
Glucosa anhidra	ISN
Almidón soluble	ISN
Piruvato de sodio	Winkler
Fosfato de potasio di básico	Winkler
Sulfato de magnesio hepta hidratado	Winkler
Fosfato de potasio mono básico	Winkler
Cloruro de sodio	Labtec
Cloruro de amonio	Merck
Agar-agar	Merck
Fenantreno	Merck
Cristal violeta	Winkler
Safranina	Winkler
API 20 NE	API
Metanol	Merck
Peróxido de hidrógeno	Merck
PMSF	Calbiochem
Bradford	Biorad
Diesel	Petrobras
Hyper ladder (estándar de peso molecular)	Fermentas
dNTP	Fermentas
Cloruro de magnesio	Fermentas

Taq polimerasa	Fermentas
Gel Red	Biqtium
Partidores	IDT-DNA
E.Z.N.A. mini prep Kit	OMEGA Bio-Tek

**Tabla 2. Reactivos utilizados.**

### **Cepas bacterianas**

En este trabajo se utilizaron como controles experimentales las cepas *E. coli* BW y *P. aeruginosa* PAO1, obtenidas del laboratorio de microbiología molecular del Dr. Claudio Vasquéz Guzmán de la Universidad de Santiago de Chile (USACH).

### **Partidores**

Para la amplificación del gen 16S rDNA se utilizaron los partidores:

27 F:            5'AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG'3

1492R :        5'CGG TTA CCT TGT TAC GAC TT'3

## MÉTODOS

### Selección de suelos

Para la realización de esta tesis se utilizaron muestras de suelos provenientes de la 49° Expedición Científica Antártica (ECA 49), obtenidas por el investigador Juan Monrás Charles apoyado por el proyecto INACH T\_19 adjudicado por el Dr. José Pérez Donoso. Las muestras fueron tomadas en las Islas Shetland del Sur (62°10 S, 58°49 W), desde el horizonte superficial del suelo. Se eligieron 4 suelos no expuestos a diesel (A0, B4, C3 y C8) y 4 suelos expuestos (D3, D4, E2 y E4).

### Análisis estadístico y matemático

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa GraphPad Prism v5.0. El análisis de ANOVA de una vía se utilizó para establecer las diferencias significativas entre más de dos grupos utilizando un  $p < 0,05$ . El análisis de Tukey se utilizó para comparar diferencias entre todos los grupos.

La predicción algorítmica para la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos se realizó con el programa MATLAB (The MathWorks Inc 2008), con los algoritmos “análisis paralelo de factores” (PARAFAC) y “mínimos cuadrados parciales desdoblados con bilinearización de residuos” (U-PLS/RBL). Ambos algoritmos fueron implementados utilizando la interface gráfica MVC2.

## 1. MÉTODOS DE ANÁLISIS QUÍMICO Y BIOLÓGICO DE SUELOS

### Determinación de pH

El pH se determinó resuspendiendo 1 gramo de suelo con 10 mL de agua destilada, luego de decantar por 5 min se utilizó un electrodo de vidrio y se registró el pH del sobrenadante (Lierop, 1977).

### Determinación de HAPs triaromáticos

El análisis cuantitativo se realizó siguiendo un protocolo descrito por Alarcón y cols. (2013) mediante espectroscopía de fluorescencia total con análisis multivariado de datos. La extracción de compuestos apolares se realizó a partir de 1 gramo de suelo, al que se agregó 5 mL de hexano y 1 mL de una mezcla de acetonitrilo:agua (70:30). La extracción



fue asistida por microondas con un programa de 250 W por 2 min, 750 W por 10 min y posteriormente se enfrió por 10 min. Se tomó el volumen de hexano con una pipeta Pasteur y se enrazó a 5 mL. Finalmente, se determinó los espectros de fluorescencia total (emisión de 220 a 400 nm cada 5 nm y excitación de 324 nm a 550 nm cada 2 nm) los que fueron pre-tratados para eliminar los efectos de fluorescencia Rayleigh y armónico.

Posteriormente, estas matrices de excitación-emisión fueron analizadas mediante el software MathLab para predecir las concentraciones de fenantreno en los extractos de suelo. Para ello, se empleó los métodos PARAFAC y U-PLS/RBL. El primero es un análisis cualitativo y cuantitativo, con el que se puede predecir el espectro de fluorescencia de los analitos dentro de una solución compleja. PARAFAC es capaz de tomar los valores de las matrices de excitación-emisión y extraer los espectros de los fluoróforos presentes junto con sus concentraciones relativas empleadas para su cuantificación (considerada como una cromatografía virtual). UPLS/RBL es una herramienta para análisis cuantitativo que predice con mayor flexibilidad que PARAFAC, pero no entrega información cualitativa de los compuestos, y que en este caso evidenció una buena predicción. Las rutinas para realizar dichos análisis se encuentran disponibles en internet <http://www.models.kvl.dk/algorithms> al igual que la interface gráfica MVC2 usada (<http://www.chemometry.com>). Anteriormente se realizó un proceso de calibración y validación del sistema.

Para poder utilizar esta metodología, se evaluó la proporcionalidad entre la intensidad de fluorescencia y la concentración de fenantreno, se descartó el efecto matriz del medio y el filtro interno. Posterior a una validación con concentraciones conocidas, se determinó que este nuevo método tiene un error de predicción menor al 10%, siendo un valor aceptable para matrices complejas.

### **Cuantificación de metales pesados**

La cuantificación se realizó por ICP-masa, a través de un servicio comercial de la Comisión Chilena de Energía Nuclear (CChEN).

### **Determinación de actividad biológica total a distintas temperaturas**

La determinación se realizó siguiendo el protocolo descrito por Casida (1977). En un vial ámbar se agregó por cada gramo de suelo 160 µL de TTC al 3% y 400 µL de agua destilada estéril, se incubó 1 semana a 8°C, 18°C o 28°C. Como control se utilizó un vial sin muestra de suelo. Posteriormente, se agregó 2 veces 1600 µL de metanol para extraer el TPF generado. Tras esto, se centrifugó a 10000 RPM por 5 min, se rescató el sobrenadante y se midió la absorbancia a  $\lambda$  485nm, la cuantificación se realizó a partir de una curva de calibración de TPF en metanol ( $R^2=1.00$ , ecuación de la recta  $y = 0.0415 + 0.00629x$ ).

### **Conteo de heterótrofos a distintas temperaturas**

La determinación de heterótrofos se realizó siguiendo el protocolo de Pepper IL (2004) con algunas modificaciones. Se resuspendió 1 gramo de suelo en 1 mL de agua destilada estéril, se agitó por 1 h a 20°C y se realizaron diluciones seriadas en una microplaca de 96 pocillos. Posteriormente, se sembró por micro gota en medio sólido R2A agar, se incubó por 48 h a temperatura constante (8, 18 o 28°C) y se determinaron las unidades formadoras de colonia por gramo (UFC g<sup>-1</sup>).

### **Aislamiento de bacterias ambientales**

El aislamiento de microorganismos ambientales se realizó a partir de los suelos expuestos y sin exponer a diésel. Se tomaron 500 mg de cada muestra (A0, B4, C3, C8, D3, D4, E2 y E4), se enriquecieron con 200 mg de fenantreno estéril y se resuspendió en 1 mL de agua destilada estéril, se sacudió vigorosamente y se incubó a 8, 18 o 28°C. Tras 72 h se sembró en medio R2A agar y se incubó a 8, 18 y 28°C, respectivamente. Luego del crecimiento en la placa, se purificó cada aislado (según morfología) por siembra en agar.

## **2. MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS**

### **Medio de cultivo**

#### Medios líquidos

Los medios Reasoner's 2 (R2A) y M9 se usaron para el crecimiento de bacterias ambientales, *E. coli* y PAO1. El medio R2A se preparó agregando a 1 litro de agua

destilada extracto de levadura 0,05%, casaminoácidos 0,05%, peptona 0,05%, glucosa anhidra 0,05%, almidón soluble 0,05%, piruvato de sodio 0,03%, fosfato de potasio di básico 0,03% y sulfato de magnesio hepta hidratado 0,005%. El pH fue ajustado a 7.0 y se esterilizó en autoclave.

El medio M9 se preparó agregando a 1 litro de agua destilada fosfato de sodio di básico 0.06%, fosfato de potasio mono básico 0.03%, cloruro de sodio 0.005% y cloruro de amonio 0.01%. El pH fue ajustado a 7.0. Se esterilizó en autoclave. Posteriormente, se agregó cloruro de calcio 0.001%, sulfato de magnesio 0.012% y glucosa anhidra 0.2% filtrados a 0.45 micras.

#### Medios sólidos

A medios R2A o M9 se les agregó agar a una concentración final de 2% p/v y se esterilizó en autoclave. Para los ensayos de motilidad, la concentración final fue 0.5% p/v y 0.25% p/v para *swarming* y *swimming*, respectivamente.

#### **Selección de bacterias degradadoras de fenantreno**

Los aislados ambientales purificados fueron inoculados en medio líquido R2A, luego de 24 h se centrifugaron a 7000 RPM por 5 min y se lavó el sedimento bacteriano 2 veces con amortiguador fosfato 25 mM. Finalmente, se realizó un inóculo 1:1000 en medio mínimo M9 en un tubo eppendorf con fenantreno 2.000 ppm como única fuente de carbono. La adición de fenantreno estéril al tubo se realizó a partir de una solución de acetonitrilo con fenantreno agregando un volumen determinado de solución orgánica, se esperó a que se volatilice el solvente. Tras esto, se irradió con luz UV para esterilizar y se sonicó exteriormente el tubo para resuspender el fenantreno impregnado en las paredes y posteriormente se realizó el inóculo. Luego, se agitó por 5 días a temperatura ambiente hasta evidenciar un cambio de coloración del medio desde transparente a ocre. Los aislados que evidenciaron un cambio de color fueron seleccionados y se les realizó una extracción líquido-líquido, agregando 2 volúmenes de hexano y se sacudió vigorosamente por 1 min 3 veces en un vórtex. Tras esto, se enrazó a 10 mL de hexano y se midió fluorescencia total (misma metodología utilizada en la determinación de HAPs). Finalmente se seleccionaron

los aislados bacterianos por determinación computacional multivariada a partir de los espectros de fluorescencia.

### **Cultivo de bacterias ambientales**

Para los experimentos posteriores de cultivo bacteriano se tomaron colonias individuales y se inocularon en 1 mL medio líquido R2A, se crecieron durante la noche a 28°C con agitación constante a 150 RPM. Como control se incubó 1 mL de medio líquido sin inóculo. Posteriormente, se realizó un inóculo 1:100 en medio líquido R2A o M9 y se crecieron hasta una D.O.<sub>600nm</sub> de 0,1 U.A.

### **Identificación de microorganismos ambientales**

Para identificar las bacterias seleccionadas se realizó una PCR de colonia usando partidores para amplificar el gen del 16s rDNA (partidores 27F y 1492R, se observa una amplificación de aprox. 1500 pb). Cada templado se obtuvo desde un cultivo en medio líquido R2A crecido por 24 h a 28°C con agitación constante. El producto de PCR se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 2%. Los amplificados fueron secuenciados por un servicio comercial de Macrogen y posteriormente las secuencias fueron analizadas para la identificación de las bacterias.

### **Batería bioquímica**

El ensayo de batería bioquímica se realizó siguiendo las instrucciones de manufactura de API<sup>®</sup>. Se tomó 1-4 colonias desde placas frescas (aprox. 24 h de crecimiento) y se resuspendieron en una ampolla con NaCl 0.85%. Posteriormente, se agregó en los pocillos del ensayo. Para las pruebas de asimilación de D-glucosa, actividad arginina hidrolasa y actividad ureasa se agregó aceite mineral. Finalmente, se incubó por 24 h a 28°C y se compraron los resultados con una base de datos online (<http://www2.fiu.edu/~makemson/MCB3020Lab/API20neIdentTable>).

### **Determinación de temperatura óptima de crecimiento**

La temperatura óptima de crecimiento se determinó utilizando la metodología de Gallardo y cols (2014). A cultivos bacterianos crecidos en R2A a 4, 8, 18 y 28°C en D.O.<sub>600nm</sub> 0,1 se les realizó dilución seriada y se sembró por micro gota en placa con medio R2A agar.

Posteriormente, se incubó por 72 h a 4, 8, 18, 28 y 37°C y se reportaron las UFC mL<sup>-1</sup>. Tras este ensayo, los experimentos con las cepas ambientales se realizaron a 28°C.

### **Determinación de tiempo inhibitorio mínimo de exposición a luz UV**

La resistencia a radiación UV se determinó a partir de un cultivo bacteriano a D.O.<sub>600nm</sub> 0,1 el cual se sembró en líneas en placas Petri con medio M9 agar, estas fueron expuestas por 0, 30, 60, 90, 120, 180 y 240 seg a luz UV, proveniente de una lámpara posicionada 70cm sobre las placas. Posteriormente, se incubó a 28°C y se reportó el crecimiento en medio sólido. El tiempo inhibitorio mínimo de exposición a luz UV necesario para detener el crecimiento total de las bacterias se denominó MIT.

### **Ensayo catalasa y peroxidasa**

El ensayo de presencia de actividad catalasa se realizó centrifugando un cultivo bacteriano a D.O.<sub>600nm</sub> 0,1 a 7000 RPM por 5 min y se agregó peróxido de hidrógeno 30% v/v y se reportó la formación de burbujas.

La actividad peroxidasa se determinó modificando un protocolo descrito por Chen y cols. (2003). A partir de un cultivo de 5 mL a D.O.<sub>600nm</sub> 0,1, se agregó fluoruro de fenilmetilsulfonilo o PMSF (inhibidor de proteasa) y se homogenizó con un homogenizador FastPrep MP por 3 min. Tras centrifugar y desechar el sedimento bacteriano, se utilizó 200 µL de extracto en 1800 µL de peróxido de hidrógeno (1, 5, 10, 15 y 20 mM) y se midió la absorbancia por 2 min. Se determinó la desaparición de peróxido de hidrógeno correlacionando la absorbancia a 240 nm y la concentración del sustrato ( $r^2 = 0,9971$ , ecuación de la recta  $y = 0.05x - 0.01$ ) y se normalizó por miligramos de proteína (Bradford, 1976).

### **Cinética de crecimiento y degradación con fenantreno como única fuente de carbono en presencia de cadmio**

La cinética de crecimiento con fenantreno se determinó a partir de un cultivo bacteriano crecido por 24 h en medio líquido R2A. Para asegurar que el fenantreno fuese la única fuente de carbono, se centrifugó a 7000 RPM por 5 min y se lavó el sedimento bacteriano 2 veces con amortiguador fosfato 25 mM. Posteriormente, se realizó un inóculo 1:1000 en medio mínimo M9 con fenantreno estéril a 500 mg L<sup>-1</sup> y concentraciones crecientes de

CdCl<sub>2</sub> (0, 0.025, 0.05, 0.5 y 5 mg L<sup>-1</sup>). Se incubó con agitación constante a 28°C por 168 h (7 días) y cada 24 h se contabilizó el número de UFC mL<sup>-1</sup>. A cada muestra de la cinética se le realizó una extracción líquido-líquido con hexano, agregando 3 veces 2 volúmenes de solvente y sacudiendo vigorosamente por 1 min. Finalmente, se determinó la concentración de fenantreno remanente analizando la fluorescencia total por determinación computacional multivariada.

### **Cinética de crecimiento con diesel como única fuente de carbono**

La cinética de crecimiento con diesel se determinó a partir de un cultivo bacteriano crecido 24 h en medio líquido R2A, se centrifugó a 7000 RPM por 5 min y se lavó el sedimento bacteriano 2 veces con amortiguador fosfato 25 mM. Posteriormente, se realizó un inóculo 1:1000 en medio mínimo M9 con diesel 0,2% p/v como única fuente de carbono. Finalmente, se incubó con agitación constante a 28°C por 168 h (7 días) y cada 24 h se contabilizó el número de UFC mL<sup>-1</sup>.

### **Concentración inhibitoria mínima**

La concentración inhibitoria mínima (MICs) fue determinada usando el protocolo descrito por Elías et al. (2012). Soluciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, CdCl<sub>2</sub>, K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> y Pb(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> a 2, 100, 8 y 20mg L<sup>-1</sup>, respectivamente fueron preparados en 300µL de medio M9. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas en una microplaca de 96 pocillos y se inocularon con 5 µL de cultivo bacteriano a una D.O.<sub>600nm</sub> ~0.05. Las microplacas se incubaron a 28°C y se registró su crecimiento tras 72 h. Las placas con los controles *E. coli* y *P. aeruginosa* PAO1 fueron incubados a 37°C.

### **Bioaumentación de terrario**

El ensayo de biorremediación *ex situ* se realizó a partir de un terrario con muestra de suelo obtenido de la playa de Quintero expuesta a un derrame de petróleo desde septiembre del 2014. Las muestras fueron tomadas durante enero del 2015 en la playa de Quintero, Quinta región de Valparaíso (32°76 S, 71°52 W), desde el horizonte superficial del suelo. La bioaumentación se realizó a partir de 400 mL de medio de cultivo R2A inoculado con *P. flavescens* D43FB. Luego de 24 h de crecimiento a 28°C, donde se reportó 6 x 10<sup>7</sup> UFC mL<sup>-1</sup> se centrifugó a 7000 RPM por 5 min, se lavó el sedimento bacteriano 2 veces con

amortiguador fosfato 25 mM y se agregó el sedimento bacteriano al terrario. Posteriormente, se incubó a 28°C y cada 24 h se agitó el contenedor vigorosamente. Finalmente, se tomaron muestras cada 1 semana y se cuantificó los HAPs por espectroscopía de fluorescencia. Como control se utilizó un terrario con muestra de suelo de Quintero sin bioaumentación.

