



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA, BIOTECNO-
LOGÍA Y MATERIALES

USO POTENCIAL DE BACTERIAS AISLADAS DEL DESIERTO DE ATACAMA PARA
BIOPROCESOS CON METALES PESADOS: UNA APROXIMACIÓN GENÓMICA

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE
INGENIERO CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA

NICOLÁS ANTONIO SALAS WALLACH

PROFESORA GUÍA:
ORIANA SALAZAR AGUIRRE

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:
CRISTINA DORADOR ORTIZ
BÁRBARA ANDREWS FARROW

SANTIAGO DE CHILE
2021

RESUMEN DE LA MEMORIA PARA OPTAR
AL TÍTULO DE INGENIERO CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA
POR: NICOLÁS ANTONIO SALAS WALLACH
FECHA: 2021
PROF. GUÍA: ORIANA SALAZAR AGUIRRE

USO POTENCIAL DE BACTERIAS AISLADAS DEL DESIERTO DE ATACAMA PARA BIOPROCESOS CON METALES PESADOS: UNA APROXIMACIÓN GENÓMICA

Los metales pesados corresponden a un conjunto de elementos que contiene a metales y metaloides de alto peso molecular en comparación con el agua. En concentraciones altas son extremadamente tóxicos produciendo la muerte de los organismos expuestos. A pesar de ello existen microorganismos que tienen mecanismos para sobrevivir y prosperar en ambientes contaminados por los metales pesados, éstos principalmente consisten en la expulsión, captura o cambio de estado de oxidación del ion tóxico. De esta manera, algunos de los mecanismos son compatibles con actividades como la biominería (solubilización y lixiviación de minerales), bioremediación (reducción de la concentración de iones tóxicos) y la biosíntesis de nanopartículas. Es por ello que existe un constante interés en descubrir nuevos organismos que permitan mejorar estos procesos.

En este contexto se estudia la factibilidad de utilizar bacterias provenientes del desierto de Atacama para su aplicación en bioprocesos con metales a través de la identificación de genes marcadores de resistencia a cobre y hierro. Se seleccionan ocho bacterias provenientes de distintas lagunas y salares de la eco-región del desierto. En ellas se encuentran genes característicos de la resistencia a cobre, como lo son la familia *cop* y *cus*, utilización de hierro, como los genes para el transporte de Fe(III) (síntesis y transporte de sideróforos) y para el transporte de Fe(II) (transportadores de membrana). Además se caracteriza las adaptaciones de estas cepas a su ambiente desde una perspectiva genómica, considerando el resistoma ambiental y genes de mantención energética.

Basado en el trabajo realizado se propone una metodología de selección de organismos para los bioprocesos de biominería, bioremediación y/o biosíntesis de nanopartículas de metales. Ésta se inicia con una selección de un metal y alguno de los bioprocesos anteriormente mencionados, y un metal. Luego se recomienda el aislamiento de microorganismos provenientes de ambientes contaminados y una posterior secuenciación de su genoma. Finalmente se debe realizar una búsqueda de los genes codificantes para factores que permitan la resistencia al metal, ya sea de forma directa por bombas, chaperonas o enzimas oxidoreductoras, o indirecta por algún metabolito afecte al ion metálico, por ejemplo los ácidos orgánicos y el ion carbonato.

La principal candidata para estudios posteriores es la cepa 121 *Shewanella* sp. WE21, pues es capaz de realizar cualquiera de los bioprocesos estudiados, debido a su capacidad de reducir metales. No obstante, deber corroborarse la información con experimentos para cuantificar la generación de biomasa, biofilms, capacidad reductora y concentración mínima inhibitoria.

Se requiere un estudio de factibilidad económica para la aplicación de la tecnología para los diferentes metales que considere el precio de estos elementos en el mercado.

La lógica te llevará desde A hasta B. La imaginación te conducirá a todas partes.

Agradecimientos

Es increíble lo rápido que pasa el tiempo cuando uno está en buena compañía y disfrutando de su vida. La vida universitaria me trajo muchas alegrías, experiencias y crecimiento personal, cosas que no podrían haber sido posible de no ser por la maravillosa gente que me rodea.

Primero quiero agradecer a mi familia por soportarme, incentivarme a conocer el mundo y ser un apoyo increíble durante toda mi vida. En especial a mi querido hermano Álvaro que siempre me muestra que se puede lograr lo que uno de desea, mi mamá Andrea por enseñarme a ser constante y perseverante para lograr mis objetivos, mi papá Antonio por inculcarme el amor por la ciencia, las personas y por disfrutar los buenos momentos de la vida y mi perrita Dominga por demostrarme que nunca es tarde para aprender. A mis amados abuelos Mónica, Elisa y Nino que me han enseñado a través de sus historias que somos ciudadanos del mundo y debemos embarcarnos en aventuras para cumplir nuestros sueños por inverosímiles que parezcan. Y a mi nana Eliana por criarme y siempre estar atenta que nunca me falte algo ni pase hambre.

Segundo agradezco a mis amigos y amigas del colegio que hicieron muy especial esos años y los que vinieron después, en especial a mis amigos del alma Enzo y JP, y mis amigas Nati y Cami. Gracias a mis queridos *Chaquetinis* y *Sementales* con los que nunca faltó una risa ni sostén en tiempos difíciles. Quiero reconocer el labor de mis profes Pato Cortéz, Juan Zúñiga, Ricardo Jofré y Cachupo que siempre creyeron en mi y me ayudaron a superarme.

Por último pero no menos importante, a mis amigos de la universidad y los que he hecho en el camino. Andrés y la Romi me acompañaron en todo mi camino universitario siempre siendo un apoyo importante. Quiero agradecer a toda la gente maravillosa que conocí en OpenBio y la que existe en el departamento IQBM, nunca me había sentido tan acogido en algún lugar, en especial a mis amigos y amigas Véliz, Lorna, Danito, Quemus, Benja P, Cesar, Vane, Andi, Gualla, Denisse, Javi R, Benja A, Mumo, Gera, Javi V, Cata G, Ami e Isa, quiero que sepan que siempre tendrán un lugar en mi corazón y mi vida. Y mis amigos que he encontrado por las más maravillosas casualidades de la vida Nico M, Vale G, Cecilia y mi hermano italiano Andrea Evangelista. Quiero agradecer a todo el personal de la Universidad que ha creído en mi, a Loreto, a Noemí, al profe Álvaro, la profe Oriana y la Gina. De igual manera quiero agradecer al equipo de trabajo de Antofagasta, a Cristina por aceptarme y apoyarme en la realización del trabajo, a Pablo por ser siempre un soporte y un gran amigo y a Shelsy por guiarme y darme ánimos.

Tabla de Contenido

Introducción	1
1. Marco teórico	2
1.1. Metales pesados	2
1.1.1. Definición	2
1.1.2. Toxicidad	2
1.1.3. Mecanismos de remoción fisicoquímicos	3
1.2. Resistencia biológica a metales pesados	3
1.2.1. Barreras extracelulares	3
1.2.2. Transporte activo de iones	4
1.2.3. Secuestro extracelular	4
1.2.4. Secuestro intracelular	4
1.2.5. Cambio del estado de oxidación	5
1.3. Genes asociados a la resistencia de metales pesados	6
1.3.1. Genes asociados a la resistencia de cobre	6
1.3.2. Genes asociados a la resistencia de hierro	7
1.4. Microbiología del desierto de Atacama	11
1.4.1. Fuentes de energía	12
1.5. Diagramas de especiación para los iones de cobre y hierro	13
1.6. Bioprosesamiento de metales	14
1.6.1. Biominería	14
1.6.2. Bioremediación	14
1.6.3. Biosíntesis de nanopartículas	15
1.6.4. Propuesta de nuevo sistema de selección de organismos para su utilización en bioprocesos con metales pesados	16
2. Objetivos	17
2.1. Objetivo general	17
2.2. Objetivos específicos	17
3. Metodología	18
3.1. Revisión de organismos	18
3.1.1. Anotación de los genomas e identificación de especie	18
3.1.2. Selección de cepas	19
3.2. Genómica comparativa	19
3.2.1. Revisión de resistomas	19

3.2.2.	Árboles filogenéticos	19
3.2.3.	Presencia de genes marcadores de resistencia	20
3.2.4.	Otros mecanismos de resistencia	22
3.2.5.	Comparación del número de genes asociados a la resistencia y utilización de cobre y hierro entre cepas cercanas	22
3.2.6.	Proposición de clústers	23
3.2.7.	Búsqueda de genes de fotoheterotrofia y litheterotrofia	23
4.	Resultados	24
4.1.	Cepas aisladas	24
4.2.	Selección de cepas	26
4.3.	Presencia de genes de resistencia	27
4.3.1.	Otros genes de resistencia	28
4.4.	Comparación entre cepas cercanas	29
4.4.1.	Comparación del número de genes asociados a la tolerancia de hierro y cobre	29
4.4.2.	Caracterización filogenética	30
4.5.	Contexto genómico	30
4.6.	Adaptaciones para la subsistencia en la eco-región del desierto de Atacama	32
4.6.1.	Resistomas	32
4.6.2.	Genes para la mantención energética	35
4.7.	Proposición de metodología para la búsqueda de microorganismos propicios para bioprocesos	35
5.	Discusión	39
5.1.	Diversidad bacteriana y caracterización filogenética	39
5.2.	Elección de microorganismos con probable resistencia al cobre y hierro	39
5.3.	Genes marcadores de resistencia y probables clústers	40
5.4.	Comparación de genes para uso y resistencia de hierro y cobre con cepas cercanas	41
5.5.	Adaptaciones producto del medio ambiente	41
5.6.	Predicción de otros agentes que permiten la resistencia a partir de modelos metabólicos	42
5.7.	Metodología propuesta	43
5.8.	Limitaciones del trabajo	44
6.	Conclusiones	46
	Bibliografía	48
A.	Genes utilizados para la elaboración de los árboles filogenéticos	57
B.	Anexo Información para realizar la selección	59
C.	Anexo Puntajes asignados	61
D.	Anexo Comparaciones del número de genes asociados a la resistencia y utilización de cobre y hierro entre cepas similares	62

D.1. Comparación del número de genes identificados para la resistencia de cobre y hierro para la cepa AC2 <i>Bacillus altitudinis</i> y cepas filogenéticamente cercanas	62
D.2. Comparación del número de genes identificados para la resistencia de cobre y hierro para la cepa LB7 <i>Bacillus paralicheniformis</i> y cepas filogenéticamente cercanas	65
D.3. Comparación del número de genes identificados para la resistencia de cobre y hierro para la cepa 264 <i>Nesterenkonia lutea</i> y cepas filogenéticamente cercanas	67
D.4. Comparación del número de genes identificados para la resistencia de cobre y hierro para la cepa 618 <i>Roseovarius tolerans</i> y cepas filogenéticamente cercanas	69
D.5. Comparación del número de genes identificados para la resistencia de cobre y hierro para la cepa CA01 <i>Sphingopyxis bauzanensis</i> y cepas filogenéticamente cercanas	71
D.6. Comparación del número de genes identificados para la resistencia de cobre y hierro para la cepa 121 <i>Shewanella</i> sp. WE21 y cepas filogenéticamente cercanas	73
D.7. Comparación del número de genes identificados para la resistencia de cobre y hierro para la cepa S11 <i>Serratia quinivorans</i> y cepas filogenéticamente cercanas	75
D.8. Comparación del número de genes identificados para la resistencia de cobre y hierro para la cepa LB8 <i>Streptomyces thermogriseus</i> y cepas filogenéticamente cercanas	77
E. Anexo Genes encontrados <i>upstream</i> y <i>downstream</i>	79
F. Anexo Genes presentes en los resistomas	80

Introducción

Los metales pesados corresponden a metales y metaloides con un alto peso molecular comparados con el agua. Se caracterizan por tener una alta toxicidad para la gran mayoría de los organismos vivos, estando relacionados con daños oxidativos, mutaciones, deterioro del sistema nervioso, carcinogénesis y muerte [1]. Dadas las propiedades electroquímicas que algunos de estos elementos poseen se han desarrollado actividades para poder extraerlos y usarlos en manufactura, diseñar nuevas tecnologías, mejoramiento de suelos, etc [1]. De esta manera ha aumentado su concentración en la superficie terrestre, elevando su biodisponibilidad y la contaminación del medio ambiente tanto como en el agua, aire y suelo [1].

No obstante lo anterior, existen microorganismos capaces de sobrevivir a concentraciones tóxicas de metales pesados, ya que han desarrollado mecanismos para utilizarlos en su metabolismo, expulsarlos del interior, reducir su toxicidad y precipitarlos [2]. Sobre esta base se sustenta la búsqueda de organismos con aplicaciones industriales en procesos de lixiviación y detoxificación de metales.

Por otra parte, el desierto de Atacama y el altiplano chileno son zonas caracterizadas por condiciones extremas, tales como elevada salinidad, índices altos de radiación ultravioleta y presencia de metales pesados [3, 4]. Por lo que los organismos que allí habitan deben poseer adaptaciones para sobrevivir al continuo estrés, entre ellas la resistencia a metales pesados [4]. El estudio de estos organismos es parte de la labor que realiza el laboratorio de Complejidad Microbiana y Ecología Funcional, ubicado en el Instituto Antofagasta, que investiga la microbiología presente en estas zonas [5].

Capítulo 1

Marco teórico

1.1. Metales pesados

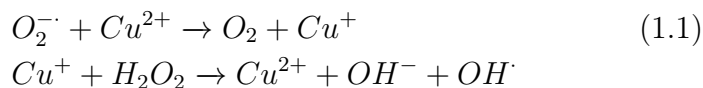
1.1.1. Definición

Se definen como metales pesados los elementos químicos metálicos o metaloides de alto peso molecular y alto nivel de toxicidad, como por ejemplo el arsénico (As), cadmio (Cd), cobalto (Co), cobre (Cu), cromo (Cr), hierro (Fe), mercurio (Hg), manganeso (Mn), níquel (Ni), plomo (Pb), selenio (Se), uranio (U) y zinc (Zn) [1]. Normalmente su concentración en la superficie es baja y sus fuentes naturales corresponden a erupciones volcánicas, erosión y meteorización de rocas. En los últimos años las actividades humanas como la minería, agricultura, quema de combustibles fósiles y corrosión han elevado peligrosamente sus niveles contaminando el medio ambiente [1, 6].

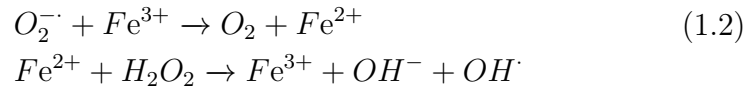
1.1.2. Toxicidad

La toxicidad de estos elementos depende de su biodisponibilidad y las concentraciones encontradas en las células. En condiciones normales en las células se encuentran en concentraciones ínfimas, denominándose elementos trazas y siendo partes fundamentales de enzimas como grupos prostéticos o cofactores por sus propiedades electroquímicas [7]. Sin embargo, en altas concentraciones tienen efectos tóxicos induciendo a daños en material genético, enzimas, organelos y membranas, esto al reemplazar iones, oxidar moléculas y producir especies reactivas de oxígeno [1]. Este último efecto es causado por el cobre y hierro que mediante las reacciones de Haber-Weiss (Ecuación 1.1) y Fenton (Ecuación 1.2), respectivamente, forman radicales hidroxilos que poseen un gran potencial oxidativo [8].

Ecuación de Haber-Weiss



Ecuación de Fenton



1.1.3. Mecanismos de remoción fisicoquímicos

Existen mecanismos fisicoquímicos que permiten la remoción de estos contaminantes desde el ambiente. A continuación se presentan los más utilizados.

- **Precipitación química**

Consiste en bajar la solubilidad de los elementos mediante formación de sales insolubles (como carbonatos, hidróxidos y sulfuros) o su adsorción a superficies, para luego proceder a procesos de clarificación y filtración [9]. No obstante, los lodos generados por la precipitación son de difícil extracción, siendo ésta su principal desventaja [2].

- **Resinas de intercambio iónico**

El fundamento de esta técnica es la adsorción de los iones metálicos a resinas poliméricas artificiales con alta afinidad por los iones de los metales pesados. En ella los cationes son adsorbidos e intercambiados por protones (H^+) o iones de sodio (Na^+), mientras los aniones son intercambiados por iones de cloro (Cl^-) [10]. Destacan en su alta eficiencia, capacidad y selectividad para tratar flujos de agua contaminados. Estas características permiten la recuperación de los metales para su utilización en otros procesos [10]. Pero solo se logra un buen desempeño si la corriente a tratar es ácida [2].

- **Filtración por membrana**

Esta técnica utiliza una membrana con poros pequeños que permite la separación del agua de contaminantes mediante un proceso de filtrado. Algunos de sus procesos más conocidos son la ultrafiltración, nanofiltración, osmosis inversa y ultrafiltración con polímeros soportados, siendo la principal diferencia el tamaño de los poros de la membrana exceptuando la última que utiliza polímeros para adsorber los iones metálicos formando un agregado de mayor tamaño [11]. Sus principales ventajas son el pequeño tamaño que requiere para su instalación y que no produce lodos tóxicos, pero tiene un costo elevado en relación con otros procesos [2].

1.2. Resistencia biológica a metales pesados

Los microorganismos han desarrollado diversas estrategias para sobrevivir a concentraciones tóxicas de metales. Estas pueden clasificarse en los siguientes grupos:

1.2.1. Barreras extracelulares

Consiste en evitar el ingreso de los iones contaminantes al interior de la célula, valiéndose de superficies que adsorban el contaminante. Principalmente la adsorción ocurre por las cargas electrostáticas de los iones (en su mayoría cationes) que son atraídas a cargas negativas en los grupos carboxilo, amino, fosfato e hidroxilo que predominan en la pared celular, cápside bacteriana, biofilms y polímeros extracelulares [2]. Debido a que el proceso ocurre por adsorción solo requiere de biomasa, por lo que puede utilizarse con organismos muertos [12].

1.2.2. Transporte activo de iones

Se basa en el uso de bombas de flujo para el transporte activo de iones metálicos fuera del citoplasma, su fuerza motora puede corresponder a la hidrólisis de ATP o al aprovechamiento de un gradiente electroquímico. Es considerado el sistema más común entre las bacterias resistentes a metales pesados y sus genes de resistencia pueden encontrarse tanto en cromosomas como vectores [12]. Las bombas pueden clasificarse principalmente en 3 familias, las cuales se describen a continuación.

- **Transportadores RND (resistencia a división por nodulación)**

Familia de permeasas que utilizan el transporte por antiporte de H^+ para mover del periplasma a la membrana plasmática metales pesados, drogas, colesterol, entre otras sustancias [12, 13].

- **Facilitador de difusión de cationes (CDF)**

Conjunto de permeasas con función transportadora desde el citoplasma hacia el periplasma de iones metálicos divalentes. Su fuerza motora corresponde a un transporte por antiporte de H^+ . Se encuentran presente en todos los reinos con funciones asociadas a los metales [12, 14].

- **ATPasas tipo P**

Familia de permeasas presentes en todos los organismos vivos, su principal función es transportar iones y lípidos al periplasma o al espacio extracelular. En particular para el caso de los iones metálicos es utilizada para la formación de metaloproteínas. Su fuerza motora corresponde a la desfosforilación de ATP [15].

1.2.3. Secuestro extracelular

Esta estrategia es muy similar a la de barreras extracelulares, puesto que consiste en la adsorción de iones a sustancias secretadas por la célula. Destaca la secreción de polímeros y agentes complejantes como ácidos orgánicos, sideróforos y glutatión que permiten la captura extracelular de los iones [2, 12].

Por otra parte, puede ocurrir de manera indirecta por la liberación de ácido sulfhídrico (H_2S), formación de carbonatos, oxidación con triyoduro (I_3^-), por mencionar algunos ejemplos. En el primer caso las bacterias sulfato-reductoras liberan ácido sulfhídrico que reduce los iones [2, 12], la precipitación por carbonatos se debe a la capacidad ureolítica de algunas bacterias y la liberación de ion carbonato que reacciona con los iones formando una sal con baja solubilidad [16]. Por último las bacterias yodo oxidantes son capaces de oxidar yoduro a yodo que reacciona con otros iones de yoduro formando triyoduro que es capaz de oxidar iones y elementos precipitados [17].

1.2.4. Secuestro intracelular

En el caso de que los iones se encuentren dentro de la célula y no sean transportados hacia el exterior, pueden ser secuestrados para inmovilizarlos. Esto es posible al formar precipitados insolubles o ser adsorbidos en proteínas, particularmente en proteínas ricas en sulfuros,

polifosfatos y cisteínas. Destacan las metalotioneínas y fitoquelatinas cuya función principal es quelar los iones tóxicos al unirse en zonas ricas en cisteínas [2, 12].

1.2.5. Cambio del estado de oxidación

La toxicidad y biodisponibilidad de los metales pesados depende del estado de oxidación en que se encuentre el ion, puesto a que varía la solubilidad, la afinidad por sitios catalíticos y sus propiedades electroquímicas. Es por ello que algunos de los mecanismos de detoxificación modifican el estado de oxidación para iones menos solubles e inocuos. Por otra parte, también es posible que los iones sean usados en el metabolismo energético de las células como fuentes de electrones (oxidación) o como aceptor final de electrones (reducción) [12].

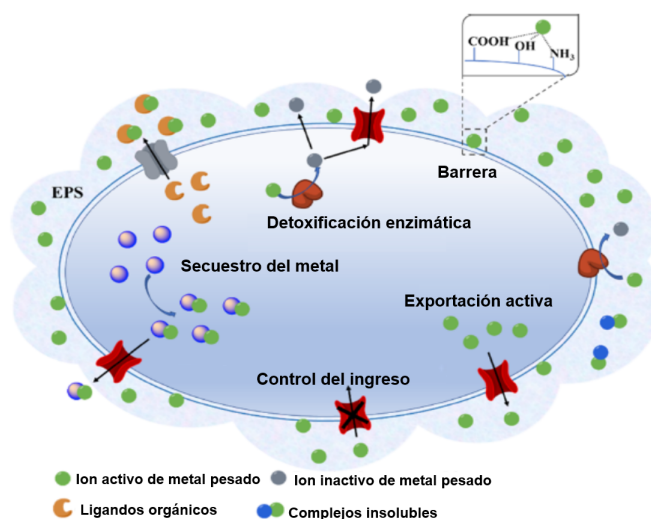


Figura 1.1: Mecanismos de resistencia a metales pesados. Adaptado de [2].

1.3. Genes asociados a la resistencia de metales pesados

1.3.1. Genes asociados a la resistencia de cobre

- **Clúster *pco***

Compuesto por el operón con los genes *pcoABCD*, los genes *pcoE* y los reguladores *pcoR* (activador) y *pcoS* (sensor). Los genes presentes en el operón transcriben para una cobre oxidasa (*pcoA*), ingreso de cobre al citoplasma (*pcoC* y *pcoD*, que pueden encontrarse fusionados en el gen *ycnJ*) y funciones aún desconocidas (*pcoB*). En cuanto a las proteínas de los genes fuera del operon, PcoE tiene asociada la función de unirse a cobre en el periplasma, PcoR corresponde a un activador transcripcional y PcoS se relaciona con el censo de cobre protoplasmático [18].

- **Clúster *cop***

El operón *cop* es considerado uno de los operones fundamentales en la resistencia al cobre, particularmente por la presencia de los genes *copA* y *copB* que codifican para ATPasas tipo-P para la translocación de cobre Cu(I). En algunos casos se ha reportado que la proteína CopA también tiene actividad de oxidasa bajando la toxicidad del ion [19]. El operón puede encontrarse como *copYZAB* [18] o *copABCD* y los genes independientes *copRS* [20]. Los productos de los genes *copC* y *copD* se asocian a la incorporación de cobre en el periplasma y a la membrana citoplasmática, respectivamente [18, 20]. Por otra parte, *copZ* codifica para una chaperona de iones de cobre permitiendo el intercambio, transporte y síntesis de moléculas que requieran del ion [21]. Los sistemas reguladores vienen codificados por los genes *copY*, *copR* y *copS*, el primero como un agente represor [21] y los dos últimos como proteínas censoras de cobre a nivel citoplasmático y membrana interna respectivamente [20].

- **Clúster *cut***

Se han reportado los genes *cutABCDEF* relacionados con la incorporación (*cutA* y *cutB*), almacenamiento (*cutE* y *cutF*), transporte en el interior (*cutE* y *cutF*) y hacia el exterior de la célula (*cutC* y *cutD*) [22]. Sin embargo, se ha encontrado que tienen un papel secundario en estas funciones y en la resistencia al cobre, salvo *cutE*, que codifica para una apoliproteína N-acetiltransferasa que acetila proteínas para la resistencia a cobre [18].

- **Clúster *cue***

El clúster está compuesto por *cueR* y *cueO*. El primero codifica para un regulador de los genes *cueO* y *copA*. En cuanto a CueO corresponde a una oxidasa multicobre cuya finalidad es oxidar el evitar el daño asociado a las reacciones que pueden llevarse con Cu(I). Para ello oxida Cu(I) a una forma menos reactiva Cu(II), evitando que se lleve a cabo la reacción de Haber-Weiss (Ecuación 1.1) [18].

- **Clúster *cus***

Los genes de *cus* se organizan en 2 operones, el operón *cusRS* con función reguladora y censal de Cu(I) en el periplasma, y el operón *cusCFBA* que codifica para un complejo

expulsor de iones de cobre desde el citoplasma o periplasma [18].

- **Calcóforos**

Corresponden a moléculas sintetizadas por los organismos para capturar iones de cobre extracelular para su posterior recuperación. Se han descrito principalmente en bacterias metanotrofas con el nombre de metanobactinas (Mbn). A la fecha se han descrito más de 74 operones que tienen como base los genes *mbnA*, *mbnB*, *mbnC* con funciones de biosíntesis [23].

