

UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



***CARACTERIZACIÓN GENÓMICA Y FUNCIONAL DE  
BACTERIAS HIDROCARBONOCLÁSTICAS PARA LA  
BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CO-CONTAMINADOS EN  
ESCALA PILOTO***

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

***ESTER ROCÍO GONZÁLEZ RIVERA***

**Directores de Tesis: Dr. Michael Seeger P.**

**Dr. Davor Cotoras T.**

**Santiago-CHILE**

**Enero, 2023**

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

**INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER**

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

**ESTER ROCÍO GONZÁLEZ RIVERA**

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

---

**Director de Tesis:**

**Dr. Michael Seeger P.**

---

**Director de Tesis:**

**Dr. Davor Cotoras T.**

---

**Comisión Evaluadora de Tesis:**

**Dr. Carlos Santiviago C.**

---

**Dr. Vinicius Maracajá C.**

---

**Dr. Francisco Chavéz E.**

---

## **Financiamiento**

Esta tesis fue financiada gracias a: Fondecyt 1200756 y Fondos USM PI\_M\_2020\_43.

## **Congresos nacionales e internacionales**

G.Rivera, E., Durán, R., Seeger, M. (2021). Genetic determinants for Bacterial Heavy Metal resistance (HMR): An open source and manually curated dataset for genomic and metagenomic analyses. XXV Congreso Latinoamericano de Microbiología (ALAM). 25-28 agosto, 2021, Asunción, Paraguay.

G.Rivera, E., Durán, R., Seeger, M. (2021). Creación de base de datos curada de genes de resistencia a metales pesados e identificación *in silico* de genes de resistencia a cobre en *Stutzerimonas* y *Acinetobacter* nativas chilenas. Reunión anual conjunta: Sociedad de biología de Chile, Sociedad de Botánica de Chile y Sociedad de Ecología de Chile. 24-26 noviembre, 2021, Formato remoto.

G.Rivera, E., Durán, R., Macaya, C., Salazar-Tapia, F. Baéz-Mattus, X. Seeger, M. (2022). Metal Tolerance/Resistance Genes database (MTRG\_db) and its use to monitor bacterial consortium during bioremediation of copper hydrocarbon polluted soils. 18th International Symposium of Microbial Ecology (ISME18). 14-19 august, 2022, Lausanne, Switzerland.

## Agradecimientos

Quisiera agradecer profundamente a todas las personas que me entregaron y entregan su apoyo, en especial a mi madre, que me enseñó a ser fuerte y a hacer las cosas bien. Agradezco y reconozco el esfuerzo que ella hizo en su vida, para yo llegar aquí.

Si bien, esta tesis es un proceso y un paso de muchos, implicó un trabajo arduo y un gran crecimiento, profesional y personal. En este sentido, agradezco a todos mis compañeros de laboratorio, grandes personas, grandes amigos. Fue hermoso vivir la experiencia Valparaíso con ustedes, eternos en el corazón, Constanza, Felipe, Loreto, Lisette, Ximena.

En este camino de ciencia creo que he tenido dos importantes mentores, que han dado de su tiempo y amistad para mi crecimiento, es chistoso juntarlos en este agradecimiento, pero en mi tiempo primero Luciano fue un pilar fundamental en pregrado, un muy buen amigo, que por cierto es una de las personas más inteligentes que conozco, estoy profundamente agradecida de su cariño (que viene de las maneras menos esperadas). Y en este segundo período Roberto, del mismo modo un ser difícil de descifrar, pero que me acogió con mucho amor y buena onda, agradezco tu amistad y todo tu apoyo en esta tesis, que fue ¡mucho!

No puedo dejar fuera de este camino a mi compañero incondicional y el que más me apañó con todos los desafíos que implicó esta tesis, cambiarse de ciudad, vivir sola, semanas de experimentos sin parar y múltiples salidas a la playa. Gracias Joaquín, por tu cariño y paciencia, por ser compañero y fuente de inspiración, por invitarme a tus aventuras y seguirme en las mías.

De lejos pero muy cerca en el corazón, están mis otras yo, ellas mismas, que me llenaron de sus ricos pensamientos, consejos y opiniones, que vienen de mundos que se alejan y acercan a la ciencia. La vida, me puso estímulos muy emocionantes, mis amigas son uno de ellos, agradezco en especial a Natalia y Victoria, que tuvieron la fuerza suficiente para no dejarme perder esta hermosa experiencia.

Aprovecho de mencionar a mi amigo Diego, que siempre ha tenido la voluntad de ayudar, de entregar una palabra amena y por supuesto, poner a disposición sus conocimientos informáticos.

Quién soy y las puertas que se abrieron y cerraron para terminar dónde estoy, son claramente fruto de la semilla científica y de amor por la naturaleza, que mi madre Mónica supo cultivar, de mis hermanos Vicente y Clemente que me acompañaron a explorar el mundo. Le doy gracias a mis abuelos y abuelas, a la tía Rosa y a mi familia, por darme de su confianza y preocupación, y cariño al crecer.

También le agradezco a los líderes de investigación Davor y Michael, al primero por ser el puente que me permitió llegar a un lugar nuevo, y al profesor Michael, por darme la posibilidad de investigar según mis intereses, con mucha libertad y por considerarme para vivir este mundo académico-científico sin ningún temor.

## Índice general

|   |    |
|---|----|
| Financiamiento.....   | 3  |
| Congresos nacionales e internacionales.....   | 3  |
| Agradecimientos.....  | 4  |
| Índice general.....   | 5  |
| Índice de fórmulas.....   | 7  |
| Índice de figuras y tablas.....   | 8  |
| Resumen.....  | 10 |
| Abstract.....   | 11 |
| Glosario.....   | 12 |
| Introducción.....   | 14 |
| Calidad e importancia del suelo en el ecosistema.....                                       | 14 |
| Contaminación del suelo.....  | 15 |
| Contaminación del suelo por productos derivados del petróleo.....                           | 16 |
| Contaminación del suelo por metales.....  | 17 |
| Normativa en Chile.....   | 18 |
| Estrategias biológicas de descontaminación de suelos contaminados con HC.....               | 19 |
| Mecanismos bacterianos para la degradación de HC y resistencia a metales pesados.....       | 21 |
| Bacterias hidrocarbonoclásticas y tolerantes a metales en Chile.....                        | 24 |
| Monitoreo del proceso de biorremediación en suelo.....                                      | 25 |
| Contaminación en Chile: Sitio Las Salinas.....  | 27 |
| Motivación de estudio.....  | 28 |
| Hipótesis.....  | 29 |
| Objetivo general.....   | 29 |
| Objetivos específicos.....  | 29 |
| Materiales y métodos.....   | 30 |
| Materiales.....   | 30 |
| Cepas bacterianas.....  | 30 |
| Medios y condiciones de cultivo.....  | 31 |
| Estudios genómicos.....   | 31 |
| Identificación <i>in silico</i> de genes de resistencia y tolerancia a metales pesados..... | 32 |
| Estudios funcionales.....   | 32 |
| Determinación de concentración mínima inhibitoria.....                                      | 32 |
| Crecimiento de cepas bacterianas en HC alifáticos de cadena media.....                      | 34 |
| Sobrevivencia a cobre del consorcio en suelo co-contaminado con diésel.....                 | 34 |
| Núcleos de suelo.....   | 35 |
| Montaje núcleos de suelo.....   | 35 |
| Preparación del consorcio para la bioaumentación.....                                       | 37 |