### **Ensayo de motilidad en placa**

El ensayo de motilidad se determinó siguiendo un protocolo descrito por Tremblay y cols. (2007). Se utilizó medio M9 agar 0.5% p/v y 0.25% p/v (*swarming* y *swimming*, respectivamente). Tras autoclavarlos se agregaron a placas Petri y se secaron por flujo laminar por 60 min para el ensayo de *swarming* y 20 min para *swimming*. Tras este período de secado fueron inmediatamente inoculados por picadura con un cultivo bacteriano a una D.O.<sub>600nm</sub> de 0.1 y se incubaron a 28°C por 16 h. Para el ensayo de quimiotaxis se modificó el protocolo agregando a la placa Petri seca 20 µL de glucosa 0.2% p/v, solución saturada de fenantreno y/o diesel.

### **Ensayo de quimiotaxis por capilaridad**

El ensayo de quimiotaxis se realizó siguiendo el protocolo descrito por Gordillo y cols. (2007). Un cultivo bacteriano saturado crecido en medio R2A a 28°C se centrifugó y lavó con amortiguador de quimiotaxis (Tris-HCl 10 mM, pH 7.4). Posteriormente, se tomó 100µL ( $5 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>) y se agregó en una punta de micropipeta de 200µL. Luego, se instaló una aguja de jeringa estéril como capilar, unida a una jeringa con amortiguador de quimiotaxis con fenantreno o glucosa soluble. Después de 90 min de incubación a temperatura ambiente se removió la aguja, se realizaron diluciones seriadas y se sembró en medio sólido R2A. Finalmente, se registró las UFC mL<sup>-1</sup> tras 24 h de incubación a 28°C.

### **Análisis de producción de biosurfactantes**

Para determinar la presencia de biosurfactante, se siguió un protocolo descrito por Wei y cols. (2005). A partir de un sobrenadante de un cultivo bacteriano crecido por 5 días a 28°C en medio M9 con fenantreno como fuente de carbono se determinó la presencia de biosurfactante a través del índice E24. Se agregó 3 mL de diesel y 2 mL de sobrenadante de cultivo y se agitó vigorosamente por 1 min 2 veces. Luego de 24 h, se midió el porcentaje

correspondiente a la altura de la emulsión generada respecto la altura total. Además, se determinó la presencia de surfactante mediante colapso de gota. Para esto, se tomó 5  $\mu\text{L}$  de un concentrado del sobrenadante y se depositó sobre una superficie plana y se agregó 2  $\mu\text{L}$  de solución de tinción azul de metileno. En ambos experimentos se utilizó como controles agua destilada (control negativo) y SDS al 0.5% (control positivo).

### **Ensayo de formación de biopelícula**

La formación de biopelícula se cuantificó mediante el protocolo descrito por O'Toole y cols. (2011). Cultivos bacterianos a D.O.<sub>600nm</sub> 0.1 se utilizaron para inocular (1:100) medios de cultivo M9 en microplaca de 96 pocillo, los cuales fueron incubados por 24 h. Para cuantificar el crecimiento, se midió la D.O.<sub>600nm</sub>. Se lavó cada pocillo y se agregó una solución de cristal violeta, luego de 3 min se lavó cada pocillo cuidadosamente. Finalmente, se agregó una solución de acetona etanol y se resuspendió. Por último, se midió absorbancia a 590 nm (correspondiente al pico máximo del espectro de cristal violeta). El valor reportado es la absorbancia correspondiente al cristal violeta normalizado por la densidad óptica del cultivo ( $\text{U.A.}_{590\text{ nm}} / \text{U.A.}_{600\text{ nm}^{-1}}$ ).

### **Ensayo de adhesión**

La adhesión a cristales de fenantreno se determinó a partir de un cultivo crecido *overnight*, se realizó un inóculo 1:1000 en medio líquido M9 con fenantreno estéril 2000 mg L<sup>-1</sup>, se incubó por 5 días a 28°C y 150 RPM, se lavó y se tiñó con cristal violeta. Finalmente, se observó por microscopio óptico y se registró fotográficamente.

### **Microscopía electrónica de barrido**

La adhesión a cristales de fenantreno se terminó a partir de un cultivo bacteriano crecido en medio líquido M9 con glucosa y fenantreno como fuente de carbono. Tras 24 y 120 h de incubación a 28°C, se agregaron 10  $\mu\text{L}$  de la solución a una grilla de cobre en ausencia de *coating* u otro tratamiento químico, y se dejó secar al aire. Posteriormente, la muestra fue visualizada usando un microscopio electrónico de barrido (SEM) modelo LVEM5 Delong con un voltaje de 5kV.

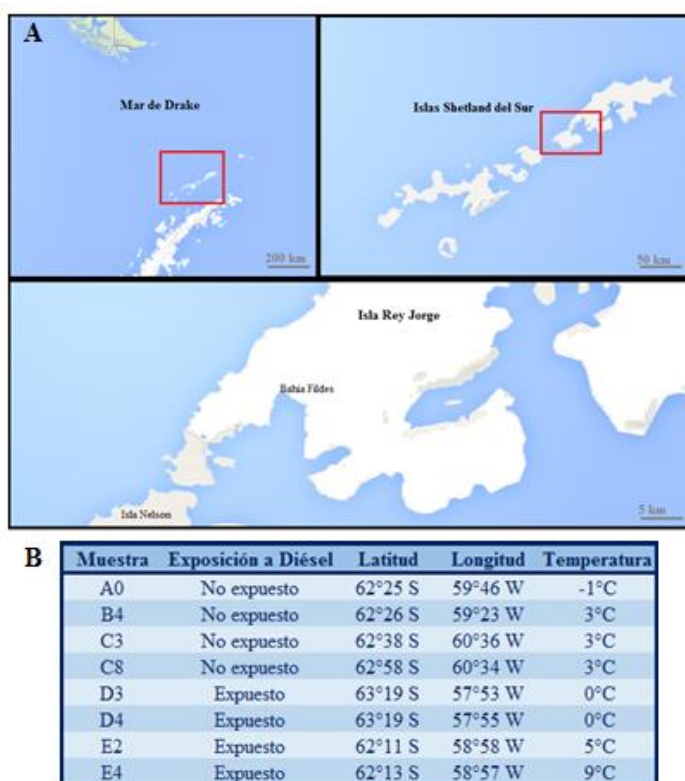


## RESULTADOS

### I. Caracterización química y biológica de muestras de suelos antárticos expuestos y sin exponer a diesel

#### Selección de las muestras de suelo

Las muestras fueron tomadas en las Islas Shetland del Sur ( $62^{\circ}10$  S,  $58^{\circ}49$  W) (**Fig. 7A**), desde el horizonte superficial del suelo. Al momento de ser tomadas, las muestras presentaban una temperatura promedio de  $3^{\circ}\text{C}$ . Se eligieron para los análisis 4 suelos no expuestos a diesel (A0, B4, C3 y C8) y 4 suelos expuestos (D3, D4, E2 y E4) (**Fig. 7B**).

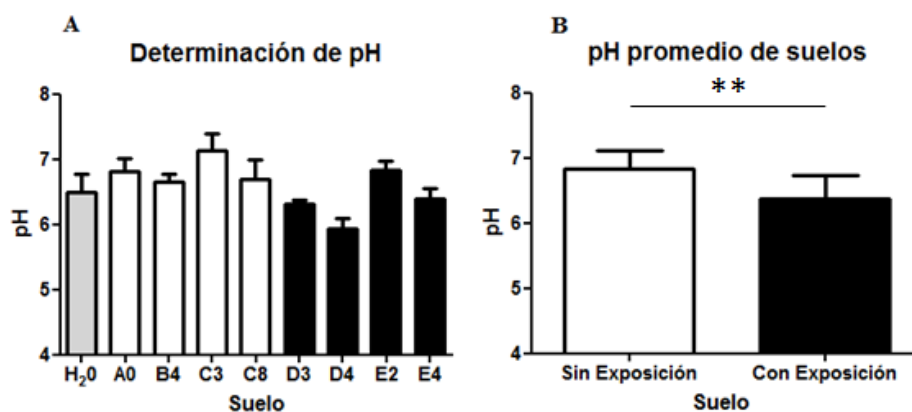


**Figura 7. Zona de muestreo.** (A) Mapa de las cercanías de la Bahía Fildes, Isla Rey Jorge (Islas Shetland del Sur)  $62^{\circ}10$  S,  $58^{\circ}49$  W. (B) Tabla de coordenadas y características de las muestras tomadas durante ECA 49 en Febrero de 2013.

#### Determinación del pH de los suelos

La determinación de pHs indicó que las muestras sin exposición a diesel tienen en promedio un pH de  $6.8 \pm 0.25$  y las muestras expuestas a diesel  $6.4 \pm 0.35$  (**Fig. 8**). El análisis estadístico (test de comparación múltiple de Tukey) mostró diferencias significativas entre ambos grupos de datos, lo que podría deberse a un alto número de variables (minerales, metales, contaminación y/o biodiversidad). Dentro de los valores obtenidos, las muestras C3 y D4 se alejan del promedio registrando pH de 7.14 y 5.92

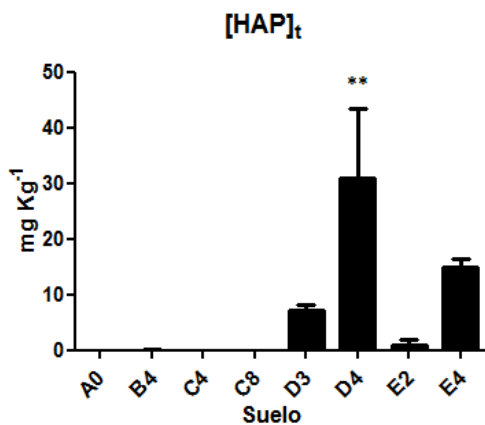
respectivamente; sin embargo, estos valores no son estadísticamente significativos. Está reportado que a pH neutro se favorecería un potencial proceso de remediación (Margesin, 1997). En base a este resultado, se comenzó a trabajar con un medio de cultivo a pH neutro que permita el aislamiento y crecimiento de cepas bacterianas ambientales, como el medio R2A (van der Linde, 1999).



**Figura 8. Determinación del pH en muestras de suelo Antártico.** (A) Se determinó el pH a muestras de suelo sin exposición a diesel (barras blancas) y a muestras expuestas a diesel (barras negras). (B) Se comparó el promedio de las muestras de suelo sin exposición a diesel (barra blanca) y el promedio de las muestras expuestas a diesel (barra negra). El análisis estadístico test de comparación múltiple de Tukey mostró diferencias significativas,  $p < 0,05$ .

### Cuantificación de HAP en suelo

La cuantificación de hidrocarburos aromáticos policíclicos de los 8 suelos indicaron que los suelos D3, D4, E2 y E4 (suelos expuestos) presentan una concentración de HAP mucho mayor que los suelos sin exposición (Fig. 9). En particular, la muestra D4 presenta la mayor concentración de los 8 suelos,  $\sim 30 \text{ mg Kg}^{-1}$  de hidrocarburo aromático. Por otro lado, las muestras no expuestas (A0, B4, C3 y C8) presentan una concentración aproximada de  $0.01 \text{ mg Kg}^{-1}$ . En el suelo D4 los HAP estarían más de 2000 veces más concentrados que en los suelos no expuestos.



**Figura 9. Concentración de HAP en suelo.** Se determinó la concentración de HAP triaromáticos en los suelos sin exponer a diesel (A0, B4, C3, C8) y en los suelos expuestos D3, D4, E2 y E4 (barras negras). El análisis estadístico comparación múltiple de Tukey mostró diferencias significativas,  $p < 0,05$ .

### Cuantificación de cadmio, cromo y plomo en suelos

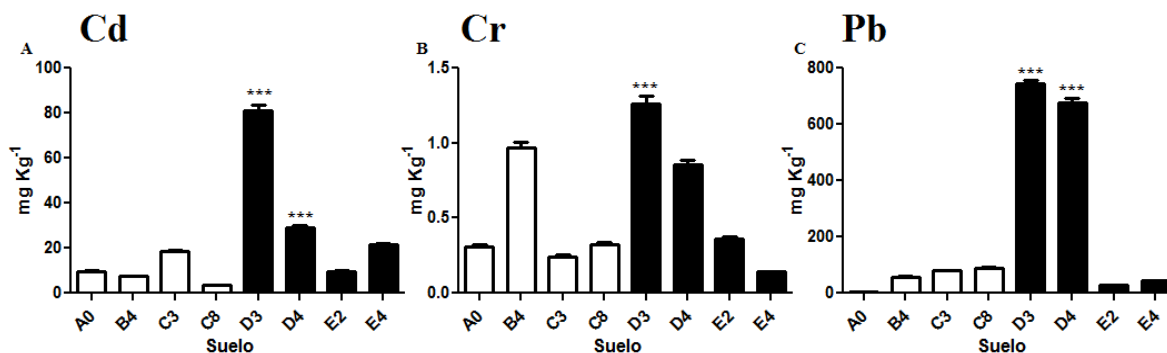
La cuantificación de cadmio no mostró diferencia significativa en el grupo de los suelos no expuestos, a excepción de la muestra C3, que en comparación a las muestras A0, B4 y C8 presentó casi el doble de concentración del metal (**Fig. 10A**). Por otro lado, en el grupo de las muestras expuestas a diesel, el suelo D3 presentó altos niveles de cadmio, con una concentración total de  $83 \text{ mg Kg}^{-1}$ , esto corresponde casi 8 veces al promedio de las muestras no expuestas a diesel y 4 veces al promedio de las muestras expuestas.

La determinación de cromo indicó que los suelos no expuestos presentan una baja concentración del metal, a excepción de la muestra B4 ( $0,97 \text{ mg Kg}^{-1}$ ), que contiene casi 3 veces los niveles del promedio del grupo no expuesto. Mientras, en los suelos expuestos se observan 2 muestras con altos niveles de cromo, la muestra D3 y D4, con  $1,26$  y  $0,84 \text{ mg Kg}^{-1}$  respectivamente (**Fig. 10B**), siendo valores similares a la muestra no expuesta B4 y representan cerca de 3 y 7 veces los niveles de la muestras E2 y E4, respectivamente.

Finalmente, la determinación de plomo indicó que los suelos no expuestos contienen valores similares, en promedio  $58,2 \text{ mg Kg}^{-1}$  del metal. Mientras, los suelos expuestos presentan una diferencia significativa entre las muestras D3 y D4 ( $743$  y  $678 \text{ mg Kg}^{-1}$  respectivamente) en comparación a las muestras E2 y E4 ( $29$  y  $44 \text{ mg Kg}^{-1}$ ) (**Fig. 10C**). Estos últimos con casi 20 veces menos concentración del metal. Esto refleja una gran

diferencia entre los suelos D3 y D4 con los suelos con E2 y E4 que presentan una baja concentración de plomo.

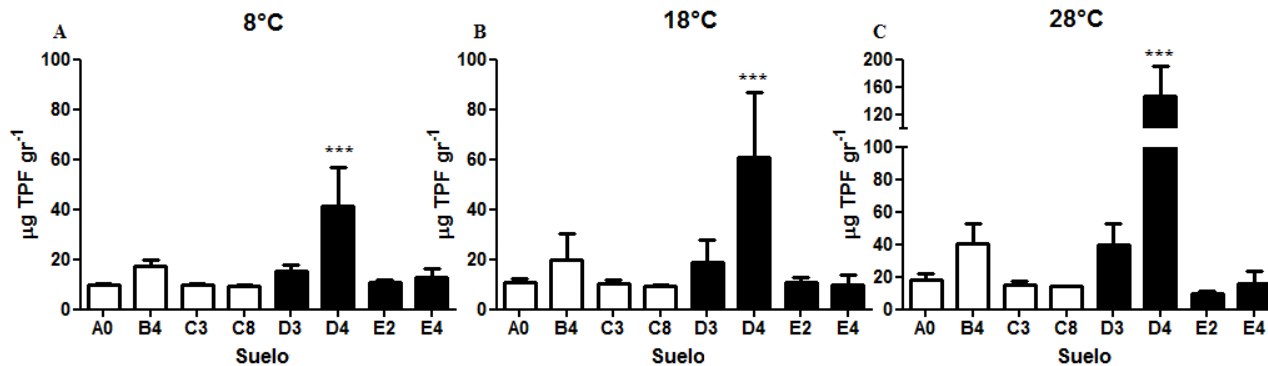
Globalmente, se observa en las muestras sin exposición a diesel una menor concentración de Cd, Cr y Pb comparado con los suelos expuestos a diesel D3 y D4. Por otro lado, las muestras E2 y E4 no presentan una alta concentración de metales pesados.



**Figura 10. Cuantificación de metales pesados de suelo Antártico.** Se determinó por ICP-masa la concentración de (A) cadmio, (B) cromo y (C) plomo en muestras de suelo antártico sin exponer a diesel (barras blancas) y suelo antártico expuesto a diesel (barras negras). El análisis estadístico test de comparación de Tukey mostró diferencias significativas en los 3 experimentos,  $p < 0,0001$ .