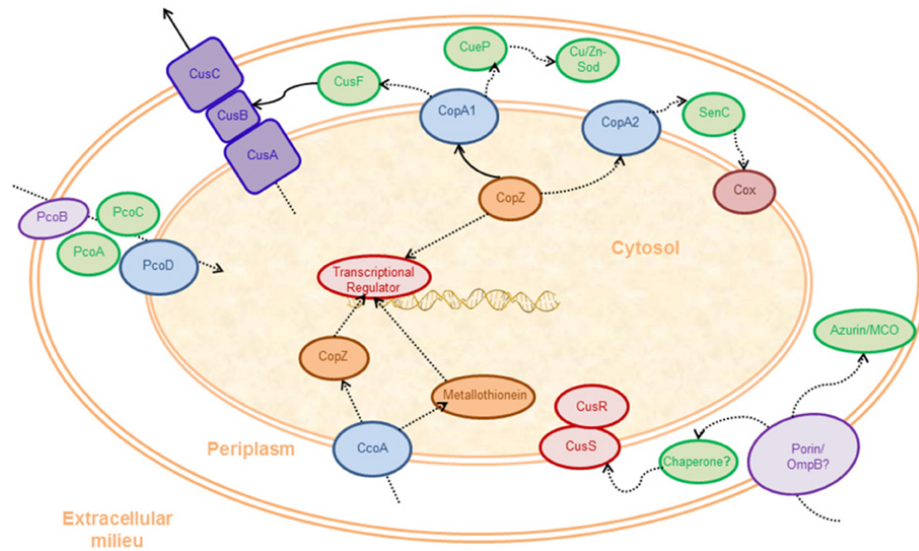


Figura 1.2: Resumen de mecanismos de resistencia y homeostáticos para cobre [24]

1.3.2. Genes asociados a la resistencia de hierro

El hierro puede encontrarse en 2 especies iónicas: el ion ferroso (Fe(II)) y el ion férrico (Fe(III)), siendo solubles e insolubles en agua respectivamente. Además en el ambiente predomina el ion férrico puesto que el ion ferroso es oxidado por el oxígeno atmosférico, esto produce que las concentraciones de hierro biodisponible sean bajas [25]. Por otro lado, el hierro es un nutriente limitante en el crecimiento bacteriano por lo que la mayoría de los mecanismos que involucran hierro son para su solubilización, incorporación y almacenamiento [26]. No obstante, existen proteínas expulsoras de hierro que se transcriben cuando éste alcanza concentraciones tóxicas dentro de la célula [27].

Genes reguladores de la incorporación

- **Regulador FUR**

El represor transcripcional FUR (Ferric Uptake Regulator) regula la mayoría de los genes relacionados con la incorporación de hierro. En particular reduce la expresión de los genes implicados en la síntesis de sideróforos y clústers de genes para la incorporación del ion ferroso como el clúster *feo* y el clúster *efe* ante concentraciones elevadas de hierro en el citoplasma [26, 28]. La proteína FUR se une al ion ferroso en el citoplasma y el complejo se adhiere a cajas FUR en el ADN que se ubican en la zona *upstream* de

los genes de esta manera bloqueando su transcripción [26]. Posee genes homólogos en actinobacterias y en alphaproteobacterias llamados *ideR* e *irr*, respectivamente [27].

Genes mediadores de la incorporación

La incorporación de iones de hierro se lleva a cabo principalmente por 2 mecanismos que dependen de los estados de oxidación de este. El ion ferroso ingresa por proteínas especializadas ya que es soluble, por otra parte el ion férrico requiere de moléculas complejantes que lo solubilicen (como los sideróforos) y proteínas que medien la incorporación del complejo.

- **Clúster *feo***

El clúster *feo* esta compuesto por el operón *feoABC*, siendo el complejo codificado por este el principal responsable de la incorporación del ion ferroso por parte de las bacterias. Es regulado por las proteínas FUR y FNR (proteína sensora de oxígeno). Al ser un sistema para el ion ferroso las bacterias que lo poseen en general se encuentran en ambientes con bajas concentraciones de oxígeno (ambientes anaeróbicos o microaeróbicos) o ambientes ácidos. La proteína principal del complejo es FeoB, que realiza el transporte. A FeoA no se le ha encontrado función aun pero su presencia mejora el rendimiento de FeoB. Por otra parte, FeoC solo se encuentra en gammaproteobacteria y se le supone una función como sensor de hierro [25].

- **Clúster *fhu***

En el clúster *fhu* (*ferric hydroxamate uptake*) se codifican las proteínas responsables del ingreso de sideróforos tipo hidroxamato unidos con hierro al interior de la célula. Algunos de los sideróforos que transporta son ferricromos, aerobactinas, ácido rodotúlico y coprogen [29].

Puede encontrarse como el operón *fhuACDB* o como *fhuCDBA*. La proteína FhuA transporta los complejos a través de la membrana externa, FhuD (ubicada en el periplasma) y FhuB (ubicada en la membrana interior) los transportan desde el periplasma al citoplasma mediante la hidrólisis de ATP catalizada por FhuC [30].

- **Clúster *yfe***

Los genes *yfe* se encuentran en 2 clústers *yfeABCD* e *yfeE*, siendo el primero el de mayor importancia y dónde reside la funcionalidad. Éste clúster es regulado por FUR y codifica para un transportador ABC compuesto por una proteína de unión al ion ferroso o manganeso en el periplasma (YfeA), una permeasa de la membrana interna formada por YfeC e YfeD y una proteína de unión a ATP. En cuanto a YfeE aun no se le conoce función pero se cree que puede aportar en el transporte, sin ser esencial [31, 32].

- **Clúster *efe***

El clúster *efeUOB* guarda relación con el ingreso de los iones Fe(II) y Fe(III). La versatilidad en el ingreso de los iones está dada por el complejo EfeUO, EfeO posee un sitio de unión al ion Fe(III) que facilita la acción de la permeasa EfeU permitiendo el ingreso del ion. En el caso de haber el ion ferroso la proteína peroxidasa EfeB se une al complejo EfeUO y oxida el ion [28].

- **Clúster *fbp***

El clúster *fbp* (ferric binding protein) se ha descrito para microorganismos con capacidad de ser patógenos, pues es utilizado para ingresar el ion férrico al citoplasma. El patógeno intercepta transportadores de hierro del huésped como la transferrina y la lactoferrina provocando la liberación del ion al periplasma donde el complejo FbpABC permite su incorporación. La función propuesta para la proteína FbpA es de unión al ion de hierro y de un posible sistema de almacenamiento de hierro en el periplasma [33], por otra parte el complejo FbpBC actúa como permeasa de hierro para la membrana interna [34].

Genes relacionados al eflujo de hierro

- **Bombas tipo P_{1B} ATPasa**

Los genes aquí encontrados codifican para proteínas de exportación de ion ferroso utilizando ATP como fuerza motora. Las proteínas sintetizadas tienen un rol en la resistencia al estrés oxidativo producido por ambientes con oxígeno y hierro. Algunos de los representantes son los genes *pfeT* (antes *zosA*), *frvA*, *ctpD*, *pmtA* y *nia* [27].

- **Facilitador de difusión de cationes (CDF)**

Corresponden a facilitadores del transporte de iones metálicos utilizando un gradiente de protones como fuente de energía. Se pueden encontrar los genes *fieF*, *aitP* y *feoE* [27].

- **Superfamilia mayor de facilitadores (MFS)**

Estos transportadores aun no está claro su mecanismo de funcionamiento pero son capaces de transportar un distintas moléculas (iones, amino ácidos y lípidos). No obstante, la estructura es conservada y consta de 2 dominios distintivos. En este grupo se puede encontrar el gen *iceT* (antes *mdtD*) que es capaz de transportar un complejo de hierro con citrato o citrato solo [27].

- **Ferritina unida a la membrana**

Esta clasificación corresponde a estructuras tipo ferritina que se encuentran unidas a la membrana, diferenciándose en que logran bajar la concentración intracelular de hierro. El principal gen encontrado es *mbfA* [27].

Genes asociados al cambio del estado de oxidación

Los iones de hierro pueden ser oxidados o reducidos dependiendo de las características del metabolismo bacteriano. En el caso de la oxidación ocurre principalmente para la obtención de energía y puede tener efectos secundarios como la biolixiviación de cobre. Por otra parte, la reducción es llevada a cabo si el hierro es el aceptor final de electrones [35, 36, 37]. Para el caso de este trabajo, se encuentran genes asociados a la reducción por lo que estos serán abordados con mayor detalle que los de oxidación.

Genes asociados a la oxidación

- **Clúster *pio* y *mto***

Los clúster *pio* (*photosynthetic Fe(II)-oxidation*) y *mto* (*metal oxidation*) se encuentran en operones como el operón *pioABC* y *mtoABCD*. Estos codifican para sistemas similares compuestos por una porina y un citocromo c. PioA tiene función de citocromo y PioB de porina, funciones homologas con MtoA y MtoB respectivamente [35]. Ambas proteínas forman un complejo que requiere de un transportador de electrones a la membrana interna rol desempeñado por PioC y MtoD. La recepción de los electrones en la membrana es llevada a cabo por un complejo bc1 para el caso del operón *pio* y en el otro caso por MtoC [36, 37].

Genes asociados a la reducción

- **Clúster *mtr***

El clúster *mtr* (*metal reduction*) es el responsable de codificar para las proteínas que realizan la reducción de metales, entre ellos el hierro. Al igual, que los clústers *pio* y *mto* consiste principalmente en una porina y un citocromo c. Esta formado por *mtrABC*, donde *mtrA* codifica para un citocromo c que transporta electrones a través de la porina transmembrana MtrB. Posteriormente MtrC y OmcA, otros citocromos c, transfieren los electrones del complejo al hierro [35].

Genes asociados al almacenamiento de hierro

- **Genes tipo ferritina**

La familia de las ferritinas esta compuesta por tres subfamilias: las ferritinas, las bacterioferritinas y las proteínas dps (*DNA-binding proteins from starved cell*). Esta familia tiene en común que es capaz de almacenar hierro en sus estructuras de manera de evitar la reacción de Fenton y liberarlo cuando es requerido [38]. Las ferritinas y bacterioferritinas se ubican en el citoplasma mientras las últimas cercanas al ADN. Sus secuencias tienen poca similitud entre sí (menor al 20%) y se encuentran distribuidas en todos los reinos, no obstante los eucariontes solo tienen ferritina [39, 38].

- **Clúster *mam***

Los magnetosomas corresponden a minerales de hierro de origen biológico formados en el interior de las bacterias, allí cumplen la función de orientar a la bacteria con el campo magnético de la Tierra. La formación de los magnetosomas requiere de 4 etapas, las que son: invaginación de la membrana, clasificación de proteínas en la membrana invaginada, alineamiento del magnetosoma y biomineralización [40].

Hay alrededor de 40 genes que codifican para la formación de magnetosomas y que se clasifican en distintos operones que en su conjunto se les conoce como MAI (*Magnetosome gene Island*). Los principales operones son *mamAB*, *mamGFDC* y *feoAB* [40].

Sideróforos

Los sideróforos corresponden a moléculas con capacidad de formar complejos solubles con el ion férrico del ambiente, en general corresponden a metabolitos secundarios secretados por bacterias. Pueden clasificarse en 4 grupos dependiendo de su estructura: catecolatos, fenolatos, hidroximatos y carboxilatos. En la Tabla 1.1 se pueden apreciar algunos ejemplos de cada grupo [26, 41, 29].

El proceso de captura del complejo sideróforo-hierro a la bacteria dependerá si esta es Gram-positiva o Gram-negativa. Para el caso de las primeras, un complejo específico permitirá su ingreso por la membrana exterior (normalmente el complejo de membrana TonB), para posteriormente ser incorporado al citoplasma por una bomba accionada por ATP. Para el caso de las Gram-negativas solo ocurre el proceso de incorporación por medio de la ATPasa [26].

Tabla 1.1: Ejemplos de sideróforos y su clasificación

Carboxilatos	Catecolatos
Staphyloferrina A	Enterobactina
Rizoferrina	Salmoquelina
Fenolatos	Hidroxamatos
Yersiniabactina	Alcaligina
Pioquelina	Aerobactina

1.4. Microbiología del desierto de Atacama

Las condiciones extremas que existen en el desierto de Atacama y en las regiones aledañas (altiplano) lo han catalogado como uno de los límites secos de la vida, se caracteriza por tener alta radiación UV, desecación, temperaturas extremas, presencia de elementos oxidantes y ambientes ácidos y alcalinos [42, 43].

La zona en que se ubica el desierto puede ser subdividida dadas las características geográficas en zonas de extrema aridez (por ejemplo estación Yungay), salares (por ejemplo Salar de Atacama y Salar de Huasco) y sitios con mayor humedad ubicados en el altiplano, como las lagunas Piacota y Cotacotani. Dependiendo de la humedad del sector se puede encontrar una distribución taxonómica diferente de los microorganismos, no obstante en su mayoría son cianobacterias y actinobacterias [42]. En el caso de los lugares con mayor humedad, proliferan los organismos fotosintéticos que se encuentran en el agua o deben refugiarse en rocas. En el caso de que se encuentren entre los granos de las rocas se les denomina organismos endolitos y si se encuentran bajo cristales translúcidos, organismos hipólitos [44]. También se han encontrado que en las lagunas hipersalinas subsisten organismos de la clase Bacilli, ya que tienen una gran adaptabilidad y resistencia a soluciones caotrópicas [45] y en cuencas evaporíticas alpha y gamma proteobacterias [46]. Por otra parte, en las regiones áridas e hiperáridas se encuentran principalmente actinobacterias [42].

1.4.1. Fuentes de energía

Las largas sequías que existen en los desiertos dificultan la supervivencia de la vida en ellos. Debido que la presencia de agua favorece la circulación de nutrientes y substratos a la célula, permite el correcto funcionamiento del metabolismo y posibilita el movimiento de microorganismos. Además están presentes otros factores de estrés como la alta radiación UV, alta salinidad, temperaturas extremas y baja cantidad de carbono y nitrógeno [44].

Para enfrentar la desecación los microorganismos entran en una fase de dormancia o inanición, que se caracteriza por una menor actividad metabólica. Si bien en esta fase hay un menor consumo energético se requiere de una fuente energética que aun no ha podido ser identificada, pero se han ideado 2 hipótesis para responder la interrogante [44].

Hipótesis de las reservas energéticas

Una de las hipótesis para el suministro constante de energía en los organismos es la generación de reservas energéticas durante períodos con humedad para mantenerse durante la dormancia. Particularmente, los organismos fotosintéticos oxigénicos realizan rápidamente la fotosíntesis al tener presencia de agua líquida producto de lluvias ocasionales, condensación o derretimiento de hielos y con ello generan una reserva energética ya que el proceso es dependiente del agua. Estos organismos son la principal entrada de carbono al sistema cuando no hay plantas [44].

Por otra parte, los organismos heterotrófos aprovechan la presencia del agua para capturar nutrientes del ambiente o producto de la lisis celular de otros organismos. También se ha reportado la liberación de azúcares hexosas y polímeros extracelulares, en presencia de humedad, por cianobacterias que traen consigo un aumento de la actividad metabólica de los heterotrófos. Además, el rápido consumo de oxígeno de los heterotrófos permite condiciones anaeróbicas y facilita la prosperidad de organismos quimiolitioautotrófos que consumen metano e hidrógeno [44].

Si bien existen ambientes que soportan esta hipótesis, no explica el caso para desiertos hiper áridos donde las precipitaciones ocurren en décadas o no existen. Siendo este el caso del desierto de Atacama [44].

Hipótesis de consumo constante de energía

Para ambientes hiper áridos en que la fotosíntesis oxigénica se ve limitada por la falta de agua, los organismos heterotrófos utilizan fuentes alternativas para cumplir sus requerimientos energéticos durante la inanición. Estas pueden ser gases trazas (litoheterotrofia) o luz solar (fotoheterotrofia), condiciones que están presentes en gran parte de los desiertos [44].

Los organismos litoheterotrófos habitan en zonas afóticas donde consumen gases trazas (di-hidrógeno (H_2), monóxido de carbono (CO) y metano (CH_4)) que son donantes altamente energéticos de electrones. El gas más utilizado es el di-hidrógeno, su consumo ocurre en bacterias de varias taxones y ecosistemas, y su metabolización se asocia a las enzimas [NiFe]-hidrogenasas del grupo 1H. El consumo de monóxido de carbono también está bien distribuido entre bacterias y se relaciona con la enzima monóxido de carbono dehidrogenasa. Por último, el metano no es un gas tan relevante en ambientes desérticos, pues se considera que su

consumo se reduce con la falta de agua y solo se ha localizado en linajes muy específicos de alfa- y gammaproteobacterias [44].

La fotoheterotrofia se da por sistemas formados por bacterioclorofilas (Bchl) o rodopsinas (Rho) que permiten la formación de un potencial de membrana utilizando fotones. El proceso se le conoce como fototrofia aeróbica anoxigénica [44].

A diferencia de la fotosíntesis oxigénica, los sistemas con Bchl utilizan pigmento bacterioclorofila A. Además, poseen un solo fotosistema que es cíclico, es decir, recicla sus electrones en el sistema y por tanto no requiere del consumo de agua. Por otro lado los sistemas con rodopsina constan de una bomba de iones (opsina tipo 1) y un cofactor retinal (cromóforo), que crean un potencial capaz de sintetizar ATP [44].

1.5. Diagramas de especiación para los iones de cobre y hierro

Las especies existentes de los distintos metales pueden variar dependiendo de las condiciones ambientales (pH, potencial electroquímico, moléculas orgánicas, agentes complejantes, etc). Parte de estos efectos pueden verse en los diagramas de Pourbaix que presentan las posibles especies de los elementos dadas variaciones entre pH y potencial electroquímico. En la Figura 1.3 se encuentran los diagramas para el cobre y hierro. En ella se puede ver que las especies iónicas son más probables de existir en ambientes ácidos, mientras que en ambientes neutros o alcalinos predominan complejos oxidados que son usualmente insolubles.

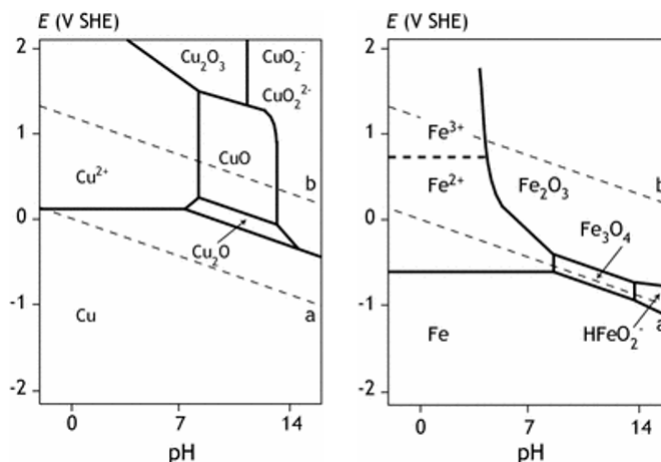


Figura 1.3: Diagramas de Pourbaix para cobre y hierro a 25°C en presencia de agua [47].

1.6. Bioprocésamiento de metales

1.6.1. Biominería

La biominería es el proceso por el cual es posible extraer metales desde minerales o desechos utilizando microorganismos. Se le conoce también como biolixiviación, pues los organismos permiten lixiviar algunos de los elementos que componen al mineral [48].

Es posible reconocer 2 tipos de biolixiviación, la realizada por organismos litoautótrofos y la por heterótrofos. La primera consiste en que el organismo utiliza el metal como fuente de energía provocando su oxidación. En particular, este es el caso para la lixiviación de cobre realizada por la bacteria ácida *Acidithiobacillus ferrooxidans* que oxida iones de hierro y provoca indirectamente la oxidación y solubilización del cobre (notar que en la Figura 1.3 a pHs ácidos existen las especies iónicas) [49].

Por otro lado, la lixiviación con organismos heterótrofos (bacterias y hongos) ocurre por la liberación de agentes complejantes al medio que permiten cambiar localmente las condiciones (pH) e interactúan con los elementos logrando la solubilización. Algunos de estos agentes son los polímeros extracelulares, ácidos orgánicos (ácido acético, ácido cítrico, ácido oxálico, por nombrar algunos) y sideróforos. Actualmente esta tecnología se encuentra en evaluación ya que al necesitar una fuente de energía externa eleva los costos, sin embargo puede ser rentable para metales con precios elevados como el oro, el grupo del platino (rutenio, rodio, paladio, osmio, iridio y platino) y elementos de tierras raras [50]. Una posible aplicación se ha encontrado para la bacteria *Roseovarius tolerans* con capacidad de oxidar yoduro (I^-) a yodo (I_2) y posteriormente formar triyoduro (I_3^-), agente que tiene la capacidad de reaccionar con el oro y solubilizarlo [17].

Al comparar la biolixiviación con la lixiviación química, el proceso biológico permite obtener elementos desde minerales de baja ley, recuperar metales desde desechos o escoria, tiene menores costos operacionales (biolixiviación litótrofa) y una huella ambiental considerablemente menor (menos emisiones de óxidos de azufre, dióxido de carbono, arsénico, etc). No obstante, es un proceso más lento, se posee menos control del proceso y no es posible su uso para todos los minerales. A pesar de las desventajas, cerca de un 20 % de la producción mundial de cobre se lleva a cabo por biominería [51].

1.6.2. Bioremediación

La bioremediación es el proceso por el cual se eliminan agentes contaminantes de un ambiente utilizando organismos, ya sean muertos o vivos. Destaca el uso de microorganismos por su presencia en diversos ambientes, su capacidad de rápido crecimiento y una elevada área superficial. Esto ha hecho que la bioremediación con microorganismos se le considere una tecnología importante e incipiente para la remediación ambiental [2].

El uso de microorganismos puede conllevar a distintas estrategias para la remoción de los metales pesados del ambiente, algunas de estas son:

- **Adsorción**

Algunas estructuras sintetizadas por las células, como polímeros extracelulares, proteí-

nas y lípidos, son capaces de adsorber iones de metales o metaloides. Esto se debe a la presencia de los grupos funcionales carboxilos, amino, fosfato y sulfatos que interactúan con las cargas electromagnéticas de los iones provocando su atracción. Además existen pretratamientos (ácidos, básicos o térmicos) opcionales que aumentan las cargas y exposición de los grupos [2].

- **Cambios de estados de oxidación**

La transferencia de electrones mediada por enzimas óxido-reductoras de metales produce un cambio en el estado de oxidación de los iones contaminantes. Estos cambios modifican la solubilidad del ion acorde a las propiedades que este tenga (aumento de solubilidad o precipitación). Este es el caso del ion mercuríco Hg(II) que es reducido a mercurio Hg(0), un elemento volátil por lo que se elimina del ambiente [2].

- **Bioprecipitación**

La formación de complejos estables e insolubles es una de las formas en que se pueden eliminar los iones contaminantes. La liberación de sulfuros, fosfatos, carbonatos y oxalatos por parte de las bacterias permite la precipitación de los agentes contaminantes al formar compuestos con baja solubilidad [52].

Actualmente diversos procesos para remediar sitios contaminados están siendo probados y escalados. Por ejemplo, la planta piloto instalada en el Valle de San Joaquín, CA, USA para el abatimiento de selenio (Se) por la bacteria *Thauera selenatis* obteniendo una reducción del 98 % de los iones [2, 53].

1.6.3. Biosíntesis de nanopartículas

Las nanopartículas (NPs) son partículas de tamaño menor a 100 nm con tres dimensiones. Son una tecnología muy promisoría por su capacidad de trabajar a nivel molecular, teniendo aplicaciones en física, química, biología, medicina, ingeniería y otras áreas interdisciplinarias. Éstas pueden clasificarse según su composición y origen (natural o sintético) [54].

Convencionalmente las NPs se sintetizan de manera química reduciendo el tamaño de elementos a niveles nanométricos con tratamientos químicos y físicos. Los tratamientos utilizan una gran cantidad de productos tóxicos y recursos energéticos, siendo estos las principales desventajas para su síntesis. Además la utilización de productos tóxicos limita el uso de las NPs en el ámbito médico [54].

Por otra parte, es posible realizar la síntesis de NPs metálicas con organismos vivos. Este proceso utiliza las enzimas reductoras y paredes celulares presentes en los organismos para reducir iones metálicos y así producir partículas sólidas. Sin embargo, aun se desconoce el proceso completo, pero se ha identificado a la enzima nitrato reductasa como uno de los agentes claves. A la fecha se han logrado sintetizar NPs de cobre, hierro, oro, plata, entre otros metales y también de óxidos y sulfuros. Más aún las NPs generadas biológicamente han demostrado biocompatibilidad para su uso en medicina. [54].

1.6.4. Propuesta de nuevo sistema de selección de organismos para su utilización en bioprocesos con metales pesados

En la actualidad los microorganismos utilizados en los distintos bioprocesos asociados a metales son aislados desde medios con presencia de estos contaminantes y seleccionados a partir de un cultivo que mide su rendimiento para la aplicación [55, 56]. No obstante, esta solución no considera un estudio genético de los mecanismos que permiten la solubilización, ni la asociación de organismos en un consorcio. Siendo estos factores una forma de aumentar el rendimiento y producción de los procesos con metales anteriormente referidos [57].