|  |           |
|--|-----------|
| Medición de parámetros fisicoquímicos.....   | 38        |
| Monitoreo de la comunidad bacteriana cultivable.....   | 40        |
| Seguimiento molecular de las cepas bacterianas .....   | 40        |
| Análisis estadístico .....   | 45        |
| <b>Resultados.....</b>   | <b>46</b> |
| Identificación <i>in silico</i> de genes de resistencia/ tolerancia a metales pesados.....                                       | 46        |
| Construcción base de datos.....  | 46        |
| Identificación de genes asociados a resistencia a metales en genomas de cepas hidrocarbonoclasticas .....                        | 48        |
| Análisis de genes asociados a la tolerancia/resistencia a cobre en genomas de cepas hidrocarbonoclasticas de suelo.....          | 49        |
| Caracterización del contexto genómico de los genes de resistencia/ tolerancia a cobre .....                                      | 51        |
| Resistencia/tolerancia a metales pesados de las cepas hidrocarbonoclasticas de suelo.....  | 53        |
| Tolerancia a cobre de las cepas hidrocarbonoclasticas de suelo.....  | 53        |
| Crecimiento en HC alifáticos de cadena media y/o larga como única fuente de carbono.....   | 55        |
| Crecimiento bacteriano en medio líquido suplementado con HC alifáticos.....  | 55        |
| Crecimiento bacteriano en medio sólido suplementado con HC alifáticos .....  | 56        |
| Capacidad de crecimiento del consorcio bacteriano en microcosmo de suelo contaminado con HC alifáticos y CuSO <sub>4</sub> ..... | 56        |
| Caracterización de parámetros generales del suelo.....   | 57        |
| Monitoreo de parámetros fisicoquímicos del núcleo de suelo .....   | 58        |
| Monitoreo de parámetros biológicos del núcleo de suelo.....  | 59        |
| Monitoreo de parámetros moleculares.....   | 62        |
| Cuantificación absoluta genes de degradación de HC .....   | 64        |
| Cuantificación absoluta genes de resistencia a cobre .....   | 65        |
| Degradación de HC en el núcleo de suelo .....  | 69        |
| <b>Discusión .....</b>   | <b>72</b> |
| Base de datos HMR_gen .....  | 72        |
| Cepas bacterianas y determinantes genéticos de respuesta a cobre .....   | 73        |
| Caracterización del consorcio bacteriano.....  | 73        |
| Ensayos pilotos de biorremediación .....   | 76        |
| Monitoreo de la comunidad bacteriana cultivable.....   | 76        |
| Seguimiento molecular del consorcio bacteriano .....   | 77        |
| Remoción de hidrocarburos alifáticos .....   | 78        |
| <b>Conclusiones .....</b>  | <b>80</b> |
| <b>Bibliografía.....</b>   | <b>81</b> |
| <b>Anexo .....</b>   | <b>91</b> |

## Índice de fórmulas

|  |    |
|--|----|
| FÓRMULA 1   PORCENTAJE DE HUMEDAD .....              | 38 |
| FÓRMULA 2   ECUACIÓN DE GOMPERTZ MODIFICADA .....    | 39 |
| FÓRMULA 3   NÚMERO DE COPIAS DEL GEN DE INTERÉS..... | 45 |

## Índice de figuras y tablas

|   |    |
|---|----|
| FIGURA 1   FUNCIONES DEL SUELO .....  | 14 |
| FIGURA 2   PROCESOS DE DEGRADACIÓN Y/O RETENCIÓN DE LOS HC DESPUÉS DE UN EVENTO DE CONTAMINACIÓN .....  | 17 |
| FIGURA 3   ESTRATEGIAS BIOLÓGICAS DE BIORREMEDIACIÓN.....   | 20 |
| FIGURA 4   RUTAS DE DEGRADACIÓN DE HC ALIFÁTICOS EN CONDICIONES AEROBIAS (A, B) Y CONDICIONES ANAEROBIAS (C, D).....  | 23 |
| FIGURA 5   INTERACCIÓN BACTERIAS, CONTAMINANTES Y COMPONENTES DEL SUELO .....   | 25 |
| FIGURA 6   ESTRATEGIAS METODOLÓGICAS EMPLEADAS PARA LA CARACTERIZACIÓN BACTERIANA.. .....   | 31 |
| FIGURA 7   ESQUEMA DE REPRESENTACIÓN DEL MONTAJE DE LOS NÚCLEOS DE SUELO. ....  | 36 |
| FIGURA 8   ESQUEMA DEL SISTEMA DE AIREACIÓN UTILIZADO EN EL MONTAJE DE LOS NÚCLEOS DE SUELO.. .....   | 37 |
| FIGURA 9   GENES DE RESPUESTA A COBRE COMPONEN EN MAYOR PORCENTAJE A HMR_GEN.....   | 46 |
| FIGURA 10   TRANSPORTE TRANSMEMBRANA ES EL MECANISMO PREPONDERANTE EN HMR_GEN.....  | 47 |
| FIGURA 11   GÉNEROS CORRESPONDIENTES A BACTERIAS AMBIENTALES SE ENCUENTRAN EN MAYOR PROPORCIÓN EN HMR_GEN. ....   | 48 |
| FIGURA 12   STUTZERIMONAS SP. DN36 PRESENTA EL MAYOR NÚMERO DE GENES DE RESPUESTA A COBRE. ....   | 49 |
| FIGURA 13   TRANSPORTE TRANSMEMBRANA COMO MECANISMO PRINCIPAL DE RESPUESTA A COBRE.....   | 50 |
| FIGURA 14   CONTEXTO GENÓMICO DE GENES IDENTIFICADOS Y SELECCIONADOS DE RESISTENCIA/TOLERANCIA A COBRE PARA CADA UNA DE LAS ESPECIES BACTERIANAS PERTENECIENTES AL CONSORCIO HIDROCARBONOCLÁSTICO. .... | 52 |
| FIGURA 15   STUTZERIMONAS SP. DN36 PRESENTA LA MAYOR CIM DE COBRE EN MEDIO LÍQUIDO LPTMS COMPROBADA.. ....  | 54 |
| FIGURA 16   CRECIMIENTO DE LAS CEPAS ACINETOBACTER SP. AA64, A. RADIORESISTENS DD78, STUTZERIMONAS SP. DN36 Y RHODOCOCCUS SP. ICBD2 EN MEDIO SÓLIDO CON 2 MM CUSO4.....                                 | 54 |
| FIGURA 17   N-HEXADECANO ES LA FUENTE DE CARBONO QUE REPORTA MAYOR CRECIMIENTO EN LAS CEPAS DN36, AA64, DD78, E ICBD2.....  | 55 |
| FIGURA 18   EL CONSORCIO BACTERIANO ES DETECTABLE EN SUELO CO-CONTAMINADO POR RECuento DE HETERÓTROFOS TOTALES. ....  | 57 |
| FIGURA 19   RESUMEN PARÁMETROS FISIQUÍMICOS DE LOS NÚCLEOS DE SUELO C1, C3 Y C5. ....   | 59 |
| FIGURA 20   LOS TRATAMIENTOS DE BIOESTIMULACIÓN Y BIOAUMENTACIÓN ESTIMULAN EL CRECIMIENTO DE BACTERIAS CULTIVABLE EN EL SUELO. ....   | 60 |
| FIGURA 21   LA COMUNIDAD BACTERIANA DEL SUELO PROVENIENTE DEL SITIO LAS SALINAS NO REPORTA CRECIMIENTO EN MEDIOS SELECTIVOS PARA DEGRADADORAS DE HC.....  | 61 |
| FIGURA 22   LA COMUNIDAD NATIVA DEL SUELO LAS SALINAS NO REPORTA BACTERIAS CULTIVABLES TOLERANTES A COBRE Y DIÉSEL.....   | 61 |
| FIGURA 23   LA EXPOSICIÓN A COBRE PERMITE LA SELECCIÓN EFECTIVA DE HETERÓTROFOS CULTIVABLES TOLERANTES A COBRE EN SUELO.....  | 62 |
| FIGURA 24   EXTRACCIÓN DE DNA EFECTIVA EN TODOS LOS TRATAMIENTOS EVALUADOS.....   | 63 |
| FIGURA 25   MONITOREO DE GENES DE ALKB, ALKB2, ALKM Y ALKB_PS DURANTE EL PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN. ....   | 65 |
| FIGURA 26   CUANTIFICACIÓN ABSOLUTA POR QPCR DE COPB_RH EN SUELO.....   | 66 |
| FIGURA 27   CUANTIFICACIÓN ABSOLUTA POR QPCR DE COPA_AC EN SUELO.....   | 66 |
| FIGURA 28   CUANTIFICACIÓN ABSOLUTA POR QPCR DE COPA_PS EN SUELO. ....  | 67 |
| FIGURA 29   CUANTIFICACIÓN ABSOLUTA POR QPCR DE ACTP EN SUELO. ....   | 68 |
| FIGURA 30   CUANTIFICACIÓN ABSOLUTA POR QPCR DE ACRD_PS EN SUELO.....   | 68 |
| FIGURA 31   TASA DE REMOCIÓN DE HC DE FRACCIÓN C10-C16 DE LOS NÚCLEOS DE SUELO SEGÚN MODELO DE GOMPERTZ MODIFICADO. ....  | 70 |
| FIGURA 32   TASA DE REMOCIÓN DE HC DE FRACCIÓN C16-C34 DE LOS NÚCLEOS DE SUELO SEGÚN MODELO DE GOMPERTZ MODIFICADO.....   | 71 |