### Determinación de la actividad biológica total de los suelos

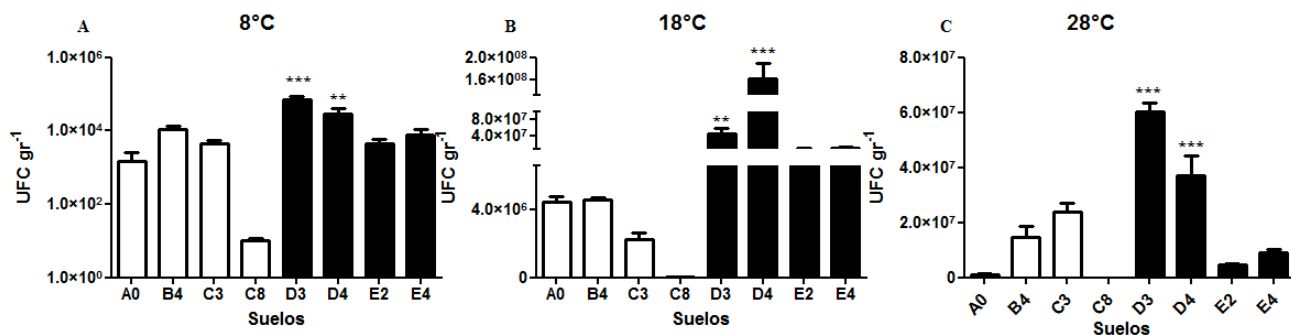
Los niveles de formación de TPF obtenidos en todos los suelos analizados se asocian a una baja actividad deshidrogenasa, ya que se ha descrito que la reducción de TTC en suelo puede alcanzar valores en el orden de mg TPF g<sup>-1</sup>. En ese sentido, los 8 suelos estudiados presentan valores de 3 órdenes de magnitud por debajo a lo reportado (Casida, 1977). Lo que puede deberse al empobrecimiento de estos o las condiciones extremas de la Antártica. Por otro lado, la actividad biológica total (ABT) indicó que la actividad metabólica de los microorganismos del suelo aumenta al incrementarse la temperatura de incubación (Fig. 11). Además, se observa a las 3 temperaturas de ensayo que las muestras de suelo no expuestas y los suelos expuestos a diesel E2 y E4 presentan una baja ABT en comparación con los suelos D3 y D4. Específicamente, el suelo expuesto a diesel D4 tiene una mayor actividad biológica que el resto de las muestras de suelo. A 8, 18 y 28°C es 3, 5 y 6.7 veces mayor que las otras 7 muestras, lo que podría deberse a que los hidrocarburos estén actuando como fuente de energía para los microorganismos del suelo.



**Figura 11. Determinación de actividad biológica total.** Se analizó la formación de TPF por gramo ( $\mu\text{g gr}^{-1}$ ) a (A) 8°C, (B) 18 °C y (C) 28 °C, de muestras de suelo sin exposición a diesel (barras blanca) y muestras expuestas a diesel (barra negra). El análisis estadístico test de comparación múltiple de Tukey mostró diferencias significativas en las 3 condiciones,  $p < 0,0001$ .

### Determinación del número de heterótrofos en los suelos

Una segunda caracterización biológica de los suelos fue la determinación de heterótrofos cultivables totales. Se determinó las unidades formadoras de colonia por gramo de suelo y el efecto de la temperatura en este valor (8, 18 y 28°C) (**Fig. 12**). Tal como la ABT, se observa que el número de UFC  $\text{gr}^{-1}$  aumentó con la temperatura de incubación. En promedio, al comparar los heterótrofos a 8 con 18 o 28°C aumenta aproximadamente 1000 veces. Este aumento es sorprendentemente mayor para la muestra expuesta a diesel D4, la cual en promedio aumenta casi 3000 veces. Además, se observa que en promedio las muestras expuestas a diesel D3 y D4 presentan a 8°C, 18°C y 28°C, 2, 3 y 5 veces más heterótrofos que los otros suelos. Al igual que la ABT, esta información posiblemente se relaciona con la presencia de compuestos orgánicos del diesel que podrían actuar como suplemento del suelo.

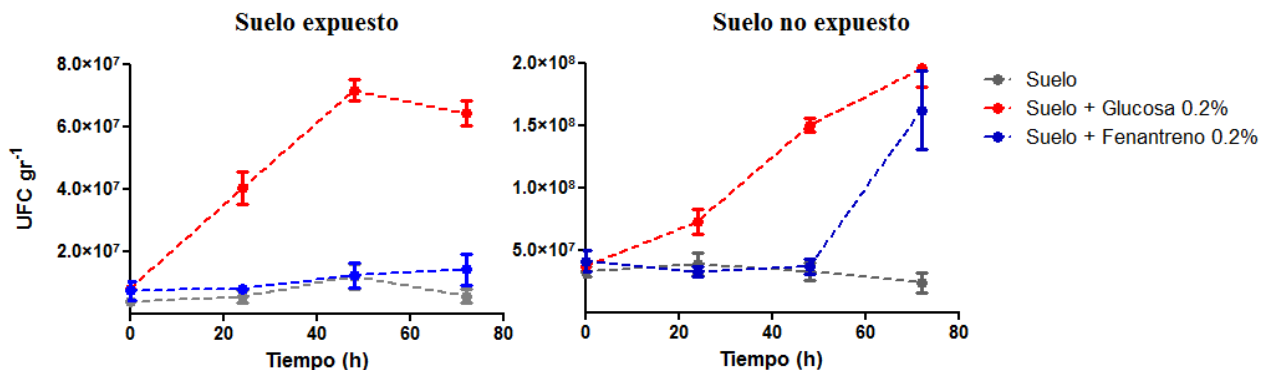


**Figura 12. Determinación de unidades formadoras de colonia por gramo de suelo.** Se determinó las unidades formadoras de colonia por gramo de suelo a (A) 8°C, (B) 18°C y (C) 28°C, en suelos sin exposición a diesel (barras blanca) y expuestos a diesel (barra negra). El análisis estadístico test de comparación múltiple de Tukey mostró diferencias significativas en las 3 condiciones,  $p < 0,0001$ .

## II. Aislamiento y caracterización de bacterias degradadoras de fenantreno resistentes a metales.

### Enriquecimiento de suelos

En base a los resultados obtenidos en el Objetivo 1, se determinó si el fenantreno actúa como suplemento en el suelo. Esto se realizó a través de la medición de las UFC gr<sup>-1</sup> de muestras de suelo proveniente de Antártica expuestas y sin exponer a diésel, distintas a las 8 seleccionadas anteriormente. Se utilizó como fuentes de carbono 0,2% de glucosa o fenantreno. Al analizar el suelo no expuesto a diesel suplementado con glucosa, las UFC gr<sup>-1</sup> aumentaron constantemente hasta las 48 h. A las 72 h las UFC gr<sup>-1</sup> aumentaron cerca de 11 veces en comparación al suelo sin suplementar con glucosa. Por otro lado, en el suelo suplementado con fenantreno no se observó diferencias en relación al control (**Fig. 13A**). En suelo expuesto a diesel suplementado con glucosa hubo un aumento constante hasta las 72 h, las UFC gr<sup>-1</sup> aumentaron cerca de 8 veces respecto al control. Al suplementar con fenantreno se observó un efecto similar al control; sin embargo, luego de 72 h se observa un aumento importante en las UFC (6.7 veces más UFC gr<sup>-1</sup> respecto al suelo control) (**Fig. 13B**). Estos resultados indican que se puede utilizar fenantreno como suplemento del suelo, ya que en muestras contaminadas con diesel existen microorganismos capaces de utilizar el fenantreno como fuente de carbono.



**Figura 13. Enriquecimiento de suelos.** Se determinó UFC gr<sup>-1</sup> en el tiempo en (A) suelo sin exponer a diesel y (B) con exposición, modificando la fuente nutritiva, control (●), 0.2 % de glucosa (■) y 0.2% de fenantreno (◆).

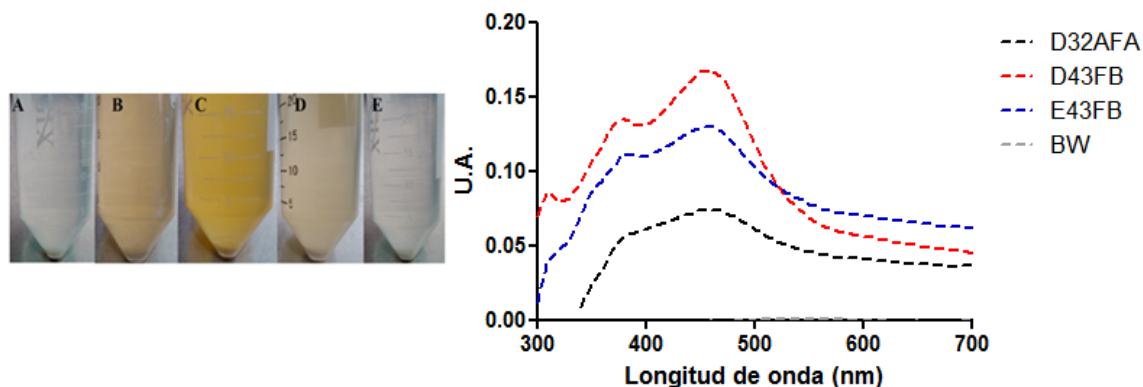
### Selección de microorganismos a partir de suelos antárticos

A partir de la información del enriquecimiento de suelos, se utilizó fenantreno estéril (200 mg g<sup>-1</sup>) como suplemento del suelo. Tras la incubación por 5 días a 8, 18 y 28°C, en medios sólidos LB, M9 y R2A se seleccionaron 350 aislados bacterianos en base a diferencias en la morfología de las colonias, de las cuales 111 fueron aisladas de los suelos A0, B4, C3 y C8, mientras que 239 de los suelos D3, D4, E2 y E4 (expuestos a diesel).

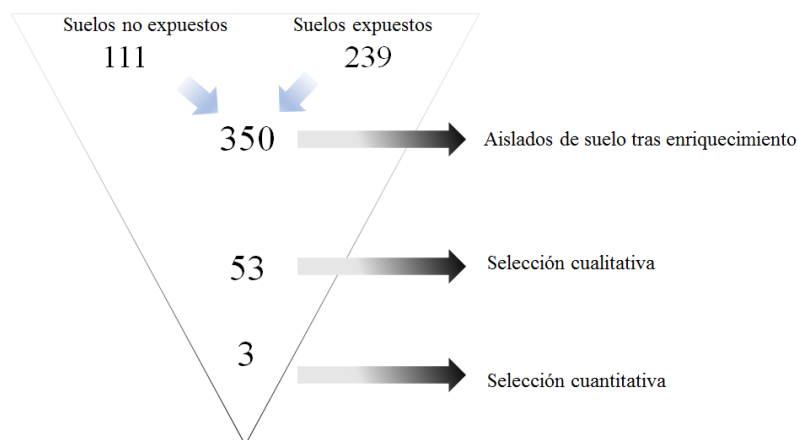
Todos los aislados fueron crecidos en medio líquido M9 suplementado con fenantreno como única fuente de carbono, y en base a los cambios en la coloración del medio de cultivo desde transparente a ocre (**Fig. 14**), se seleccionó las cepas capaces de metabolizar fenantreno. De este modo, se obtuvo 4 originarios de suelos no expuestos a diesel y 49 de sitios expuestos.

Finalmente, se analizaron los cultivos de los 53 microorganismos seleccionados y se determinó el fenantreno remanente, a través de una extracción líquido-líquido con hexano y espectroscopía de fluorescencia total asociada a calibración multivariada. Mediante este análisis se seleccionaron 3 aislados bacterianos correspondientes a aquellos que presentaron una menor concentración remanente de fenantreno comparado con un control sin bacteria. Los aislados seleccionados fueron D32AFA, D43FB y E43FB con 31, 5 y 15% remanente de fenantreno, respectivamente. Mediante diluciones seriadas se determinó el número de bacterias en cada muestra analizada: 1.5x10<sup>7</sup>, 1.1x10<sup>9</sup> y 9.0x10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup>, respectivamente. A partir de este punto se seleccionó estas 3 cepas para los estudios

posteriores de caracterización (**Fig. 15**). Cabe destacar que estos 3 aislados fueron encontrados en suelos expuestos a diesel.



**Figura 14. Metabolización de fenantreno.** Izquierda, fotografía de tubos con medio M9 y fenantreno como única fuente de carbono tras 5 días de incubación. Control sin bacteria (A), cultivo de aislado D32AFA (B), cultivo de aislado D43FB (C), cultivo de aislado E43FB (D), cultivo de *E. coli* (D) y cultivo de PAO1 (E). Derecha, espectro de absorbancia de los cultivos de D32AFA (---), D43FB (---), E43FB (---) y *E. coli* (---).



**Figura 15. Esquema resumen de selección de microorganismos.** Se aisló 350 microorganismos antárticos tras un enriquecimiento con fenantreno. Se seleccionó 53 capaces de metabolizar fenantreno mediante ensayo cualitativo y finalmente se eligió 3 que cuantitativamente demostraron degradar fenantreno.

### Identificación de microorganismos

Mediante la amplificación y secuenciación del gen 16s rDNA, se identificó los 3 aislados seleccionados. El aislado D43FB se identificó como *Pseudomonas flavescens* y EF3FB como *Pseudomonas guineae*, ambos con un 96% de identidad. Cabe destacar que *P. guineae* se ha relacionado directamente con microorganismos aislados desde Antártica, entre estos: *P. psychrophila* y *P.deceptionensis*, ambos microorganismos fueron aislados



desde Isla Rey Jorge en la Antártica (misma isla donde fueron tomadas las muestras). Mientras, la cepa D32AFA no dio un resultado coherente con su fisiología, ya que el análisis bioinformático la identificó como perteneciente al género *Pseudomonas*; sin embargo, esta cepa es Gram positivo.

### Caracterización microbiológica de los aislados seleccionados

Como parte de la caracterización de los aislados ambientales, se realizó 2 tipos de ensayos:

- 1.- Microbiológicos: i) tinción de Gram, ii) temperatura óptima de crecimiento, iii) índice de perfil analítico (API 20 NE, API 10 s y crecimiento en anaerobiosis).
- 2.- Resistencia a estrés oxidativo: iv) resistencia a luz UV, v) determinación de la concentración inhibitoria mínima (MIC) de peróxido de hidrógeno, vi) presencia de catalasa y actividad peroxidasa.

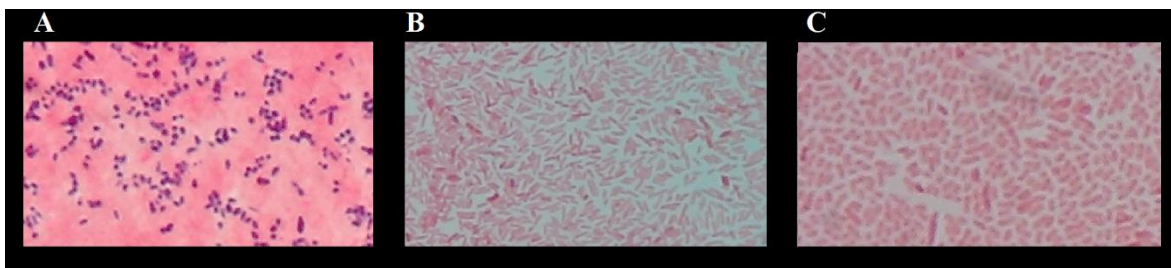
Los resultados de las caracterizaciones realizadas a los 3 aislados ambientales y a los controles *E. coli* y PAO1 se resumen en la **Tabla 3**.

Caracterización	D32AFA	D43FB	E43FB	<i>E. coli</i>	PAO1
Tinción Gram	+	-	-	-	-
Forma	Coco	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo
Temperatura óptima de crecimiento	28°C	28°C	28°C	37°C	37°C
Crecimiento en medio LB	+	+	+	+	+
Crecimiento en medio R2A	+	+	+	+	+
Crecimiento en medio mínimo con glucosa	+	+	+	+	+
Crecimiento en medio mínimo con fenantreno	+	+	+	-	-
Capacidad de crecer a 4°C	+	+	+	-	-
Capacidad de crecer a 8°C	+	+	+	-	-
Capacidad de crecer a 18°C	+	+	+	+	+
Capacidad de crecer a 28°C	+	+	+	+	+
Capacidad de crecer a 37°C	-	-	-	+	+
Resistencia a luz UV	120 s	180 s	180 s	180 s	30 s
MIC H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [mM]	0,03	0,03	0,125	<0,03	<0,03
Presencia de catalasa	+	+	+	+	+
<i>Swimming</i>	-	-	-	-	-
<i>Swarming</i>	+	-	-	-	+
<i>Swarming</i> en presencia de fenantreno	-	-	-	-	-
<i>Swarming</i> en presencia de antraceno	-	-	-	-	-
<i>Swarming</i> en presencia de combustible	-	-	-	-	-
Formación de biopelícula	-	+	-	-	+
Adhesión a perla de vidrio	+	+	+	+	+
Adhesión a cristal de fenantreno	+	+	+	-	-

**Tabla 3. Caracterización de aislados bacterianos.** Se determinó para los aislados ambientales D32AFA, D43FB y E43FB, *E. coli* y PAO1 características microbianas como tinción de Gram, temperatura óptima de crecimiento, resistencia a luz UV, MIC a peróxido de hidrógeno, motilidad y adhesión, el signo “+” representa resultado positivo a l ensayo, mientas, el signo “-“ representa resultado negativo para el ensayo.

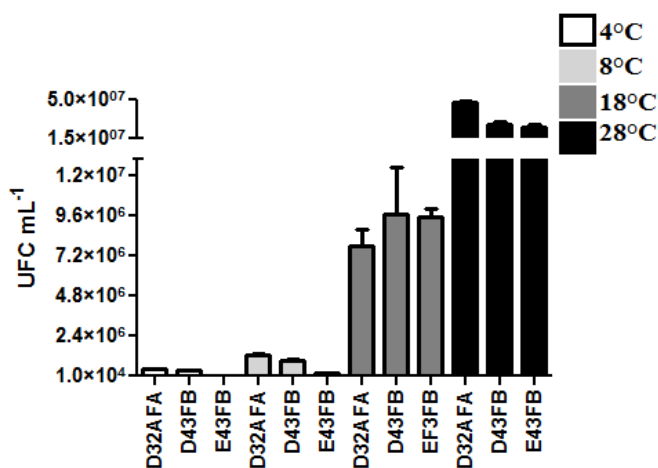
## Caracterización microbiológica

Mediante microscopía óptica se determinó que los aislados D43FB y E43FB corresponden a bacilos Gram negativo y D32AFA a un coco Gram positivo (**Fig. 16**).