Por otro lado, se calcula que cerca del 99% de las bacterias no son cultivables con la tecnología y conocimiento actuales. Principalmente porque no se conocen las condiciones naturales que permiten su crecimiento ni si es necesaria una colaboración entre las bacterias. Pero las nuevas tecnologías de secuenciación masiva han permitido conocer parte de la diversidad que no es cultivable y estudiarlas mediante metagenómica [58]. Es así como se presenta un criterio para la selección de bacterias la búsqueda de genes asociados a la tolerancia de metales pesados en los genomas secuenciados de los organismos. Esto permitiría conocer si bacterias no cultivables en el laboratorio o consorcios son capaces de tolerar metales pesados y biotransformarlos.

En esta memoria se evalúan un grupo de genomas provenientes de bacterias aisladas de la eco-región del desierto de Atacama, ya que los mecanismos que permiten su subsistencia pueden tener aplicaciones en bioprocesos.

Capítulo 2

Objetivos

2.1. Objetivo general

Estudiar la factibilidad desde una perspectiva genómica, de utilizar microorganismos aislados desde el desierto de Atacama para distintos bioprocesos con los metales pesados hierro y cobre.

2.2. Objetivos específicos

- Ensamblar y anotar los genomas pertenecientes a organismos aislados desde el desierto de Atacama.
- Identificar genes marcadores de tolerancia a hierro y cobre en el genoma de microorganismos aislados.
- Caracterizar a través de árboles filogenéticos a los microorganismos aislados.
- Diseñar una metodología de selección de microorganismos para aplicaciones en biominería, bioremediación y biosíntesis de nanopartículas utilizando herramientas bioinformáticas.

Capítulo 3

Metodología

3.1. Revisión de organismos

3.1.1. Anotación de los genomas e identificación de especie

El laboratorio de Complejidad Microbiana y Ecología Funcional del Instituto Antofagasta tuvo disponible la secuencia de 19 genomas sin analizar, de bacterias y arqueas aisladas de distintos salares y lagunas altiplánicas de pH alcalino de la eco-región del desierto de Atacama.

La revisión de los genomas se llevó a cabo usando el programa online KBase, software que permite subir, analizar información genética y generar modelos al unificar distintas herramientas utilizadas en la bioinformática [59]. Inicialmente, se cargó al servidor las 19 secuencias y se ensambló el genoma utilizando los algoritmos para ensamble Velvet y SPAdes. El desempeño de ambos fue comparado según las categorías de menor número de contigs, contigs más largos, genes predichos más largos y menos errores (*mismatches*), con lo que el algoritmo SPAdes tuvo una mejor respuesta [60].

Posteriormente, se realizó la anotación del genoma usando los algoritmos RAST¹ y Prokka² [60], de ellos se obtuvo resultados muy similares para la anotación de los genomas. Sin embargo, se optó por usar la anotación RAST pues es compatible con otras aplicaciones bioinformáticas de KBase.

Adicionalmente se clasificó taxonómicamente las cepas utilizando secuencias del ribosoma 16s y la herramienta de NCBI BLASTn para encontrar las especies que guardan mayor similitud a cada una [63].

¹El sistema RAST (*Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology*) anota la proteínas usando la clasificación FIGfams para las familias de proteínas. En la que se requiere que al menos se comparta un 70 % de similaridad entre ellas o que en genomas muy similares (sobre el 90 %) se encuentren flanqueadas por regiones similares [61]

²En el algoritmo utilizado por Prokka (*rapid prokaryotic genome annotation*) se hace uso de la herramienta Prodigal para buscar los genes candidatos, luego se utiliza BLAST+ con cada uno de los genes comparando solo con secuencias enteras y comprobadas teniendo como criterios un *e-value* de 10^{-6} [62]

3.1.2. Selección de cepas

Se realizó una búsqueda bibliográfica de los genes más comunes que se relacionen con la resistencia y utilización de cobre y de hierro en microorganismos. Los genes encontrados luego son buscados en la anotación de los genomas de cada una de las cepas. Por otra parte, se investigó en la bibliografía sobre el uso de las especies encontradas o filogenéticamente cercanas en trabajos relacionados con metales pesados (resistencia y biotransformación).

Con los resultados obtenidos de la sección anterior se realizó una asignación de puntajes, asignando un punto si la cepa cumple con los criterios presentados a continuación. Las cepas con mayor puntajes fueron seleccionadas acotando el grupo de individuos con que trabajar.

- Criterios de selección a partir de los genes presentes:
 - Ingreso de complejos metálicos con citrato
 - Ingreso de complejos metálicos con hidroxamato
 - Síntesis de EPS o biofilms
- Criterios de selección a partir de información sobre especies relacionadas:
 - Formación de nanopartículas de cobre o hierro
 - Formación de carbonatos
 - Síntesis de sideróforos
 - Generación de óxido de manganeso
 - Solubilización de metales, independiente de sideróforos
 - Oxidación/Reducción de yodo
 - Trabajos con tierras raras
- Pertener a una clase filogenética con interés biotecnológico (actinobacterias)

De esta manera se obtienen 8 organismos con los que se continuó el trabajo, donde cada clase de bacteria (alphaproteobacteria, gammaproteobacteria, bacillus y actinobacteria) tiene 2 representantes. Así se esperó una mayor representación de las posibles adaptaciones genéticas para cada clase.

3.2. Genómica comparativa

3.2.1. Revisión de resistomas

Pérez et al. (2008) en [64] define un set de genes que representan el resistoma³ ambiental de la bacteria *Rhodobacter* sp. Rb3. Basado en su trabajo se identificaron los genes pertenecientes al resistoma ambiental en los organismos seleccionados. Los genes identificados fueron clasificados para establecer cuánto representa su clasificación de la totalidad del resistoma.

3.2.2. Árboles filogenéticos

Con la herramienta de KBase “*Insert Genome Into SpeciesTree - v2.2.0*” y con los parámetros predeterminados se construyeron los distintos árboles filogenéticos. Esta herramienta

³Conjunto de genes asociados a la resistencia a algún factor

utiliza un set de 49 genes conservados (ver Anexo A) para determinar las diferencias filogenéticas, dónde se incluyen tRNA sintetetasas, proteínas y secuencias ribosomales, entre otros. En las figuras generadas (Figuras 4.3, D.1, D.4, D.7, D.10, D.13, D.16, D.19, D.22) la distancia horizontal representa el grado de cambio (con unidades de sustituciones nucleotídicas por sitio) y los números en los nodos el grado de seguridad de que las ramas son distintas (oscila entre 0 y 1) [65].

3.2.3. Presencia de genes marcadores de resistencia

Genes marcadores de resistencia a cobre

Para determinar la presencia de genes marcadores de resistencia en los genomas de las bacterias se buscó en UniProt las secuencias de los genes *pcoABCD*, *copABCDZ*, *cutACEF*, *cueO*, *cusABCF* en la Tabla 3.1 están las entradas, nombres de los genes y las cepas de las que se obtuvo la secuencia. Luego, con la herramienta de búsqueda por similitud de secuencias “*BLASTp prot-prot Search - v2.7.1*” de KBase [66] se identificó posibles candidatos de genes homólogos en los genomas de las bacterias aisladas. Los candidatos fueron revisados manualmente con un BLAST en la base de datos de UniProt [67] para confirmar que correspondan al gen.

Tabla 3.1: Genes marcadores de resistencia a metales pesados utilizados para identificar homólogos en los genomas seleccionados

Código UniProt	Gen	Bacteria
Q47452	<i>pcoA</i>	<i>Escherichia coli K12</i>
Q47453	<i>pcoB</i>	<i>Escherichia coli K12</i>
Q47454	<i>pcoC</i>	<i>Escherichia coli K12</i>
Q47455	<i>pcoD</i>	<i>Escherichia coli K12</i>
Q59385	<i>copA</i>	<i>Escherichia coli K12</i>
O32220	<i>copA</i>	<i>Bacillus subtilis 168</i>
P12375	<i>copB</i>	<i>Pseudomonas syringae pv. tomato</i>
P05425	<i>copB</i>	<i>Enterococcus hirae ATCC 9790</i>
P12376	<i>copC</i>	<i>Pseudomonas syringae pv. tomato</i>
C0SP95	<i>ycnJ</i>	<i>Bacillus subtilis 168</i>
P12377	<i>copD</i>	<i>Pseudomonas syringae pv. tomato</i>
O32221	<i>copZ</i>	<i>Bacillus subtilis 168</i>
A0A353GDF2	<i>copZ</i>	<i>Rhizobium sp.</i>
P69488	<i>cutA</i>	<i>Escherichia coli K12</i>
A0A2M9SMC7	<i>cutA</i>	<i>Streptomyces albidoflavus</i>
P67826	<i>cutC</i>	<i>Escherichia coli K12</i>
Q830V2	<i>cutC</i>	<i>Enterococcus faecalis ATCC 700802</i>
P23930	<i>cutE</i>	<i>Escherichia coli K12</i>
P40710	<i>cutF</i>	<i>Escherichia coli K12</i>
P40710	<i>cueO</i>	<i>Escherichia coli K12</i>
P38054	<i>cusA</i>	<i>Escherichia coli K12</i>
A0A4U9HNE2	<i>cusA</i>	<i>Serratia rubidaea</i>
P77239	<i>cusB</i>	<i>Escherichia coli K12</i>
P77211	<i>cusC</i>	<i>Escherichia coli K12</i>
P77214	<i>cusF</i>	<i>Escherichia coli K12</i>
Q8E8R5	<i>cusF</i>	<i>Shewanella oneidensis MR-1</i>

Genes marcadores para resistencia y utilización de hierro

Se ejecutó el software FeGenie que permite identificar genes asociados a la regulación, transporte, almacenamiento, formación de magnetosomas y cambios de estado de oxidación de hierro dados los genomas de las bacterias [68] sobre los genomas identificando los genes presentes. De los genes encontrados no se considera en esta sección los asociados a la captación de hemoglobina, transferrina ni la síntesis y transporte de sideróforos pues existe una gran diversidad de genes para ellos.

Debido a que FeGenie no detecta los genes que codifican para bombas de flujo de hierro, se buscó la secuencia de los genes de la Tabla 3.2 descritos en *Ferrous iron efflux systems in bacteria* [27] en UniProt [67] para posteriormente realizar el mismo procedimiento usado para los genes marcadores de cobre. Para ambos casos cobre se verificó que los genes identificados correspondan a los predichos realizando una búsqueda por BLAST en UniProt.

Tabla 3.2: Genes de bombas de eflujo de hierro

Código UniProt	Gen	Bacteria
A0A164SM15	<i>pfeT</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
Q8Y992	<i>frvA</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
P69380	<i>fieF</i>	<i>Escherichia coli</i>
Q9I447	<i>aitP</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Q8ZLNQ0	<i>iceT</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
A9CKH9	<i>mbfA</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>

3.2.4. Otros mecanismos de resistencia

La presencia de polímeros extracelulares (EPS), generación de óxidos de manganeso y óxidos de yodo también influyen en la captación de metales pesados y por ende la resistencia a estos. Se estudió la presencia de estos mecanismos buscando con la herramienta BLASTp [66] de KBase los genes presentes en la siguiente Tabla 3.3. Además se complementó la búsqueda de genes para la síntesis de EPS usando la herramienta “View Function Profile for Genomes - v1.4.0” [69] que permite visualizar la presencia de dominios funcionales de las proteínas en los genomas.

Tabla 3.3: Genes relacionados con otros mecanismos de resistencia

Código UniProt	Gen	Mecanismo relacionado	Bacteria	Referencia
A0A0A1GY75	<i>ioxA</i>	Oxidación de yodo	<i>Roseovarius</i> sp. A-2	[70]
A0A061QGJ9	<i>ioxB</i>	Oxidación de yodo	alpha proteobacterium Q-1	[70]
A0A061QGR2	<i>ioxC</i>	Oxidación de yodo	alpha proteobacterium Q-1	[70]
P75030	<i>ureA</i>	Formación de carbonatos	<i>Bacillus subtilis</i> 168	[71]
Q9FCD1	<i>ureA</i>	Formación de carbonatos	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	[71]
P71035	<i>ureB</i>	Formación de carbonatos	<i>Bacillus subtilis</i> 168	[71]
Q9FCD2	<i>ureB</i>	Formación de carbonatos	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	[71]
Q883F3	<i>ureAB</i>	Formación de carbonatos	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	[71]
O86507	<i>ureAB</i>	Formación de carbonatos	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	[71]
P77837	<i>ureC</i>	Formación de carbonatos	<i>Bacillus subtilis</i> 168	[71]
Q9FCD3	<i>ureC</i>	Formación de carbonatos	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	[71]
A5PCK8	<i>mopA</i>	Oxidación de manganeso	<i>Erythrobacter</i> sp. SD-21	[72]
P71431	<i>mofA</i>	Oxidación de manganeso	<i>Leptothrix discophora</i>	[72]
A0A6N7N9Q2	<i>mnxG</i>	Oxidación de manganeso	<i>Escherichia coli</i>	[72]

3.2.5. Comparación del número de genes asociados a la resistencia y utilización de cobre y hierro entre cepas cercanas

Utilizando los genomas presentes en la base de datos KBase y los de las bacterias aisladas se construyó un árbol filogenético para cada una de ellas. Se seleccionó los genomas de las 20 bacterias más filogenéticamente cercanas de cada una para estudiar la presencia de los genes de resistencia y utilización de cobre y hierro. En las secciones siguientes se describe el procedimiento seguido para identificar y contabilizar el número de genes asociado a la resistencia a cada metal, que posteriormente permitió ordenar las cepas de mayor a menor resistencia o utilización del metal.

Resistencia al hierro

Utilizando el conjunto de genomas se ejecutó el software FeGenie [68] identificando los genes involucrados en la homeostasis del hierro, considerando todos los genes identificados.

Resistencia al cobre

Se supuso que el número de genes relacionados al uso y resistencia al cobre (cuproproteínas, mecanismos de resistencia, regulación) guarda relación con un mayor nivel de tolerancia dado lo expuesto por *Arguello et al.* (2013) en [24].

Para los conjuntos de genomas formados al realizar el árbol filogenético se les construyó los pangenomas de cada uno usando la herramienta “*Build Pangenome with OrthoMCL - v2.0*” que permite la detección de genes ortólogos en un conjunto de genomas y agrupa los resultados en un pangenoma del conjunto [73]. Seguidamente se usó la herramienta “*Compare Genomes from Pangenome*” que tiene la función de agrupar los genes homólogos del conjunto de genomas que componen el pangenoma [74], con ello se realizó la comparación entre cepas de los genes codificantes para reguladores transcripcionales, cobre-oxidases, bombas de flujo, proteínas de incorporación, proteínas de adsorción y chaperonas que la notación permitió distinguir.

3.2.6. Proposición de clústers

Se utilizó los resultados obtenidos en la sección de comparación de cepas para elegir las cepas que tengan mayor número de genes de cobre y de hierro, las cepas S11 *Serratia quinivorans* y 121 *Shewanella* sp. WE21.

A las cepas seleccionadas se le realizó una exploración manual en el visulizador de genes de KBase de los 10 genes ubicados inmediatamente en la región *upstream* y 10 en la región *downstream* en busca de clústers o islas de genes que se asocien con la resistencia a metales pesados. Si se encontraban genes con notación de proteína hipotética o sin notación, se llevó a cabo un BLAST en la base de datos de NCBI para identificar a que gen corresponde.

3.2.7. Búsqueda de genes de fotoheterotrofia y lithoheterotrofia

Se revisó bibliografía asociada a la mantención energética durante periodos de dormancia y se seleccionó los genes marcadores de fotoheterotrofia (clúster *bchl*, clúster *puf* y rodopsinas [44, 75]) y de lithoheterotrofia (*hhyS* y *hhyL*, para H_2 [76, 77] y *coxL* para *CO* [78]). Se realizó una búsqueda en los genomas para identificar los genes, ésta se llevó a cabo usando la anotación del genoma y se complementó con la herramienta BLASTp de KBase.

Capítulo 4

Resultados

4.1. Cepas aisladas

Las 19 cepas aisladas por el laboratorio de Complejidad Microbiana y Ecología Funcional se presentan en la Tabla 4.1 y en la Figura 4.1 mostrando la codificación usada, el sitio de aislamiento (si está reportado), la especie identificada y la clase taxonómica de estas.

Tabla 4.1: Taxonomía y ubicación de las cepas.

Cepa	Sitio de aislamiento	Especie	Clase
86	Laguna de Piacota	<i>Acinetobacter bohemicus</i>	Gammaproteobacteria
94A		<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	Gammaproteobacteria
110		<i>Exiguobacterium aurantiacum</i>	Bacilli
119	Laguna de Cotacotani	<i>Psychrobacter alimentarius</i>	Gammaproteobacteria
253	Salar de Huasco	<i>Erythrobacter</i> sp. THAF29	Alphaproteobacteria
AC		<i>Bacillus vallismortis</i>	Bacilli
AC2	Salar de Atacama	<i>Bacillus altitudinis</i>	Bacilli
SN		<i>Haloarcula tradensis</i>	Halobacteria
S11		<i>Serratia quinivorans</i>	Gammaproteobacteria
LB8		<i>Streptomyces thermogriseus</i>	Actinobacteria
D1		<i>Serratia quinivorans</i>	Gammaproteobacteria
S54		<i>Serratia quinivorans</i>	Gammaproteobacteria
LB7		<i>Bacillus paralicheniformis</i>	Bacilli
NP42		<i>Bacillus paralicheniformis</i>	Bacilli
264	Salar de Huasco	<i>Nesterenkonia lutea</i>	Actinobacteria
276	Salar de Huasco	<i>Seohaecicola saemankumensis</i>	Actinobacteria
618	Salar de Llamará	<i>Roseovarius tolerans</i>	Alphaproteobacteria
121	Salar de Huasco	<i>Shewanella</i> sp. WE21	Gammaproteobacteria
CA01	Salar de Huasco	<i>Sphingopyxis bauzanensis</i>	Alphaproteobacteria

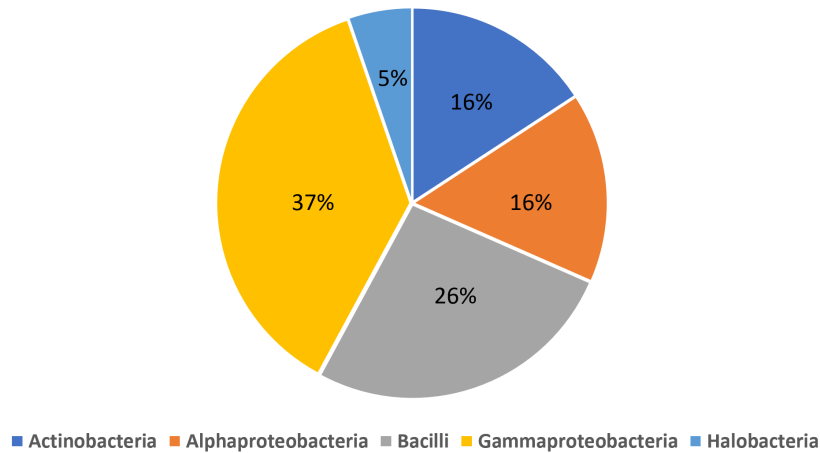


Figura 4.1: Abundancia de clases en las cepas del laboratorio

En la Figura 4.2 se reportan algunos genes encontrados en los genomas y propiedades asociadas a la biotransformación de metales (con mayor enfoque en cobre y hierro) para bacterias filogenéticamente cercanas o de la misma especie. El color celeste representa la presencia de genes y/o características favorables, el rojo elevada sensibilidad y el blanco la ausencia de información. Toda la información puede encontrarse en el Anexo B.

		Especies		Especies																						
		Tinción de Gram	Cepa	N° Asignado	86	94A	110	119	253	AC	AC2	SN	S11	LB8	D1	S54	LB7	NP42	264	276	618	121	CA01			
Revisión Genomas	Cobre	Bombas de eflujo																								
		Proteínas oxidativas																								
		Reguladores / Sensores																								
		Adsorción en proteínas																								
		Proteínas de incorporación																								
		Censo de concentración (incluye inhibición)																								
	Hierro	Ingreso de sideróforos																								
		Ingreso de iones (Fe+2 y Fe+3)																								
		Ingreso complejos con citrato																								
		Ingreso complejos con hidroxamato																								
		Formación de clusters de Fe-S (proteínas isc)																								
		Regulación (FUR u otro)																								
	Genérico	Bombas de eflujo																								
		Almacenamiento																								
		Bombas de eflujo de metales																								
Sensor de metales pesados																										
Síntesis de EPS																										
Síntesis de glutatión																										
Síntesis de H2S																										
Revisión bibliográfica		Formación de carbonatos reportada																								
		Resistencia a metales pesados																								
		Síntesis de sideróforos																								
	Formación de nanopartículas de Cu o Fe																									
	Síntesis de EPS o biofilms																									
	Absorción/adsorción de metales pesados																									
	Características patógenas																									
	Trabajos con tierras raras																									
	Oxidación/Reducción de yodo																									
	Solubilización de metales (aparte de sideróforos)																									
Generación de óxido de manganeso																										

Figura 4.2: Genes de resistencia presentes en las cepas e información bibliográfica de especies relacionadas

4.2. Selección de cepas

Con la comparación realizada a las 19 cepas, según los criterios descritos en la sección 3.1.2 “Selección de cepas” de Metodología, se seleccionan 8 que cumplen con los requerimientos de resistencia y una potencialidad en bioprocesos de metales. Las bacterias seleccionadas se pueden ver en la Tabla 4.2 junto con su razón de elección, el puntaje asignado a cada una puede revisarse en el Anexo C. Por otra parte, su distribución filogenética se presenta en el árbol de la Figura 4.3.

Tabla 4.2: Selección de cepas para el trabajo

Cepa	Especie	Razón de selección
AC2	<i>Bacillus altitudinis</i>	Cumplimiento de criterios
LB7	<i>Bacillus paralicheniformis</i>	Cumplimiento de criterios
CA01	<i>Sphingopyxis bauzanensis</i>	Cumplimiento de criterios
S11	<i>Serratia quinivorans</i>	Cumplimiento de criterios
618	<i>Roseovarius tolerans</i>	Trabajos relacionados con tierras raras
121	<i>Shewanella</i> sp. WE21	Capacidad de reducción de metales en membrana
LB8	<i>Streptomyces thermogriseus</i>	Ser actinobacteria y cumplimiento de criterios
264	<i>Nesterenkonia lutea</i>	Ser actinobacteria y cumplimiento de criterios

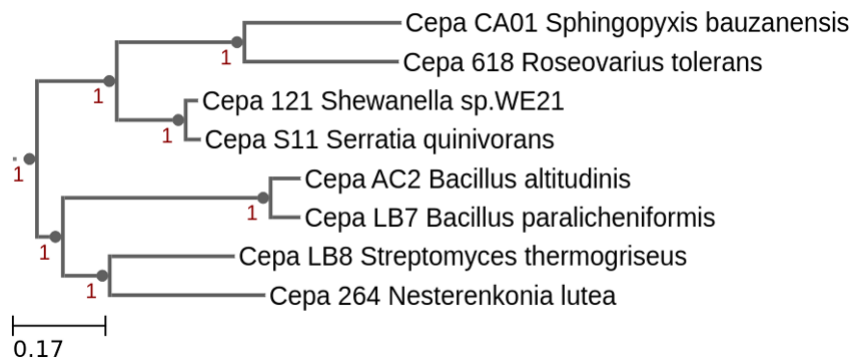


Figura 4.3: Árbol filogenético de las cepas seleccionadas construido en KBase por la herramienta “*Insert Genome Into SpeciesTree - v2.2.0*”. El valor en los nodos indica el grado de seguridad de que la cepa sea distinta de otra, éste puede variar entre 0 y 1, con 1 como valor máximo. Por otro lado, la distancia corresponde al número de sustituciones nucleotídicas por sitio.

4.3. Presencia de genes de resistencia

Se encuentran genes característicos de la resistencia de cobre y utilización de hierro al explorar en detalle los genomas. Para el cobre principalmente existen probables bombas de flujo dada por los genes *copA*, *copB*, *cusA* y *cusB*, genes de incorporación de cobre como *copC*, *copD* e *ycnJ*, y mecanismos de oxidación de cobre por la proteína CueO, siendo esta la única que realiza una biotransformación. Los genes pueden verse en la Figura 4.4.

Especie	<i>S. brouzansis</i>	<i>R. tolerans</i>	<i>S. sp WE21</i>	<i>S. quinivorans</i>	<i>B. altitudinis</i>	<i>B. parolicheniformis</i>	<i>S. thermogriseus</i>	<i>N. lutea</i>
Cepa	CA01	618	121	S11	AC2	LB7	LB8	264
<i>copA</i>		2	2	1	1	1	1	1
<i>copB</i>	1							
<i>copC</i>		1		1				
<i>copD</i>				1				
<i>copZ</i>			1		1	1	1	1
<i>ycnJ</i>					1	1	1	
<i>cutA</i>			1	1			1	
<i>cutC</i>				1			1	
<i>cutE</i>	1	1	1	1			2	
<i>cutF</i>			1	1				
<i>cueO</i>		1		1	1		2	
<i>cusA</i>			1					
<i>cusB</i>			1					
<i>cusF</i>			1					

Figura 4.4: Genes asociados a la resistencia al cobre presentes en las cepas seleccionadas.

En el caso del hierro, los genes identificados se asocian a su uso y resistencia. Se encuentra que la presencia de proteínas de almacenamiento y reguladores transcripcionales como FUR es universal. Además todas las cepas tienen sistema de incorporación de iones libres, ya sean férricos o ferrosos que complementan al transporte realizado por los sideróforos. Y algunas de ellas presentan sistemas de expulsión de iones ferrosos. La información puede verse en la Figura 4.5.