Tabla 1 | Concentraciones máximas permisibles (CMP) para residuos peligrosos. DCTO 148..... 19

|   |    |
|---|----|
| TABLA 2   CONCENTRACIONES DE HC Y METALES DETECTADAS EN EL SITIO LAS SALINAS Y SUS ALREDEDORES. (SEIA, 2018). ....                    | 28 |
| TABLA 3  CEPAS HIDROCARBONOCLÁSTICAS PERTENECIENTES A LA COLECCIÓN LABMMBA.....   | 30 |
| TABLA 4   SOLUCIONES METÁLICAS Y SU USO PARA LA DETERMINACIÓN CIM. ....   | 33 |
| TABLA 5   DESCRIPCIÓN TRATAMIENTOS EVALUADOS EN NÚCLEOS DE SUELO .....  | 36 |
| TABLA 6   TIEMPOS DE CRECIMIENTO ESPECÍFICOS POR CEPA PARA BIOAUMENTACIÓN. ....   | 38 |
| TABLA 7   PARTIDORES DISEÑADOS PARA EL CLONAMIENTO DE GENES DE RESPUESTA A COBRE DE LAS CEPAS DEL CONSORCIO HIDROCARBONOCLÁSTICO..... | 42 |
| TABLA 8   PARTIDORES DEGENERADOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE GENES DE RESPUESTA A COBRE .....   | 42 |
| TABLA 9   ENZIMAS DE RESTRICCIÓN UTILIZADAS PARA LA DIGESTIÓN DEL PLÁSMIDO .....  | 44 |



|  |    |
|--|----|
| TABLA 10   NÚMERO DE GENES DE RESISTENCIA/TOLERANCIA IDENTIFICADOS EN LOS GENOMAS BACTERIANOS DE LAS CEPAS<br>HIDROCARBONCLÁSTICAS DE SUELO. ....  | 49 |
| TABLA 11   CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE LAS CEPAS <i>P. STUTZERI</i> DN36, <i>A. RADIORESISTENS</i> DD78,<br><i>ACINETOBACTER</i> SP. AA64 Y <i>RHODOCOCCUS</i> SP. ICB2 FRENTE A DIFERENTES METALES Y METALOIDES. .... | 53 |
| TABLA 12   CRECIMIENTO DE CEPAS HIDROCARBONCLÁSTICAS EN MEDIO SÓLIDO CON HC ALIFÁTICOS COMO ÚNICA FUENTE DE<br>CARBONO. ....   | 56 |
| TABLA 13   CARACTERÍSTICAS DE LA COMPOSICIÓN DE SUELO DE EXPERIMENTOS DE NÚCLEOS DE SUELO. ....  | 57 |
| TABLA 14   CONCENTRACIÓN DE MACRONUTRIENTES EN LOS NÚCLEOS DE SUELO CONTROL, BIOESTIMULADO Y BIOAUMENTADO<br>CON CO-CONTAMINACIÓN. ....  | 58 |
| TABLA 15   REMOCIÓN DE HC C <sub>16</sub> -C <sub>34</sub> EN LOS NÚCLEOS DE SUELO. ....   | 70 |

## Resumen

El suelo es una matriz que cumple con importantes procesos biológicos, siendo una fuente de alimentos y la base para un sinnúmero de procesos geobiológicos. Su contaminación es una problemática que hoy en día pone en riesgo a los ecosistemas y la calidad de vida humana, lo que se ha ido agravando con el auge de las actividades industriales, como la agricultura, minería y la extracción-refinamiento del petróleo, aumentando las concentraciones de HC, metales, antibióticos y otros residuos en el suelo. En respuesta a esta realidad han surgido algunas soluciones biotecnológicas para la descontaminación, como la biorremediación que utiliza microorganismos, como las bacterias para la metabolización de toda clase de xenobióticos gracias a su versatilidad y diversidad genética. Esto posiciona la biorremediación como la única técnica de bajo costo y amigable con el medio ambiente.

En este trabajo se estudió la relevancia de la presencia de determinantes genéticos de respuesta a cobre en un proceso de biorremediación de suelos co-contaminados con HC alifáticos y cobre. Para esto primero se construyó una extensa base de datos de genes de respuesta a metales, HMR\_gen, donde se recopiló 558 genes que responden tanto a metales, metales pesados y metaloides. La construcción de HMR\_gen permitió la posterior identificación de genes de respuesta a cobre en bacterias ambientales nativas de la V región de Chile, las que fueron caracterizadas en cuanto a la presencia de elementos de respuesta a cobre mediante análisis bidireccionales de mejor *hit* mediante tBLASTn, corroborándose las identificaciones manualmente y analizando el contexto genómico de cada identificación. Por otro lado, se determinó la tolerancia experimental a cobre de las cepas pertenecientes al consorcio, mediante ensayos de concentración mínima inhibitoria en medio líquido y sólido, se caracterizó el crecimiento bacteriano en diferentes fuentes de HC alifáticos de las cepas pertenecientes al consorcio, como n-hexano, n-dodecano, n-octano, n-tetradecano y diésel. Luego se consolidó un consorcio bacteriano para su uso en un proceso de biorremediación, *ex situ*, a nivel de laboratorio, con núcleos de suelo de aproximadamente 60 kg, monitoreando parámetros operacionales, fisicoquímicos y biológicos durante 8 semanas. Dentro de estos parámetros se consideró el volumen de lixiviado, la temperatura, pH, conductividad, humedad, heterótrofos totales, tolerantes a diésel, tolerantes a diésel y cobre y solo cobre. Además, se realizó el seguimiento de genes de degradación de HC *alkM* y *alkB*, así también se cuantificaron por qPCR absoluto los genes de respuesta a cobre *actP*, *copA*, *copB* y *acrD* en tres condiciones experimentales: i) suelo control con historial de contaminación, ii) suelo con historial de contaminación bioestimulado y bioaumentado y iii) suelo con historial de contaminación bioestimulado y bioaumentado recontaminado con 10 mM de cobre. Los resultados mostraron que se logró la remoción de un 80% de HC de cadena media en la condición iii. Además, fue posible hacer un seguimiento del proceso de biorremediación detectando y cuantificando los genes de degradación de HC y de respuesta a cobre. Paralelamente, el consorcio bacteriano no se vio afectado por las altas concentraciones de cobre en el suelo, y fue detectado tanto por cultivo como por seguimiento molecular, contrastando con la comunidad nativa, que no fue capaz de remover exitosamente los HC del suelo. Este trabajo permitió la creación de HMR\_gen, una base de datos amplia y diversa, la cual facilita el monitoreo de marcadores moleculares en suelo, por otro lado, los tratamientos de bioestimulación y bioaumentación fueron efectivos para la descontaminación de HC alifáticos de cadena corta y media del suelo.

## Abstract

### Genomic and functional study of a bacterial association for pilot-scale bioremediation of soils co-contaminated with heavy metals and petroleum hydrocarbons

Soil is a matrix that fulfills important biological processes, such as being a source of food and the basis for a vast variety of geobiological processes. Its contamination is a major problem that today puts ecosystems and the quality of human life at risk, being aggravated with the rise of industrial activities, such as agriculture, mining and oil extraction and refining, increasing the concentrations of hydrocarbons, metals, antibiotics and other residues in the soil. In response to this scenario, many biotechnological solutions for decontamination have emerged, including bioremediation, which uses microorganisms such as bacteria for the metabolization of all kinds of xenobiotics. This is achieved through the versatility and genetic diversity of bacteria, allowing the positioning of bioremediation as the only low-cost, and environmentally friendly technique.