**Figura 16. Tinción de Gram.** Análisis de tinción de Gram de los aislados (A) D32AFA, (B) D43FA y (C) E43FB.

Para determinar las condiciones óptimas para los ensayos de degradación de fenantreno, se determinó la temperatura óptima de crecimiento en medio R2A a través de la determinación de UFC mL<sup>-1</sup>. Se determinó que la temperatura óptima de crecimiento para los 3 aislados es 28°C, siendo capaces de crecer desde 4°C. Estos resultados sugieren que son bacterias psicotolerantes y nos permiten sugerir su potencial uso para biorremediación del continente antártico. Además, los aislados son incapaces de crecer a 37°C (**Fig. 17**).



**Figura 17. Temperatura óptima de crecimiento.** Se determinó las UFC mL<sup>-1</sup> para D32AFA, D43FB y E43FB crecidas en medio R2A a distintas temperaturas: 4°C (barras blancas), 8°C (barras gris claro), 18°C (barras gris oscuro) y 28°C (barras negras).

Por otro lado, se evaluó la capacidad de crecimiento de los aislados en los medios de cultivo LB, PTY, R2A y en medio mínimo M9 suplementado con glucosa o fenantreno, como única fuente de carbono. Los resultados obtenidos muestran que los 3 aislados son capaces de crecer en estos medios, independiente de la fuente de carbono utilizada. Además, se realizó una caracterización bioquímica y de crecimiento utilizando distintas fuentes de carbono. El resumen de estos resultados se detalla en la **Tabla 4**.

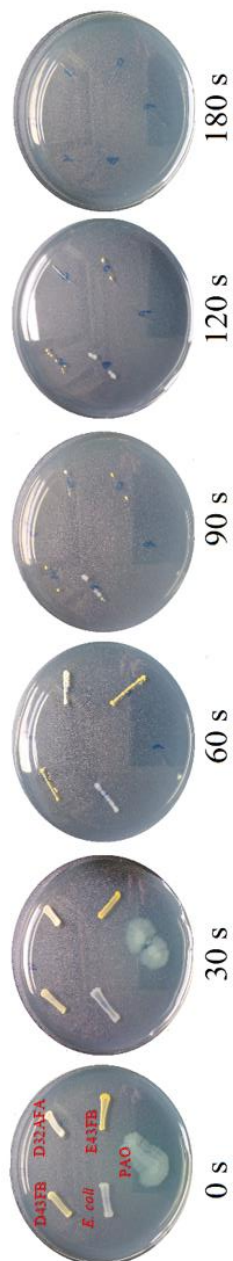
API	D32AFA	D43FB	E43FB
NO <sub>3</sub>	+	-	-
TRP	+	+	+
GLU	-	-	-
ADH	-	-	-
URE	-	-	-
ESC	+	+	+
GEL	+	-	-
PNPG	+	+	+
GLU	+	+	+
ARA	+	+	+
MNE	+	+	-
MAN	+	+	-
NAG	+	-	-
MAL	+	+	+
GNT	+	+-	-
CAP	+	+	-
ADI	+	-	-
MLT	+	+	-
CIT	+	+	-
PAC	+	+	-
OX	-	+	+

**Tabla 4. Ensayos bioquímicos y crecimiento con distintas fuentes de carbono.** Se analizó bioquímicamente los aislados ambientales D32AFA, D43FB y E43FB. Los ensayos se realizaron a 28°C por 24 h en presencia de oxígeno, a excepción de aquellos con la inicial subrayada que se realizaron en anaerobiosis: Reducción de nitrato a nitrito (NO<sub>3</sub>), generación de indol a partir de L-triptófano (TRP), fermentación ácida de glucosa (GLU), actividad arginina hidrolasa (ADH), actividad ureasa (URE), hidrólisis de β-glucosido (ESC), hidrólisis de escualina (GEL), actividad β-galactosidasa (PNPG), asimilación de D-glucosa (GLU), asimilación de L-arabinosa (ARA), asimilación de D-manosa (MNE), asimilación de D-manitol (MAN), asimilación de N-acetil-glucosamina (NAG), asimilación de D-maltosa (MAL), asimilación de gluconato de potasio (GNT), asimilación de ácido cáprico (CAP), asimilación de ácido adípico (ADI), asimilación de ácido málico (MAL), asimilación de citrato trisódico (CIT), asimilación de ácido fenilacético (PAC) y presencia de citocromo oxidasa (OX). El símbolo “+” representa resultado positivo,“-” representa resultado negativo y “+-” representa resultado inconcluso.

### Resistencia a estrés oxidativo

La resistencia a estrés oxidativo se caracterizó por 2 razones. En un primer lugar, para relacionar la capacidad de degradar fenantreno con la resistencia a estrés oxidativo, debido principalmente porque la metabolización de hidrocarburos aromáticos genera ROS (González, 2011). En segundo lugar para evaluar una proyección final de esta tesis, donde se contempla seleccionar cepas capaces de degradar diesel a través de un proceso de biorremediación en Antártica. Para esto, se determinó i) resistencia a luz UV, ii) MIC de peróxido de hidrógeno, iii) presencia de catalasa y iv) actividad peroxidasa (además de la repercusión que tienen las peroxidasas en la resistencia a estrés oxidativo, está demostrado que la peroxidasa de rabanito ayuda en la oxidación de HAPs en aguas contaminadas (Chen, 2014). Para los 4 experimentos, se comparó con las cepas control *E. coli* BW y PAO1.

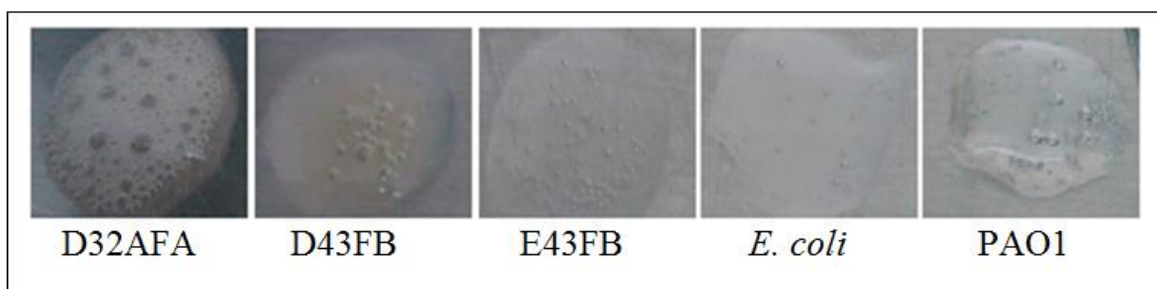
El tiempo mínimo inhibitorio (MIT) de resistencia a la exposición a luz UV determinó que el aislado D32AFA es la cepa más sensible al UV (120 s) mientras que D43FB y E43FB tienen un MIT de 180 s, al igual que *E. coli* BW. El MIT de PAO1 fue de 60 s (Fig. 18).



**Figura 18. Tiempo mínimo de exposición a luz UV que inhibe el crecimiento.** Se determinó el MIT a luz UV para las cepas D32AFA, D43FB, E43FB, *E. coli* BW y PAO1 en medio sólido M9. Los tiempos de exposición fueron 0, 30, 60, 90, 120 y 180 s. En cada placa el orden de izquierda a derecha de los microorganismos es D43FB, D32AFA, *E. coli*, E43FB y PAO1.

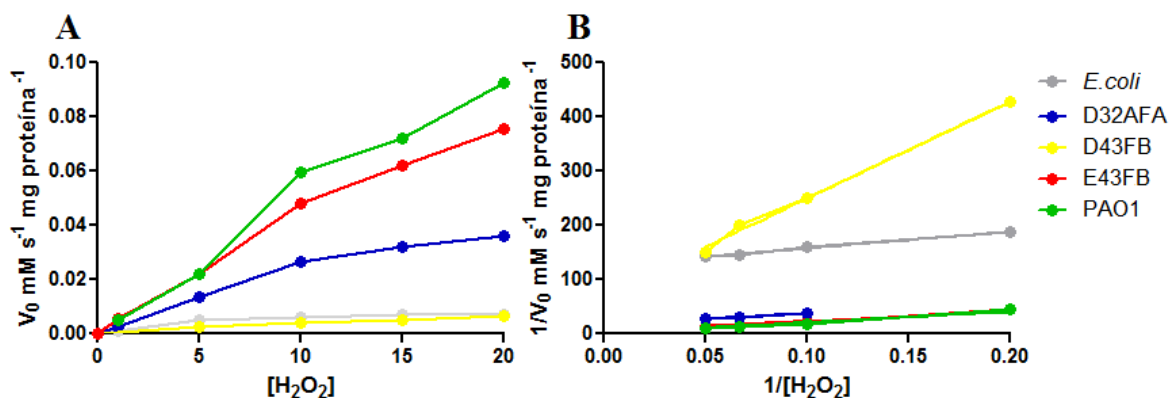
ii) Los valores de MIC de peróxido de hidrógeno en medio M9 para es E43FB 0.125 mM y tanto para D32AFA y D43FB es 0.03 mM, mientras que para las cepas control *E. coli* BW y PAO1 fue <0.03 mM (**Tabla 5**). Como se esperaba, se observó una mayor resistencia a estrés oxidativo para los 3 aislados antárticos.

iii) El ensayo de presencia de catalasa determinó que las 3 cepas antárticas presentan esta enzima, fenómeno que se observa por la formación de burbujas en un cultivo expuesto a peróxido de hidrógeno (**Fig. 19**).



**Figura 19. Presencia de catalasa.** Se evidenció la presencia de catalasa al observar la aparición de burbujas al exponer a peróxido 30%.

Junto con esto, de manera más detallada se determinó iv) la cinética pseudo-enzimática de degradación de peróxido de hidrógeno evaluando la actividad enzimática de todos los procesos biológicos que descompongan  $H_2O_2$  en el extracto celular (Chen, 2003). Esto se realizó a partir de extractos celulares tratados con concentraciones crecientes de peróxido. Se graficó el efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de degradación (**Fig. 20A**) y el doble recíproco para calcular el coeficiente  $V_{max} K_m^{-1} (s^{-1} mg^{-1})$  como parámetro cinético (**Fig. 20B**). Los valores fueron 0.005, 0.0006, 0.0059, 0.0032 y  $0.051 s^{-1} mg^{-1}$  (para D32AFA, D43FB, E43FB, *E. coli* y PAO1, respectivamente). E43FB presentó el coeficiente más alto, siendo 83 y 15% mayor que *E. coli* BW y PAO1, respectivamente (**Tabla 5**).



**Figura 20. Cinética pseudo enzimática de peroxidasa.** (A) Se determinó el valor de velocidad inicial por miligramo de proteína respecto a la concentración de sustrato midiendo la desaparición durante 120 s de la absorbancia a 240 nm (peróxido de hidrógeno). (B) Se determinó los inverso de velocidad inicial por miligramo de proteína respecto al inverso de la concentración de sustrato para las cepas D32AFA (●), D43FB (●), E43FB (●), *E. coli* (●) y PAO1 (●).

	D32AFA	D43FB	E43FB	<i>E. coli</i>	PAO1
MIT UV ( $\text{s}^{-1}$ )	120	180	180	180	60
MIC $\text{H}_2\text{O}_2$ (mM)	0,03	0,03	0,125	0,01	0,01
$V_0 \text{ max}$ ( $\text{mM s}^{-1} \text{mg}^{-1}$ )	0,055	0,014	0,164	0,008	0,726
Km (mM)	11,1	25,3	27,6	2,4	141,1
$V_0/\text{Km}$ ( $\text{s}^{-1} \text{mg}^{-1}$ )	0,0050	0,0006	0,0059	0,0032	0,0051

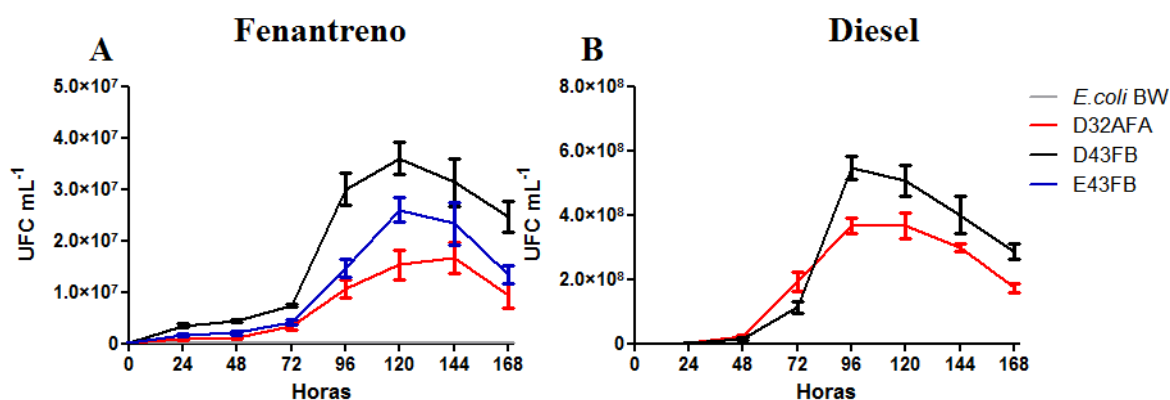
**Tabla 5. Caracterización resistencia a estrés oxidativo.** Para D32AFA, D43FB, E43FB, *E. coli* BW y PAO1, se les determinó MIT a luz UV, MIC a peróxido de hidrógeno y actividad peroxidasa.

En base a los parámetros fisiológicos y bioquímicos determinados, los aislados ambientales bacterianos evidenciaron mayor resistencia o tolerancia al estrés oxidativo que los controles no antárticos, *E. coli* y PAO1. El aislado que presentó mayor resistencia/tolerancia al estrés oxidativo es E43FB (tolera 180 s a luz UV, 0.125 mM de peróxido de hidrógeno y presenta un coeficiente  $V_{\text{max}} \text{ Km}^{-1}$  mayor al resto de los microorganismos analizados).

### Cinética de crecimiento con fenantreno y diesel como única fuente de carbono

Se realizó una curva de crecimiento en medio M9 con fenantreno como única fuente de carbono ( $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) a  $28^\circ\text{C}$  durante 7 días (Fig. 21A). Se observa en promedio una fase lag de 72 h y la fase estacionaria para las cepas se evidencia a partir del 4° día. Además, D43FB es la bacteria que alcanza un mayor número de UFC  $\text{mL}^{-1}$ , lo que se relaciona directamente con su mayor capacidad de degradar fenantreno y con el mayor número de células en estas condiciones (selección cuantitativa), mientras que la cepa D32AFA es la que tiene un menor crecimiento.

Al utilizar diesel al 0.2% como única fuente de carbono (a 28°C por 7 días) (**Fig. 21B**), solo los aislados D32AFA y D43FB son capaces de crecer. En comparación con la curva con fenantreno, las cepas crecen casi 10 veces con diesel. En estas condiciones, a las 72 h se observa ambas cepas en fase exponencial, mientras que con fenantreno a las 72 h está finalizando la fase *lag*. Además, se determina la incapacidad de la cepa E43FB para un posible uso de biorremediación de sitios contaminados con diesel debido a su ausencia de crecimiento. Cabe destacar, que *E. coli* no es capaz de crecer con fenantreno ni diesel como única fuente de carbono, por otro lado PAO1 no crece con fenantreno como única fuente de carbono; sin embargo, es capaz de metabolizar componentes del diésel, logrando crecer más del doble que D43FB (dato no mostrado).



**Figura 21. Cinética de crecimiento con hidrocarburos como única fuente de carbono.** Se determinó el crecimiento (UFC mL<sup>-1</sup>) en el tiempo de los aislados D32AFA (—), D43FB (—), E43FB (—) y *E. coli* BW (—) en medio M9 con (A) fenantreno (500 µg/mL) como única fuente de carbono y (B) en medio M9 con diesel (0.2%) como única fuente de carbono.

### Efecto de los metales pesados en el crecimiento y degradación de fenantreno

Se evaluó el efecto fisiológico de los metales sobre las bacterias seleccionadas, para lo cual se determinó la MIC en medio mínimo M9 con glucosa como fuente de carbono (**Tabla 6**). Para el Cr<sup>+6</sup>, ión de alta solubilidad en agua, la MIC para D32AFA y D43FB es 5 µg mL<sup>-1</sup> y para E43FB es 0.25 µg mL<sup>-1</sup> (la MIC para *E. coli* y PAO1 es 5 µg mL<sup>-1</sup>). Para el cadmio la MIC de D32AFA es 50 µg mL<sup>-1</sup>, de D43FB es 25 µg mL<sup>-1</sup> y para E43FB es 6.25 µg mL<sup>-1</sup>. En estas condiciones el crecimiento de *E. coli* es inhibido a 25 µg mL<sup>-1</sup> y de PAO1 sobre 100 µg mL<sup>-1</sup>, correspondiente a la concentración de solubilidad del cadmio en este medio. Estos resultados de resistencia se asocian con la concentración de metales en los suelos (**Fig. 10**), donde el suelo D3 (suelo donde se aisló la cepa D32AFA) presenta una mayor



concentración de cadmio y cromo en comparación a los suelos D4 y E4 (suelo origen de los otros aislados). Para el plomo no se pudo determinar la MIC ya que en M9 precipita a partir de  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ , concentración a la cual los 3 aislados son capaces de crecer.