Especie		<i>S. bauzonensis</i>	<i>R. tolerans</i>	<i>S. sp WE21</i>	<i>S. quinivorans</i>	<i>B. altitudinis</i>	<i>B. parvulicheniformis</i>	<i>S. thermograceus</i>	<i>N. litsea</i>
Cepa		CA01	618	121	S11	AC2	LB7	LB8	264
Incorporación	FUR	2	3	2	1	1	1	3	2
	feoA	1		1	1		1		
	feoB	1		1	1		1		
	yfeA		1		2				2
	yfeB				2	2	2	2	2
	fbpA			4		1			1
	fbpB			1	1				
	fbpC			1	1			1	1
	efeB			1	1				
	efeO				1				
	efeU				1				
	futA1		1						
	fbpB-futB				1			1	1
Expulsión	pfeT				1	1			
	iceT				1				
	fieF			1	1				
	mbfA		1						
Sideróforos	Síntesis			45	10	11	14	7	
	Transporte	23	54	8	48	23	24	13	14
Reducción	mtrA			1					
	mtrB			1					
	mtrC			1					
	mtrD			1					
	mtrE			1					
	mtrF			1					
Almacenamiento	dpsA	1		1	1	1	2	1	1
	Ferritin			1	1			1	
	Bacterioferritin	1	2	2	1			1	

Figura 4.5: Genes asociados al uso y resistencia al hierro presentes en las cepas seleccionadas.

4.3.1. Otros genes de resistencia

En algunas de las bacterias estudiadas se encuentran genes responsables de la oxidación de yodo, que actúa como agente solubilizante, y de la lisis de urea, reacción que conlleva a la formación de carbonatos con los metales. Por otro lado, todas las bacterias poseen genes relacionados con la producción de polímeros extracelulares, capacidad que puede ser explicada dada las zonas extremas de dónde provienen estas bacterias. Esto se debe a que una presencia de biofilm mejora la respuesta ante el estrés de las bacterias, permitiendo resistir concentraciones de agentes tóxicos mayores a las de un crecimiento planctónico. Los resultados están en la Figura 4.6.

Transformación	Mecanismo	Cepa	Especie							
			<i>S. baizonensis</i>	<i>R. tolerans</i>	<i>S. sp WE21</i>	<i>S. quinivorans</i>	<i>B. altitudinis</i>	<i>B. paralicheniformis</i>	<i>S. thermogriseus</i>	<i>N. lutea</i>
Adsorción y reducción	Síntesis de polímeros extracelulares	CA01								
		618								
Formación de carbonatos	Lisis de urea	121								
		S11								
		AC2								
Oxidación	Oxidación de yodo	LB7								
		LB8								
		264								

Figura 4.6: Probable presencia de polímeros extracelulares y genes asociados a la oxidación de yodo y lisis de urea.

4.4. Comparación entre cepas cercanas

4.4.1. Comparación del número de genes asociados a la tolerancia de hierro y cobre

La presencia de proteínas que utilizan cobre y las proteínas de resistencia a éste permiten suponer un grado de resistencia al metal contaminante. Es por ello que se estudian estas proteínas y se comparan si las cepas aisladas presentan una mayor presencia de genes al provenir de un ambiente extremo. Lo mismo se realiza para genes detectados por FeGenie que guardan relación con la resistencia y utilización del hierro. Se comparan los genomas de las bacterias con el de otras 20 cepas cercanas disponibles en la base de datos de KBase.

Al realizar las comparaciones (ver Anexo D) se ordenan las bacterias en un orden decreciente según el número de genes encontrados. En el caso de los genes para cobre se obtiene que 5 (cepa AC2 *Bacillus altitudinis*, cepa LB7 *Bacillus paralicheniformis*, cepa S11 *Serratia quinivorans*, cepa 121 *Shewanella* sp. WE21, cepa LB8 *Streptomyces thermogriseus*) de las 8 bacterias se encuentran en las primeras 5 de su grupo, y para el hierro solamente 3 (cepa 618 *Roseovarius tolerans*, cepa S11 *Serratia quinivorans*, cepa 121 *Shewanella* sp. WE21). Lo que se puede revisar en las Tablas 4.3 y 4.4.

Tabla 4.3: Cepas aisladas con mayor presencia de genes relacionados a la resistencia al cobre en comparación a otras similares. Son ordenadas según la posición relativa a sus pares al comparar el número de genes.

Cepa	Posición relativa
Cepa AC2 <i>Bacillus altitudinis</i>	1.
Cepa LB7 <i>Bacillus paralicheniformis</i>	1.
Cepa S11 <i>Serratia quinivorans</i>	1.
Cepa 121 <i>Shewanella</i> sp. WE21	1.
Cepa LB8 <i>Streptomyces thermogriseus</i>	5.

Tabla 4.4: Cepas aisladas con mayor presencia de genes relacionados al uso y resistencia al hierro en comparación a otras similares.

Cepa	Posición relativa
Cepa 618 <i>Roseovarius tolerans</i>	1.
Cepa S11 <i>Serratia quinivorans</i>	5.
Cepa 121 <i>Shewanella</i> sp. WE21	3.

4.4.2. Caracterización filogenética

Todas las cepas estudiadas son diferentes de las que se encuentran en la base de datos KBase como se puede apreciar en los árboles filogenéticos presentes en el Anexo D.

4.5. Contexto genómico

Del estudio de los genes relacionados con el uso y la resistencia al hierro y al cobre en las cepas 121 *Shewanella* sp. WE21 y S11 *Serratia quinivorans* no se encontraron islas genómicas. La mayoría de los clústers encontrados guardan relación con el transporte de hierro principalmente de sideróforos, como se puede ver en la Figura 4.7. No obstante, se encuentran clústers con genes marcadores como lo son *cusABF* (Figura 4.8) y *copCD* (Figura 4.10) para el cobre y *feoABC* (Figura 4.12), *mtrABCEF* (Figura 4.9) y *efeBOU* (Figura 4.11) para el hierro. La información sobre las secuencias *upstream* y *downstream* se encuentran en el Anexo E.

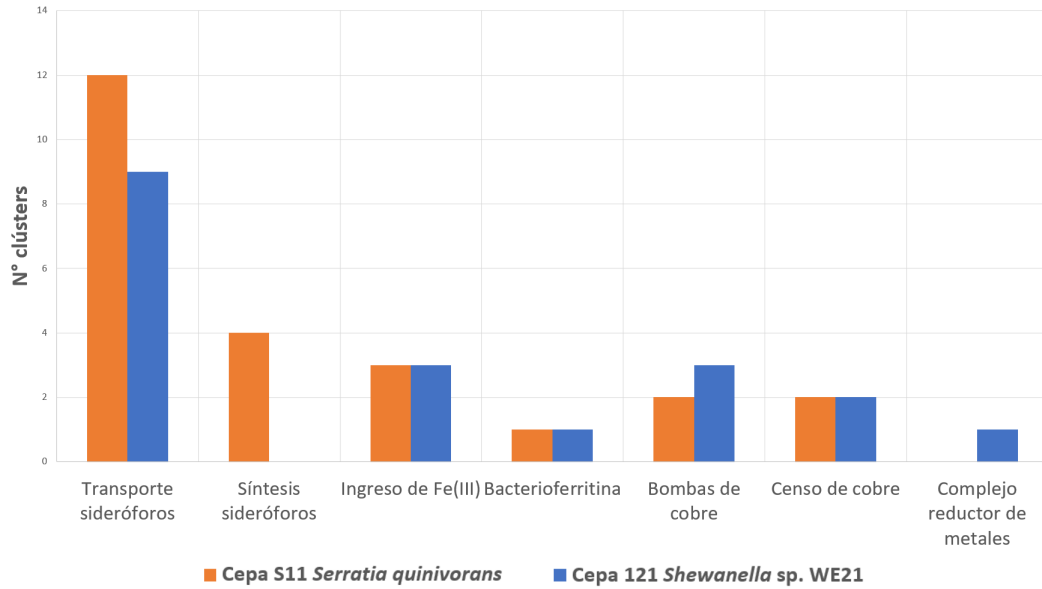


Figura 4.7: Número de clústers encontrados para las cepas 121 *Shewanella sp. WE21* y S11 *Serratia quinivorans*.



Figura 4.8: Clúster cus encontrado en la cepa 121 *Shewanella sp. WE21*.

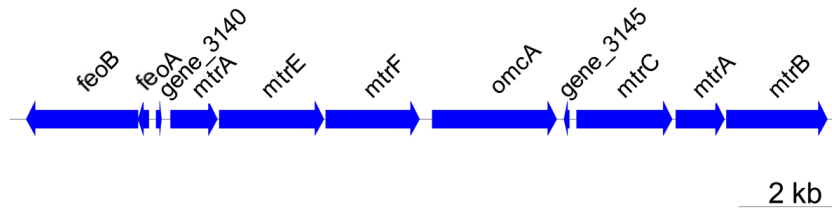


Figura 4.9: Clúster feo y mtr encontrados en la cepa 121 *Shewanella sp. WE21*.

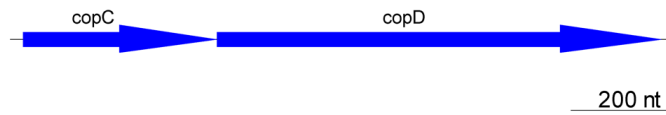


Figura 4.10: Parte del clúster cop encontrado en la cepa S11 *Serratia quinivorans*.

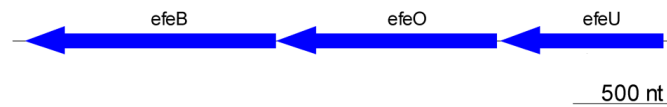


Figura 4.11: Clúster efe encontrado en la cepa S11 *Serratia quinivorans*.

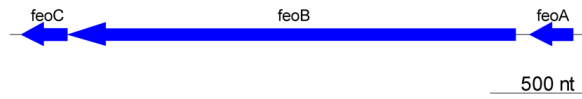


Figura 4.12: Clúster feo encontrado en la cepa S11 *Serratia quinivorans*.

4.6. Adaptaciones para la subsistencia en la eco-región del desierto de Atacama

4.6.1. Resistomas

La subsistencia en el ambiente desértico plantea el desarrollo de estrategias para la supervivencia ante las condiciones extremas, como lo son las variaciones de temperatura, salinidad elevada, presencia de metales pesados, altos niveles de radiación, entre otros. Los probables genes involucrados en las estrategias de supervivencia de las bacterias están recopilados en los resistomas presentados en las Figuras 4.13, 4.14, 4.15 y 4.16, y se encuentran en el Anexo F. En las que son clasificados según el factor de estrés o estrategia que representan y ordenados porcentualmente. Las cepas que tuvieron ordenes semejantes fueron agrupadas, como se aprecia en las Figuras 4.13 y 4.14.

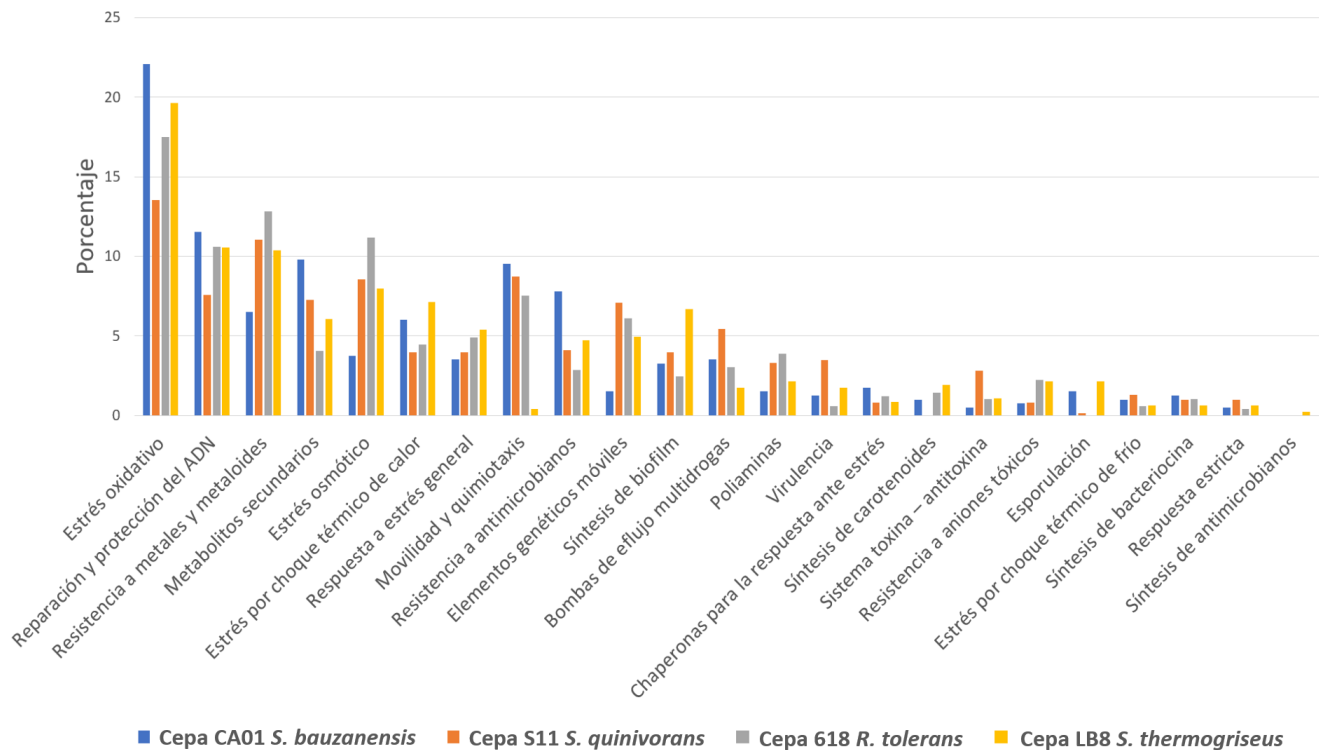


Figura 4.13: Porcentajes de genes de las distintas estrategias asociadas al resistoma de las cepas.

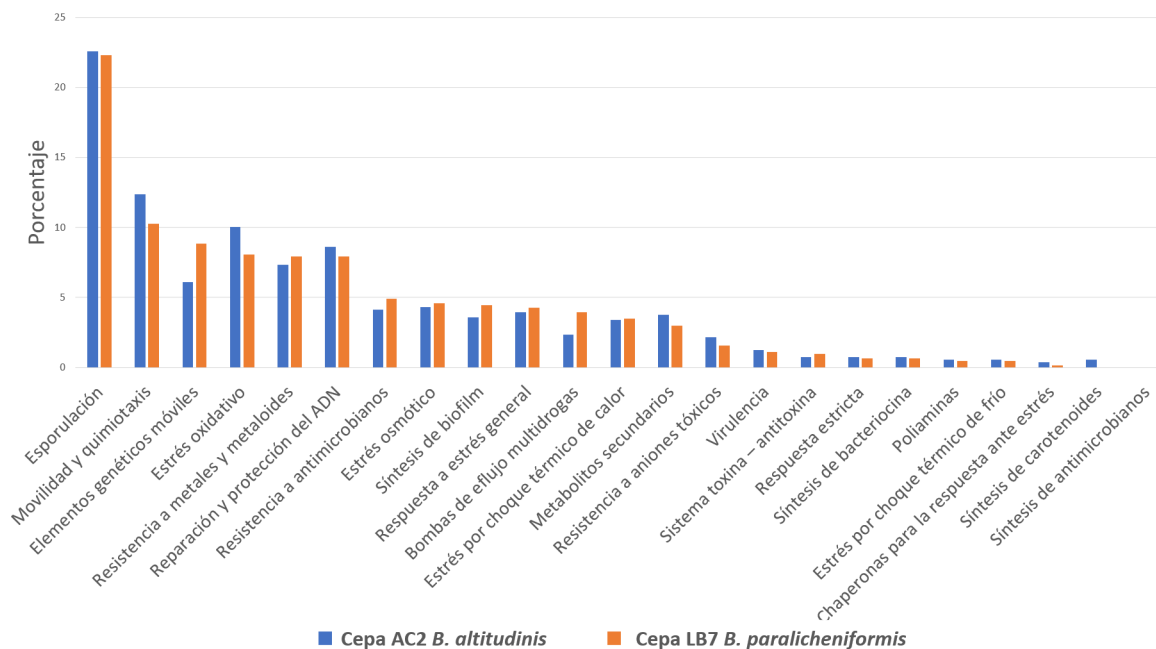


Figura 4.14: Porcentajes de genes de las distintas estrategias asociadas al resistoma de las cepas *Bacillus*.

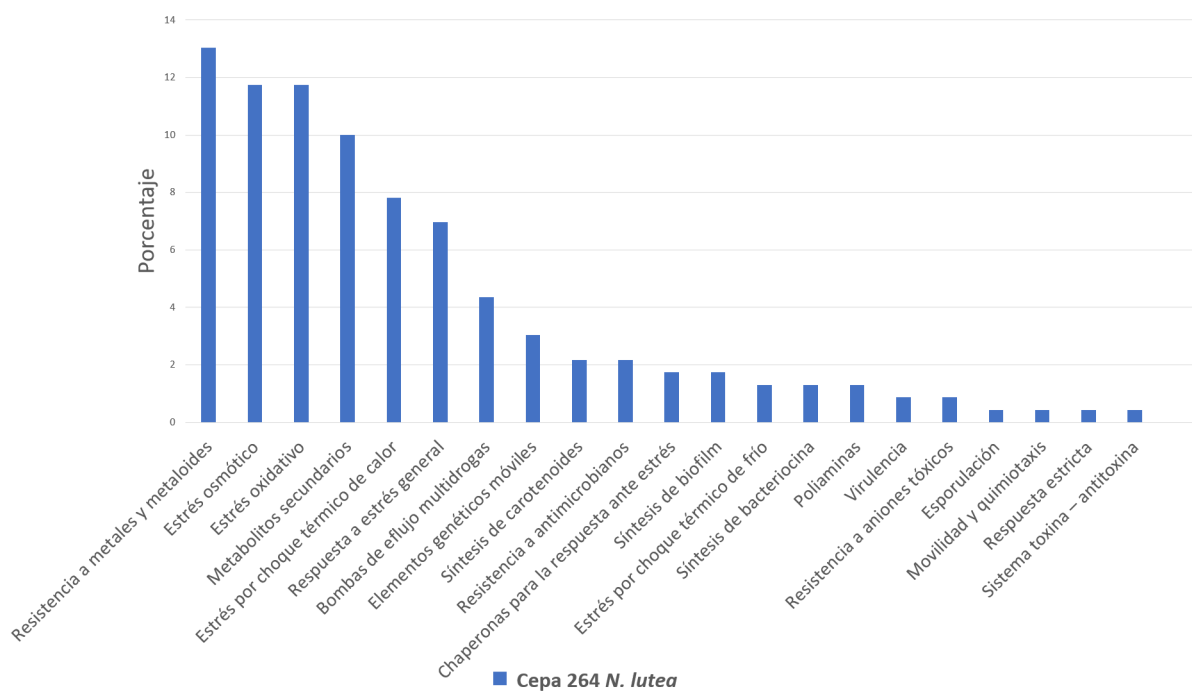


Figura 4.15: Porcentajes de genes de distintas estrategias asociadas al resistoma de la cepa 264 de *Nesterenkonia lutea*.

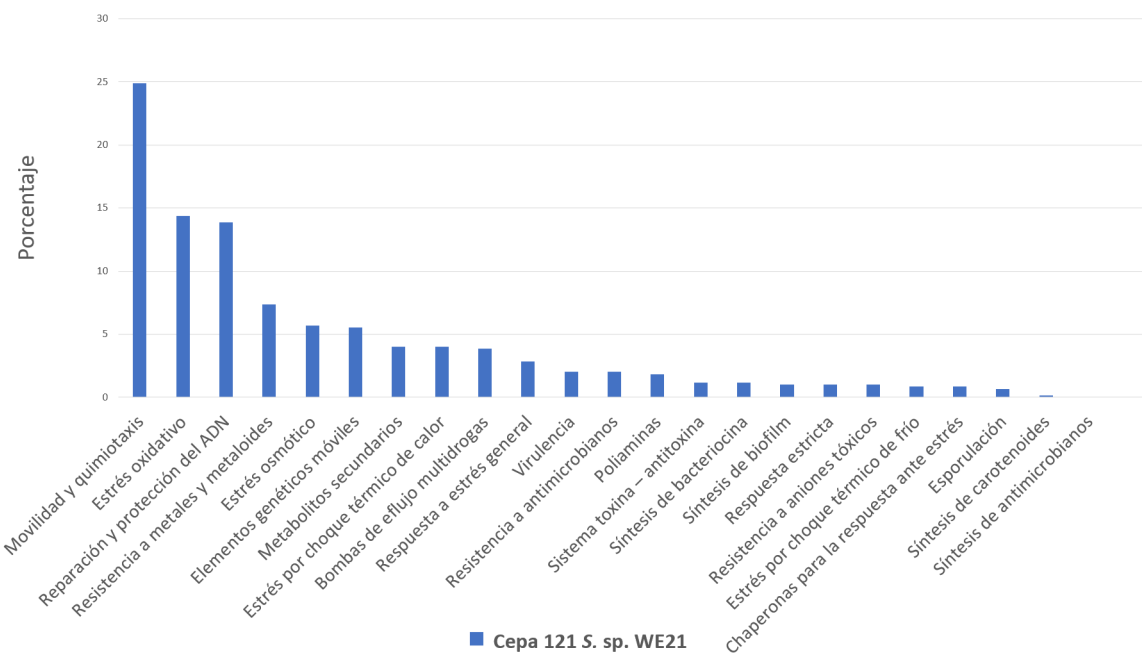


Figura 4.16: Porcentajes de genes de distintas estrategias asociadas al resistoma de la cepa 121 de *Shewanella* sp. WE21.

4.6.2. Genes para la mantención energética

En cuanto a la fotoheterotrofia se identifican genes de rodopsinas en la cepa 264 *Nesterenkonia lutea* y proteínas pertenecientes a los fotosistemas asociados a la fotosíntesis anoxigénica en las cepas 618 *Roseovarius tolerans*, 121 *Shewanella* sp. WE21 y LB8 *Streptomyces thermogriseus*. Aunque, solo se encontró clústers completos en la cepa 618 *Roseovarius tolerans*, para las otras es necesaria un estudio a mayor profundidad para corroborar la presencia de la ruta.

Por otra parte, hay presencia de genes relacionados con el consumo de monóxido de carbono y de hidrógeno en las cepas 618 *Roseovarius tolerans*, 121 *Shewanella* sp. WE21 y LB8 *Streptomyces thermogriseus*, representando metabolismos lithoheterótrofos. Destacando la cepa de *Streptomyces* por poseer enzimas para ambos gases. Los resultados se presentan en la Figura 4.17.

		Especie	<div style="display: flex; justify-content: space-around; text-align: center;"> <div style="transform: rotate(-45deg); white-space: nowrap;">S. bauxanensis</div> <div style="transform: rotate(-45deg); white-space: nowrap;">R. tolerans</div> <div style="transform: rotate(-45deg); white-space: nowrap;">S. sp WE21</div> <div style="transform: rotate(-45deg); white-space: nowrap;">S. quinivorans</div> <div style="transform: rotate(-45deg); white-space: nowrap;">B. altitudinis</div> <div style="transform: rotate(-45deg); white-space: nowrap;">B. paralicheniformis</div> <div style="transform: rotate(-45deg); white-space: nowrap;">S. thermogriseus</div> <div style="transform: rotate(-45deg); white-space: nowrap;">N. lutea</div> </div>							
		Cepa	CA01	618	121	S11	AC2	LB7	LB8	264
Metabolismo	Fotoheterotrofia	Fotosíntesis anoxigénica								
		Sistemas con rodopsina								
	Lithoheterotrofia	Consumo CO								
		Consumo H2								

Figura 4.17: Presencia de probables rutas metabólicas para la mantención energética.

4.7. Proposición de metodología para la búsqueda de microorganismos propicios para bioprocesos

Basada en el trabajo realizado se propone una metodología con el fin de evaluar el potencial de cada bacteria y facilitar su selección para algún bioproceso (biominería, bioremediación o biosíntesis de nanopartículas). Los pasos a seguir pueden verse en la Figura 4.18 y son explicados a continuación.

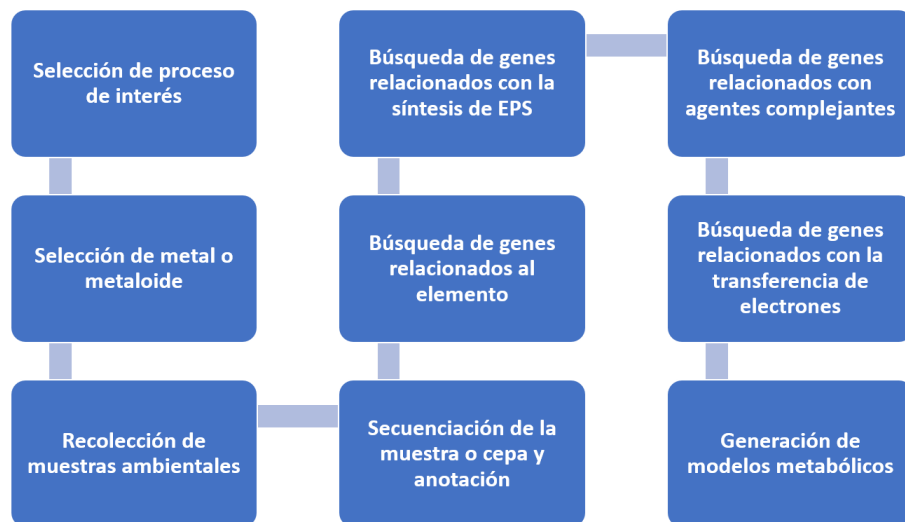


Figura 4.18: Metodología propuesta para identificación de microorganismos útiles para bioprocesos.