Here, we analyzed the relevance of the presence of genetic determinants for copper resistance in a bioremediation process of aliphatic hydrocarbons and copper co-polluted soils. For this purpose, an extensive database of metal-response genes, HMR\_gen, was built, where 558 genes that responded to both metals, heavy metals and metalloids were collected. The construction of HMR\_gen allowed the subsequent identification of copper-responsive genes in native environmental bacteria from the V region of Chile, which were characterized for the presence of copper-responsive elements by bidirectional best-hit analysis using tBLASTn, where the identifications were manually corroborated, and the genomic context of each of those identifications analyzed. On the other hand, experimental tolerance to copper of the strains was determined through minimum inhibitory concentration assays in liquid and solid media. Bacterial growth was also characterized in different sources of aliphatic hydrocarbons of the strains, such as n-hexane, n-dodecane, n-octane, n-tetradecane and diesel. Then, a bacterial consortium was established for use in a bioremediation process, ex situ, at laboratory level, with soil cores of approximately 60 kg, monitoring operational, physicochemical, and biological parameters for 8 weeks. These parameters included leachate volume, temperature, pH, conductivity, humidity, total heterotrophs, diesel tolerant, diesel and copper tolerant and copper only. In addition, hydrocarbon degradation genes *alkM* and *alkB* were monitored, as well as copper response genes *actP*, *copA*, *copB* and *acrD*, which were quantified by absolute qPCR in three experimental conditions: i) Hydrocarbon polluted soil (control), ii) Hydrocarbon polluted soil bio-stimulated and bio-augmented and iii) soil with a contamination history bio-stimulated and bio-augmented re-contaminated with 10 mM copper. The results showed that 80% of medium chain hydrocarbons removal was achieved in condition iii. In addition, it was possible to monitor the bioremediation process by detecting and quantifying the HC degradation and copper response genes. Also, the bacterial consortium was not affected by the high copper concentrations in the soil, and was detected both by culture and molecular monitoring, contrasting with the native community, which was not able to successfully remove hydrocarbons from the soil. This work allowed the creation of HMR\_gen, a wide and diverse database, which facilitates the monitoring of molecular markers in soil, on the other hand, the biostimulation and bioaugmentation treatments were effective for the decontamination of short and medium chain aliphatic hydrocarbons presents in soil.

## Glosario

**16S - 23S (ITS):** Espacio transcrito internamente – *internally transcribed space*

**16S ADNr:** Ácido desoxirribonucleico ribosomal 16S

**ABC:** *ATP Binding Cassettes*

**ADN:** Ácido desoxirribonucléico

**ARGs:** Genes de resistencia a antimicrobianos

**BacMet:** *Antibacterial Boicide & Metal Resistance Genes Database*

**BH:** Análisis de mejor *hit* bidireccional.

**BLAST:** *Basic Local Alignment Search Tool*

**BLASTp:** *Basic Local Alignment Search Tool protein*

**BTEX:** Benceno, Tolueno, Etilbenceno y Xileno

**CG-Masa:** Cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masa

**CIM:** Concentración mínima inhibitoria

**Ct:** Señal de fluorescencia

**CYPs:** Hemoenzimas citocromo P450

**DFAST:** *DDBJ Fast Annotation and submission Tool*

**DRO:** Rango orgánico de diésel

**dsDNA:** Ácido desoxirribonucléico de doble hebra.

**EAWAG:** *Eidgenössische Anstalt für Wasserversorgung, Abwasserreinigung und Gewässerschutz*

**GoogleScholar:** Servicio de buscador

**GRTM:** Gen de resistencia/tolerancia a metales

**HC:** Hidrocarburos

**HMR\_gen:** Genes de respuesta a metales pesados – *Heavy metal response gen*

**HMRG:** Genes de resistencia a metales pesados – *Heavy metal resistance genes*

**LabMMBA:** Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología Ambiental

**LB:** Medio de cultivo Luria-Bertani

**LB/amp:** Medio de cultivo Luria-Bertani suplementado con ampicilina

**LPTMS-Agar:** Medio de cultivo mínimo mineral bajo en fosfato con agar

**LPTMS:** Solución mineral tampón Tris baja en fosfato

**Medio BH:** Medio de cultivo Bushnell Hass

**MetaCyc:** Base de datos curada de rutas metabólicas

**MINSAL:** Ministerio de Salud

**MMA:** Ministerio del Medio Ambiente

**MMO:** Metano monooxigenasas

**MNC:** Medio de cultivo no convencional

**MP:** Metales pesados

**NADPH:** Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

**NCBI:** *National Center for Biotechnology Information*

**OD:** Densidad óptica

**ORO:** Rango orgánico de aceite

**PAH:** Hidrocarburo aromático policíclico

**PBCs:** Policlorobifenilos

**PCB:** Bifenilos policlorados

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

**pMMO:** Monooxigenasas insolubles

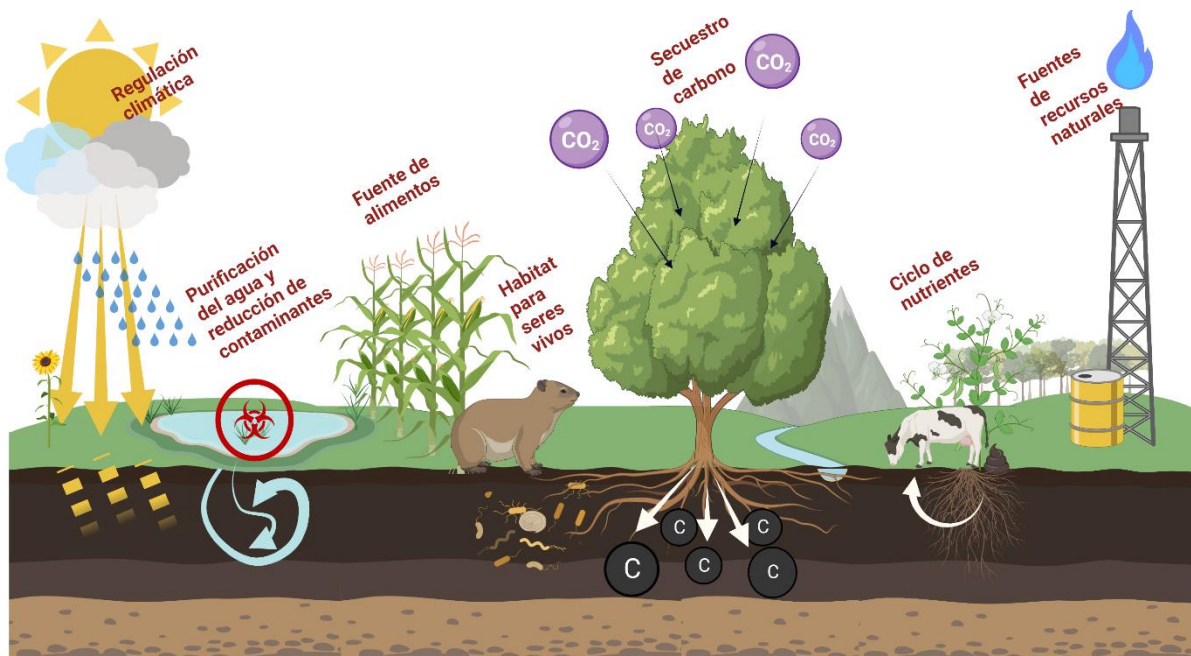
**primerBLAST:** Herramienta de diseño de partidores  
**PTFE:** Politetrafluoroetileno  
**Pubmed:** Motor de búsqueda de artículos científicos  
**PVC:** Cloruro de polivinilo<sub>n</sub>  
**qPCR:** Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real  
**RCA:** Resolución de Calificación Ambiental  
**RHObase:** *Ring-Hydroxylating Oxygenase database*  
**RND/NRD:** *Resistance Nodulation Division*  
**RPM:** Revoluciones por minuto  
**sMMO:** Monooxigenasas solubles  
**SOC:** Caldo súper óptimo con represión catabólica  
**Swissprot/Uniprot:** Base de datos biológica de proteínas  
**tBLASTn:** Bases de datos de nucleótidos traducidas mediante una consulta de proteínas  
**TM1:** Tomas de muestra superior  
**TM2:** Tomas de muestra media  
**TM3:** Tomas de muestra inferior  
**TPH:** HC totales presentes en el suelo  
**TSA:** Agar Triptona de Soja  
**UFC:** Unidades formadoras de colonias  
**UTFSM:** Universidad Técnica Federico Santa María

## Introducción

### Calidad e importancia del suelo en el ecosistema

El suelo es una matriz compleja que alberga una gran cantidad de recursos y un cuarto de la diversidad biológica del planeta (Bardgett and van der Putten, 2014; Honorato Ricardo, 1994). Estrechamente ligado a la calidad del suelo se encuentra el bienestar humano, ya que el suelo corresponde a la principal fuente de obtención de alimentos, por lo cual un suelo sano entrega seguridad alimentaria para el planeta (Gomiero, 2016).