Cepa	MIC $\text{Cd}^{+2}$ [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ]	MIC $\text{Cr}^{+6}$ [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ]	MIC $\text{Pb}^{+2}$ [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ]
D32AFA	50	5	>20
D43FB	25	5	>20
E43FB	6,25	0,25	>20
<i>E.coli</i>	25	5	>20
PAO1	>100	5	>20

**Tabla 6. MIC de metales pesados de las cepas aisladas.** Se determinó la MIC de  $\text{Cd}^{+2}$ ,  $\text{Cr}^{+6}$  y  $\text{Pb}^{+2}$  a los aislados ambientales y los controles *E. coli* y PAO1.

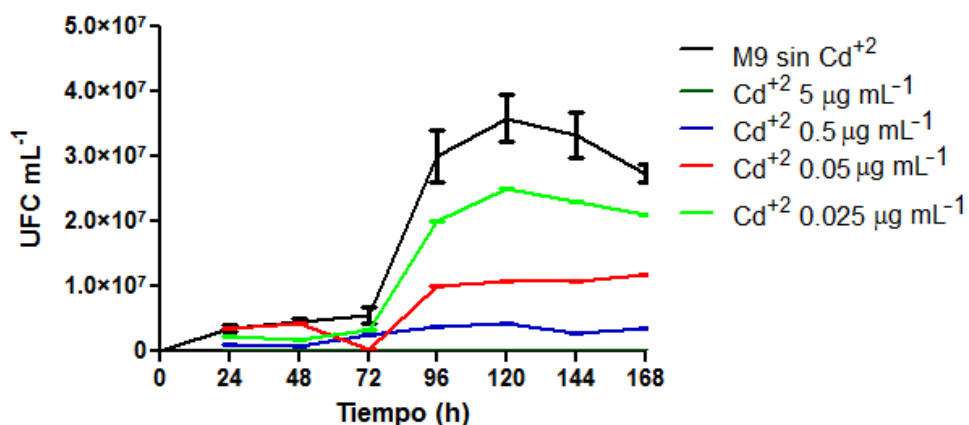
Para evaluar el efecto de los metales en la degradación de HAPs, debido a su importancia a nivel de toxicidad y su alta presencia en el diesel se decidió seguir trabajando con cadmio y excluir cromo y plomo en los análisis posteriores.

En base a los resultados del Objetivo 2, principalmente, por i) la mayor metabolización de fenantreno y alto crecimiento en presencia del hidrocarburo, ii) capacidad de crecer con diesel como única fuente de carbono, iii) alta resistencia a cadmio (en comparación con los 3 aislados ambientales) se seleccionó a D43FB como el aislado para evaluar los mecanismos de metabolización de fenantreno y el efecto del cadmio en la degradación del HAP.

### **Cinética de crecimiento en presencia de cadmio**

Se determinó el efecto de concentraciones crecientes de cadmio ( $\text{Cd}^{+2}$ ) en el crecimiento de la cepa D43FB con fenantreno como única fuente de carbono ( $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) (**Fig. 22**). Se observa que al agregar  $\text{Cd}^{+2}$  en concentraciones mayores a  $0.025 \mu\text{g mL}^{-1}$  existe un efecto negativo sobre el crecimiento. Este resultado indica que con fenantreno como única fuente de carbono existe una sensibilidad mayor a  $\text{Cd}^{+2}$  en comparación al crecimiento con glucosa, donde  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$  de  $\text{Cd}^{+2}$  inhiben el crecimiento.

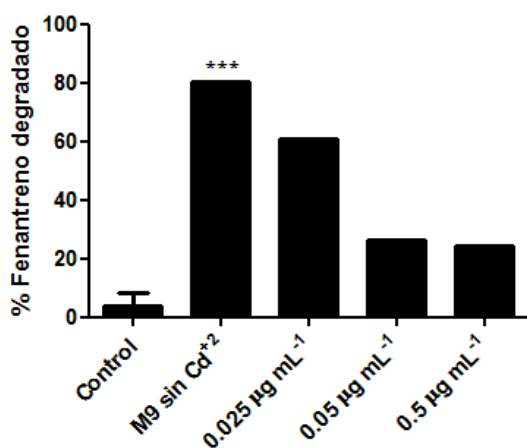




**Figura 22. Efecto del cadmio en el crecimiento con fenantreno como única fuente de carbono.** Se determinó el crecimiento por UFC mL<sup>-1</sup> en el tiempo del aislados D43FB en medio M9 con fenantreno (500 µg mL<sup>-1</sup>) como única fuente de carbono a concentraciones crecientes de Cd<sup>+2</sup> (0, 0.025, 0.05, 0.5 y 5 µg mL<sup>-1</sup>).

### Cinética de degradación de fenantreno

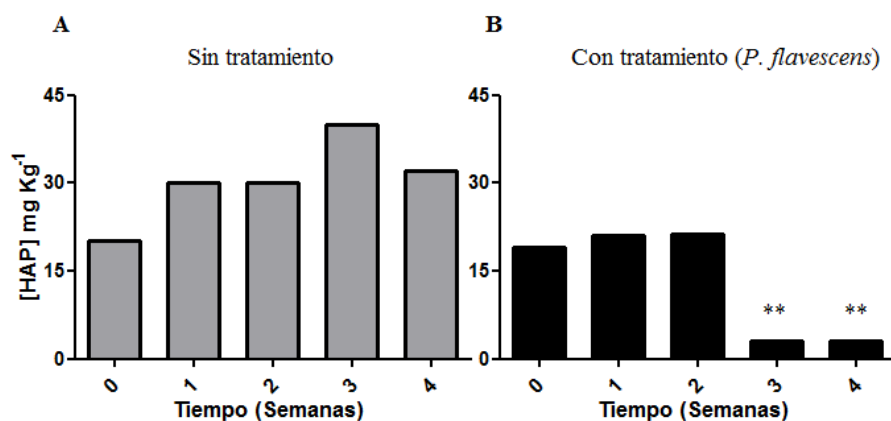
A partir de la cinética de crecimiento en presencia de Cd<sup>+2</sup> se determinó la concentración remanente de fenantreno a través de un análisis espectroscópico de fluorescencia. Los resultados sugieren que la cepa en ausencia de cadmio degradó aproximadamente el 80% del fenantreno, mientras que en las muestras con 0.025, 0.05 y 0.5 µg mL<sup>-1</sup> de cadmio se observó una disminución notoria de la degradación, metabolizando 60, 26 y 25%, respectivamente (**Fig. 23**).



**Figura 23. Degradación de fenantreno en presencia de Cd<sup>+2</sup>.** Se determinó la degradación de fenantreno a los 7 días de crecimiento en presencia de concentración se crecientes de cadmio (0, 0.025, 0.05 y 0.5 µg mL<sup>-1</sup>).

## Ensayo de bioaumentación con *P.flavescens* D43FB

En base a los resultados anteriores se determinó si la cepa *P.flavescens* D43FB puede ser utilizada en un proceso de biorremediación. Se cuantificó en el tiempo los HAPs presentes en un terrario bioaumentado con la cepa ambiental y un control sin tratamiento (**Fig. 24**). Al tiempo 0 se cuantificó en el control-20 mg Kg<sup>-1</sup> de HAPs. No se observaron cambios significativos en la concentración de hidrocarburo en el tiempo. Por otro lado, al tiempo 0 en el terrario con tratamiento se determinó 19 mg Kg<sup>-1</sup>. Valor similar a las siguientes 2 semanas: 20 y 22 mg Kg<sup>-1</sup> respectivamente. Interesantemente, a la tercera semana de tratamiento la concentración de HAP en suelo disminuyó a 4 mg Kg<sup>-1</sup>, valor que se mantuvo a la cuarta semana. La disminución corresponde a una degradación del 75% de HAP en el terrario, confirmando el potencial de biorremediación de la cepa antártica *P. flavescens* D43FB en bioprocesos de bioaumentación.



**Figura 24. Bioaumentación de terrario con *P.flavescens* D43FB.** Se cuantificó la concentración de HAPs en el tiempo en terrarios con suelo obtenido de la playa Quintero, (A) el terrario control sin tratamiento, barras grises y (B) terrario tratado con la cepa *P.flavescens* D43FB ( $2.4 \times 10^{10}$  UFC), barras negras. El análisis estadístico test de comparación múltiple de Tukey mostró diferencias significativas,  $p < 0,05$

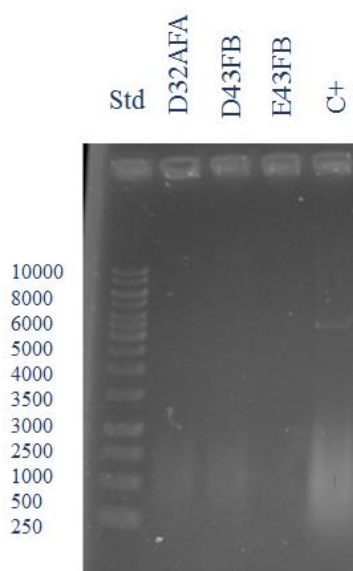
### III. Dilucidar procesos asociados a la degradación de fenantreno

La degradación de fenantreno por cepas bacterianas esta descrita por 5 procesos, los cuales fueron analizados para dilucidar cuales están asociados a la degradación: i) metabolización guiada por enzimas dioxigenasas, ii) la quimiotaxis, iii) liberación de biosurfactantes, iv) formación de biopelícula y v) adhesión a cristales de fenantreno.

## Presencia de dioxigenasas

Se evaluó la capacidad de los aislados para degradar fenantreno en condiciones anaeróbicas (usando jarra GasPak). Se determinó que sólo el aislado D43FB crece en anaerobiosis en presencia de glucosa; sin embargo, no es capaz de degradar fenantreno y utilizarlo como única fuente de carbono en estas condiciones. En anaerobiosis las rutas metabólicas difieren a las vías que utilizan al O<sub>2</sub> como aceptor de electrones, donde las enzimas dioxigenasas son reemplazada por enzimas dicarboxilasas, entre otras (Meckenstock, 2011). Esta información nos sugiere que D43FB requiere de O<sub>2</sub> para degradar fenantreno, por lo que su metabolización podría ser catalizada por enzimas dioxigenasa. Sumado a esto, la batería bioquímica indica que esta sepa es positiva para el ensayo de indol. Se sugiere la presencia de indol dioxigenasa, enzima homóloga a otras dioxigenasas de compuestos aromáticos (Boyd, 1997).

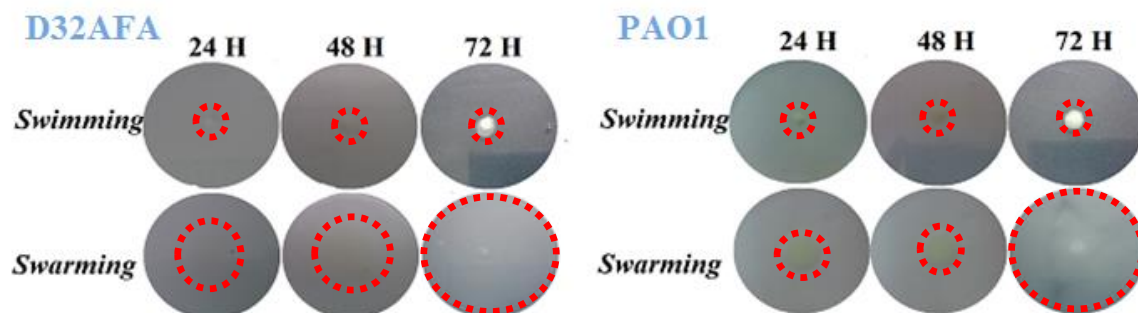
Por otro lado, está descrito que los genes de metabolización de HAPs pueden estar en el ADN cromosomal o plasmidial. A partir de esto, se realizó una purificación plasmidial utilizando una columna *mini prep*. Tras purificar, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%. No se evidenció presencia de plásmidos (**Fig. 25**), lo que sugiere que los genes que codifican la degradación de fenantreno se encontrarían en el ADN cromosomal.



**Figura 25. Purificación de plásmidos.** Se observa en el carril 1 el estándar de peso molecular, carril 2, 3 y 4 aislados D32AFA, D43FB y E43FB. El último carril contiene el control positivo, correspondiente a un purificado plasmidial de PbjASKA (6000 pb aprox.).

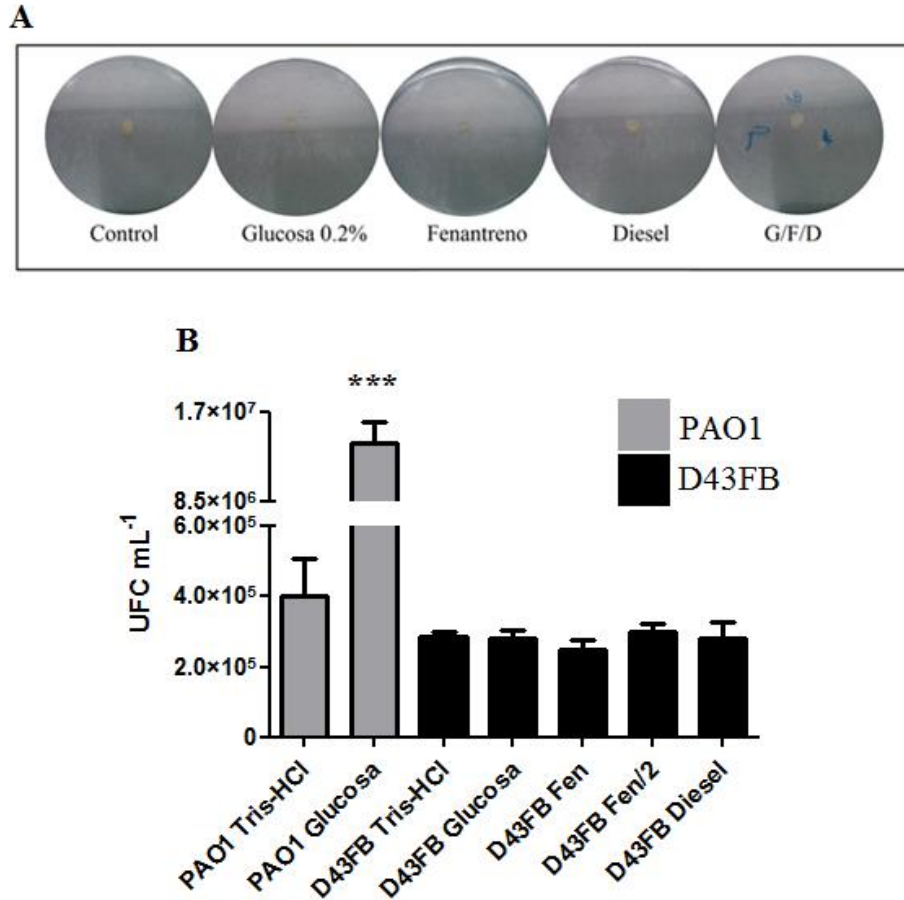
### Quimiotaxis.

En un primer lugar se estudió la quimiotaxis analizando la capacidad de motilidad por *swimming* y *swarming*. Para esto, cultivos a una D.O.  $600\text{ nm}$  de 0,1 se sembraron en M9 agar 0.25% (*swimming*) y 0.5% (*swarming*) (**Fig. 26**). D32AFA y PAO1 presentaron una motilidad tipo *swarming*, mientras que ninguna cepa presentó movimiento tipo *swimming*.



**Figura 26. Ensayo de motilidad.** Se determinó motilidad tipo *swimming* y tipo *swarming* en el tiempo (24, 48 y 72 h) en medio M9-agar 0,25% y 0,5% respectivamente para las cepas D32AFA y PAO, en rojo se delimita el crecimiento de las cepas.

Para determinar si en la cepa D43FB la quimiotaxis es un posible proceso asociado a la degradación de fenantreno se realizaron 2 ensayos diferentes. En medio sólido M9 (0.5% agar) con la cepa D43FB sembrada en el centro se agregó una solución con glucosa, fenantreno y/o diesel 0.2% en el contorno. Tras la incubación a  $28^{\circ}\text{C}$  no se observó en ningún caso un efecto de los compuestos sobre la motilidad de la cepa (**Fig. 27A**). Junto con esto, se realizó un ensayo de quimiotaxis por capilaridad frente a glucosa, fenantreno soluble, mitad de concentración de fenantreno soluble o diesel. El ensayo evidenció la ausencia de quimiotaxis en presencia de todos los componentes, evidenciándose una cantidad similar de  $\text{UFC mL}^{-1}$  tras sembrar el contenido dentro de la aguja. Como control se comparó con PAO1, que presenta quimiotaxis por glucosa (**Fig. 27B**). Estos resultados nos permiten sugerir que se descarta la quimiotaxis como un posible procesos asociado a la degradación como parte de la estrategia de la cepa D43FB para poder metabolizar fenantreno.



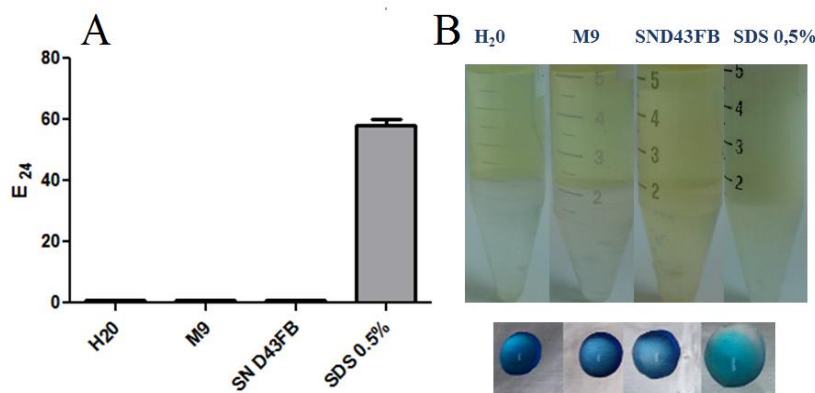
**Figura 27. Ensayo de quimiotaxis.** Se evaluó la capacidad quimiotáctica de D43FB por (A) ensayo en placa con glucosa, fenantreno y/o diesel en medio M9. Y por (B) ensayo de capilaridad en tris-HCl (control), glucosa, fenantreno soluble, mitad de la concentración de fenantreno soluble y diesel.