1. Selección de proceso de interés

Se debe seleccionar si el proceso guardará relación con biominería, biorremediación o biosíntesis de nanopartículas pues de ello dependerán los procesos metabólicos que se requieran para lograrlo.

2. Selección de metal o metaloide con interés

Puede seleccionarse un elemento o un conjunto de ellos que suelen estar presentes. De esta manera será posible estudiar los mecanismos de resistencia en el organismo.

3. Recolección de muestras de ambientes con presencia de metales

De manera de asegurar que el organismo sea resistente al elemento o a los elementos, es pertinente buscar ambientes que tengan presencia de este elemento y obtener una muestra. Cabe destacar, que ambientes más ácidos favorecen la solubilización y ambientes más básicos la precipitación.

4. Secuenciación de la muestra ambiental o cepa aislada y posterior anotación

Si es posible aislar cepas desde la muestra ambiental, se debe realizar. Posteriormente secuenciar y anotar el genoma (puede utilizarse cualquier algoritmo, de preferencia que sea compatible con otras herramientas bioinformáticas). En el caso de no lograr aislar cepas, puede llevarse a cabo una secuenciación de todas maneras y herramientas computacionales reconstruirán los genomas presentes en el consorcio.

5. Búsqueda de genes relacionados a la utilización del elemento

Ya sea por revisión manual o por medio de algún software especializado, como FeGenie por ejemplo, es posible estudiar los genes relacionados a la resistencia o uso del metal.

6. Búsqueda de genes relacionados a la formación de polímeros extracelulares

La presencia de polímeros extracelulares permite una mayor supervivencia de los organismos en medios ricos en metales y también en procesos de solubilización y precipitación. En base a lo anterior se recomienda buscar genes implicados en su síntesis o evidencia bibliográfica que la especie estudiada, o alguna cercana, se haya descrito la presencia de estos polímeros.

7. Búsqueda de genes relacionados con agentes complejantes

Los agentes complejantes como los sideróforos, calcóforos y ácidos orgánicos permiten la solubilización de metales. Para determinar si hay presencia de genes implicados en su síntesis puede usarse el software FeGenie para los sideróforos, una búsqueda manual o una búsqueda por dominios de proteínas.

8. Búsqueda de genes relacionados con transferencias de electrones

De manera manual es posible buscar genes que codifiquen para proteínas transportadoras de electrones y que permitan la oxidación o reducción de metales.

9. Generación de modelos metabólicos

Siendo un paso opcional, es posible reconstruir modelos metabólicos a partir del genoma utilizando softwares como AutoKEGGRec, ModelSEED version 2.2, KBase, GEMSiRV, entre otros [79]. De esta manera se pueden encontrar medios mínimos que sustenten el crecimiento del organismo o la síntesis de moléculas que aporten al bioproceso (por ejemplo ácido sulfhídrico o carbonatos para la precipitación). Es también posible modelar consorcios bacterianos para obtener predicciones sobre su comportamiento y crecimiento.

A continuación, se presentan 2 ejemplos de aplicación del algoritmo propuesto para la biominería de oro y para la síntesis de nanopartículas por la cepa 618 *Roseovarius tolerans*. En la Figura 4.19 la cepa es evaluada para su uso en biominería, según el genoma posee genes relacionados con la producción de agentes complejantes (ácidos orgánicos y polímeros extracelulares) y por la capacidad de generar óxidos de yodo por el clústero iox presente en ella. Además, cabe destacar que la proteína CopA también permite la resistencia a los iones de oro [19].

El caso similar al evaluar para la potencial síntesis de nanopartículas (Figura 4.20), solo que al no tener proteínas que aseguren una transferencia de iones hacia el exterior no sería posible aseverar que esta bacteria es capaz de formar nanopartículas sin realizar un cultivo.

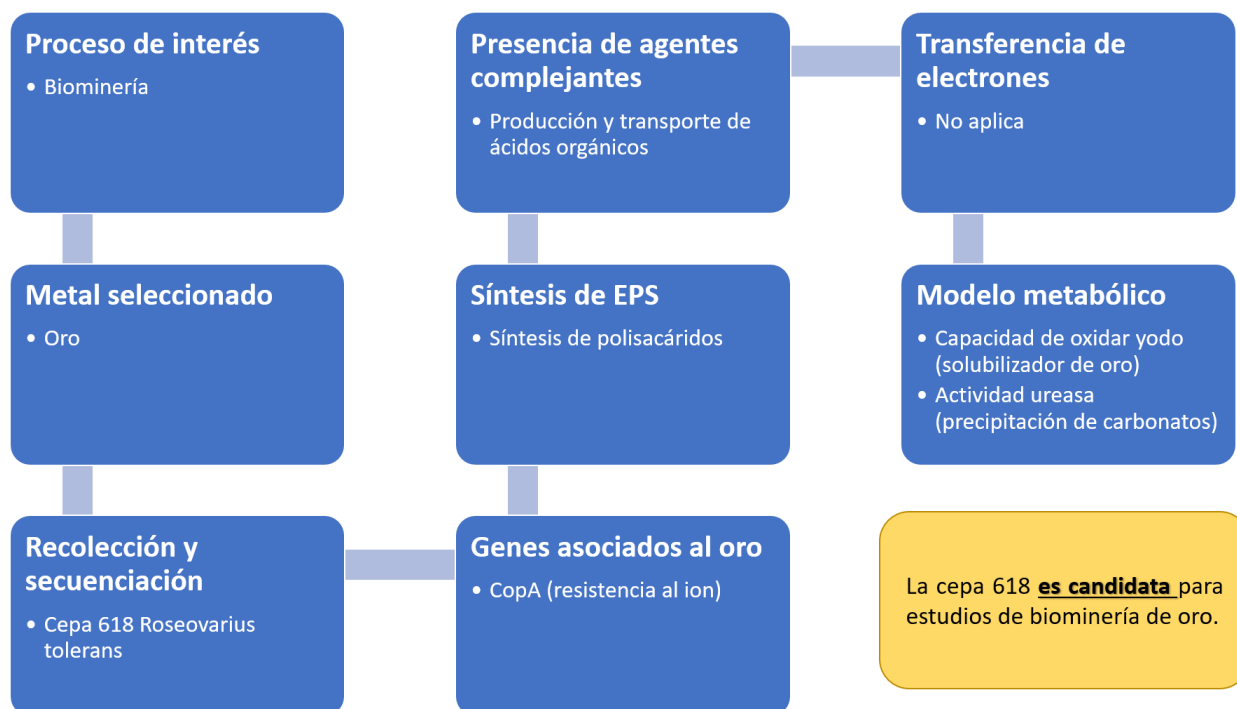


Figura 4.19: Ejemplo de aplicación del algoritmo propuesto para biominería de oro por la cepa 618 *Roseovarius tolerans*.

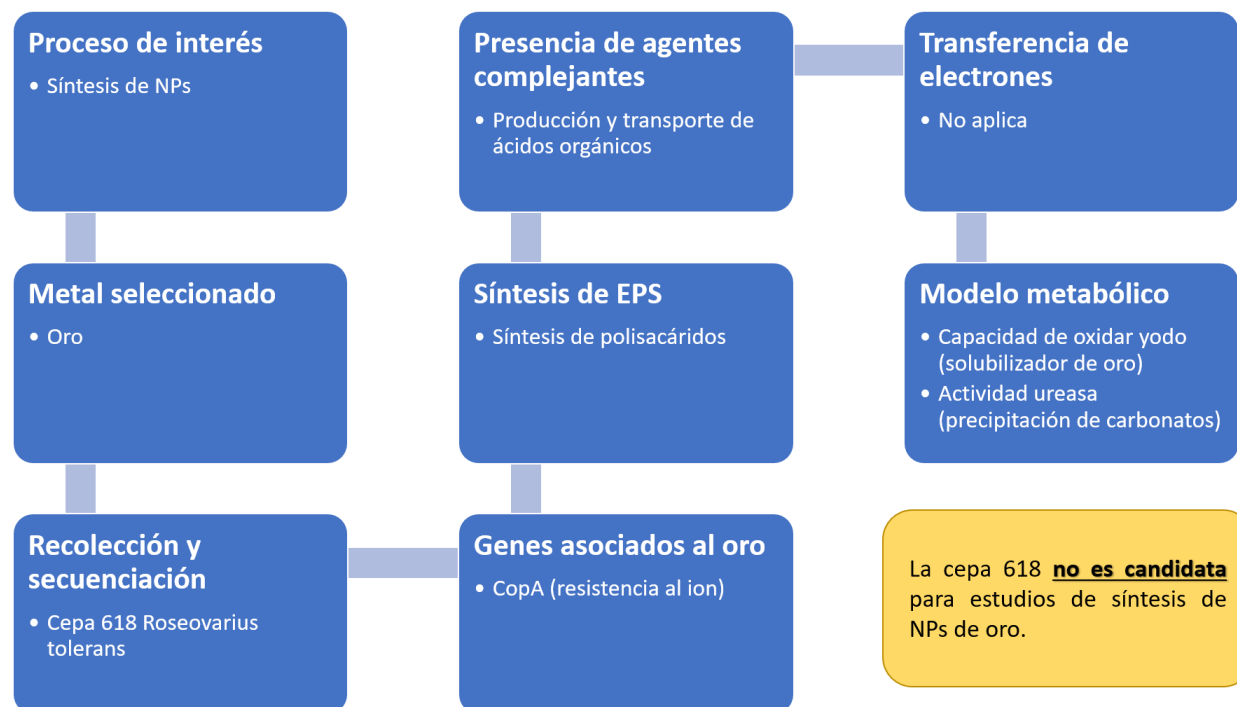


Figura 4.20: Ejemplo de aplicación del algoritmo propuesto para síntesis de nanopartículas de oro por la cepa 618 *Roseovarius tolerans*.

Capítulo 5

Discusión

5.1. Diversidad bacteriana y caracterización filogenética

Como se puede ver en la Figura 4.1 en los genomas predominan las alphaproteobacterias, gammaproteobacterias y bacillus siendo más de la mitad de los organismos aislados. Este resultado concuerda con lo descrito por estudios anteriores sobre la microbiología del desierto de Atacama, donde se señala que en ambientes acuáticos predominan las cianobacterias, bacillus y proteobacterias [42, 45, 46].

De los árboles filogenéticos presentes en el Anexo D es posible ver que todas las cepas aisladas son completamente diferentes de las que se encuentran en la base de datos KBase. Esto puede deberse a que se el número de cepas disponibles en la base de datos es acotado y/o que las cepas aisladas sean nuevas y se hayan diferenciado de las filogenéticamente más cercanas. Para confirmar que sean cepas nuevas se debe realizar pruebas de laboratorio con cultivo para caracterizarlas fisiológica y quimitaxonómicamente, además de sus secuencias en otras bases de datos de genomas [63].

5.2. Elección de microorganismos con probable resistencia al cobre y hierro

Dado que todas las cepas poseen mecanismos para la supervivencia a metales pesados (en particular el caso estudiado de cobre y hierro) y genes para la síntesis de agentes reductores (que pueden captar los iones tóxicos), como el glutati6n y los pol6meros extracelulares, es posible suponer que las bacterias viven en ambientes que tienen presencia de estos iones. Adem6s esto se sustenta en que fueron aisladas desde masas de agua que actúan como cuencas evaporíticas concentrando distintos iones y componentes [46].

Puesto a que la mayoría de los genes identificados que se relacionan con la utilización del cobre son mecanismos de eflujo y detoxificación, y para el hierro son mecanismos para su incorporación se puede deducir que el cobre actúa como un agente t6xico que debe ser eliminado y el hierro como un nutriente.

Los criterios de selección permitieron encontrar los organismos con mayor diversidad de genes que guardan relación con la resistencia a cobre y hierro, y que se hayan reportado trabajos previos en algún bioproceso con estos metales [17, 52, 48, 54]. Sin embargo, otro criterio pudo haber sido considerar el número de copias de los genes. Ya que podría ser una de las determinantes para tener resistencia a concentraciones elevadas de metales pesados.

5.3. Genes marcadores de resistencia y probables clústers

Se ha reportado que en zonas contaminadas con determinados metales pesados hay mayor diversidad y copias de genes asociados a la resistencia de estos [80]. En este caso al comparar los genes presentes para la resistencia de cobre de las bacterias estudiadas con la bacteria biolixivante *Acidithiobacillus ferrivorans* ACH del trabajo de *Barahona et al.* (2020) [81] se encuentra que hay número bajo de copias de genes, baja diversidad y no hay clústers específicos para la resistencia a cobre en las bacterias. Luego bajo una perspectiva genómica, es posible suponer que las bacterias aisladas tienen un nivel de tolerancia al cobre menor que *Acidithiobacillus ferrivorans* por el menor número de genes.

La presencia mayoritaria de transportadores de hierro como ion férrico en la Figura 4.5 permite deducir que la mayoría del hierro se encuentra oxidado. Al contrario del caso para el cobre, los genes de hierro son abundantes y se organizan en clústers. Destaca el clúster encontrado en la cepa 121 *Shewanella* sp. WE21 conformado por los genes *mtrABCEF-omcA* y *feoAB*, correspondientes a un complejo reductor de metales y a un mecanismo de ingreso de ion ferroso. Esta composición es conservada entre el género *Shewanella* [82] y podría ser funcional si el complejo reductor reduce el ion férrico a ferroso que luego sea captado por el complejo *feoAB*, de esta manera podría potencialmente solubilizar hierro para su incorporación.

Un elevado contenido de hierro en el citoplasma puede conllevar a la formación de radicales libres con posteriores daños celulares [38]. Para ello la célula dispone de mecanismos para regular su ingreso (proteína *FUR*), encapsular el hierro libre (estructuras tipo ferritina) y eliminar el exceso de hierro [26, 38, 27]. En el caso de las bacterias aisladas todas presentan regulación por *FUR* y estructuras tipo ferritina, pero solo algunas mecanismos para la expulsión de hierro. Lo que puede deberse a una forma de mantener la homeostasis del hierro, formando reservas y evitando daños oxidativos, y una baja concentración de hierro soluble. La literatura hace mención al gen *feoE* (similar a *fieF*) presente en *Shewanella oneidensis* MR-1 que elimina el exceso de hierro en el interior provocado por la reducción de éste en el complejo *mtrABC* [27].

Se puede contrastar la diferencia entre genes de síntesis de sideróforos con la de transporte de estos en la Figura 4.5. Esto puede deberse a errores en la detección de genes o a que estas bacterias necesitan la interacción con otras bacterias en ambientes naturales para subsistir y tener una fuente de ingreso de hierro por medio de sideróforos [26].

Aunque se encontraron genes que otorgan resistencia a los metales pesados, el principal mecanismo que tendrían estas bacterias sería del tipo secuestro extracelular, pues ningún otro permite bajar las concentraciones en el ambiente. El secuestro viene dado por la capacidad

de sintetizar polímeros extracelulares que producen una reducción de los iones y posterior precipitación en torno a la célula [2], y la degradación de urea que forma carbonatos insolubles con los iones en solución [16].

Por otra parte, es posible deducir que las concentraciones en el agua de estos metales son bajas, pues viven en un hábitat alcalino que no propicia la formación de iones solubles. Este resultado es similar al medido por *Mladinic et al.* (1987) [83] en la laguna Cotacotani que midió 42,7 [$\mu\text{g/L}$] de cobre y 62,5 [$\mu\text{g/L}$] de hierro [83]. Concentraciones mucho menores al compararse con la Norma Chilena de agua potable que establece un límite máximo de 2,0 [mg/L] para el cobre y 0,3 [mg/L] para el hierro [84]. Lo que podría condicionar que exista una baja cantidad de genes asociados a la resistencia y detoxificación de los metales pues las concentraciones no son elevadas.

Las zonas del mar con bajo contenido de hierro (aproximadamente 0,012 [$\mu\text{g/L}$]) poseen concentraciones elevadas de sideróforos para captar el hierro insoluble, en algunos casos hasta 5 veces las de zonas ricas en hierro [85]. Es posible esperar un comportamiento similar para estas bacterias en cuanto a los sideróforos ya que el hierro es parte de su metabolismo y su biodisponibilidad es baja.

5.4. Comparación de genes para uso y resistencia de hierro y cobre con cepas cercanas

Dado lo señalado por *Arguello et al.* (2013) [24] sobre una correlación entre las proteínas que utilizan el cobre y la resistencia a éste, se puede suponer que la mayoría de estas bacterias tienen una tolerancia mayor que una gran parte de las cepas cercanas de la base de datos. No obstante, se debe verificar que el supuesto sea correcto realizando cultivos para determinar la concentración mínima inhibitoria de cobre y dentro de lo posible revisar el transcriptoma para ver la activación de genes.

En el caso del hierro solo 3 bacterias de las aisladas sobresalen en la cantidad de genes. Lo que puede deberse a una menor competencia por recursos ya que el ambiente extremo (alta radiación, alta salinidad, elevado estrés oxidativo, entre otros [4]) es menos favorable para la proliferación bacteriana.

5.5. Adaptaciones producto del medio ambiente

Si bien la mayoría de los genes de transporte de hierro codifican para el transporte del ion férrico, algunas bacterias poseen genes para la incorporación del ion ferroso. Ion que generalmente esta presente en condiciones anóxicas pues el oxígeno lo oxida con facilidad [25]. Lo anterior puede indicar que estas bacterias podrían habitar ambientes con poco oxígeno como sedimentos, bajo tierra, al interior de biofilms y o en tapetes bacterianos.

En los resistomas presentados en las Figuras 4.13, 4.14, 4.15 y 4.16 es posible observar que existen distinto orden en la cantidad porcentual de los genes asociados a los distintos mecanismos de resistencia al ambiente. Esta diferencia podría explicar las estrategias de las bacterias frente a agentes estresantes como la radiación ultravioleta, desecación, entre otros.

Por ejemplo, en el caso de las cepas pertenecientes a *Bacillus* predominan los genes de esporulación por sobre la motilidad, no así en el caso visto para la cepa 121 de *Shewanella* sp. WE21, que posee muy pocos genes asociados a la esporulación. Esto generaría que en condiciones inhóspitas los *Bacillus* esporulen y la cepa de *Shewanella* migre a mejores condiciones. El caso es similar con el resto de las cepas que poseen un número bajo de genes de movilidad y de esporulación, pero más genes para enfrentar el estrés oxidativo, térmico, osmótico y reparación de ADN.

Pese a que las bacterias encontradas viven en ambientes con presencia de agua, algunas de ellas tienen adaptaciones (fotoheterotrofia y lithoheterotrofia) que les permiten sobrevivir a ambientes de sequedad en estado de dormancia. Lo que puede deberse a fluctuaciones en la cantidad de agua por las estaciones del año. Esta adaptación puede ser útil para los bioprocesos si no se tiene una fuente de alimentación constante para evitar la muerte del cultivo. No obstante, se requiere un estudio de mayor profundidad para verificar la fotoheterotrofia propuesta pues hasta el momento no se ha descrito *Shewanella* y *Streptomyces* con esta capacidad.

Al suponer que estas bacterias viven en consorcios y posiblemente en tapetes bacterianos, se puede desprender desde los genes encontrados posibles roles ecológicos para la mantención del consorcio y sus nutrientes. El primer indicio corresponde a las bacterias que poseen genes de síntesis de sideróforos y permiten que el resto de las bacterias pueda tener una fuente de hierro [26]. Por otro lado, la primera capa del posible tapete debiera estar compuesto por bacterias capaces de fijar carbono e ingresar energía al sistema [86]. Es decir que tengan genes para realizar fotoheterotrofia y lithoheterotrofia como es el caso de las cepas 618 *Roseovarius tolerans*, 121 *Shewanella* sp. WE21 y LB8 *Streptomyces thermogriseus*. Luego corresponderían bacterias heterótrofas en las capas inferiores, hasta tener zonas anóxicas en que podría habitar la cepa 121 de *Shewanella* sp. WE21 que es capaz de reducir distintos compuestos que son utilizados por el resto del consorcio [82].

El desierto de Atacama posee altas concentraciones de sulfatos y percloratos en sus suelos, y poco material orgánico características que lo vuelven muy similar a la composición del suelo marciano [87]. Además se cree que el agua presente en Marte sería hipersalina como algunas de las lagunas encontradas en los salares del desierto [88]. Considerando lo anterior y los genes encontrados en los resistomas y a la mantención energética se podría suponer que estas bacterias tendrían capacidades de sobrevivir o colonizar condiciones extraterrestres [89].

5.6. Predicción de otros agentes que permiten la resistencia a partir de modelos metabólicos

Es posible generar modelos metabólicos a partir de los genomas e información sobre los medios de cultivo que permiten el crecimiento bacteriano. Estos modelos son capaces de predecir medios mínimos, producción de metabolitos, tasas de crecimiento y comportamiento de consorcios bacterianos a través de moléculas compartidas [90]. La información generada puede ser útil ya que permite distinguir distintos modos de crecimiento (planctónicos o con biofilms), seleccionar consorcios que favorezcan el crecimiento y predecir posibles aplicaciones en los bioprocesos (metabolismo de metales, manganeso, urea, yodo y agentes complejantes).

Las construcciones de modelos preexistentes de cepas modelos sirven de molde para diseñar uno nuevo con mayor fiabilidad [90]. En la Tabla 5.6 se presentan la bacteria aislada y la cepa con un modelo curado. A pesar de la utilidad de los modelos metabólicos y de los modelos moldes, no se pudieron desarrollar los cultivos que permiten el curado debido a que la pandemia del COVID-19 lo impidió.

Tabla 5.1: Cepas con modelos metabólicos disponibles

Cepa	Especie	Cepa Modelo	Referencia
CA01	<i>Sphingopyxis bauzanensis</i>	<i>Sphingopyxis granuli</i> TFA	[91]
618	<i>Roseovarius tolerans</i>	<i>Ruegeria pomeroyi</i>	[92]
121	<i>Shewanella</i> sp. WE21	<i>Shewanella oneidensis</i> MR-1	[93]
S11	<i>Serratia quinivorans</i>	<i>Serratia marcescens</i> Db11	[94]
AC2	<i>Bacillus altitudinis</i>	<i>Bacillus subtilis</i> 168	[95]
LB7	<i>Bacillus paralicheniformis</i>	<i>Bacillus licheniformis</i> WX-02	[96]
LB8	<i>Streptomyces thermogriseus</i>	<i>Streptomyces leeuwenhoekii</i> C34	[97]
264	<i>Nesterenkonia lutea</i>	<i>Paenarthrobacter aurescens</i> TC1	[98]

5.7. Metodología propuesta

Los pasos propuestos para la metodología permiten identificar características asociadas al trabajo con el elemento seleccionado. La búsqueda que se realiza es altamente sensible a la naturaleza del elemento dado que los distintos estados de oxidación presentan diversas solubilidades y toxicidades.

La metodología es sensible a la cantidad de información que disponible sobre el metal y la bacteria. Principalmente debido a que los genes de los mecanismos potencialmente útiles no se encuentran identificados en todas las bacterias y no siempre se pueden encontrar por homología.

Si bien pueden existir un número considerable de genes relacionados con el elemento, no son los únicos mecanismos que deben abordarse para discernir si la bacteria es útil para el bioproceso. Por ejemplo, los agentes complejantes (sideróforos) y la síntesis de EPS permiten la biolixiviación de cobre por organismos heterótrofos sin guardar relación con él [50].

En el proceso de biorremediación se busca la eliminación del componente tóxico ya sea por precipitación o cambio de toxicidad dado su estado oxidativo. Para ello se puede tener en consideración la síntesis de polímeros extracelulares, formación de carbonatos y cambios de estado de oxidación [1, 2, 12, 16]. No obstante, sólo se consideran para este trabajo la lisis de urea y cambios de estado de oxidación, pues no es posible medir la cantidad de polímeros sintetizada sin un cultivo y la efectividad de estos. Luego las posibles candidatas son las cepas 618 *Roseovarius tolerans*, S11 *Serratia quinivorans*, LB7 *Bacillus paralicheniformis*, LB8 *Streptomyces thermogriseus* y 121 *Shewanella* sp. WE21.

Para la biominería lo fundamental es lograr la solubilización y enriquecimiento de los elementos en una solución. Esto puede lograrse por una acidificación del ambiente o por cambios en el estado de oxidación. El primer caso puede ocurrir localmente por el uso de agentes complejantes o en todo el medio, por ejemplo el uso de ácido sulfúrico en la biolixiviación de

cobre [26, 51]. En cambio, el segundo puede deberse a la transferencia de electrones entre el elemento y la bacteria o la interacción con agentes oxidantes en el medio [17]. Considerando que la producción de agentes complejantes no es cuantificable mediante las herramientas utilizadas, se utiliza el criterio de cambio de estado de oxidación para la selección de candidatos. Entonces es posible utilizar en biominería las cepas 618 *Roseovarius tolerans* y 121 *Shewanella* sp. WE21.

En cuanto a la síntesis de NPs se requiere que el ion metálico sea reducido y precipitado, para que actúe como sitio de nucleación para otros iones. La reducción puede ser llevada a cabo por la interacción con moléculas y enzimas en el interior y exterior de la célula. Si se lleva a cabo en el interior de la célula es necesario realizar una lisis celular para recuperar las NPs, mientras que en el exterior se puede mantener el cultivo [54]. Dado lo anterior para este trabajo se considera como mejor opción la mantención del cultivo. Además el poco conocimiento que existe en torno a moléculas y enzimas específicas para la síntesis impide una revisión completa sin hacer experimentos en laboratorio. De esta manera solo se puede asegurar reducción y formación de posibles nanopartículas por la cepa 121 *Shewanella* sp. WE21.