Reacciones esenciales para la vida, como el transporte de elementos químicos, la transformación de materia orgánica, la regulación climática e hidrológica y los procesos geobiológicos fundamentales tiene lugar en el suelo, cuando éste se encuentra en buenas condiciones (Omuto et al., 2013) (**Figura 1**). El suelo actúa como un medio que facilita las relaciones simbióticas de plantas, hongos y otros microorganismos (van der Heijden et al., 2008), es aquí donde ocurre uno de los procesos más importante para las cadenas tróficas superiores, la degradación de la materia orgánica, por acción de microorganismos -bacterias y hongos- se transforma la materia vegetal en sustancias húmicas, ricas en nutrientes altamente biodisponibles para los organismos superiores (Truskewycz et al., 2019). Para facilitar la comprensión de las dinámicas de suelo y su composición, éste se ha categorizados en dos grandes estratos i) estrato de suelo superficial, también conocido como porción suave, compuesto principalmente por sustancias húmicas y ácidos fúlvicos y ii) estrato de suelo profundo, conocido como porción dura, rica en minerales y compuestos inorgánicos (Pan et al., 2016).



**Figura 1 | Funciones del suelo.** Se presentan las principales funciones que tienen lugar en el suelo. CO<sub>2</sub> : Dióxido de carbono, C: carbono. Adaptado de FAO, 2020.

En los últimos años ha adquirido gran relevancia el estudio de los microorganismos presentes en el suelo y su efecto en las propiedades fisicoquímicas del suelo. Existen estudios que han logrado determinar cómo características intrínsecas del suelo, fertilidad, cantidad de nutrientes, capacidad de síntesis de sustancias húmicas, color e interacción planta-microorganismo se encuentran comandadas por la diversidad microbiológica que alberga esta matriz (Doran and Parkin, 2015).

A pesar de la gran preocupación que ha suscitado en los últimos años con respecto al suelo y los intentos por su protección y consecuente comprensión, se ha registrado una drástica disminución de suelo fértil a nivel mundial (FAO et al., 2020; Gomiero, 2016). El suelo es capaz de regenerarse de forma natural; sin embargo, se considera un recurso finito dado que sus ciclos de regeneración son demasiado extensos para enmarcarse en el período de una vida humana (Lal, 2009). En consideración de la situación actual velar por el bienestar del suelo se ha convertido en una de las 14 prioridades reconocidas por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación (FAO) y una de las labores propuestas para la agenda 2030 de las Naciones Unidas (Rodríguez-Eugenio et al., 2018).

### **Contaminación del suelo**

Una de las principales causas de la pérdida de suelo fértil ha sido la contaminación de éste; las principales fuentes de contaminación del suelo han sido catalogadas de tipo antropogénico, es decir, por acción humana. Se ha determinado que la actividad humana es responsable de la degradación de un tercio del suelo mundial (Ellis, 2011; FAO et al., 2020). Dentro de la acción humana, podemos encontrar como principal causa de contaminación a las actividades industriales (Hall et al., 2003). Los modelos económicos vigentes han priorizado dinámicas de producción basadas la extracción de recursos naturales y la puesta en marcha de procesos no sostenibles en el tiempo, promoviendo el auge de las actividades industriales (Kumar and Meena, 2019).

En orden de impacto tenemos que las principales actividades contaminantes del suelo son la industria petrolera, minera, agrícola y ganadera, textil, mecánica y actividades militares. Estas generan residuos contaminantes como hidrocarburos (HC), metales pesados, (MP) residuos agroquímicos (pesticidas, nitratos, fosfatos y plaguicidas), policlorobifenilos (PCBs), microfibras y microplásticos, entre otros (Rodríguez-Eugenio et al., 2018). Estos contaminantes poseen propiedades fisicoquímicas que les permiten permanecer por largos períodos de tiempo sin alteración en el medio ambiente, es decir, son altamente recalcitrantes, además pueden ser movilizados de una matriz a otra en base a su solubilidad y las condiciones del ambiente (Batista et al., 2016).

Existen diferentes componentes en el suelo que determinan la distribución final de los contaminantes, por ejemplo las sustancias húmicas son capaces de interaccionar químicamente con metales pesados, encapsulándolos en complejos orgánicos lo que genera una barrera de fases que impide la infiltración hacia las porciones duras del suelo (Yildirim et al., 2021). Del mismo modo otros contaminantes orgánicos pueden ser secuestrados a nivel superficial de manera reversible y/o irreversible; sin embargo, cuando éstos alcanzan la segunda porción del

suelo (dura) son secuestrados irreversiblemente por el menor tamaño de poro que promueve la compactación y mineralización del suelo (Stroud et al., 2007). La problemática ambiental que supone la contaminación de los suelos se agudiza cuando los contaminantes vertidos en él suelo terminan en depósitos de agua, no tan solo superficiales por arrastre o erosión, sino también en las aguas subterráneas por infiltración y el sobrepaso del nivel freático (Iturbe and Silva, 2015), convirtiéndolos en un gran riesgo para la población humana y los ecosistemas en general.

Uno de los efectos más perjudiciales de los contaminantes, es la perturbación de las comunidades microbianas que habitan el suelo; la alteración de las funciones que cumplen los microorganismos repercute directamente en la calidad y fertilidad del suelo consecuentemente en la vida de las personas (Honorato, 1994).

La contaminación por desechos industriales en Chile ha sido minimizada y no atendida con prontitud por lo cual hoy en día en Chile existen contaminaciones crónicas que conocemos como zonas de sacrificio (Valenzuela, 2016). Éstas no solo han tenido un fuerte impacto en las zonas industriales, sino también en zonas urbanas, representando un riesgo para la salud humana y un detrimento para la vida en estos lugares (Henríquez et al., 2006).

### **Contaminación del suelo por productos derivados del petróleo**

Los productos derivados del petróleo son de los contaminantes más frecuentes en el suelo (Mracnova et al., 2002), una gran porción de la Tierra hoy en día se encuentra contaminada con HC a causa de la extracción y transporte de petróleo crudo (Gennadiev et al., 2015). El petróleo ha sido la principal y más poderosa fuente de carbono/energía desde el siglo XVII hasta la actualidad (Hall et al., 2003). En su composición concentra compuestos hidrocarbonados complejos, como HC alifáticos y aromáticos, y algunos compuestos de alto peso molecular policondensados como resinas y asfaltos (Tang et al., 2012).

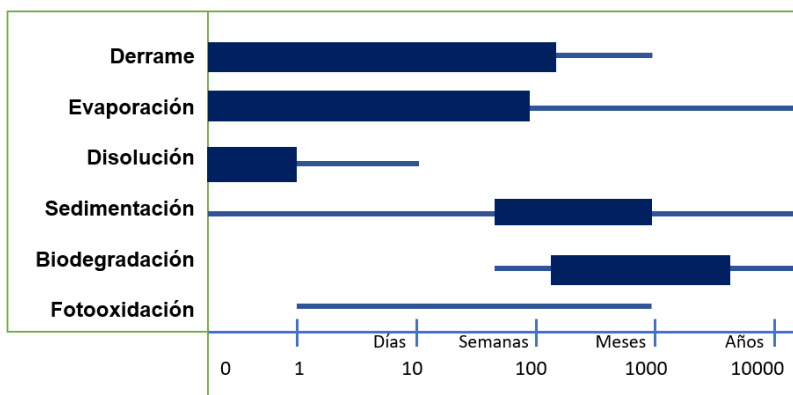
Los HC alifáticos corresponden a la familia más abundante (20-50%) en los ambientes contaminados por petróleo (Rojo, 2009). Dentro de los HC alifáticos podemos tener tres grandes clasificaciones: 1. HC de cadena corta  $C_{2-9}$ , conocido como rango de orgánicos de gasolina (GRO) 2. HC de cadena media  $C_{10-19}$ , conocido como rango orgánico de diésel (DRO) 3. HC de cadena larga  $C_{19-39}$ , conocido como rango orgánico de aceite (ORO). Los grandes problemas medioambientales que representan los HC se relacionan estrechamente con sus propiedades fisicoquímicas, son compuestos altamente recalcitrantes y persistentes, son muy móviles, por lo cual fácilmente pueden llegar a contaminar fuentes de agua (Kuppusamy et al., 2020). La toxicidad de estos compuestos se relaciona con la presión de vapor, viscosidad, tensión superficial y solubilidad en lípidos que poseen (Carreón and Herrick, 2012).