### Producción de biosurfactantes

Para determinar la producción de biosurfactante, se analizaron 2 metodologías. La primera, la determinación del índice E24, equivalente al porcentaje de emulsión del sobrenadante en presencia de diesel. El segundo, el ensayo de colapso de gota, donde se determina la alteración a la tensión superficial.

El ensayo de índice E24 para el sobrenadante concentrado de un cultivo de D43FB crecido con fenantreno como única fuente de carbono determinó un valor cercano a 0%, al igual que los controles agua destilada y medio M9 (al control SDS al 0.5% se le determinó un E24 cercano al 60%) (Fig. 28A). Junto a esto, el ensayo de colapso de gota sugiere que no hay biosurfactantes liberados al sobrenadante, debido a la ausencia de alteración en la

tensión superficial de la gota de sobrenadante teñida con azul de metileno (**Fig. 28 B**). Estos resultados sugieren que la producción de biosurfactantes no correspondería a un proceso asociado a la degradación de fenantreno por D43FB.



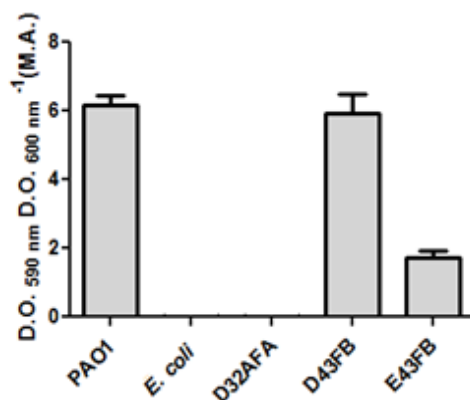
**Figura 28. Evaluación de producción de biosurfactantes.** Se determinó la producción de biosurfactantes a través de (A) índice  $E_{24}$  y (B) colapso de gota. Se analizó para ambos experimentos el sobrenadante de D43FB y los controles agua, M9 y SDS 0.5%

### Formación de biopelícula y adhesión a fenantreno

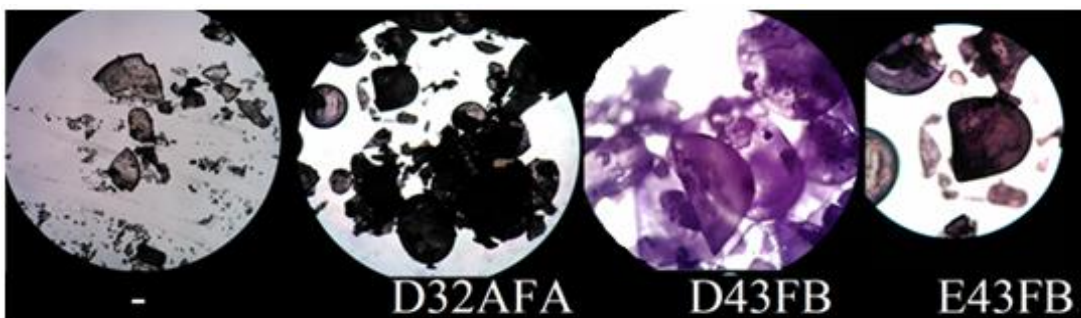
Otro proceso analizado fue la adhesión de los microorganismos a cristales de fenantreno; para esto, se determinó la formación de biopelícula y la adhesión de las bacterias a fenantreno. En el análisis de formación de biopelícula se observa PAO1 (control positivo) y D43FB como las cepas que evidenciaron un alto nivel de adhesión a la pared de la microplaca (**Fig. 29**).

Por microscopía óptica, se evaluó la adhesión al hidrocarburo en medio M9 con fenantreno como única fuente de carbono (**Fig. 30**). Cabe destacar que *E. coli* y PAO1 no crecieron en este medio. Por otro lado, se puede observar una mayor coloración (tinción con cristal violeta) de los cristales en el cultivo de D43FB, lo que concuerda con lo obtenido en el ensayo de biopelícula. Esto sugiere que uno de los procesos asociados a la degradación de fenantreno presente en esta cepa podría ser la adhesión a fenantreno. Por otro lado, al analizar la cepa E43FB en el ensayo de tinción también se observó una coloración violeta, aunque fue más tenue que D43FB, esto se correlaciona directamente con el resultado de formación de biopelícula en microplaca, donde se observó una formación de menor intensidad que la cepa D43FB. En ambos ensayos no se observa la formación de

biopelícula o adhesión de la cepa D32AFA a la placa o al cristal de fenantreno, respectivamente.



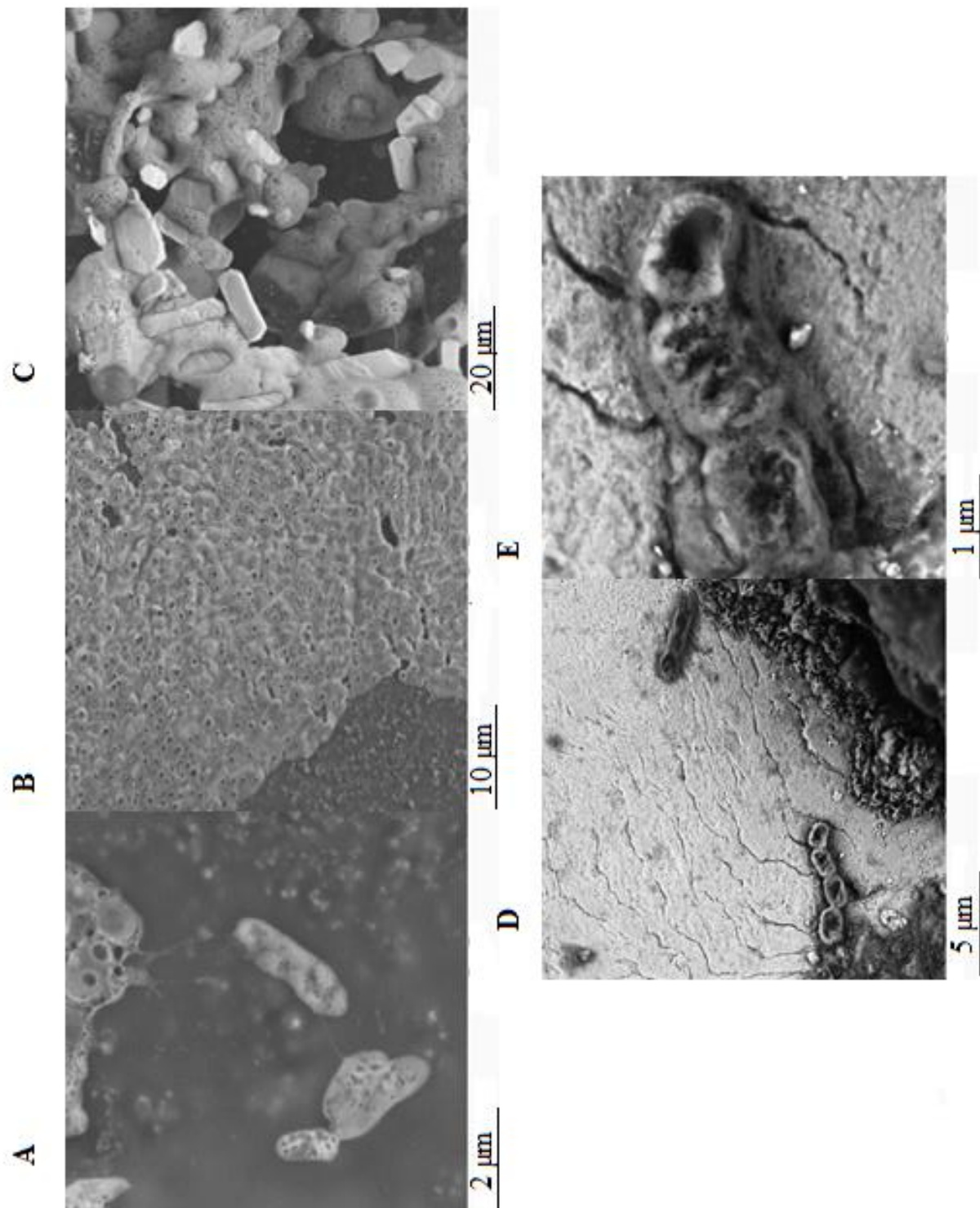
**Figura 29. Ensayo de formación de biopelícula.** Se determinó la capacidad de formar biopelícula en medio de cultivo M9 en placa multipocillo, a 24 h. Tras el crecimiento, se midió absorbancia a 600 nm. Se lavó cada pocillo y se agregó cristal violeta, luego se agregó una solución de acetona etanol y se resuspendió. Por último, se midió absorbancia a 590 nm para PAO1, *E. coli*, D32AFA, D43FB y E43FB.



**Figura 30. Adhesión a cristales de fenantreno.** Se analizó en un microscopio óptico la capacidad de adhesión de las bacterias a cristales de fenantreno.

Por último, para determinar de manera más detallada se evaluó la capacidad de adhesión de la cepa D43FB a cristales de fenantreno por microscopía electrónica de barrido (SEM) a partir de un cultivo de crecido 24 h en medio M9 con glucosa (**Fig. 31A** y **31B**) y otro por 120 h en medio M9 con fenantreno como única fuente de carbono (**Fig. 31D** y **31E**). Se comparó con una imagen de cristal de fenantreno en medio M9 (**Fig. 31C**). Los resultados indican que la cepa sería capaz de adherirse a fenantreno, siendo éste, un posible proceso asociado a la degradación de HAPs, favoreciendo la transferencia difusiva de masa de HAP a las células. Este resultado se relaciona directamente con el ensayo de adhesión a cristales de fenantreno teñido con cristal violeta y a la formación de biopelícula.





**Figura 31. SEM de bacteria adherida a cristales de fenantreno.** Se evaluó por SEM (A, B) un cultivo bacteriano de D43FB crecido 24 h en medio M9 con glucosa, (C) cristales de fenantreno sin bacteria y (D y E) un cultivo bacteriano de D43FB crecido 120 h en medio M9 con fenantreno.



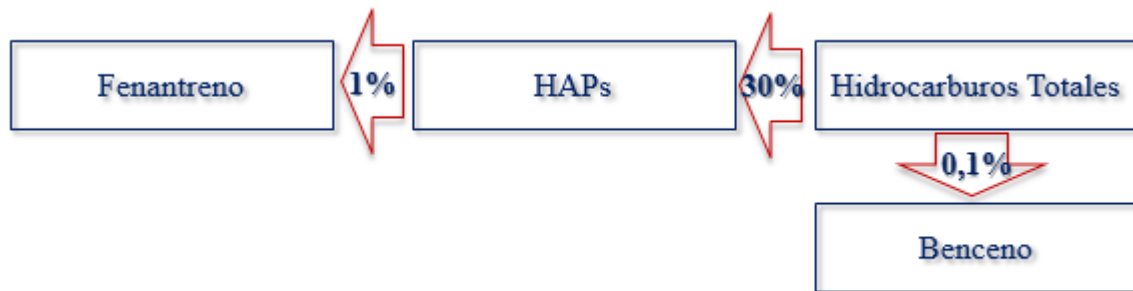
## DISCUSIÓN

### CARACTERIZACIÓN DE SUELOS ANTÁRTICOS

#### Contaminación de HAP y metales pesados

Los resultados obtenidos nos permiten discutir sobre el grado de contaminación de las muestras. El pH de las 8 muestras no indica que exista algún efecto en el suelo, ya que no mostro variaciones importantes y se mantuvo en un rango cercano a la neutralidad. Respecto a la concentración de HAP, se evidencia claramente la diferencia entre los suelos expuestos y los no expuestos, casi 1000 veces menos concentrado estos últimos y en relación al suelo D4 este valor llega a 2000 veces más HAPs.

Se observa que la exposición a diesel es responsable de la concentración de HAP. Junto con esto, estudios anteriores realizados por Pantoja (tesis de grado, Pantoja, 1994) indican que el fenantreno representa casi el 1% de los HAP y estos corresponden al 30% de los hidrocarburos totales del diesel, por lo que la contaminación determinada de fenantreno permite predecir la concentración de diesel en valores sobre los 10000 mg Kg<sup>-1</sup>. Por otro lado, está reportado que el benceno representa ~0.1% p/p de los hidrocarburos totales presentes en el diesel (Dunlap, 1988). Estos valores permitieron realizar la conversión (Fig. 32) y así predecir la concentración de benceno en suelos expuestos hasta ~10 mg Kg<sup>-1</sup>.



**Fig. 32. Conversión de concentración de fenantreno a hidrocarburo total.** Los valores de la concentración de fenantreno se utilizaron para predecir la concentración de Hidrocarburos Totales y benceno, la conversión se hace a partir de que el fenantreno equivale al 1% de los HAPs, y estos al 30% de los hidrocarburos totales. Además, está reportado que el benceno corresponde al 0.1% de los hidrocarburos.

En la normativa Chilena no hay claridad respecto la concentración en hidrocarburos en suelos. Otras normas como la Holandesa definen valores de referencia y de intervención (valor de intervención corresponde a la contaminación severa de los suelos donde es

necesario remediar) de 0.01 y 1 mg Kg<sup>-1</sup>, respectivamente, para compuestos aromáticos como el benceno (Brion y Rosso, 1998). Por otro lado, la norma de Panamá permite un valor máximo de hidrocarburos totales de <0.05 mg L<sup>-1</sup> en México el valor del benceno no puede superar los 15 mg Kg<sup>-1</sup> para suelos de uso industrial (Norma 138, 2003) y el valor de diesel no más de 1200 mg Kg<sup>-1</sup> para suelo residencial agrícola y hasta los 5000 mg Kg<sup>-1</sup> para el suelo industrial.

En relación a los metales pesados la norma Chilena define que la concentración de cadmio, cromo y plomo no puede superar los 40, 150 y 400 mg Kg<sup>-1</sup>. Por otro lado, la ley Holandesa define las concentraciones de intervención para suelos contaminados con cadmio, cromo y plomo en 12, 380 y 530 mg Kg<sup>-1</sup> (Brion, 1998). Bajo estos parámetros, se expone en la **Tabla 7** la situación de cada suelo considerando los valores de la norma Holandesa para metales en suelo y la norma Mexicana para diesel en suelos. Se puede determinar el grado de contaminación de los suelos Antárticos expuestos a diesel como alarmante, debido a que 5 de los 8 suelos deberían ser intervenidos si se aplicaran las leyes europeas y Mexicana.

Suelo	Cd	Cr	Pb	Hidrocarburos	Benceno	Intervención		
						Chile	Holanda	México
A0	9,79	0,31	6,24	1,38	0,00	No	No	No
B4	7,51	0,97	57,9	13,89	0,01	No	No	No
C3	18,4	0,24	80,2	0,90	0,00	No	Cd	No
C8	3,35	0,32	88,6	1,41	0,00	No	No	No
D3	81,3	1,26	743	2423,7	2,42	Cd, Pb	Cd, Pb, B	H
D4	28,9	0,85	678	17272,2	17,27	Pb	Cd, Pb, B	H, B
E2	9,59	0,36	28,2	313,1	0,31	No	B	No
E4	21,4	0,14	44	4950,6	4,95	No	Cd, B	H

**Tabla 7. Niveles de contaminación según Norma Chilena, Holandesa y Mexicana.** Concentración de cadmio, cromo y plomo, y predicción de HAP total y benceno (mg Kg<sup>-1</sup>). Valores en rojo representan concentraciones sobre la norma. Las columnas de la derecha representan si valores de la norma chilena esta sobrepasado en metales, holandesa en metales y benceno y mexicana en hidrocarburos totales (H) o benceno (B). En la norma Chilena y Holandesa no hay claridad sobre la concentración de hidrocarburos totales, para la norma Mexicana no hay claridad sobre los metales pesados en suelo.

### **Análisis biológico de los suelos.**

En relación a la caracterización biológica, se observaron 3 fenómenos interesantes. El primero es el aumento de la ABT y el número de heterótrofos en el suelo a mayores temperaturas de incubación (**Figs. 11 y 12**). En parte, esto nos indica la presencia de microorganismos psicrotolerantes también llamados psicrófilos facultativos ya que resisten

bajas temperaturas pero su temperatura óptima es en torno a los 20-30°C. Esto en parte se puede explicar por los cambios de temperatura que existen en el continente Antártico, específicamente en Bahía Fildes en Isla Rey Jorge, donde fueron tomadas las muestras de suelo. En esta región las temperaturas son variables y no tan gélidas como ocurre más al sur. Estos datos se corroboran con ensayos anteriores de nuestro laboratorio, donde los aislados seleccionados tienden a crecer mejor a 28°C. Esta característica de psicofacultativo permite extrapolar una posible aplicación biotecnológica en regiones continentales con temperaturas más elevadas y no sólo en zonas de bajas temperaturas. Un segundo fenómeno interesante es la baja ABT de los suelos analizados en comparación con suelos no antárticos o continentales (Casida 1977). Este empobrecimiento del suelo puede deberse a las bajas temperaturas, contenido de HAP, metales, biodiversidad, entre otros factores. El tercer punto es que el suelo D4 presenta la mayor ABT a pesar de ser el suelo con mayor contenido de HAPs, esto podría explicarse porque el diesel actúa como fuente de carbono para el suelo. El ensayo de enriquecimiento descrito en la Fig. 13 indicó que el fenantreno puede actuar como suplemento de suelos expuestos a diesel, principalmente debido a que en este tipo de muestras predominan aquellos microorganismos capaces de tolerar y metabolizar tóxicos del medio.