Al comparar la utilización de organismos para la remoción de metales pesados con los mecanismos de remoción fisicoquímicos es posible suponer una ventaja en el método biológicos por la no generación de lodos tóxicos y un potencial precio más barato. Ante lo cual la tecnología puede ser promisoria. No obstante, aun se debe estudiar la tasa de crecimiento y biomasa del organismo y si la inmovilización lograda es permanente u otros organismos o procesos geoquímicos liberen las sustancias.

5.8. Limitaciones del trabajo

Para validar los resultados obtenidos se requiere trabajar en el laboratorio cultivando las bacterias a distintas concentraciones de metales pesados y estudiar la transcripción de sus genes. De lo contrario no se podrán asegurar los resultados de una manera funcional, pues puede que los genes no se expresen o no sean funcionales.

Debido a que las cepas no son cepas modelos, la familia de algunos de los genes implicados en estos bioprocesos aun no han sido completamente identificada. Es el caso de las proteínas de oxidación de yodo y manganeso que figuran como cobre oxidasas sin función específica al realizar un BLASTp, pero tienen homología con las proteínas descritas en los trabajos previos [17, 72]. Sin embargo, es posible dilucidar si tienen estos genes al realizar un cultivo con $MnSO_4$ para verificar la oxidación de manganeso (ocurre un cambio de coloración) y un cultivo con almidón y yoduro de potasio para verificar la oxidación de yoduro a yodo (el almidón también cambia de color) [70].

Se espera que a medida que haya más conocimiento acerca de las secuencias características de los genes marcadores, más candidatos será posible encontrar y afirmar con mayor certeza.

El trabajo realizado supone que las anotaciones realizadas al genoma son correctas. No obstante, dado que el algoritmo de las anotaciones utiliza homología para detectar genes puede generar discordancias entre bases datos como fue el caso de RAST, FeGenie, BLAST

en NCBI y BLAST en UniProt. Lo que resulta en discordancias entre las secciones de genes marcadores y de comparaciones entre cepas. Esta problemática es inherente a las bases de datos usadas y existirá a menos que se unifique la información.

de

Capítulo 6

Conclusiones

El desierto de Atacama es un ambiente extremo en el que los microorganismos se han adaptado para sobrevivir y prosperar. De esta manera es posible encontrar organismos únicos en el mundo que permiten entender como se desarrolla la vida en dichas condiciones y aprovechar estos para actividades productivas de una manera más sustentable.

En el trabajo se identifican las especies cercanas a las cepas aisladas a través del ensamble y anotación del genoma, se reconocen los principales genes marcadores de resistencia y utilización de cobre y hierro, y se logra el diseño e implementación de una metodología de búsqueda. Por lo que se cumplen los objetivos planteados.

La metodología propuesta se basa principalmente en la secuenciación de los genomas de los organismos y las características de los metales a estudiar. Es una guía para la búsqueda de información para establecer si estos son potencialmente útiles para algún bioproceso con metales como la biorremediación, biominería y biosíntesis de nanopartículas. Al aplicar ésta en el conjunto de cepas aisladas se obtiene que 5 de las 8 cepas pueden ser candidatas para su utilización en algún proceso, pero solo la cepa 121 *Shewanella* sp. WE21 podría aplicarse en todos los procesos evaluados. Sería necesario corroborar esta predicción a través de experimentos enfocados en la capacidad de generar biomasa, biofilms y la capacidad reductora de metales.

Si bien se supone que las concentraciones de los iones biodisponibles de hierro y cobre deben ser bajas por las condiciones que existen en la eco-región del desierto de Atacama, la presencia de genes asociados a su resistencia y utilización está distribuida en las cepas estudiadas, por lo que se esperaría cierta tolerancia a la presencia de estos metales. Sin embargo aún deben ser estudiada para cuantificar la concentración mínima inhibitoria. Por otra parte, los genes asociados a la síntesis y transporte de sideróforos parecieran indicar que la colaboración entre bacterias permite un óptimo crecimiento, factor que también debe tenerse en cuenta para el diseño de experimentos.

Se encontraron otras formas de resistencia a metales pesados, pero se requiere de un mayor estudio de ellas pues la información disponible no es suficiente para afirmar su utilidad. Se proponen los experimentos de oxidación de manganeso, formación de carbonatos, síntesis de

biofilms y oxidación de yoduro.

Es necesario estudiar si el uso de estas bacterias es económicamente factible, pues requieren de la adición de sustratos para su crecimiento. La factibilidad económica del proceso dependerá fuertemente del precio del metal, es así como probablemente para la obtención de hierro y cobre no sea económicamente factible, pero para elementos más valiosos como las tierras raras o elementos del grupo del platino (rutenio, rodio, paladio, osmio, iridio y platino) sí lo sea.

Bibliografía

- [1] TCHOUNWOU, P.B., YEDJOU, C.G., PATLOLLA, A.K., SUTTON, D.J. Heavy metal toxicity and the environment. Molecular, clinical and environmental toxicology, págs. 133–164, 2012.
- [2] YIN, KUN AND WANG, QIAONING AND LV, MIN AND CHEN, LINGXIN. Microorganism remediation strategies towards heavy metals. Chemical Engineering Journal, 360: 1553–1563, 2019.
- [3] TAPIA, J., GONZÁLEZ, R., TOWNLEY, B., OLIVEROS, V., ÁLVAREZ, F., AGUILAR, G., MENZIES, A., CALDERÓN, M. Geology and geochemistry of the Atacama Desert. Antonie van Leeuwenhoek, 111(8): 1273–1291, 2018.
- [4] AZUA-BUSTOS, A., URREJOLA, C., VICUÑA, R. Life at the dry edge: microorganisms of the Atacama Desert. FEBS letters, 586(18): 2939–2945, 2012.
- [5] Laboratorio de complejidad microbiana y ecología funcional [En línea]. <http://institutoantofagasta.cl/presta/index.php?id_category=21&controller=category>, [Consulta: 25 de julio del 2020].
- [6] GAIERO, D., PROBST, J., DEPETRIS, P., LELYTER, L., KEMPE, S. Riverine transfer of heavy metals from Patagonia to the southwestern Atlantic Ocean. Regional Environmental Change, 3(1-3): 51–64, 2002.
- [7] ORGANIZATION, W.H., ET AL. Trace elements in human nutrition and health. 1996.
- [8] GAETKE, L.M., CHOW, C.K. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. Toxicology, 189(1-2): 147–163, 2003.
- [9] ABID, B.A., BRBOOTI, M.M., AL-SHUWAIKI, N.M. Removal of heavy metals using chemicals precipitation. Engineering and Technology Journal, 29(3): 595–612, 2011.
- [10] RENGARAJ, S., YEON, K.H., MOON, S.H. Removal of chromium from water and wastewater by ion exchange resins. Journal of hazardous materials, 87(1-3): 273–287, 2001.
- [11] GUNATILAKE, S. Methods of removing heavy metals from industrial wastewater. Methods, 1(1): 14, 2015.

- [12] IANIEVA, O. [Mechanisms of bacteria resistance to heavy metals]. Mikrobiolohichnyĭ zhurnal (Kiev, Ukraine : 1993), 71: 54–65, 11 2009.
- [13] TSENG, T.T., GRATWICK, K.S., KOLLMAN, J., PARK, D., NIES, D.H., GOF-FAEU, A., SAIER JR, M.H. The RND permease superfamily: an ancient, ubiquitous and diverse family that includes human disease and development proteins. Journal of molecular microbiology and biotechnology, 1(1): 107–125, 1999.
- [14] HANEY, C.J., GRASS, G., FRANKE, S., RENSING, C. New developments in the understanding of the cation diffusion facilitator family. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 32(6): 215–226, 2005.
- [15] PALMGREN, M.G., NISSEN, P. P-type ATPases. Annual review of biophysics, 40: 243–266, 2011.
- [16] ANBU, P., KANG, C.H., SHIN, Y.J., SO, J.S. Formations of calcium carbonate minerals by bacteria and its multiple applications. Springerplus, 5(1): 1–26, 2016.
- [17] KUDPENG, K., BOHU, T., MORRIS, C., THIRAVETYAN, P., KAKSONEN, A.H. Bioleaching of Gold from Sulfidic Gold Ore Concentrate and Electronic Waste by *Roseovarius tolerans* and *Roseovarius mucosus*. Microorganisms, 8(11): 1783, 2020.
- [18] RENSING, C., GRASS, G. *Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing environment. FEMS microbiology reviews, 27(2-3): 197–213, 2003.
- [19] BÜTOF, L., WIESEMANN, N., HERZBERG, M., ALTZSCHNER, M., HOLLEITNER, A., REITH, F., NIES, D. Synergistic gold–copper detoxification at the core of gold biomineralisation in *Cupriavidus metallidurans*. Metallomics, 10(2): 278–286, 2018.
- [20] COOKSEY, D.A. Molecular mechanisms of copper resistance and accumulation in bacteria. FEMS microbiology reviews, 14(4): 381–386, 1994.
- [21] COBINE, P.A., GEORGE, G.N., JONES, C.E., WICKRAMASINGHE, W.A., SOLIOZ, M., DAMERON, C.T. Copper transfer from the Cu (I) chaperone, CopZ, to the repressor, Zn (II) CopY: metal coordination environments and protein interactions. Biochemistry, 41(18): 5822–5829, 2002.
- [22] COOKSEY, D.A. Copper uptake and resistance in bacteria. Molecular microbiology, 7(1): 1–5, 1993.
- [23] KENNEY, G.E., ROSENZWEIG, A.C. Chalkophores. Annual review of biochemistry, 87: 645–676, 2018.
- [24] ARGUELLO, J.M., RAIMUNDA, D., PADILLA-BENAVIDES, T. Mechanisms of copper homeostasis in bacteria. Frontiers in cellular and infection microbiology, 3: 73, 2013.
- [25] LAU, C.K., KREWULAK, K.D., VOGEL, H.J. Bacterial ferrous iron transport: the Feo system. FEMS Microbiology Reviews, 40(2): 273–298, 2016.

- [26] KRAMER, J., ÖZKAYA, Ö., KÜMMERLI, R. Bacterial siderophores in community and host interactions. Nature Reviews Microbiology, 18(3): 152–163, 2020.
- [27] PI, H., HELMANN, J.D. Ferrous iron efflux systems in bacteria. Metallomics, 9(7): 840–851, 2017.
- [28] MIETHKE, M., MONTEFERRANTE, C.G., MARAHIEL, M.A., VAN DIJL, J.M. The *Bacillus subtilis* EfeUOB transporter is essential for high-affinity acquisition of ferrous and ferric iron. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 1833(10): 2267–2278, 2013.
- [29] FECKER, L., BRAUN, V. Cloning and expression of the *fhu* genes involved in iron (III)-hydroxamate uptake by *Escherichia coli*. Journal of bacteriology, 156(3): 1301–1314, 1983.
- [30] ABDELHAMED, H., LU, J., LAWRENCE, M.L., KARSI, A. Ferric hydroxamate uptake system contributes to *Edwardsiella ictaluri* virulence. Microbial pathogenesis, 100: 195–200, 2016.
- [31] FETHERSTON, J.D., MIER, I., TRUSZCZYNSKA, H., PERRY, R.D. The Yfe and Feo transporters are involved in microaerobic growth and virulence of *Yersinia pestis* in bubonic plague. Infection and immunity, 80(11): 3880–3891, 2012.
- [32] PERRY, R.D., MIER, I., FETHERSTON, J.D. Roles of the Yfe and Feo transporters of *Yersinia pestis* in iron uptake and intracellular growth. Biometals, 20(3): 699–703, 2007.
- [33] SENSOY, O., ATILGAN, A.R., ATILGAN, C. FbpA iron storage and release are governed by periplasmic microenvironments. Physical Chemistry Chemical Physics, 19(8): 6064–6075, 2017.
- [34] ADHIKARI, P., BERISH, S.A., NOWALK, A.J., VERALDI, K.L., MORSE, S.A., MIETZNER, T.A. The *fbpABC* locus of *Neisseria gonorrhoeae* functions in the periplasm-to-cytosol transport of iron. Journal of Bacteriology, 178(7): 2145–2149, 1996.
- [35] ILBERT, M., BONNEFOY, V. Insight into the evolution of the iron oxidation pathways. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics, 1827(2): 161–175, 2013.
- [36] BRYCE, C., BLACKWELL, N., SCHMIDT, C., OTTE, J., HUANG, Y.M., KLEINDIENST, S., TOMASZEWSKI, E., SCHAD, M., WARTER, V., PENG, C., ET AL. Microbial anaerobic Fe (II) oxidation—Ecology, mechanisms and environmental implications. Environmental microbiology, 20(10): 3462–3483, 2018.
- [37] HE, S., BARCO, R.A., EMERSON, D., RODEN, E.E. Comparative genomic analysis of neutrophilic iron (II) oxidizer genomes for candidate genes in extracellular electron transfer. Frontiers in microbiology, 8: 1584, 2017.
- [38] AROSIO, P., ELIA, L., POLI, M. Ferritin, cellular iron storage and regulation. IUBMB life, 69(6): 414–422, 2017.

- [39] RIVERA, M. Bacterioferritin: structure, dynamics, and protein–protein interactions at play in iron storage and mobilization. Accounts of chemical research, 50(2): 331–340, 2017.
- [40] DIEUDONNÉ, A., PIGNOL, D., PRÉVÉRAL, S. Magnetosomes: biogenic iron nanoparticles produced by environmental bacteria. Applied microbiology and biotechnology, 103(9): 3637–3649, 2019.
- [41] WILSON, B.R., BOGDAN, A.R., MIYAZAWA, M., HASHIMOTO, K., TSUJI, Y. Siderophores in iron metabolism: from mechanism to therapy potential. Trends in molecular medicine, 22(12): 1077–1090, 2016.
- [42] BULL, A.T., ASENJO, J.A., GOODFELLOW, M., GOMEZ-SILVA, B. The Atacama Desert: technical resources and the growing importance of novel microbial diversity. Annual review of microbiology, 70: 215–234, 2016.
- [43] CUBILLOS, C.F., AGUILAR, P., GRÁGEDA, M., DORADOR, C. Microbial communities from the world’s largest lithium reserve, Salar de Atacama, Chile: Life at high LiCl concentrations. Journal of Geophysical Research: Biogeosciences, 123(12): 3668–3681, 2018.
- [44] LEUNG, P.M., BAY, S.K., MEIER, D.V., CHIRI, E., COWAN, D.A., GILLOR, O., WOEBKEN, D., GREENING, C. Energetic Basis of Microbial Growth and Persistence in Desert Ecosystems. Msystems, 5(2), 2020.
- [45] CUBILLOS, C.F., PAREDES, A., YÁÑEZ, C., PALMA, J., SEVERINO, E., VEJAR, D., GRÁGEDA, M., DORADOR, C. Insights into the microbiology of the chaotropic brines of Salar de Atacama, Chile. Frontiers in microbiology, 10: 1611, 2019.
- [46] RASUK, M.C., KURTH, D., FLORES, M.R., CONTRERAS, M., NOVOA, F., POIRE, D., FARIAS, M.E. Microbial characterization of microbial ecosystems associated to evaporites domes of gypsum in Salar de Llamara in Atacama desert. Microbial ecology, 68(3): 483–494, 2014.
- [47] PEDEFERRI, P. Pourbaix Diagrams. En: Corrosion Science and Engineering, págs. 57–72. Springer, 2018.
- [48] ZHUANG, W.Q., FITTS, J.P., AJO-FRANKLIN, C.M., MAES, S., ALVAREZ-COHEN, L., HENNEBEL, T. Recovery of critical metals using biometallurgy. Current opinion in biotechnology, 33: 327–335, 2015.
- [49] QUATRINI, R., JOHNSON, D.B. Acidithiobacillus ferrooxidans. Trends in microbiology, 27(3): 282–283, 2019.
- [50] POLLMANN, K., KUTSCHKE, S., MATYS, S., KOSTUDIS, S., HOPFE, S., RAFF, J. Novel biotechnological approaches for the recovery of metals from primary and secondary resources. Minerals, 6(2): 54, 2016.
- [51] MOSKVITCH, K. Marzo 2012. Biomining: How microbes help to mine copper [En Línea].

BBC news. <<https://www.bbc.com/news/technology-17406375>>, Consulta: 16 de julio del 2020.

- [52] GADD, G.M. Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. Microbiology, 156(3): 609–643, 2010.
- [53] CANTAFIO, A.W., HAGEN, K.D., LEWIS, G.E., BLEDSOE, T.L., NUNAN, K.M., MACY, J.M. Pilot-scale selenium bioremediation of San Joaquin drainage water with *Thauera selenatis*. Applied and environmental microbiology, 62(9): 3298–3303, 1996.
- [54] WONG-PINTO, L.S., MENZIES, A., ORDÓÑEZ, J.I. Bionanomining: biotechnological synthesis of metal nanoparticles from mining waste—opportunity for sustainable management of mining environmental liabilities. Applied Microbiology and Biotechnology, 104(5): 1859–1869, 2020.
- [55] KUMAR, A., SAINI, H.S., KUMAR, S. Bioleaching of gold and silver from waste printed circuit boards by *Pseudomonas balearica* SAE1 isolated from an e-waste recycling facility. Current microbiology, 75(2): 194–201, 2018.
- [56] LI, D., LI, R., DING, Z., RUAN, X., LUO, J., CHEN, J., ZHENG, J., TANG, J. Discovery of a novel native bacterium of *Providencia* sp. with high biosorption and oxidation ability of manganese for bioleaching of heavy metal contaminated soils. Chemosphere, 241: 125039, 2020.
- [57] SAJJAD, W., ZHENG, G., ZHANG, G., MA, X., XU, W., KHAN, S. Bioleaching of copper-and zinc-bearing ore using consortia of indigenous iron-oxidizing bacteria. Extremophiles, 22(6): 851–863, 2018.
- [58] CHAUDHARY, D.K., KHULAN, A., KIM, J. Development of a novel cultivation technique for uncultured soil bacteria. Scientific reports, 9(1): 1–11, 2019.
- [59] ARKIN, A.P., COTTINGHAM, R.W., HENRY, C.S., HARRIS, N.L., STEVENS, R.L., MASLOV, S., DEHAL, P., WARE, D., PEREZ, F., CANON, S., ET AL. KBase: the United States department of energy systems biology knowledgebase. Nature biotechnology, 36(7): 566, 2018.
- [60] ALLEN, B., DRAKE, M., HARRIS, N., SULLIVAN, T. Using KBase to assemble and annotate prokaryotic genomes. Current Protocols in Microbiology, 46(1): 1E–13, 2017.
- [61] AZIZ, R.K., BARTELS, D., BEST, A.A., DEJONGH, M., DISZ, T., EDWARDS, R.A., FORMSMA, K., GERDES, S., GLASS, E.M., KUBAL, M., ET AL. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. BMC genomics, 9(1): 1–15, 2008.
- [62] SEEMANN, T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. Bioinformatics, 30(14): 2068–2069, 2014.
- [63] VILLALOBOS, A.S., WIESE, J., AGUILAR, P., DORADOR, C., IMHOFF, J.F. *Subtercola vilae* sp. nov., a novel actinobacterium from an extremely high-altitude cold volcano lake in Chile. Antonie van Leeuwenhoek, 111(6): 955–963, 2018.

- [64] PÉREZ, V., DORADOR, C., MOLINA, V., YÁÑEZ, C., HENGST, M. *Rhodobacter* sp. Rb3, an aerobic anoxygenic phototroph which thrives in the polyextreme ecosystem of the Salar de Huasco, in the Chilean Altiplano. Antonie Van Leeuwenhoek, 111(8): 1449–1465, 2018.
- [65] SUTORMIN, R. Insert Genome Into SpeciesTree - v2.2.0 [En línea]. KBase. <https://kbase.us/applist/apps/SpeciesTreeBuilder/insert_set_of_genomes_into_species_tree/release>, [Consulta: 05 de febrero del 2021].
- [66] CHIVIAN, D. BLASTp prot-prot Search - v2.7.1 [En línea]. KBase. <https://kbase.us/applist/apps/kb_blast/BLASTp_Search/release>, [Consulta: 05 de febrero del 2021].
- [67] UniProt. BLAST. [En línea]. <<https://www.uniprot.org/blast/>>, [Consulta: 04 de enero del 2021].
- [68] GARBER, A.I., NEALSON, K.H., OKAMOTO, A., MCALLISTER, S.M., CHAN, C.S., BARCO, R.A., MERINO, N. FeGenie: A comprehensive tool for the identification of iron genes and iron gene neighborhoods in genome and metagenome assemblies. Frontiers in microbiology, 11: 37, 2020.
- [69] CHIVIAN, D. View Function Profile for Genomes - v1.4.0 [En línea]. KBase. <https://kbase.us/applist/apps/kb_phylogenomics/view_fxn_profile/release>, [Consulta: 05 de febrero del 2021].
- [70] BÁRBARA, O. Uso de bacterias yoduro-oxidantes como potencial aplicación en la obtención de yodo para la industria minera no metálica. Univeridad de Antofagasta, 2015.
- [71] CRUZ-RAMOS, H., GLASER, P., WRAY, L., FISHER, S.H. The *Bacillus subtilis* ureABC operon. Journal of bacteriology, 179(10): 3371–3373, 1997.
- [72] GESZVAIN, K., BUTTERFIELD, C., DAVIS, R.E., MADISON, A.S., LEE, S.W., PARKER, D.L., SOLDATOVA, A., SPIRO, T.G., LUTHER III, G.W., TEBO, B.M. The molecular biogeochemistry of manganese (II) oxidation. Biochemical Society Transactions, 40(6): 1244–1248, 2012.
- [73] SUTORMIN, R. Build Pangenome with OrthoMCL - v2.0 [En línea]. KBase. <https://kbase.us/applist/apps/PangenomeOrthomcl/build_pangenome_with_orthomcl/release>, [Consulta: 05 de febrero del 2021].
- [74] DEJONGH, M. Compare Genomes from Pangenome [En línea]. KBase. <https://kbase.us/applist/apps/GenomeComparisonSDK/compare_genomes/release>, [Consulta: 05 de febrero del 2021].
- [75] ZHENG, Q., ZHANG, R., KOBLÍŽEK, M., BOLDAREVA, E.N., YURKOV, V., YAN, S., JIAO, N. Diverse arrangement of photosynthetic gene clusters in aerobic anoxygenic phototrophic bacteria. PloS one, 6(9): e25050, 2011.
- [76] GREENING, C., BERNEY, M., HARDS, K., COOK, G.M., CONRAD, R. A soil actino-

- bacterium scavenges atmospheric H₂ using two membrane-associated, oxygen-dependent [NiFe] hydrogenases. Proceedings of the National Academy of Sciences, 111(11): 4257–4261, 2014.
- [77] CONSTANT, P., CHOWDHURY, S.P., HESSE, L., PRATSCHER, J., CONRAD, R. Genome data mining and soil survey for the novel group 5 [NiFe]-hydrogenase to explore the diversity and ecological importance of presumptive high-affinity H₂-oxidizing bacteria. Applied and environmental microbiology, 77(17): 6027–6035, 2011.
- [78] CORDERO, P.R., BAYLY, K., LEUNG, P.M., HUANG, C., ISLAM, Z.F., SCHITTENHELM, R.B., KING, G.M., GREENING, C. Atmospheric carbon monoxide oxidation is a widespread mechanism supporting microbial survival. The ISME journal, 13(11): 2868–2881, 2019.
- [79] MENDOZA, S.N., OLIVIER, B.G., MOLENAAR, D., TEUSINK, B. A systematic assessment of current genome-scale metabolic reconstruction tools. Genome biology, 20(1): 1–20, 2019.
- [80] BESAURY, L., BODILIS, J., DELGAS, F., ANDRADE, S., DE LA IGLESIA, R., OUDDANE, B., QUILLET, L. Abundance and diversity of copper resistance genes *cusA* and *copA* in microbial communities in relation to the impact of copper on Chilean marine sediments. Marine pollution bulletin, 67(1-2): 16–25, 2013.
- [81] BARAHONA, S., CASTRO-SEVERYN, J., DORADOR, C., SAAVEDRA, C., REMONSELLEZ, F. Determinants of copper resistance in *Acidithiobacillus ferrivorans* ACH isolated from the Chilean altiplano. Genes, 11(8): 844, 2020.
- [82] FREDRICKSON, J.K., ROMINE, M.F., BELIAEV, A.S., AUCHTUNG, J.M., DRISCOLL, M.E., GARDNER, T.S., NEALSON, K.H., OSTERMAN, A.L., PINCHUK, G., REED, J.L., ET AL. Towards environmental systems biology of *Shewanella*. Nature Reviews Microbiology, 6(8): 592–603, 2008.
- [83] MLADINIC, P., HREPIC, N., QUINTANA, E.H. Caracterización física y química de las aguas de los lagos Chungará y Cotacotani. Arch Biol Med Exp, 20: 89–94, 1987.
- [84] Instituto Nacional de Normalización. 2005. Norma Chilena Oficial: Agua potable - Parte 1 - Requisitos (NCh409/1.Of2005) [En línea]. <<https://ciperchile.cl/pdfs/11-2013/norovirus/NCh409.pdf>>, [Consulta: 02 de marzo del 2021].
- [85] BOITEAU, R.M., MENDE, D.R., HAWCO, N.J., MCILVIN, M.R., FITZSIMMONS, J.N., SAITO, M.A., SEDWICK, P.N., DELONG, E.F., REPETA, D.J. Siderophore-based microbial adaptations to iron scarcity across the eastern Pacific Ocean. Proceedings of the National Academy of Sciences, 113(50): 14237–14242, 2016.
- [86] PRIETO-BARAJAS, C.M., VALENCIA-CANTERO, E., SANTOYO, G. Microbial mat ecosystems: structure types, functional diversity, and biotechnological application. Electronic Journal of Biotechnology, 31: 48–56, 2018.
- [87] MARTINS, Z., COTTIN, H., KOTLER, J.M., CARRASCO, N., COCKELL, C.S., DE LA

- TORRE NOETZEL, R., DEMETS, R., DE VERA, J.P., D'HENDECOURT, L., EHRENFREUND, P., ET AL. Earth as a tool for astrobiology—a European perspective. *Space Science Reviews*, 209(1): 43–81, 2017.
- [88] AERTS, J.W., RIEDO, A., MELTON, D.J., MARTINI, S., FLAHAUT, J., MEIERHENRICH, U.J., MEINERT, C., MYRGORODSKA, I., LINDNER, R., EHRENFREUND, P. Biosignature analysis of Mars soil analogs from the Atacama Desert: challenges and implications for future missions to Mars. *Astrobiology*, 20(6): 766–784, 2020.
- [89] NICHOLSON, W.L. Experimental evolution to explore adaptation of terrestrial bacteria to the Martian environment. *En: Molecular Mechanisms of Microbial Evolution*, págs. 241–265. Springer, 2018.
- [90] HENRY, C.S., BERNSTEIN, H.C., WEISENHORN, P., TAYLOR, R.C., LEE, J.Y., ZUCKER, J., SONG, H.S. Microbial community metabolic modeling: a community data-driven network reconstruction. *Journal of cellular physiology*, 231(11): 2339–2345, 2016.
- [91] GARCÍA-ROMERO, I., NOGALES, J., DÍAZ, E., SANTERO, E., FLORIANO, B. Understanding the metabolism of the tetralin degrader *Sphingopyxis granuli* strain TFA through genome-scale metabolic modelling. *Scientific reports*, 10(1): 1–14, 2020.
- [92] VAN TOL, H.M. Computational and experimental models of diatom-bacteria interaction. Tesis de Doctorado, 2019.
- [93] PINCHUK, G.E., HILL, E.A., GEYDEBREKHT, O.V., DE INGENIIS, J., ZHANG, X., OSTERMAN, A., SCOTT, J.H., REED, S.B., ROMINE, M.F., KONOPKA, A.E., ET AL. Constraint-based model of *Shewanella oneidensis* MR-1 metabolism: a tool for data analysis and hypothesis generation. *PLoS Comput Biol*, 6(6): e1000822, 2010.
- [94] YAN, Q., ROBERT, S., BROOKS, J.P., FONG, S.S. Metabolic characterization of the chitinolytic bacterium *Serratia marcescens* using a genome-scale metabolic model. *BMC bioinformatics*, 20(1): 1–13, 2019.
- [95] HENRY, C.S., ZINNER, J.F., COHOON, M.P., STEVENS, R.L. iBsu1103: a new genome-scale metabolic model of *Bacillus subtilis* based on SEED annotations. *Genome biology*, 10(6): 1–15, 2009.
- [96] GUO, J., ZHANG, H., WANG, C., CHANG, J.W., CHEN, L.L. Construction and analysis of a genome-scale metabolic network for *Bacillus licheniformis* WX-02. *Research in microbiology*, 167(4): 282–289, 2016.
- [97] RAZMILIC, V., CASTRO, J.F., ANDREWS, B., ASENJO, J.A. Analysis of metabolic networks of *Streptomyces leeuwenhoekii* C34 by means of a genome scale model: Prediction of modifications that enhance the production of specialized metabolites. *Biotechnology and bioengineering*, 115(7): 1815–1828, 2018.
- [98] OFAIM, S., ZARECKI, R., POROB, S., GAT, D., LAHAV, T., KASHI, Y., ALY, R., EIZENBERG, H., RONEN, Z., FREILICH, S. Genome-Scale reconstruction of *Paenarthrobacter aurescens* TC1 metabolic model towards the study of atrazine bioremediation.