Como hemos mencionado la presencia de HC en el suelo es un problema medioambiental de gran envergadura dada su extensión e impactos ecológicos (Fuentes Alburquenque, 2014; Kuppusamy et al., 2020; Rojo, 2009). Su presencia en el suelo es aún más preocupante que los daños que representan para la salud humana -intoxicación, alteraciones de la salud física y mental (Kuppusamy et al., 2020; Rajasekhar et al., 2018)-, ya que muy bajas concentraciones de HC en el suelo perjudican severamente la calidad, dinámica y equilibrio ecológico del suelo



(Truskewycz et al., 2019). La presencia de HC provoca un cambio inmediato en la naturaleza del medio ambiente, daña a los microorganismos del suelo inhibiendo sus procesos enzimáticos (Alrumman et al., 2015), menoscabar la funcionalidad de la comunidad microbiana altera directamente el ecosistema. Otros organismos mayores como las plantas se ven afectadas por toxicidad directa, por dificultad en alcanzar la luz del sol y el disponer de nutrientes (Van der Heijden et al., 2008). La alteración del microbioma del suelo -productores primarios- impide el adecuado desarrollo de organismos superiores (Truskewycz et al., 2019).

Los HC al ser dispuestos en el suelo sufren distintos procesos de degradación y/o retención, los cuales pueden ocurrir espontáneamente, llamados procesos de degradación, tal como la fotodegradación o evaporación de HC volátiles, como también pueden sufrir procesos de sorción y/o migración, los cuales disminuyen su biodisponibilidad (Gennadiev et al., 2015). Por el contrario, la degradación por acción biológica no es espontánea, sino que implica la participación de microorganismos especializados en la degradación de compuestos complejos como los HC (Tang et al., 2012). Si bien los procesos de atenuación natural, es decir la acción degradadora espontánea y la actividad microbiana de la comunidad nativa, son capaces de disminuir la concentración de HC, no son procesos continuos en el tiempo (**Figura 2**) (Kuppusamy et al., 2020).



**Figura 2 | Procesos de degradación y/o retención de los HC después de un evento de contaminación.** Se presentan los diferentes procesos (Derrame, Evaporación, Disolución, Sedimentación, Biodegradación y Fotooxidación) en el tiempo. El grosor de la barra indica la magnitud del proceso.

A nivel nacional han ocurrido diversos desastres ambientales significativos relacionados con contaminación por HC. En el año 2002 se derramaron 70,000 L de petróleo crudo en la desembocadura del Río Aconcagua (Palma-Fleming et al., 2008), situación que luego se repitió en 2011 en las cercanías del mismo lugar, con 50,000 L derramados (Fuentes et al., 2015).

### Contaminación del suelo por metales

Otro contaminante ampliamente distribuido en el suelo son los metales (Tchounwou et al., 2012), éstos pueden ser clasificados según sus propiedades químicas en tres grandes grupos: 1. Metales pesados (MP): vanadio (V), cromo (Cr), manganeso (Mn), hierro (Fe), cobalto (Co), níquel (Ni), cobre (Cu), zinc (Zn), galio (Ga), molibdeno (Mo), plata (Ag), cadmio (Cd), tungsteno

(W), oro (Au), mercurio (Hg), plomo (Pb) y bismuto (Bi). 2. Metales (M): aluminio (Al) y magnesio (Mg). 3. Metaloides (ML): arsénico (As), antimonio (Sb), telurio (Te) y selenio (Se) (Tchounwou et al., 2012). La principal fuente de metales en el ambiente está asociada a la actividad industrial, siendo la actividad minera uno de los mayores contribuyentes (Truskewycz et al., 2019).

Los MP en el suelo son capaces de interactuar con la materia orgánica, siendo encapsulados en complejos de arcillas y hummus -principales cargas negativas del suelo- así permanecen encapsulados en el suelo; no obstante, en altas concentraciones estos compuestos son altamente móviles por lo cual son capaces de permear a través del suelo superficial y llegar depósitos de mineralización o fuentes de agua (Iturbe and Silva, 2015). La presencia de los MP en el suelo significa un factor ambiental estresor para la comunidad microbiana del suelo, en especial para bacterias ambientales las cuales ven inhibidos sus procesos enzimáticos cuando no poseen mecanismos de respuesta a MP. Su presencia también dificulta el asentamiento de organismos mayores, tanto por el detrimento de los productores primarios, como por contaminación directa de los recursos hídricos y/o toxicidad (van der Heijden et al., 2008)

Como bien es sabido, Chile es reconocido como un importante centro minero, ocupa la primera posición en producción de cobre y cuenta con un 30% de las reservas minerales del mundo (El Mercurio, 2013), esto lo ha convertido en un nicho de desarrollo de la industria minera (Ministerio de Minería, 2018). Esta actividad, aparte de generar residuos como los MP, también aporta al medio ambiente con residuos como HC, ya que muchos procesos requieren de esta fuente de energía (Godoy-Faúndez et al., 2008; Lam et al., 2020). La alta actividad minera, ha afectado al medio ambiente contaminando suelos, sedimentos y cuerpos de aguas. Un buen ejemplo tiene lugar en la región de Valparaíso, el estuario de Aconcagua reporta concentraciones de cobre sobre las 500 ppm (Altimira et al., 2012). El estuario de Valdivia reporto la presencia de metales pesados como hierro, cobre, zinc y cromo (Palma-Fleming et al., 2008). También en zonas aisladas de nuestro país como el Fiordo Aysén se han encontrado metales pesados como el zinc en concentraciones superiores a las 160 ppm (Ahumada et al., 2004).

### **Normativa en Chile**

En Chile actualmente no contamos con una normativa de suelo que proteja, regule y organice este recurso de manera orgánica (Haro, 2007). No obstante, existen algunos decretos y leyes que abordan problemáticas propias del suelo como desertificación y/o degradación (González, 2020). Sin embargo, el resto de las legislaciones se encuentran supeditadas principalmente a la propiedad del suelo, la cual regula y norma su uso (Haro, 2007). En cuanto a residuos peligrosos presentes en el suelo, el Decreto 148 del Reglamento Sanitario del Ministerio de Salud (MINSAL) (Ministerio de Salud, 2004), es el encargo de estipular las concentraciones máximas permitidas en el medio ambiente (**Tabla 1**). Así también el decreto 3 postula concentraciones máximas de metales pesados en suelos, para la aplicación de lodos (Ministerio del Medio Ambiente, 2012).

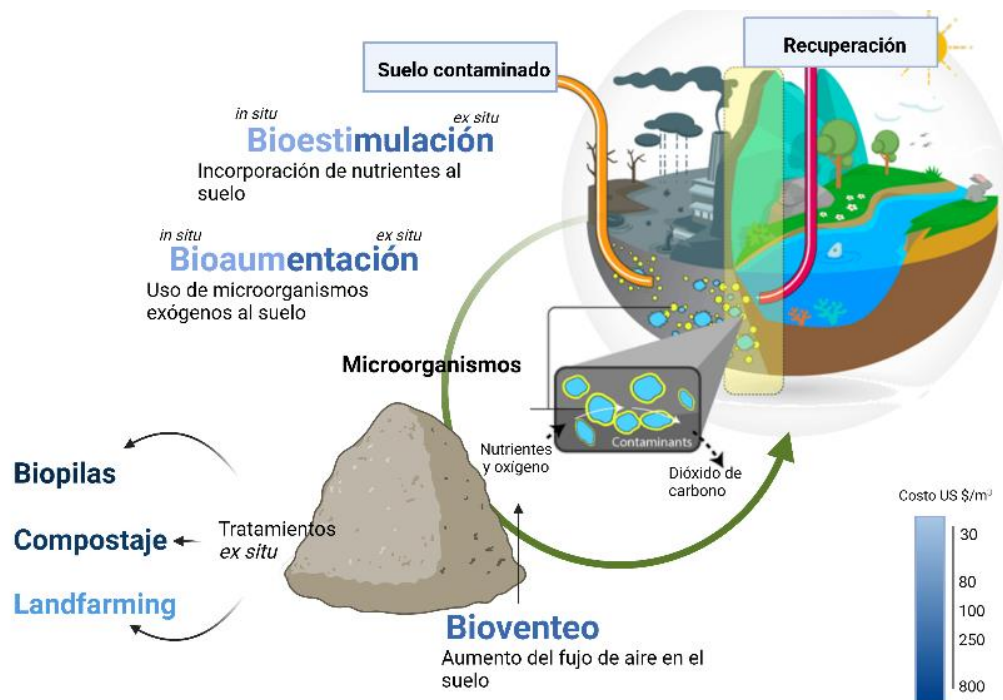
Tabla 1 | Concentraciones máximas permisibles (CMP) para residuos peligrosos. DCTO 148.