## **CARACTERIZACIÓN DE AISLADOS ANTÁRTICOS**

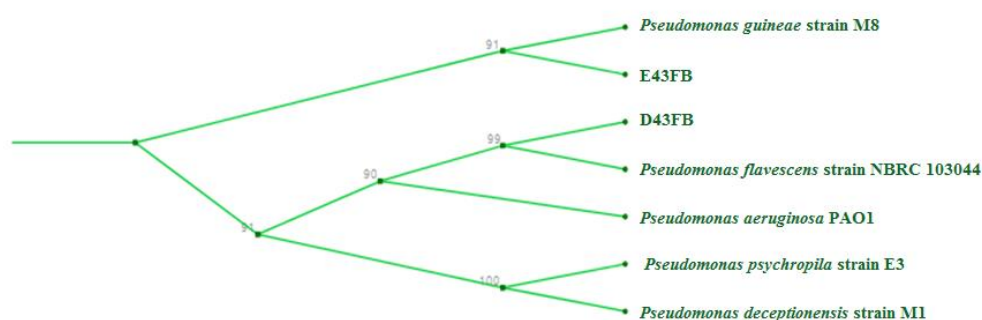
### **Método de selección**

Tras el aislamiento de las muestras de suelo se seleccionaron 53 cepas capaces de usar fenantreno. De este grupo, se seleccionó aquellos aislados que mejor degradan fenantreno, para lo cual se desarrolló un protocolo rápido, barato y fácil basado en espectroscopía de fluorescencia y calibración multivariada para la determinación del fenantreno en suelos y medios de cultivo. Este sistema basado en quimiometría es novedoso y de gran utilidad ya que involucra menor uso de solvente, es más rápido y fácil de usar que metodologías convencionales como cromatografías líquidas de alta pureza (HPLC) o cromatografía de gases (GC). Además, dentro de las ventajas de la calibración multivariada de segundo orden está la posibilidad de detectar y cuantificar un analito en una solución compleja con varios interferentes sin necesidad de separarlos físicamente (atributo conocido como la “ventaja de segundo orden”), lo que simplifica las etapas de análisis.

### Identificación de aislados degradadores de fenantreno

De los aislados seleccionados cualitativamente por calibración multivariada se eligió 3 microorganismos correspondiente al 0.85% del universo de los aislados originales. El análisis del gen del 16s rDNA permitió identificar a los aislados como *Pseudomonas flavescens* y *Pseudomonas guineae*. El tercer aislado (D32AFA) se identificó como *Pseudomonas peli* resultado que no coincide con lo obtenido en la tinción de Gram ni por batería bioquímica, por lo cual se necesitan más experimentos para su identificación. La identificación de 2 de los microorganismos como *Pseudomonas* no es sorprendente. Trabajos anteriores de nuestro laboratorio han mostrado un alto número de cepas de este género en muestras provenientes de Antártica (Gallardo, 2014). Por un lado, *P. flavescens* se relaciona con el grupo de *P. aeruginosa*, mientras que *P. guineae* se ha relacionado con aislados Antárticos provenientes de Isla Rey Jorge con características psicofacultativas. No hay información en literatura respecto de la capacidad de degradar fenantreno de estas cepas.

Un análisis filogenético realizado mediante los programas CLC Sequence Viewer y PhyDe, a partir de las secuencias nucleotídicas del gen 16S rDNA y de los microorganismos relacionados por el programa blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) indicaron que las cepas D43FB y E43FB no están muy emparentadas (dentro de su género). Por otro lado, la cepa D43FB en relación a cepas de referencia provenientes de Antártica (*P. psychrophila* y *P. deceptionensis*, provenientes de Isla Rey Jorge) tienen mayor parentesco que con la cepa E43FB (**Fig. 33**).



**Figura 33. Árbol filogenético.** Árbol de alineamiento de secuencias del gen 16s rDNA realizado en el software CLC sequence viewer 7.5. Comparado con *P. guineae*, *P. flavescens*, *P. aeruginosa*, *P. psychrophila* y *P. deceptionensis*.

Por otra parte, la temperatura óptima para los 3 aislados fue 28°C, siendo capaces de crecer desde 4°C pero incapaces de crecer a 37°C. Esto confirma a estas bacterias como psicofacultativos, característica de interés ya que si se considera un sistema de biotratamiento de suelos puede proyectarse no sólo a Antártica, sino también a lugares de mayores temperaturas.

La batería bioquímica reveló que las 3 cepas seleccionadas son positivas para los ensayos bioquímicos de generación de indol a partir de L-triptófano, sin embargo, esta descrito que *Pseudomonas* sp. es negativa. La degradación de L-triptófano por la enzima triptofanasa no se ha relacionado a la fecha con el metabolismo de oxidación de HAP, pero si la utilización de indol ya que se ha descrito que la enzima indol dioxigenasa es análoga a dioxigenasas de naftaleno o fenantreno (Boyd, 1997). Las otras pruebas bioquímicas positivas son comunes para *Pseudomonas* sp. sin una relación clara con la degradación de HAPs.

Por otro lado, la incapacidad de degradar fenantreno en ausencia de O<sub>2</sub> del aislado D43FB, permite establecer que la ruta de degradación usada por esta bacteria estaría iniciada por dioxigenasas, ya que esta enzima necesita como sustrato oxígeno molecular. La posible presencia de una enzima dioxigenasa permite por un lado ayudar a entender la ruta de degradación de fenantreno. En esta ruta participarían los genes *nahAb*, *nahAc* y *nahAd*, que en *Pseudomonas* sp. expresan el sistema ferredoxina, las subunidades mayor y menor de la dioxigenasa catalizando la dioxigenación de fenantreno a cis-1,2-dihidroxifenantreno o cis-3,4-dihidroxifenantreno (Seo, 2009). Esta ruta es bastante conservada, lo que nos permite predecir una orto o meta escisión de los anillos a través de varias oxidaciones, para generar ftalato o entrar a la ruta de degradación de naftaleno y generar ácido salicílico y metabolitos del metabolismo central como ácido pirúvico y acetil CoA (Peng, 2008 y Seo, 2007).

### **Efecto del cadmio**

Como se indicó antes, el cadmio afecta a los microorganismos disminuyendo la actividad de moléculas antioxidantes, aumentando ROS y uniéndose al ADN provocando daños genéticos. En literatura, los estudios de HAP y metales pesados tienden a desarrollarse sobre consorcios microbianos y no con cepas bacterianas. Por lo mismo, no hay mucha información en relación al efecto que tienen sobre la degradación de hidrocarburos aromáticos.

El MIC de  $\text{CdCl}_2$  para la cepa D43FB es  $25 \text{ mg L}^{-1}$  en medio M9 con glucosa como fuente de carbono; sin embargo, se evidencia un aumento en la sensibilidad al metal de esta bacteria al crecer en medio M9 con fenantreno como fuente de carbono. Esto puede ser consecuencia de que el cadmio se una al azufre de los centro de hierro-azufre de enzimas que presentan dominios Rieske (la enzima dioxigenasa presenta este dominio), alterando la actividad o inhibiendo las dioxigenasas (Park, 2008).

Una segunda posibilidad es el efecto del cadmio sobre la capacidad de adhesión al cristal de fenantreno. Se ha descrito que el cadmio inhibe la formación de biopelícula en microorganismos (Jin, 2007). De este modo, cuando la bacteria comienza a adherirse a los cristales de fenantreno el metal impediría la generación de una biopelícula temprana. Jin y cols. reportaron que el cadmio puede adsorberse en los polisacáridos extracelulares que forman parte de la biopelícula, disminuyendo la remoción de HAP.

### **Degradación de fenantreno y procesos asociados**

Un aspecto para tener en cuenta para un potencial uso en biotratamiento es el porcentaje de degradación de la cepa de estudio. En este caso, *P. flavescens* D43FB es capaz de metabolizar cerca del 80% del fenantreno en 7 días. Este valor está dentro de lo descrito en literatura. En este sentido, hay bacterias que degradan porcentajes similares entre los 5 y 10 días de crecimiento (Chauhan, 2008). Interesantemente, la temperatura de crecimiento de D43FB es óptima a  $28^\circ\text{C}$  y muchos de los microorganismos descritos como degradadores de HAP crecen a temperaturas mayores, por lo que el blanco de biotratamiento es distinto. Por otro lado, en un enfoque de biorremediar el continente Antártico, D43FB es capaz de metabolizar fenantreno inclusive a  $8^\circ\text{C}$  (datos nos mostrados). Sumado a lo anterior, esta cepa es capaz de crecer y degradar fenantreno en presencia de concentraciones de  $\text{Cd}^{+2}$  50 veces mayor a la permitida por la norma Chilena para residuos industriales líquidos (Decreto 90), inclusive con una disminución significativa del crecimiento la cepa es capaz de degradar el fenantreno sobre un 20% luego de 7 días.

En literatura no hay mucho descrito en relación a la degradación de HAP en presencia de metales por bacterias. Thavamanni y cols., el 2013 reportaron en un estudio utilizando consorcios ambientales en medio mineral optimizado que el crecimiento se detenía con 10

$\mu\text{g mL}^{-1}$  de  $\text{Cd}^{+2}$ ; sin embargo, estos estudios no ahondan en cepas individuales, posibles mecanismos, o la resistencia a cadmio de cada bacteria.

En relación a los procesos asociados a la degradación de fenantreno, están descritos 4:

El primero es la ruta metabólica de degradación mediado por dioxigenasas (Cernaglia, 1984). En este trabajo sugerimos que la cepa D43FB expresaría esta enzima.

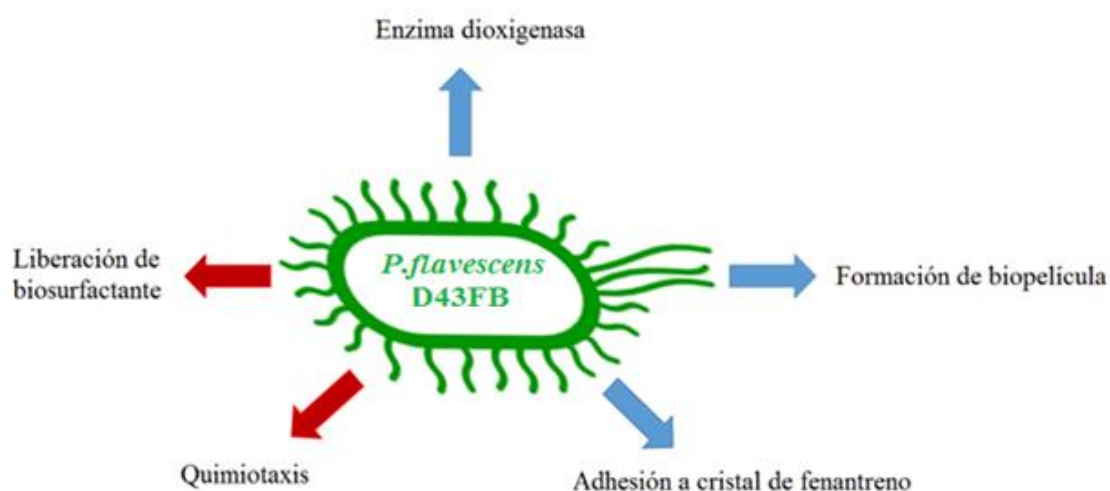
El segundo proceso propuesto es la quimiotaxis, el cual se ha descrito en *P. putida* G7 que presenta un plasmidio (NAH7) con el gen *nahY* que expresa una proteína quimiotáctica (Boronin, 2010). Esta característica no está presente en las bacterias degradadoras de HAP y por lo tanto no es sorprendente que la cepa D43FB no lo presente.

El tercer proceso es la producción y liberación de biosurfactantes. Estas moléculas son utilizadas para aumentar la solubilidad de los HAP, uno de los grandes problemas para su degradación. Existen varias bacterias descritas como productoras de bioemulsificadoras, entre ellas *P. aeruginosa*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *P. fluorescens* y *Bacillus* (Peng, 2008; Volkering, 1998 y Santos, 2008). Para estos microorganismos esta descrito que liberan biosurfactantes al crecer en medio mínimo con pireno como única fuente de carbono. Es probable que la cepa D43FB no produzca biosurfactantes, ya que existen bacterias altamente degradadoras de HAPs (*Sphingomonas* por ejemplo) en las cuales no se ha descrito producción de biosurfactantes (Johnsen, 2004).

El cuarto proceso es la adhesión a HAP para aumentar el influjo de hidrocarburo a la bacteria, en base a los resultados obtenidos planteamos que la cepa D43FB lo posee. En *P. putida*, *Mycobacterium* sp., *Methylobacterium populi*, *Sphingomonas* sp. y otras, la interacción del microorganismo con el cristal aumenta con la formación de biopelículas sobre los HAPs, siendo una forma eficiente de aumentar el flujo de los hidrocarburos a las células (Johnsen, 2007). Otro proceso asociado para aumentar el influjo de HAPs relacionado con la formación de biopelícula es la adhesión a hidrocarburos insolubles como los cristales de fenantreno. Está descrito para *Mycobacterium* que al crecer con fenantreno como fuente de carbono presenta una mayor hidrofobicidad de membrana, presentando un patrón de ácidos grasos de membrana diferente a células crecidas con glucosa, pero similar al crecer con antraceno, fluoranteno, fenantreno o pireno (Wick, 2002). Este cambio de

perfil de membrana se ha visto acompañado de una alta carga negativa; sin embargo, cómo se gatillan estos cambios o su mecanismo molecular es aún desconocido.

Los resultados sugieren que para la cepa *P.flavescens* D43FB, los procesos asociados a la degradación de fenantreno es la formación de biopelícula, adhesión a cristales de fenantreno y metabolización por dioxigenasas. Además, se descartó la liberación de biosurfactante y quimiotaxis (**Fig. 34**). Estos últimos, no son procesos ubicuos para las bacterias degradadoras de HAPs, por lo que no es sorprendente que la cepa D43FB no los presente.



**Figura 34.** Esquema resumen de la estrategia de degradación de fenantreno propuesto para *Pseudomonas flavescens* D43FB. Las flechas azules indican posibles procesos asociados que utiliza la cepa D43FB, las flechas rojas son procesos descartados.



## CONCLUSIONES

- 1.- Las muestras de suelos antárticos expuestos a diesel presentan un alto nivel de contaminación con fenantreno y metales pesados (cadmio y plomo). En base a parámetros internacionales (ya que en Chile no existe normativa de intervención) suelos con este nivel de contaminación requieren la intervención inmediata para su remediación.
- 2.- Durante esta tesis se desarrolló una metodología de cuantificación de HAP en medios de cultivo a través de calibración multivariada, más fácil, rápida y barata que los métodos convencionales.
- 3.- Se aislaron cepas ambientales capaces de degradar fenantreno en presencia de metales pesados e inclusive a bajas temperaturas. De éstas, la cepa *Pseudomonas flavescens* D43FB presenta las mejores tasas de degradación de fenantreno y resistencia a metales.
- 4.- Los procesos asociados a la degradación de fenantreno propuesto para *Pseudomonas flavescens* D43FB es la formación de biopelícula, adhesión a cristales de fenantreno y metabolización por dioxigenasas. Se descartó la liberación de biosurfactante y quimiotaxis.
- 5.- En base a lo anteriormente expuesto, la cepa *Pseudomonas flavescens* D43FB presenta una alternativa para su uso en biorremediación en Antártica y otras zonas.

## BIBLIOGRAFÍA

- Adeniyi, A. A., & Owoade, O. J. (2010). Total petroleum hydrocarbons and trace heavy metals in roadside soils along the Lagos–Badagry expressway, Nigeria. *Environmental Monitoring and Assessment*, 167(1-4), 625-630.
- Alarcón, F., Báez, M. E., Bravo, M., Richter, P., Escandar, G. M., Olivieri, A. C., & Fuentes, E. (2013). Feasibility of the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in edible oils *via* unfolded partial least-squares/residual bilinearization and parallel factor analysis of fluorescence excitation emission matrices. *Talanta*, 103, 361-370.
- Alexander, M. (1999). *Biodegradation and bioremediation*, Second Edition. Academic Press, San Diego, CA.
- Armstrong, B., Hutchinson, E., Unwin, J., & Fletcher, T. (2004). Lung cancer risk after exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: a review and meta-analysis. *Environmental Health Perspectives*, 112(9), 970.
- Bamforth, S. M., & Singleton, I. (2005). Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 80(7), 723-736.
- Beyersmann, D., & Hartwig, A. (2008). Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. *Archives of Toxicology*, 82(8), 493-512.
- Boffetta, P., Jourenkova, N., & Gustavsson, P. (1997). Cancer risk from occupational and environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Causes and Control*, 8(3), 444-472.
- Boronin, A., & Kosheleva, I. (2010). Diversity of naphthalene biodegradation systems in soil bacteria handbook of hydrocarbon and lipid microbiology. Springer 8:1155-1163.
- Bouchez, T., D. Patureau, P. Dabert, S. Juretschko, J. Dore, P. Delgenes, R. Moletta, & M. Wagner. (2000). Ecological study of a bioaugmentation failure. *Environ. Microbiol.* 2:179-190.
- Boyd, C., Larkin, M. J., Reid, K. A., Sharma, N. D., & Wilson, K. (1997). Metabolism of Naphthalene, 1-Naphthol, Indene, and Indole by *Rhodococcus* sp. Strain NCIMB 12038. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(1), 151-155.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1), 248-254.
- Brion, D., & E. Pelletier. (2005). Modelling PAHs adsorption and sequestration in freshwater and marine sediments. *Chemosphere* 61: 867–876.
- Calixto de Campos, R., Reis dos Santos, H., & Grinberg, P. (2002). Determination of copper, iron, lead and nickel in gasoline by electrothermal atomic absorption spectrometry using three-component solutions. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 57(1), 15-28.
- Casida, L.E. (1977). Microbial metabolic activity in soil as measured by dehydrogenase determinations. *Applied and Environmental Microbiology*, 34(6), 630-636.