Scientific reports, 10(1): 1–11, 2020.

Apéndice A

Genes utilizados para la elaboración de los árboles filogenéticos

Se presentan los genes utilizados por la herramienta “*Insert Genome Into SpeciesTree - v2.2.0*” [65].

Tabla A.1: Genes conservados utilizados para la elaboración de los árboles filogenéticos [65]

Código COG	Nombre del gen	Función
COG0012	COG0012	GTPasa predicha, probable factor de transcripción
COG0013	AlaS	Alanil-tRNA sintetasa
COG0016	PheS	Fenilalanil-tRNA sintetasa subunidad alpha
COG0018	ArgS	Arginil-tRNA sintetasa
COG0030	KsgA	Dimetiladenosina transferasa (metilación de rRNA)
COG0041	PurE	Fosforibosilcarboxiaminoimidazol (NCAIR) mutasa
COG0046	PurL	Fosforibosilformilglicinamidina (FGAM) sintasa
COG0048	RpsL	Proteína ribosomal S12
COG0049	RpsG	Proteína ribosomal S7
COG0051	RpsJ	Proteína ribosomal S10
COG0052	RpsB	Proteína ribosomal S2
COG0072	PheT	Fenilalanil-tRNA sintetasa subunidad beta
COG0080	RplK	Proteína ribosomal L11
COG0081	RplA	Proteína ribosomal L1
COG0082	AroC	Corismato sintasa
COG0086	RpoC	RNA polimerasa DNA-dirigida, subunidad beta'/ 160 kD
COG0087	RplC	Proteína ribosomal L3
COG0088	RplD	Proteína ribosomal L4
COG0089	RplW	Proteína ribosomal L23
COG0090	RplB	Proteína ribosomal L2
COG0091	RplV	Proteína ribosomal L22
COG0092	RpsC	Proteína ribosomal S3

COG0093	RplN	Proteína ribosomal L14
COG0094	RplE	Proteína ribosomal L5
COG0096	RpsH	Proteína ribosomal S8
COG0097	RplF	Proteína ribosomal L6P/L9E
COG0098	RpsE	Proteína ribosomal S5
COG0099	RpsM	Proteína ribosomal S13
COG0100	RpsK	Proteína ribosomal S11
COG0102	RplM	Proteína ribosomal L13
COG0103	RpsI	Proteína ribosomal S9
COG0105	Ndk	Nucleosido difosfato quinasa
COG0126	Pgk	3-fosfoglicerato quinasa
COG0127	COG0127	Xantosina trifosfato pirofosfatasa
COG0130	TruB	Pseudouridina sintasa
COG0150	PurM	Fosforribosil Aminoimidazol (AIR) sintetasa
COG0151	PurD	Fosforribosilamina-glicina ligasa
COG0164	RnhB	Ribonucleasa HII
COG0172	SerS	Seril-tRNA sintetasa
COG0185	RpsS	Proteína ribosomal S19
COG0186	RpsQ	Proteína ribosomal S17
COG0215	CysS	Cisteinil-tRNA sintetasa
COG0244	RplJ	Proteína ribosomal L10
COG0256	RplR	Proteína ribosomal L18
COG0343	Tgt	Queuina/arqueaeosina tRNA-ribosiltransferasa
COG0504	PyrG	CTP sintasa (UTP-amonio liasa)
COG0519	GuaA	GMP sintasa, PP-ATPasa dominio/subunidad
COG0532	InfB	Factor 2 de iniciación de traducción (IF-2; GTPase)
COG0533	QRI7	Proteasas metal-dependientes

Apéndice B

Anexo Información para realizar la selección

Los genes encontrados en bibliografía, los encontrados en los genomas y la información bibliográfica sobre las especies cercanas se encuentra de manera online en los siguientes códigos QR.



Figura B.1: Código QR de los genes encontrados en bibliografía que otorgan una potencial tolerancia a metales pesados.



Figura B.2: Código QR de los genes encontrados en los genomas que otorgan una potencial tolerancia a metales pesados.



Figura B.3: Código QR de la información sobre especies cercanas que se han utilizado en estudios sobre metales pesados.

Apéndice C

Anexo Puntajes asignados

En la Figura C.1 se muestran los puntajes obtenidos por cada cepa al haber sido evaluada según los criterios definidos.

Especies		Especies																				
		<i>Acetobacter bohemius</i>	<i>Stenotrophomonas fitzophila</i>	<i>Exiguobacterium aurantiacum</i>	<i>Psychrobacter alimenterius</i>	<i>Erythrobacter dimenterius</i>	<i>Bacillus williamovis</i>	<i>Bacillus altitudinis</i>	<i>Halobaculum rodensis</i>	<i>Serratia quinivorans</i>	<i>Streptomyces thermogigaeus</i>	<i>Serratia quinivorans</i>	<i>Bacillus paratrachealis</i>	<i>Bacillus paratrachealis</i>	<i>Nocardia formis</i>	<i>Streptomyces formis</i>	<i>Rhodococcus solanaceus</i>	<i>Shewanella sp. NC21</i>	<i>Sphingopyxis balearensis</i>			
Tinción de Gram		-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-			
Cepa		86	94A	110	119	253	AC	AC2	SN	S11	LB8	D1	S54	LB7	NP42	264	276	618	121	CA01		
N° Asignado		65	66	67	68	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84		
Criterios de selección	Síntesis de sideróforos (Bibliografía)																					
	Ingreso de complejos con citrato																					
	Ingreso de complejos con hidroxamato																					
	Síntesis de EPS o biofilms																					
	Formación de carbonatos reportada																					
	Formación de nanopartículas de Cu o Fe																					
	Generación de óxido de manganeso																					
	Solubilización de metales (aparte de sideróforos)																					
	Oxidación/Reducción de yodo																					
	Trabajos con tierras raras																					
Puntaje obtenido		0	4	2	5	4	4	8	0	5	4	5	5	8	7	1	0	4	6	6		

Figura C.1: Puntajes obtenidos por las distintas cepas.

Apéndice D

Anexo Comparaciones del número de genes asociados a la resistencia y utilización de cobre y hierro entre cepas similares

A continuación se presentan los árboles filogenéticos del conjunto de genomas que se evaluó su potencial resistencia, además se muestran las comparaciones realizadas entre estos conjuntos para el caso de los genes de resistencia a cobre y hierro.

D.1. Comparación del número de genes identificados para la resistencia de cobre y hierro para la cepa AC2 *Bacillus altitudinis* y cepas filogenéticamente cercanas

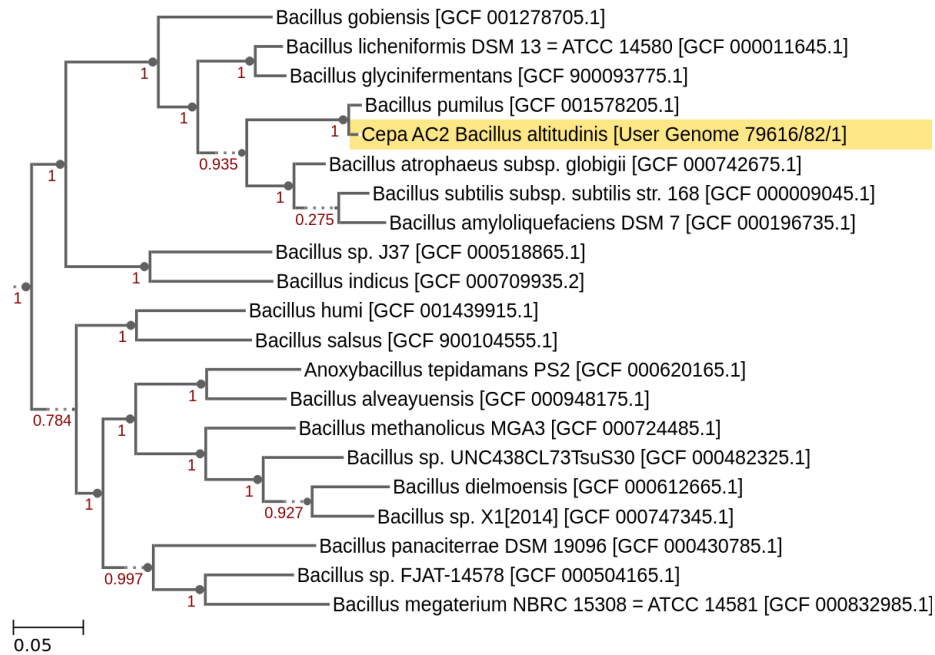


Figura D.1: Árbol filogenético para las especies cercanas a la cepa AC2 *Bacillus altitudinis* construido en KBase por la herramienta “*Insert Genome Into SpeciesTree - v2.2.0*”. El valor en los nodos indica el grado de seguridad de que la cepa sea distinta de otra, éste puede variar entre 0 y 1, con 1 como valor máximo. Por otro lado, la distancia corresponde al número de sustituciones nucleotídicas por sitio.

	Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168	Bacillus licheniformis DSM 13 = ATCC 14580	Bacillus glycinifermentans DSM 19096	Bacillus amyloliquefaciens DSM 7 = ATCC 23550	Bacillus sp. J37	Bacillus sp. UNC438CL73TsuS30	Bacillus sp. FJAT-14578	Bacillus sp. B7	Bacillus dielmoensis	Anoxybacillus tepidamans	Bacillus humi	Bacillus salsus	Bacillus methanolicus MGA3	Bacillus sp. X1[2014]	Bacillus atrophaeus subsp. globigii	Bacillus alveayuensis	Bacillus panaciterrae DSM 19096	Bacillus sp. FJAT-14578	Bacillus megaterium NBRC 15308 = ATCC 14581	Cepa AC2 Bacillus altitudinis		
Adquisición																						
Transporte hierro	7	6	6	7	13	7	6	5	6	5	9	4	5	7	8	6	10	4	7	5	5	
Transporte heme	1	1	1	1	1			1	1	1	1	1	1	1	2				3	1	1	4
Transporte heme oxigenasa		1	1												2	1						
Síntesis de sideróforos	5	18	10			7	15		6		5	5	7	3	7	6	11	18	5	11		
Transporte de sideróforos	23	21	17	9	5	17	23	8	6	11	10	26	15	21	25	15	10	20	25	19	23	
Regulación genes	14	17	11	13	24	13	50	32	9	22	9	16	10	16	22	20	22	15	18	38	16	
Reducción					3			3														
Almacenamiento	3	4	2	2	3	4	2	4	1	2	4	3	2	4	6	1	1	2	4	2	2	
Total	53	68	48	32	49	48	96	53	24	47	33	55	38	56	68	50	49	55	73	70	61	

Figura D.2: Comparación de genes relacionados con el uso y resistencia al hierro para las especies cercanas a la cepa AC2 *Bacillus altitudinis*.

	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> DSM 7 = ATCC 23250	<i>Bacillus cochenovis</i>	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Bacillus sp. X1(2014)</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> DSM 19096	<i>Bacillus sp. F37</i>	<i>Bacillus sp. FIAT-14578</i>	<i>Anoxybacillus rendamensis</i> P52	<i>Bacillus alveolatus</i>	<i>Bacillus sp. UNCA384731su330</i>	<i>Bacillus de laevis</i>	<i>Bacillus megaterium</i> DSM 13 = ATCC 14580	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subsp. elobii</i> = ATCC 14581	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subsp. str. 168</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>subsp. elobii</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>subsp. elobii</i>	<i>Cepa AC2 Bacillus altitudinis</i>				
cut				1	1	1															
cop	3	2	2	3	1	3	3	1	2	2	2	2	3	3	2	1	1	2	4	1	3
cue																					1
cus																					1
ycnl								1						1							1
Sistemas de exportación de cobre	1	1	1	1	2	1		3		2	2	1	2	1	1	4	2	1	2	3	
Sistema de ingreso de cobre														1							
Chaperonas de cobre																					1
Regulador transcripcional en respuesta de Cu(II)													1								1
Proteínas de unión a cobre		1				1	1					1	1	1	1				2		
Cobre oxidasas	1		1	2	2	3	1		1	3	1	1	1	1	1	2	1				
Cobre Amino oxidasa											1										1
Total	5	4	4	6	5	6	8	6	2	3	5	7	7	7	5	4	9	6	7	7	11

Figura D.3: Comparación de genes asociados a la resistencia al cobre para las especies cercanas a la cepa AC2 *Bacillus altitudinis*.

D.2. Comparación del número de genes identificados para la resistencia de cobre y hierro para la cepa LB7 *Bacillus paralicheniformis* y cepas filogenéticamente cercanas

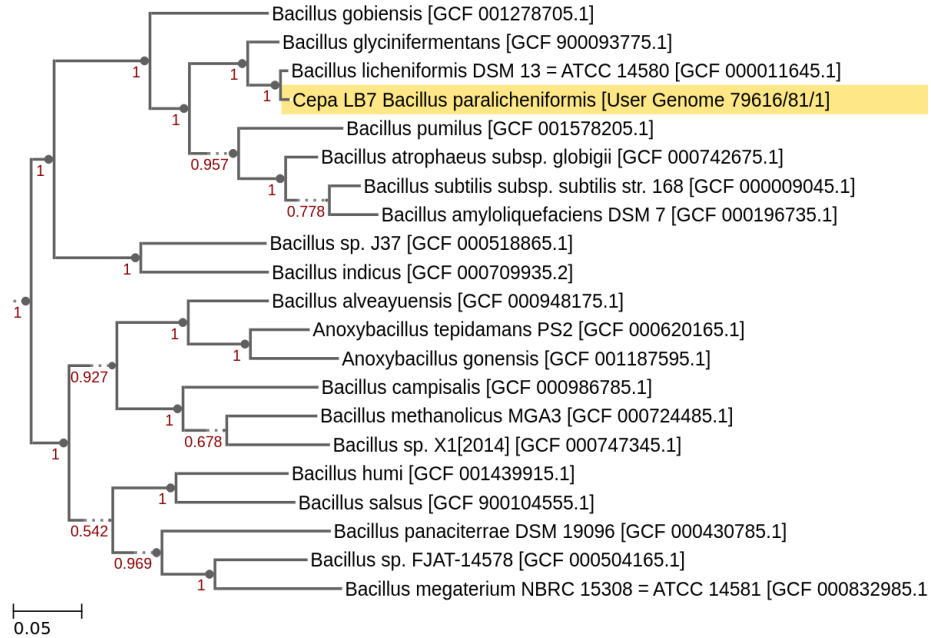


Figura D.4: Árbol filogenético para las especies cercanas a la cepa LB7 *Bacillus paralicheniformis* construido en KBase por la herramienta “Insert Genome Into SpeciesTree - v2.2.0”. El valor en los nodos indica el grado de seguridad de que la cepa sea distinta de otra, éste puede variar entre 0 y 1, con 1 como valor máximo. Por otro lado, la distancia corresponde al número de sustituciones nucleotídicas por sitio.

	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> str. 168	<i>Bacillus licheniformis</i> DSM 13 = ATCC 14580	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> DSM 7 = ATCC 25350	<i>Bacillus panaciterrae</i> DSM 19096	<i>Bacillus sp. FJAT-14578</i>	<i>Bacillus sp. J37</i>	<i>Anoxybacillus tepidamans</i> PS2	<i>Bacillus indicus</i>	<i>Bacillus methanolicus</i> MGA3	<i>Bacillus atrophaeus</i> subsp. <i>globigii</i>	<i>Bacillus sp. X1[2014]</i>	<i>Bacillus meopaterium</i> NBRC 15308 = ATCC 14581	<i>Bacillus alveayuensis</i>	<i>Anoxybacillus gonensis</i>	<i>Bacillus campisalis</i>	<i>Bacillus humi</i>	<i>Bacillus salsus</i>	<i>Bacillus panaciterrae</i> DSM 19096	<i>Bacillus sp. FJAT-14578</i>	<i>Bacillus megaterium</i> NBRC 15308 = ATCC 14581	
Adquisición																					
Transporte hierro	7	6	6	7	7	6	6	5	9	4	5	7	8	6	8	6	10	4	7	5	6
Transporte heme	1	1	1	1			1	1	1	1	1	2	1	1			3	1	1	1	1
Transporte heme oxigenasa	1	1	1			1				2		1	1								
Síntesis de sideróforos	5	18	10	7	15	6	5	5	7	3		7	6	11	18	5	14				
Transporte de sideróforos	23	21	17	9	17	23	6	11	10	26	15	21	25	18	16	15	10	20	25	19	24
Regulación genes	14	17	11	13	13	50	9	22	9	16	10	16	22	16	9	20	22	15	18	38	14
Reducción												3									
Almacenamiento	3	4	2	2	4	2	1	2	4	3	2	4	6	4	1	1	1	2	4	2	3
Total	53	68	48	32	48	96	24	47	33	55	38	56	68	48	36	50	49	55	73	70	63

Figura D.5: Comparación de genes relacionados con el uso y resistencia al hierro para las especies cercanas a la cepa LB7 *Bacillus paralicheniformis*.

	<i>Anoxybacillus Bonensis</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> DSM 7 = ATCC 23350	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> DSM 19096	<i>Bacillus gobicus</i>	<i>Bacillus pumilus</i> DSM 7 = ATCC 23350	<i>Bacillus sp. XI(2014)</i>	<i>Bacillus glycinifermentans</i>	<i>Bacillus sp. 137</i>	<i>Bacillus campisalis</i>	<i>Bacillus sp. F1AT-14578</i>	<i>Anoxybacillus indicus</i>	<i>Bacillus tequilensis</i>	<i>Bacillus alveolus</i>	<i>Bacillus licheniformis</i> DSM 13 = ATCC 14580	<i>Bacillus megaterium</i> NRRC 15308 = ATCC 14581	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> str. 168	<i>Bacillus atrophaeus</i> subsp. <i>B.lobii</i>	<i>Bacillus methanolicus</i> MGA3	Cepa LB7 <i>Bacillus paralicheniformis</i>	
cut						1		1	1			2		1							
cop	1	3	2	2	3	1	3	3	3	1	2	2	2	3	2	1	1	2	4	1	4
cue																					1
ycnl											1						1				1
Sistemas de exportación de cobre	1	1	1	1	1	2	1	2		3		2	2	1	1	4	2	1	2	3	
Sistema de ingreso de cobre	1														1						
Chaperonas de cobre																					1
Regulador transcripcional en respuesta de Cu(I)															1						
Proteínas de unión a cobre			1				1	1	1			1		1		1		1		2	
Cobre oxidasas	1	1		1	2	2			3	1		1	1		1	1	2	1			
Cobre Amino oxidasa	1																				1
Total	5	5	4	4	6	5	6	6	8	6	2	3	5	7	5	4	9	6	7	7	10

Figura D.6: Comparación de genes asociados a la resistencia al cobre para las especies cercanas a la cepa LB7 *Bacillus paralicheniformis*.

D.3. Comparación del número de genes identificados para la resistencia de cobre y hierro para la cepa 264 *Nesterenkonia lutea* y cepas filogenéticamente cercanas

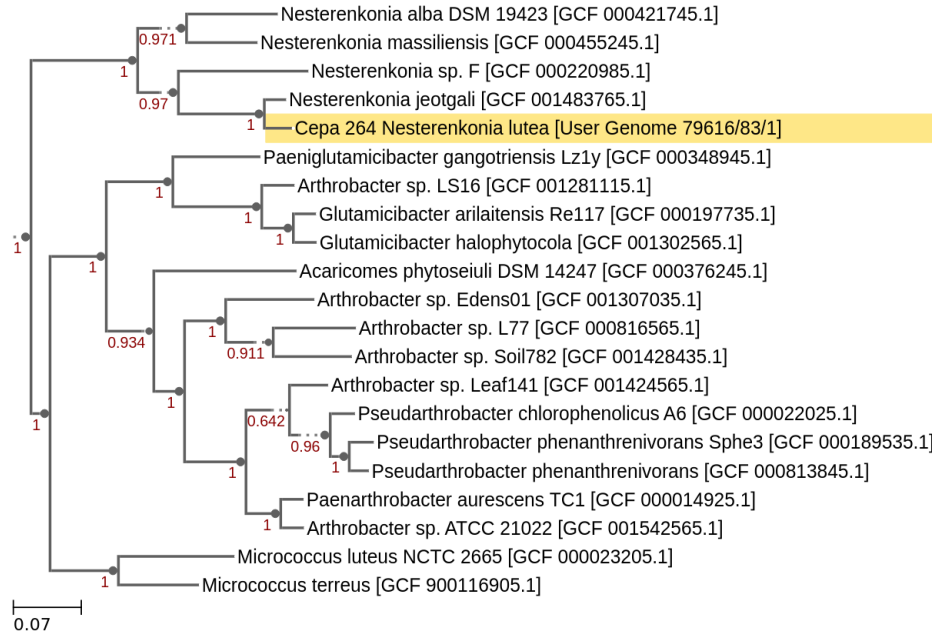


Figura D.7: Árbol filogenético para las especies cercanas a la cepa 264 *Nesterenkonia lutea* construido en KBase por la herramienta “*Insert Genome Into SpeciesTree - v2.2.0*”. El valor en los nodos indica el grado de seguridad de que la cepa sea distinta de otra, éste puede variar entre 0 y 1, con 1 como valor máximo. Por otro lado, la distancia corresponde al número de sustituciones nucleotídicas por sitio.