| Código RP | N° CAS    | Sustancia               | CMP (mg/l) |      |           |                           |      |
|-----------|-----------|-------------------------|------------|------|-----------|---------------------------|------|
| D004      | 7440-38-2 | Arsénico                | 5          | D030 | 121-14-2  | 2,4 Dinitrotolueno        | 0,13 |
| D007      | 7440-47-3 | Cromo                   | 5          | D012 | 72-20-8   | Endrin                    | 0,02 |
| D009      | 7439-97-6 | Mercurio                | 0,2        | D031 | 76-44-8   | Heptacloro (y su epóxido) | 0    |
| D008      | 7439-92-1 | Plomo                   | 5          | D032 | 118-74-1  | Hexaclorobenceno          | 0,13 |
| D010      | 7782-49-2 | Selenio                 | 1          | D033 | 87-68-3   | Hexacloro-1,3-butadieno   | 0,5  |
| D005      | 7440-39-2 | Bario                   | 100        | D034 | 67-72-1   | Hexacloroetano            | 3    |
| D018      | 71-43-2   | Benceno                 | 0,5        | D013 | 58-89-9   | Lindano                   | 0,4  |
| D006      | 7440-43-9 | Cadmio                  | 1          | D014 | 72-43-5   | Metoxicloro               | 10   |
| D019      | 56-23-5   | Tetracloruro de carbono | 0,5        | D035 | 78-93-3   | Metiletilcetona           | 200  |
| D020      | 57-74-9   | Clordano                | 0,03       | D036 | 98-95-3   | Nitrobenceno              | 2    |
| D021      | 108-90-7  | Clorobenceno            | 100        | D037 | 87-86-5   | Pentaclorofenol           | 100  |
| D022      | 67-66-3   | Cloroformo              | 6          | D038 | 110-86-1  | Piridina                  | 5    |
| D023      | 95-48-7   | o-Cresol (*)            | 200        | D011 | 7440-22-4 | Plata                     | 5    |
| D024      | 108-39-4  | m-Cresol (*)            | 200        | D039 | 127-18-4  | Tetracloroetileno         | 0,7  |
| D025      | 106-44-5  | p-Cresol (*)            | 200        | D015 | 8001-35-2 | Toxafeno                  | 0,5  |
| D026      | -----     | Cresol (*)              | 200        | D040 | 49-01-6   | Tricloroetileno           | 0,5  |
| D016      | 94-75-7   | 2,4-D                   | 10         | D041 | 95-95-4   | 2,4,5-Triclorofenol       | 400  |
| D027      | 106-46-7  | 1,4 Diclorobenceno      | 7,5        | D042 | 88-06-2   | 2,4,6-Triclorofenol       | 2    |
| D028      | 107-06-2  | 1,2 Dicloroetano        | 0,5        | D017 | 93-72-1   | 2,4,6,-TP(silvex)         | 1    |
| D029      | 75-35-4   | 1,1 Dicloroetileno      | 0,7        | D043 | 75-01-4   | Cloruro de vinilo         | 0,2  |

(\*) La suma de las concentraciones de los isómeros (*o*-cresol, *m*-cresol y *p*-cresol) debe ser inferior a la CMP establecida para el cresol.

## Estrategias biológicas de descontaminación de suelos contaminados con HC

En respuesta a la creciente necesidad de terrenos libres de contaminación (FAO et al., 2020), estrategias como la biorremediación se han posicionado como una opción sostenible, económica y medioambientalmente. Esta corresponde a una herramienta de alta efectividad en cuanto a descontaminación y recuperación de terrenos (Dutta et al., 2021) (**Figura 3**).



**Figura 3 | Estrategias biológicas de biorremediación.** Se presentan las diferentes estrategias de biorremediación: Bioestimulación, Bioaumentación y Bioventeo, y sus metodologías de aplicación *ex situ* Biopilas, Compostaje y Landfarming. Además, se incluye una escala de color azul la cual representa el costo de cada una de las estrategias biológicas de biorremediación (Rodríguez-Castro, 2022).

La biorremediación se define como el uso de microorganismos para la remoción de contaminantes (Azubuike et al., 2016). Es una técnica que puede ser empleada *in situ* o *ex situ*, la primera condición presenta como ventaja un menor uso de maquinarias, ya que no es necesario transportar o remover el suelo, además de prescindir de infraestructura (Atlas and Philp, 2005). Existen diferentes estrategias de biorremediación que pueden mejorar el proceso, tal como la bioestimulación y la bioaumentación. La bioestimulación corresponde a la incorporación de nutrientes y estimulantes que favorecen el crecimiento y activación de la comunidad nativa del suelo, y la bioaumentación, se define como la incorporación de microorganismos con ventajas adaptativas como la degradación de contaminantes al suelo. Otra estrategia que mejora la biorremediación es el bioventeo, el cual busca incorporar oxígeno en el suelo para promover la oxidación de los contaminantes y el metabolismo aeróbico (Hoff, 1993). La biorremediación es una técnica que tiene más de 80 años de existencia; sin embargo, su aplicación se enfrenta a algunos desafíos importantes y extenuantes, los cuales tienen relación estricta con las propiedades intrínsecas del suelo y la naturaleza de los contaminantes. Para poder tener resultados de descontaminación efectivos es necesario conocer en detalle las características fisicoquímicas del suelo en el cual se pretende aplicar, y la naturaleza del contaminante, además de conocer el efecto del contaminante sobre la comunidad microbiana; esta información es esencial para poder definir parámetros biológicos y operacionales en el proceso de descontaminación (Heitzer, 1993).

Por otro lado, esta técnica depende estrechamente de la biodisponibilidad y esto a su vez de la bioaccesibilidad del contaminante en la matriz. Existe una amplia discusión sobre estos términos,

pero de manera sencilla definiremos como biodisponibilidad la porción de contaminante que puede ser ingresado al organismo -cruzar su membrana celular- y como bioaccesibilidad a la suma entre la biodisponibilidad y el potencial biodisponible de un contaminante (Kuppusamy et al., 2020).

En resumen, la biorremediación es una técnica que puede ser altamente efectiva (Godoy-Faúndez et al., 2008; Varjani et al., 2015); sin embargo, su efectividad está estrechamente ligada a las propiedades de la matriz contaminada; el diseño y selección de estrategias debe considerar los factores anteriormente mencionados y ser altamente personalizada al caso de contaminación (Bravo et al., 2020; Rojas et al., 2011).

### **Mecanismos bacterianos para la degradación de HC y resistencia a metales pesados**

Dentro de los microorganismos utilizados en los procesos de remoción de HC, se posicionan en primera línea bacterias y hongos, siendo las bacterias los degradadores más ampliamente estudiados y empleados a nivel de campo, por su versatilidad y mejor desempeño en la degradación de HC en comparación con los hongos (Chikere et al., 2011; van der Heijden et al., 2008); no obstante, es bien sabido que una sola especie no es capaz de degradar completamente un mezcla compleja de HC.

La exposición a HC desencadena la adaptación de la comunidad bacteriana para la utilización de estos contaminantes como fuente de carbono, pueden suscitarse la inducción o inhibición de ciertas enzimas específicas, cambios genéticos que favorezcan o reduzcan una vía metabólica y el enriquecimiento selectivo de la comunidad hidrocarbonoclástica (Leahy and Colwell, 1990).