- Cerniglia, C. E. (1984). Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Advances in Applied Microbiology*, 30, 31-71.
- Chauhan, A., Oakeshott, J. G., & Jain, R. K. (2008). Bacterial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: strategies for bioremediation. *Indian Journal of Microbiology*, 48(1), 95-113.
- Chen, G., Patten, C.L., & Schellhorn, H.E. (2003). Controlled expression of an *rpoS* antisense RNA can inhibit RpoS function in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(11), 3485-3493.
- Chen, Z., Li, H., Peng, A., & Gao, Y. (2014). Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by horseradish peroxidase in water containing an organic cosolvent. *Environmental Science and Pollution Research*, 4:1-10.
- Choi, I. W., Kang, S. W., Seo, Y. J., & Heo, J. S. (2012). Distribution characteristics of heavy metals in soil in the vicinity of King Sejong Station, King George Island, Antarctica. *Korea Society of Soil Science and Fertilizer*, 45(1), 103-106.
- Coppotelli, B. M., Ibarrolaza, A., Dias, R. L., Del Panno, M. T., Berthe-Corti, L., & Morelli, I. S. (2010). Study of the degradation activity and the strategies to promote the bioavailability of phenanthrene by *Sphingomonas paucimobilis* strain 20006FA. *Microbial Ecology*, 59(2), 266-276.
- Coppotelli, B., Ibarrolaza, A., Del Panno, M., & Morelli, I. (2007). Effects of the inoculant strain *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA on soil bacterial community and biodegradation in phenanthrene-contaminated soil. *Microbial Ecology*, 55(2), 173-183.
- Denier van der Gon, H., & Appelman, W. (2009). Lead emissions from road transport in Europe: a revision of current estimates using various estimation methodologies. *Science of the Total Environment*, 407(20), 5367-5372.
- Di Toro, D. M., McGrath, J. A., & Stubblefield, W. A. (2007). Predicting the toxicity of neat and weathered crude oil: Toxic potential and the toxicity of saturated mixtures. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26(1), 24-36.
- Djomo, J., Dauta, A., Ferrier, V., Narbonne, J., Monkiedje, A., Njine, T., & Garrigues, P. (2004). Toxic effects of some major polyaromatic hydrocarbons found in crude oil and aquatic sediments on *Scenedesmus subspicatus*. *Water Research*, 38(7), 1817-1821.
- Dunlap, L. E., & Beckmann, D. D. (1988, November). Soluble hydrocarbons analysis from kerosene/diesel type hydrocarbons. *Proceedings of the Conference on Petroleum Hydrocarbons and Organic Chemicals in Ground Water: Prevention, Detection and Restoration* (pp. 9-11).
- El Fantroussi, S., & S. N. Agathos. (2005). Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? *Curr. Opin. Microbiol.* 8: 268–275.
- Elías, A. O., Abarca, M. J., Montes, R. A., Chasteen, T. G., Pérez-Donoso, J. M., & Vasquez, C. C. (2012). Tellurite enters *Escherichia coli* mainly through the PitA phosphate transporter. *Microbiology Open*, 1(3), 259-267.

Estados Unidos de México. (2005). Norma oficial mexicana nom-138-semarnat/ss-2003, límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y las especificaciones para su caracterización y remediación. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.

Eweis, J.B., S.J. Ergas, D. P. Y. Chang, & E.D. Schroeder. (1998). *Bioremediation Principles*. McGraw-Hill, Boston, MA.

Gallardo, C., Monrás, J. P., Plaza, D. O., Collao, B., Saona, L. A., Durán-Toro, V. & Pérez-Donoso, J. M. (2014). Low-temperature biosynthesis of fluorescent semiconductor nanoparticles (CdS) by oxidative stress resistant Antarctic bacteria. *Journal of Biotechnology*, 187:108-115.

Gentry, T.J., C. Rensing, & I.L. Pepper. (2004). New approaches for bioaugmentation as a remediation technology. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 34:447-494.

González, N., Simarro, R., Molina, M., Bautista, L., Delgado, L., & Villa, J. (2011). Effect of surfactants on PAH biodegradation by a bacterial consortium and on the dynamics of the bacterial community during the process. *Bioresource Technology*, 102(20), 9438-9446.

Gordillo, F., Chávez, F. P., & Jerez, C. A. (2007). Motility and chemotaxis of *Pseudomonas* sp. B4 towards polychlorobiphenyls and chlorobenzoates. *FEMS Microbiology Ecology*, 60(2), 322-328.

Grover, P., & Sims, P. (1970). Interactions of the K-region epoxides of phenanthrene and dibenz [a,h] anthracene with nucleic acids and histone. *Biochemical Pharmacology*, 19(7), 2251-2259.

Guttenplan, S. B., & Kearns, D. B. (2013). Regulation of flagellar motility during biofilm formation. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(6), 849-871.

Hamdi, H., S. Benzarti, L. Manusadzianas, I. Aoyama, & N. Jedidi. (2007). Bioaugmentation and biostimulation effects on PAH dissipation and soil ecotoxicity under controlled conditions. *Soil Biology and Biochemistry* 39: 1926–1935.

Ibarrolaza, A., Coppotelli, B. M., Del Panno, M. T., Donati, E. R., & Morelli, I. S. (2009). Dynamics of microbial community during bioremediation of phenanthrene and chromium (VI)-contaminated soil microcosms. *Biodegradation*, 20(1), 95-107.

Ibarrolaza, A., Coppotelli, B., Del Panno, M., Donati, E., & Morelli, I. (2011). Application of the knowledge-based approach to strain selection for a bioaugmentation process of phenanthrene-and Cr (VI)-contaminated soil. *Journal of Applied Microbiology*, 111(1), 26-35.

Järup, L. (2003). Hazards of heavy metal contamination. *British Medical Bulletin*, 68(1), 167-182

Jin, P. (2007). The impact of cadmium on a Multi-species biofilm degrading naphtalene and the role of hydrogen peroxide in cadmium-biofilm interaction. (Memoria de grado inédita). Universidad de Cincinnati. Cincinnati.

Johnsen, A. R., & Karlson, U. (2007). Diffuse PAH contamination of surface soils: environmental occurrence, bioavailability, and microbial degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76(3), 533-543.

- Johnsen, A. R., Wick, L. Y., & Harms, H. (2005). Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environmental Pollution*, 133(1), 71-84.
- Johnsen, A., & Karlson, U. (2004). Evaluation of bacterial strategies to promote the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63(4), 452-459.
- Kandeler, F., Kampichler, C., & Horak, O. (1996). Influence of heavy metals on the functional diversity of soil microbial communities. *Biology and Fertility of Soils*, 23(3), 299-306.
- Kennicutt II, M., McDonald, T., Denoux, G., & McDonald, S. (1992). Hydrocarbon contamination on the Antarctic Peninsula: I. Arthur harbor—Subtidal sediments. *Marine Pollution Bulletin*, 24(10), 499-506.
- Kim, E., Aversano, P. J., Romine, M. F., Schneider, R. P., & Zylstra, G. J. (1996). Homology between genes for aromatic hydrocarbon degradation in surface and deep-subsurface *Sphingomonas* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(4), 1467-1470.
- Laurie, A. D., & Lloyd-Jones, G. (1999). The *phn* genes of *Burkholderia* sp. strain RP007 constitute a divergent Gene cluster for polycyclic aromatic hydrocarbon catabolism. *Journal of Bacteriology*, 181(2), 531-540
- Lierop, W., & MacKenzie, A. (1977). Soil pH measurement and its application to organic soils. *Canadian Journal of Soil Science*, 57(1), 55-64.
- Ling, H., Sayer, J. M., Plosky, B. S., Yagi, H., Boudsocq, F., Woodgate & R. Yang, W. (2004). Crystal structure of a benzo [a] pyrene diol epoxide adduct in a ternary complex with a DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(8), 2265-2269.
- Madueño, L., Coppotelli, B., & Morelli, I. (2009). Efecto de la inoculación de la cepa *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA sobre la composición de un consorcio bacteriano degradador de fenantreno. *Revista Argentina de Microbiología*, 41(2), 65-72.
- Margesin, R., & Schinner, F. (1997). Efficiency of indigenous and inoculated cold-adapted soil microorganisms for biodegradation of diesel oil in alpine soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 63 (7), 2660-2664.
- Margesin, R., Neuner, G., & Storey, K. (2007). Cold-loving microbes, plants, and animals fundamental and applied aspects. *Naturwissenschaften*, 94(2), 77-99.
- Mueller, J.G., R. Devereux, D.L. Santavy, S.E. Lantz, S.G. Willis, & P.H. Pritchard. (1997). Phylogenetic and physiological comparisons of PAH-degrading bacteria from geographically diverse soils. *Antonie Van Leeuwenhoek* 71: 329-343.
- O'Reilly, K.T., & R.L. Crawford. (1989). Degradation of pentachlorophenol by polyurethaneimmobilized *Flavobacterium* cells. *Applied and Environmental Microbiology*. 55: 2113-2118
- O'Toole, G., Kaplan, H. B., & Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annual Reviews in Microbiology*, 54(1), 49-79.

- Owamah, H. I., Topi, T., Sackett, D. K., Reichmann, J., Reyes, N., Rashad, M. & Rivas-Perez, H. (2013). Heavy metals determination and assessment in a petroleum impacted River in the Niger Delta Region of Nigeria. *Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology*.
- Park, S., & Ely, R. L. (2008). Candidate stress genes of *Nitrosomonas europaea* for monitoring inhibition of nitrification by heavy metals. *Applied and environmental microbiology*, 74(17), 5475-5482.
- Pantoja B., Cornwell E. & Pezoa L. (1994). Determinación de hidrocarburos aromáticos para diesel por cromatografía líquida de alta presión (HPLC). (Memoria de licenciatura inédita). Universidad de Chile. Santiago: 65.
- Parties, A. T. C. (1960). Protocol on Environmental Protection to the Antarctic Treaty.
- Parties, A. T. C. (1991). Protocol on Environmental protection to the Antarctic Treaty.
- Peng, R. H., Xiong, A. S., Xue, Y., Fu, X. Y., Gao, F., Zhao & W. Yao, Q. H. (2008). Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(6), 927-955.
- Pepper, I.L. & Gerba C.P. (2004). *Environmental Microbiology a Laboratory Manual*. Elsevier Academic Press. Second Edition. 71-76.
- Pinyakong, O., Habe, H., & Omori, T. (2003). The unique aromatic catabolic genes in *Sphingomonads* degrading polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *The Journal of General and Applied Microbiology*, 49(1), 1-19.
- Pritchard, P.H., J. Jones-Meehan, W. Straube, C. Nestler, W. Jones, J. Hind, & J.W. Talley. (2002). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): Improved land treatment with bioaugmentation. U.S. Army Engineer Research and Development Center, Vicksburg, MS.
- Pulles, T., van der Gon, H. D., Appelman, W., & Verheul, M. (2012). Emission factors for heavy metals from diesel and petrol used in European vehicles. *Atmospheric Environment*, 61, 641-651.
- República de Chile. (2001). Establece norma de emisión para la regulación de contaminantes asociados a las descargas de residuos líquidos a aguas marinas y continentales superficiales. Decreto 90. Ministerio Secretaría General de la Presidencia.
- Resnick, S. M., Torok, D. S., Lee, K., Brand, J. M., & Gibson, D. T. (1994). Regiospecific and stereoselective hydroxylation of 1-indanone and 2-indanone by naphthalene dioxygenase and toluene dioxygenase. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(9), 3323-3328.
- Riis, V., Babel, W., & Pucci, O. H. (2002). Influence of heavy metals on the microbial degradation of diesel fuel. *Chemosphere*, 49(6), 559-568.
- Rosenberg, M., & Rosenberg, E. (1985). Bacterial adherence at the hydrocarbon-water interface. *Oil and Petrochemical Pollution*, 2(3), 155-162.
- Samanta, S. K., & Jain, R. K. (1999). Evidence for plasmid-mediated chemotaxis of *Pseudomonas putida* towards naphthalene and salicylate. *Canadian Journal of Microbiology*, 46(1), 1-6. 49

- Santos, E. C., Jacques, R. J., Bento, F. M., Peralba, M. d. C. R., Selbach, P. A., Sá, E. L., & Camargo, F. A. (2008). Anthracene biodegradation and surface activity by an iron-stimulated *Pseudomonas* sp. *Bioresource Technology*, 99(7), 2644-2649.
- Santos, I. R., Silva-Filho, E. V., Schaefer, C. E., Albuquerque-Filho, M. R., & Campos, L. S. (2005). Heavy metal contamination in coastal sediments and soils near the Brazilian Antarctic Station, King George Island. *Marine Pollution Bulletin*, 50(2), 185-194.
- Saul, D. J., Aislabie, J. M., Brown, C. E., Harris, L., & Foght, J. M. (2005). Hydrocarbon contamination changes the bacterial diversity of soil from around Scott Base, Antarctica. *FEMS Microbiology Ecology*, 53(1), 141-155.
- Seo, J. S., Keum, Y. S., Hu, Y., Lee, S. E., & Li, Q. X. (2007). Degradation of phenanthrene by *Burkholderia* sp. C3: initial 1, 2-and 3, 4-dioxygenation and meta-and ortho-cleavage of naphthalene-1, 2-diol. *Biodegradation*, 18(1), 123-131.
- Seo, J.S., Keum, Y.S., & Li, Q. X. (2009). Bacterial degradation of aromatic compounds. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 6(1), 278-309.
- Sezgin, N., Ozcan, H. K., Demir, G., Nemlioglu, S., & Bayat, C. (2004). Determination of heavy metal concentrations in street dusts in Istanbul E-5 highway. *Environment International*, 29(7), 979-985.
- Straube, W.L., C. C. Nestler, L. D. Hansen, D. Ringleberg, P. H. Pritchard, & J. Jones-Meehan. (2003). Remediation of polyaromatic hydrocarbons (PAHs) through landfarming with biostimulation and bioaugmentation. *Acta Biotechnologica* 23(2-3):179-196.
- SurrIDGE, A., Wehner, F., & Cloete, T. (2009). Bioremediation of polluted soil. *Advances in Applied Bioremediation* (pp. 103-121). Springer.
- Thavamani, P., Megharaj, M., & Naidu, R. (2013). Metal-tolerant PAH-degrading bacteria: development of suitable test medium and effect of cadmium and its availability on PAH biodegradation. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-12.
- Tremblay, J., Richardson, A. P., Lépine, F., & Déziel, E. (2007). Self-produced extracellular stimuli modulate the *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility behaviour. *Environmental Microbiology*, 9(10), 2622-2630.
- Türkdoğan, M. K., Kilicel, F., Kara, K., Tuncer, I., & Uygan, I. (2003). Heavy metals in soil, vegetables and fruits in the endemic upper gastrointestinal cancer region of Turkey. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13(3), 175-179.
- Van der Most, P., & Veldt, C. (1992). Emission Factors Manual PARCOM-ATMOS: Emission factors for air pollutants 1992; Final Version: TNO.
- Volkering, F., Breure, A., & Rulkens, W. (1997). Microbiological aspects of surfactant use for biological soil remediation. *Biodegradation*, 8(6), 401-417.
- Wang, Y.-F., Huang, K.-L., Li, C.-T., Mi, H.-H., Luo, J.-H., & Tsai, P.-J. (2003). Emissions of fuel metals content from a diesel vehicle engine. *Atmospheric Environment*, 37(33), 4637-4643.

- Watanabe, K., M. Teramoto & S. Harayama. (2002). Stable bioaugmentation of activated sludge with foreign catabolic genes harbored by an indigenous dominant bacterium. *Environ. Microbiol.* 4:577-583.
- Watson, L., Kakela, P., Stoneman, J., & Fridgen, C. (1985). Used oil recycling: department of resource development, Michigan State University.
- Wei, Y. H., Chou, C. L., & Chang, J. S. (2005). Rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* J4 originating from petrochemical wastewater. *Biochemical Engineering Journal*, 27(2), 146-154.
- Wick, A. F., Haus, N. W., Sukkariyah, B. F., Haering, K. C., & Daniels, W. L. (2011). Remediation of PAH-contaminated soils and sediments: a literature review. Virginia Polytechnic Institute, Blacksburg, VA.
- Wick, L. Y., Wattiau, P., & Harms, H. (2002). Influence of the growth substrate on the mycolic acid profiles of mycobacteria. *Environmental Microbiology*, 4(10), 612-616.
- Wilson, S. C., & Jones, K. C. (1993). Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Environmental Pollution*, 81(3), 229-249.
- Winther, M., & Slentø, E. (2010). Heavy metal emissions for danish road transport.
- Yen, K., & Gunsalus, I. (1982). Plasmid gene organization: naphthalene/salicylate oxidation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(3), 874-878.
- Yin, Y., Jia, H., Sun, Y., Yu, H., Wang, X., Wu, J., & Xue, Y. (2007). Bioaccumulation and ROS generation in liver of *Carassius auratus*, exposed to phenanthrene. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 145(2), 288-293.
- Zhang, Z., et al. (2011). Zhang, Z., Rengel, Z., Meney, K., Pantelic, L., & Tomanovic, R. (2011). Polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs) mediate cadmium toxicity to an emergent wetland species. *Journal of Hazardous Materials*, 189(1), 119-126.
- Zumberge, J. H. (1979). Mineral Resources and Geopolitics in Antarctica: The physical obstacles to exploitation of mineral resources in Antarctica are currently prohibitive, but complex political issues will be raised if such exploitation becomes profitable. *American Scientist*, 67(1), 68-77.