	Paenarthrobacter aureus TC1	Pseudarthrobacter chlorophenicus A6	Micrococcus luteus NCTC 2665	Pseudarthrobacter phenanthrenivorans Sphe3	Nesterenkonia sp. F	Glutamicibacter arilaitensis Re117	Paeniglutamicibacter gangotriensis LZ1y	Acaricomes phytoseiuli DSM 14247	Nesterenkonia alba DSM 19423	Nesterenkonia massiliensis	Arthrobacter sp. LS16	Glutamicibacter halophytocola	Arthrobacter sp. Edens01	Arthrobacter sp. L77	Arthrobacter sp. Soil782	Arthrobacter sp. Leaf141	Pseudarthrobacter chlorophenicus A6	Pseudarthrobacter phenanthrenivorans Sphe3	Pseudarthrobacter phenanthrenivorans	Paenarthrobacter aureus TC1	Arthrobacter sp. ATCC 21022	Micrococcus luteus NCTC 2665	Micrococcus terreus	
Adquisición																								
Transporte hierro	10	7	5	8	7	4	9		7	11	8	7	8	6	11	8	7	7	12	2	7			
Transporte heme					1	1							1	1	1		1						1	
Transporte heme oxigenasa							1																	
Síntesis de sideróforos	4	4		4	12	3	3				4	4	4	3	4		3	5						
Transporte de sideróforos	28	14	10	8	33	17	21	10	20	12	5	15	14	35	23	21	6	13	11	11	14			
Regulación genes	20	15	4	11	12	10	11	8	9	6	12	8	11	14	9	14	7	8	13	4	12			
Almacenamiento	2	3	2	3	2	2	3	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	1	2	1	1		
Total	64	43	21	34	67	36	46	22	37	30	30	31	40	62	49	50	22	33	43	18	35			

Figura D.8: Comparación de genes relacionados con el uso y resistencia al hierro para las especies cercanas a la cepa 264 *Nesterenkonia lutea*.

D.4. Comparación del número de genes identificados para la resistencia de cobre y hierro para la cepa 618 *Roseovarius tolerans* y cepas filogenéticamente cercanas

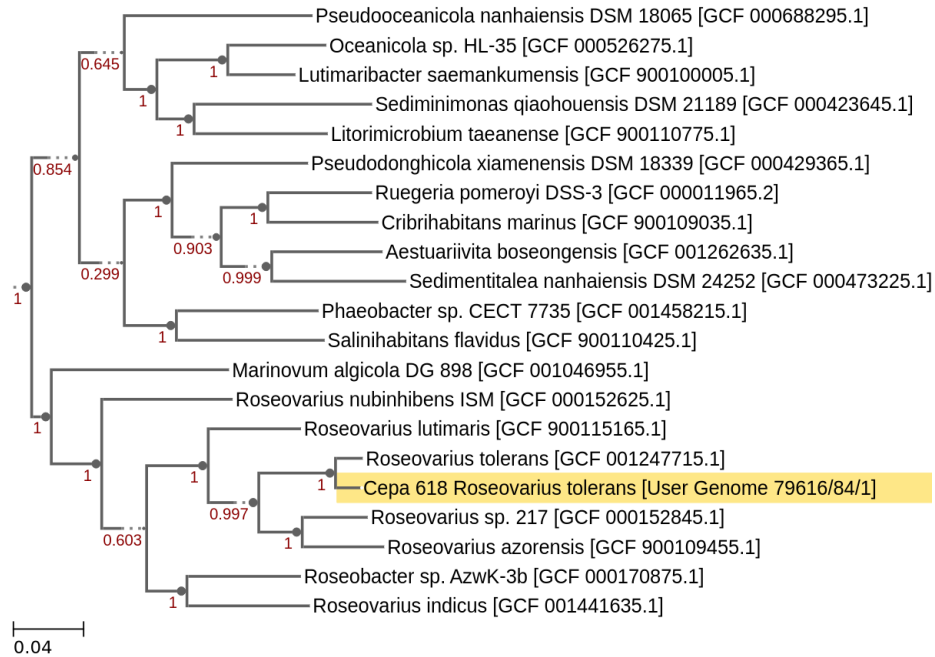


Figura D.10: Árbol filogenético para las especies cercanas a la cepa 618 *Roseovarius tolerans* construido en KBase por la herramienta “*Insert Genome Into SpeciesTree - v2.2.0*”. El valor en los nodos indica el grado de seguridad de que la cepa sea distinta de otra, éste puede variar entre 0 y 1, con 1 como valor máximo. Por otro lado, la distancia corresponde al número de sustituciones nucleotídicas por sitio.

		Ruegeria pomeroyi DSS-3	Roseovarius nubinihibens ISM	Roseobacter sp. 217	Roseobacter sp. AzwK-3b	Sediminimonas qiaohouensis DSM 21189	Pseudodonghicola xiamenensis DSM 18339	Sedimentitalea nanhaiensis DSM 24252	Oceanicola sp. HL-35	Pseudoceanicola nanhaiensis DSM 18065	Marinovum algicola DG 898	Roseovarius tolerans	Aestuariaivita boseongensis	Phaeobacter sp. CECT 7735	Lutimaribacter saemankumensis	Cribrihabitans marinus	Roseovarius azorensis	Salinhabitans flavidus	Litorimicrobium taeanense	Roseovarius lutimaris	Cepa 618 Roseovarius tolerans	
Adquisición	Transporte hierro	7	2	8	5	6	8	8	5	15	6	9	7	5	12	7	2	6	4	6	6	
	Transporte heme		1	1		2	2	2	1	2	1	1	3	1	1	2	2	2				2
	Transporte heme oxigenasa			1					1	1			1									
	Síntesis de sideróforos						4	3														
	Transporte de sideróforos	7	19	17	7	21	21	18	32	24	28	19	20	43	16	18	10	22	12	10	13	54
	Regulación genes	18	16	15	12	7	24	16	8	9	15	9	10	16	22	9	14	13	13	9	13	10
Almacenamiento		1	1	2	1	2	2	1	2	1	2	2	1	1		1	1	2			3	2
	Total	32	39	43	26	29	55	50	55	42	62	37	42	71	45	28	37	45	31	25	33	74

Figura D.11: Comparación de genes relacionados con el uso y resistencia al hierro para las especies cercanas a la cepa 618 *Roseovarius tolerans*.

D.5. Comparación del número de genes identificados para la resistencia de cobre y hierro para la cepa CA01 *Sphingopyxis bauzanensis* y cepas filogenéticamente cercanas

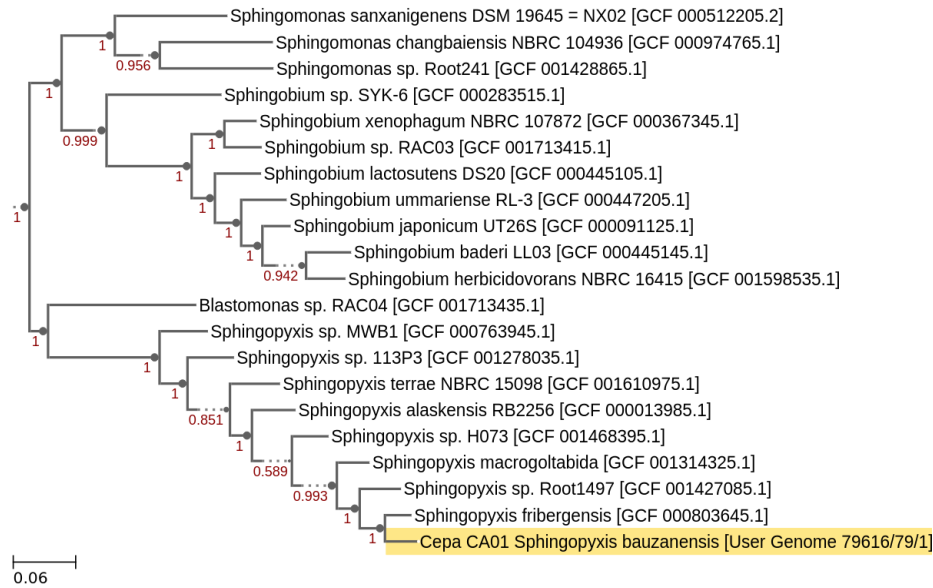


Figura D.13: Árbol filogenético para las especies cercanas a la cepa CA01 *Sphingopyxis bauzanensis* construido en KBase por la herramienta “Insert Genome Into SpeciesTree - v2.2.0”. El valor en los nodos indica el grado de seguridad de que la cepa sea distinta de otra, éste puede variar entre 0 y 1, con 1 como valor máximo. Por otro lado, la distancia corresponde al número de sustituciones nucleotídicas por sitio.

		<i>Sphingopyxis alaskensis</i> RB2256	<i>Sphingobium japonicum</i> UT26S	<i>Sphingobium</i> sp. SYK-6	<i>Sphingobium xenophagum</i> NBRC 107872	<i>Sphingobium lactosutens</i> DS20	<i>Sphingobium baderi</i> LL03	<i>Sphingobium ummariense</i> RL-3	<i>Sphingomonas sanxanigenens</i> DSM 19645 = NX02	<i>Sphingomonas changbaiensis</i> NBRC 104936	<i>Sphingopyxis sp. MWB1</i>	<i>Sphingopyxis sp. 113P3</i>	<i>Sphingopyxis alaskensis</i> RB2256	<i>Sphingopyxis sp. H073</i>	<i>Sphingopyxis macrogoltabida</i>	<i>Sphingopyxis sp. Root1497</i>	<i>Sphingopyxis fribergensis</i>	<i>Sphingopyxis sp. Root1497</i>	<i>Sphingopyxis sp. Root241</i>	<i>Sphingobium macrogoltabida</i>	<i>Sphingopyxis sp. Root1497</i>	<i>Sphingopyxis sp. H073</i>	<i>Sphingobium herbicidovorans</i> NBRC 16415	<i>Blastomonas sp. RAC03</i>	<i>Blastomonas sp. RAC04</i>	Cepa CA01 <i>Sphingopyxis bauzanensis</i>	
Adquisición	Transporte hierro	2	2	2	2	4	2	3	2	6	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	Transporte heme	1	1	1	1	2	1	1	2	1	3	1	0	0	0	1	1	1	1	0	3	1	1	1	1	1	1
	Transporte de sideróforos	17	33	46	24	27	28	37	46	24	36	12	42	35	28	42	14	29	25	44	26	23	23	23	23	23	23
	Regulación genes	9	14	20	21	29	13	27	47	20	46	14	17	25	18	19	19	14	20	20	15	16	16	16	16	16	16
	Almacenamiento	3	2	3	2	2	4	2	3	2	1	2	3	2	2	2	2	4	2	3	3	3	2	2	2	2	2
Total		32	52	72	50	64	48	70	100	53	88	31	64	64	50	66	40	48	50	72	47	44	44	44	44	44	

Figura D.14: Comparación de genes relacionados con el uso y resistencia al hierro para las especies cercanas a la cepa CA01 *Sphingopyxis bauzanensis*.

D.6. Comparación del número de genes identificados para la resistencia de cobre y hierro para la cepa 121 *Shewanella* sp. WE21 y cepas filogenéticamente cercanas

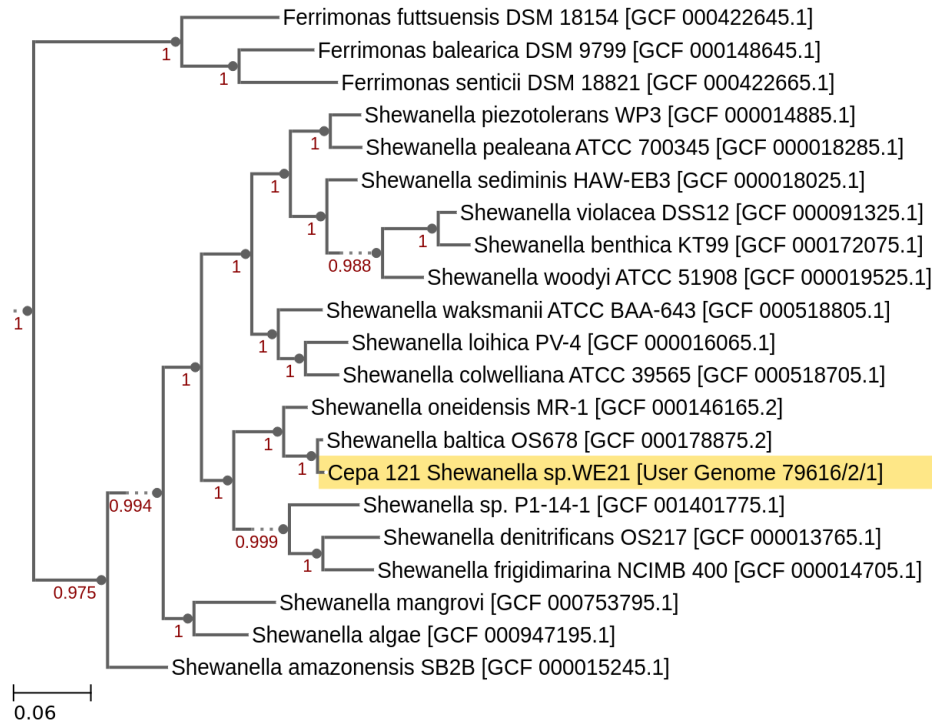


Figura D.16: Árbol filogenético para las especies cercanas a la cepa 121 *Shewanella* sp. WE21 construido en KBase por la herramienta “*Insert Genome Into SpeciesTree - v2.2.0*”. El valor en los nodos indica el grado de seguridad de que la cepa sea distinta de otra, éste puede variar entre 0 y 1, con 1 como valor máximo. Por otro lado, la distancia corresponde al número de sustituciones nucleotídicas por sitio.

		Shewanella denitrificans OS217	Shewanella frigidimarina NCIMB 400	Shewanella piezotolerans WP3	Shewanella amazonensis SB2B	Shewanella loihica PV-4	Shewanella sediminis HAW-EB3	Shewanella pealeana ATCC 700345	Ferrimonas balearica DSM 9799	Shewanella violacea DSS12	Shewanella benthica KT99	Shewanella woodyi ATCC 51908	Shewanella oneidensis MR-1	Ferrimonas futsuensis DSM 18154	Shewanella baltica OS678	Shewanella mangrovi	Shewanella algae	Shewanella amazonensis SB2B	Cepa 121 Shewanella sp. WE21			
Adquisición	Transporte hierro	2	5	5	5	5	5	5	7	5	5	5	5	5	5	5	2	5	5	5		
	Transporte heme	3	1	3	1	1	2	4	3	3	3	2	4	4	1	2	1	3	2	3	4	
	Síntesis de sideróforos	4	0	5	0	0	0	0	0	3	0	0	3	0	0	0	0	5	0	3		
	Transporte de sideróforos	26	28	43	19	15	13	28	27	24	24	36	26	46	21	28	18	29	29	41	26	45
Red-ox	Regulación genes	5	4	11	7	12	4	5	16	8	2	6	4	9	7	5	6	7	9	4	12	8
	Probable reducción	0	4	0	0	0	12	2	2	0	4	4	0	2	4	2	4	2	2	2	2	0
	Reducción	0	4	11	8	8	8	9	4	0	7	8	4	7	3	3	8	9	4	8	4	7
	Almacenamiento	2	3	3	4	3	3	3	3	4	4	3	5	4	3	3	3	6	3	5	2	4

Figura D.17: Comparación de genes relacionados con el uso y resistencia al hierro para las especies cercanas a la cepa 121 *Shewanella* sp. WE21.

	<i>Shewanella woikmanii</i> ATCC BAA-643	<i>Shewanella monorovi</i>	<i>Shewanella elgae</i>	<i>Shewanella entedis</i> MR-1	<i>Shewanella pealeana</i> ATCC 700345	<i>Ferromonas furtuensis</i> DSM 18154	<i>Shewanella piezotolerans</i> WP3	<i>Ferromonas balcarica</i> DSM 9799	<i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400	<i>Shewanella walacea</i> DS512	<i>Shewanella leytica</i> ATCC 51908	<i>Ferromonas ferrireducens</i> SR28	<i>Shewanella woodii</i> ATCC 51908	<i>Shewanella colwelliana</i> ATCC 39565	<i>Shewanella sediminis</i> HANLE83	<i>Ferromonas senticali</i> DSM 18821	Cepa 121 <i>Shewanella</i> sp. WE21					
cut	3	2	3	3	2	3	2	2	2	2	3	3	3	3	3	2	3	3	2	2		
cop	1				1	1		1	2		6	2	2	1			6				1	
cue											1											
cus																					3	
Sistemas de exportación de cobre	1		1	4	1	1	3	3	1	2	2	2	1	2	1	2	1	2	3	1	3	
Sistema de ingreso de cobre	1			1	1		1			1				1			1	1	1	1		
Chaperonas de cobre	1		1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	3
Regulador transcripcional en respuesta de Cu(I)	1	1		1	1				1					1			1				3	
Proteínas de unión a cobre																					1	
Cobre oxidasas					1			1		1			2			1						
Senso de cobre																					7	
Total	8	3	5	10	7	8	7	8	7	7	13	8	9	10	5	6	14	7	8	5	23	

Figura D.18: Comparación de genes asociados a la resistencia al cobre para las especies cercanas a la cepa 121 *Shewanella* sp. WE21.

	<i>Yersinia aldovae</i>	<i>Yersinia ruckeri</i>	<i>Roussellella chomberi</i>	<i>Rahmella chomberi</i>	<i>Serratia sp. DD3</i>	<i>Chama multitudine</i>	<i>Serratia fonticola</i>	<i>Serratia liquefaciens</i>	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Serratia rubidoea</i>	<i>Cedecea neteri</i>	<i>Bremeria goodwinii</i>	<i>Serratia odorifera</i>	<i>Pantoea</i>	<i>Pectobacterium</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Yersinia pestis</i>	<i>Obscuribacterium</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Cepa S11</i>	<i>Serratia quinivorans</i>
cut	4	4	3	4	4	4	4	5	4	4	4	4	4	2	4	4	5	4	4	4	4	4	4
cop	2	2	2	2	2	2	3	2	2	3	2		3	2		3	2	2	3	1	2		
cue	2	2	2	2	2	2	2	3	2	2	2	1	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2
cus						1	1		1		1				1			1	2				
Sistemas de exportación de cobre						1	1		1								1	1		3			
Sistema de ingreso de cobre	1	1	1				1	1		1							1						
Chaperonas de cobre							1		2														
Proteínas de unión a cobre				1		1	1	1		1	1		1	1	1	1							
Cobre oxidasas			1																				
Senso de cobre	2	2	2	2	8	2	1	1	2	1	2	1	2	2	2	2	2	2	1	1		7	
Total	9	9	8	9	8	9	12	15	9	14	10	6	10	7	6	11	9	9	11	10	11		11

Figura D.21: Comparación de genes asociados a la resistencia al cobre para las especies cercanas a la cepa S11 *Serratia quinivorans*.

D.8. Comparación del número de genes identificados para la resistencia de cobre y hierro para la cepa LB8 *Streptomyces thermogriseus* y cepas filogenéticamente cercanas

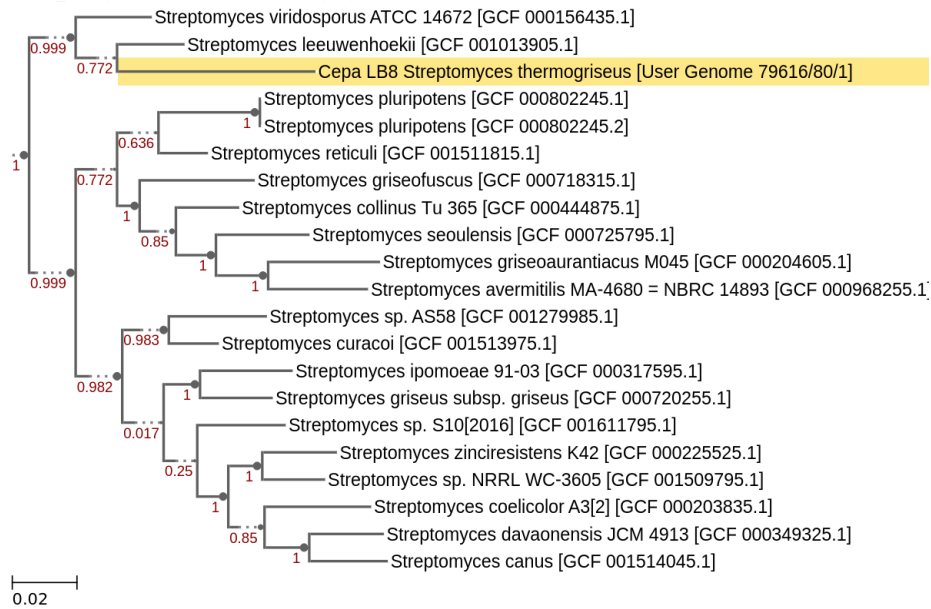


Figura D.22: Árbol filogenético para las especies cercanas a la cepa LB8 *Streptomyces thermogriseus* construido en KBase por la herramienta “Insert Genome Into SpeciesTree - v2.2.0”. El valor en los nodos indica el grado de seguridad de que la cepa sea distinta de otra, éste puede variar entre 0 y 1, con 1 como valor máximo. Por otro lado, la distancia corresponde al número de sustituciones nucleotídicas por sitio.

	<i>Streptomyces viridosporus</i> ATCC 14672	<i>Streptomyces leeuwenhoekii</i> [GCF 001013905.1]	<i>Cepa LB8 Streptomyces thermogriseus</i> [User Genome 79616/80/1]	<i>Streptomyces pluripotens</i> [GCF 000802245.1]	<i>Streptomyces pluripotens</i> [GCF 000802245.2]	<i>Streptomyces reticuli</i> [GCF 001511815.1]	<i>Streptomyces griseofuscus</i> [GCF 000718315.1]	<i>Streptomyces collinus</i> Tu 365 [GCF 000444875.1]	<i>Streptomyces seoulensis</i> [GCF 000725795.1]	<i>Streptomyces griseoaurantiacus</i> M045 [GCF 000204605.1]	<i>Streptomyces avermitilis</i> MA-4680 = NBRC 14893 [GCF 000968255.1]	<i>Streptomyces</i> sp. AS58 [GCF 001279985.1]	<i>Streptomyces curacoi</i> [GCF 001513975.1]	<i>Streptomyces ipomoeae</i> 91-03 [GCF 000317595.1]	<i>Streptomyces griseus</i> subsp. <i>griseus</i> [GCF 000720255.1]	<i>Streptomyces</i> sp. S10[2016] [GCF 001611795.1]	<i>Streptomyces zinciresistens</i> K42 [GCF 000225525.1]	<i>Streptomyces</i> sp. NRRL WC-3605 [GCF 001509795.1]	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3[2] [GCF 000203835.1]	<i>Streptomyces davaonensis</i> JCM 4913 [GCF 000349325.1]	<i>Streptomyces canus</i> [GCF 001514045.1]
Transporte hierro	5	12	7	5	16	13	5	11	8	5	11	11	5	5	4	8	5	5	11	14	5
Transporte heme	1	3	2	2	2	1	0	0	0	0	0	0	0	3	2	1	2	2	0	1	1
Transporte heme oxigenasa	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1
Síntesis de sideróforos	16	29	18	10	13	11	10	23	15	11	15	16	23	21	18	7	20	24	7	12	7
Transporte de sideróforos	19	23	13	19	17	24	11	9	9	9	9	9	12	20	30	18	20	25	12	28	13
Regulación genes	30	42	44	18	38	48	37	28	39	25	24	23	37	30	43	36	42	31	39	35	19
Almacenamiento	4	4	1	2	3	3	3	3	4	3	2	2	3	4	2	4	4	2	2	3	3
Total	75	114	85	57	89	101	67	75	75	53	62	62	81	83	99	75	93	90	71	94	48

Figura D.23: Comparación de genes relacionados con el uso y resistencia al hierro para las especies cercanas a la cepa LB8 *Streptomyces thermogriseus*.

	<i>Streptomyces avermitilis</i> MA4680 = NBRC 14893	<i>Streptomyces griseus</i> ATCC 14672	<i>Streptomyces sp. AS-3</i>	<i>Streptomyces viridosporus</i> ATCC 14672	<i>Streptomyces davauensis</i> CM 4913	<i>Streptomyces griseorubricolus</i> M045	<i>Streptomyces leuvenhoekii</i>	<i>Streptomyces seoulensis</i>	<i>Streptomyces collinus</i> T11365	<i>Streptomyces bombydii</i> 91-03	<i>Streptomyces curacoii</i>	<i>Streptomyces griseofuscus</i>	<i>Streptomyces comus</i>	<i>Streptomyces zinciresistens</i> K42	<i>Streptomyces pluripotens</i> (19217/204809/1)	<i>Streptomyces sp. S102016</i>	<i>Streptomyces sp. NRRL WC-3565</i>	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	<i>Streptomyces griseus</i> subsp. <i>griseus</i>	Cena LB8 <i>Streptomyces thermogriseus</i>		
cut	1	2	1	2	4	1	1		2	1	3	1		1	2	1	1	1	1	2	2	
cop	3	4	3	3	2	3	3	3	4	5	6	2	7		4	4	3		3	5	5	
ycnI	2		1	1	2		1		1		2				1				3		1	
Sistemas de exportación de cobre		2	1	1	2	4			1	4	3	1	3	6	1	1	3	2		4	2	2
Chaperonas de cobre	4	3																		2	1	
Proteínas de unión a cobre	1	4	2		1							2										
Cobre oxidasas	4	3	3	2	3	2	2	1	3	2	2	2	1	2		2	1	1	3	1	4	
Cobre Amino oxidasa	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	2		2	1	1		1	1		
Total	16	19	12	10	15	11	8	6	16	12	15	11	16	4	10	11	8	2	15	13	15	

Figura D.24: Comparación de genes asociados a la resistencia al cobre para las especies cercanas a la cepa LB8 *Streptomyces thermogriseus*.

Apéndice E

Anexo Genes encontrados *upstream* y *downstream*

Los genes que se encontraban aledañamente a posibles genes de tolerancia de cobre y hierro se encuentran en línea y pueden ser accedidos desde el código QR aquí presente. En él se encuentran las anotaciones hechas por el KBase y por BLASTp de NCBI para los distintos genes.



Figura E.1: Código QR con los genes encontrados en las zonas *upstream* y *downstream*.

Apéndice F

Anexo Genes presentes en los resistomas

Los genes encontrados que pertenecen al resistoma de las distintas bacterias se encuentran disponibles en línea en el siguiente código QR.



Figura F.1: Código QR con los genes pertenecientes a los resistomas.