Los géneros bacterianos hidrocarbonoclásticos de suelo mayormente descritos corresponden a *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Collimonas*, *Corynebacterium*, *Dietzia*, *Flavobacterium*, *Gordonia*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Nocardioides*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Rhodococcus*, *Sphingomonas*, *Variovorax* y otros géneros bacterianos no cultivables (Hamamura et al., 2006; Leahy and Colwell, 1990). La capacidad de degradación de los HC recae principalmente en la posesión de diferentes enzimas por las especies bacterianas, estas enzimas generalmente son parte de las principales rutas de degradación de HC (Hao et al., 2021). Se puede sumar la presencia de enzimas específicas, la producción de surfactantes, la presencia de plásmidos degradativos y algunos otros elementos móviles (Rojo, 2009). En términos generales los mecanismos de degradación de HC alifáticos se engloban en la  $\beta$ -oxidación y se pueden clasificar vías aerobias y anaerobias (**Figura 4**) (Fuentes, 2014). La ruta aerobia es usualmente iniciada por una alcano monooxigenasa, la cual a partir de un grupo metilo terminal produce *n*-alcanol, siendo una enzima clave en la activación de la degradación (Rojo, 2009). Los alcanoles son oxidados secuencialmente por alcohol deshidrogenasas y aldehído deshidrogenasas, hasta llegar a ácidos grasos, los cuales son asimilados por la vía de la  $\beta$ -oxidación (Macaya et al., 2019a)

En función del largo de la cadena alifática, actuarán diferentes enzimas (Shuai et al., 2019), para cadenas:

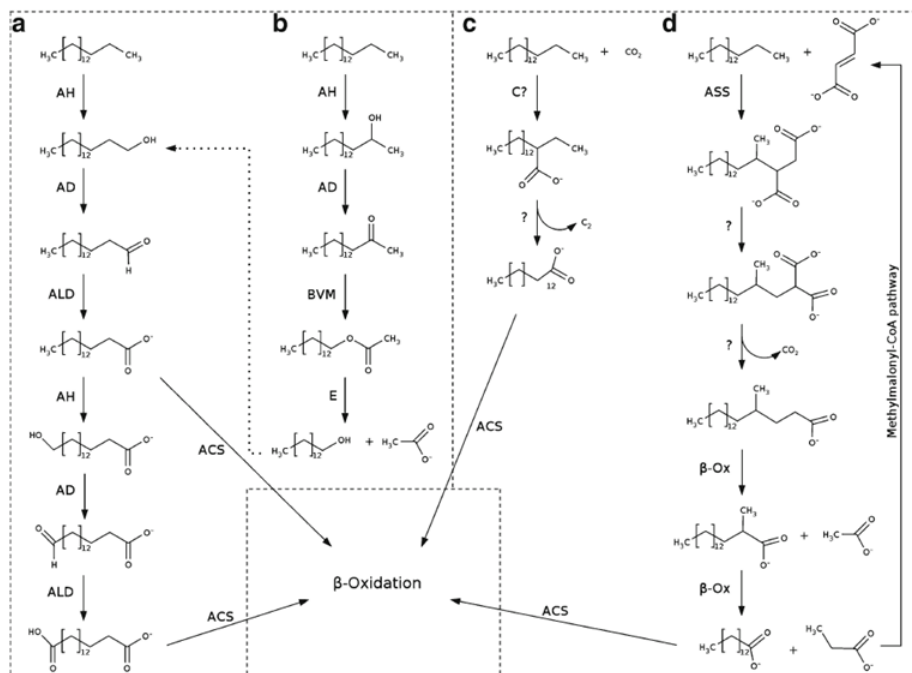
1. Cortas ( $C_1$ - $C_4$ ): La activación de la cadena alifática ocurre gracias a una metano monooxigenasa (MMO) la cual es capaz de insertar  $O_2$  a un alcano de cadena corta, esto ya que posee centros estabilizadores de hierro o cobre (Hamamura et al., 2001). Las bacterias metanotrofas, pueden tener tanto metano monooxigenasas solubles (sMMO) o insolubles (pMMO). El sistema sMMO está constituido principalmente por una hidroxilasa, reductasa y una proteína reguladora. Por otro lado, el sistema pMMO está compuesto por una estructura trimérica, con tres copias de las subunidades PmoB, PmoA y PmoC. *Nocardioides* sp. CF8 es una cepa que presenta estos dos sistemas y es capaz de crecer en HC alcanos de  $C_2$ - $C_{16}$ . Otro caso es la presencia de agrupaciones de genes *prmABCD* y *smoABCD* de *Rhodococcus* sp. BCPI, que codifican una di-hierro monooxigenasa la cual participa en la degradación de *n*-alcanos gaseosos (Macaya et al., 2019a). La participación de diferentes monooxigenasas modifica parcialmente el mecanismo de reacción inicial.

2. Medianas ( $C_5$ - $C_{16}$ ): La degradación de estos compuestos ocurre gracias a monooxigenasas de hierro no-hemo del tipo AlkB, las cuales han sido bien caracterizadas en *Pseudomonas putida* GoP1, donde se describe la presencia de dos operones *alkBFGHJKL*, que codifican AlkB, alcano monooxigenasa, AlkG rubredoxina soluble, y otras enzimas para las etapas posteriores. El segundo operón corresponde a *alkST*, que codifica una rubredoxina reductasa (AlkT y AlkS) que regula la expresión del primer operón (Natalia and de Oliveir, 2013). Además, genes tipo *alkB* se han identificado en bacterias pertenecientes a los géneros *Burkholderia*, *Acinetobacter* y *Pseudomonas* (Fuentes et al., 2015). También son capaces de utilizar HC de cadena media como sustrato las hemoenzimas citocromo P450 (CYPs), que catalizan la incorporación de un átomo de oxígeno en la cadena del alcano. La oxidación puede ser seguida por hidroxilación, desmetilación, desalquilación y sulfo oxidación (Girvan and Munro, 2016). El primer miembro de esta familia de enzimas caracterizado fue CYP153A1 de *Acinetobacter* sp. EB104 (Maier et al., 2001). Se han encontrado enzimas similares en *Proteobacteria* y *Actinobacteria*. Cepas pertenecientes a la especie *Rhodococcus* sp. poseen hasta 4 sistemas AlkB y 2 citocromos P450 (Ratnikova and Titok, 2020), mientras que *Alcanivorax borkhumensis* presenta 2 de cada sistema (van Beilen et al., 2006). CYPs además poseen un importante rol en la degradación de algunos HC aromáticos.

3. Largas ( $>C_{17}$ ): Las cadenas largas de HC se presentan como un gran desafío para la degradación. Degradadores de cadena larga como *Acinetobacter* sp. M-1 expresan sus alcano hidroxilasas diferencialmente, codificadas por los genes *alkMa* y *alkMb* (Tani et al., 2001). *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 y PR1 expresan sus genes *alkB1* y *alkB2* frente a  $C_{10}$ - $C_{24}$  (Marín et al., 2003). Se han identificado otros genes relacionados con la degradación de HC alifáticos de cadena larga, incluyendo los genes *ladA*, que codifican monooxigenasa flavina dependiente y reductasa mononucleótido flavina NADPH dependiente en *Geobacillus thermoleovorans* B23 (Boonmak et al., 2014). Los genes *almA* de *Acinetobacter* sp. DSM 17874 y *Acinetobacter baylyi* ADP1, codifican una alcano monooxigenasa de unión a flavina y la ausencia de estos genes no permiten el crecimiento en alcanos superiores a  $C_{24}$  (Throne-Holst et al., 2007).



También, la ruta anaerobia incluye enzimas como alquil succinato sintasas (Rojo, 2009; van Beilen et al., 2006). Sin embargo, la ausencia de un aceptor de electrones finales fuerte, enlentece las reacciones y obliga la participación de otros aceptores de electrones finales, como nitratos, nitritos, sulfatos, tiosulfatos, carbonatos, metales oxidados (Abbasian et al., 2015). Para la degradación de *n*-alcanos se han descrito la activación mediante la adición de fumarato a región subterminal produciendo derivados de alquil succinato, esto gracias a la actividad de alquil succinato sintasas, codificadas por los genes *assA*, descritas en *Desulfococcus oleovorans* AK01 (Callaghan et al., 2012). Esta degradación es mucho más lenta y menos efectiva en comparación con las rutas aerobias (Alisi et al., 2009).



**Figura 4 | Rutas de degradación de HC alifáticos en condiciones aerobias (a, b) y condiciones anaerobias (c, d)** (Fuentes et al., 2014.)

No obstante, la presencia de estas enzimas no asegura por completo su funcionalidad, además de poseer las enzimas involucradas en la ruta de degradación, las bacterias deben contar con mecanismos de respuestas a otros contaminantes, dado que las situaciones de co-contaminación son muy frecuentes (Pascucci, 2011). Los HC generalmente se encuentran asociados a la presencia de metales pesados en el suelo, de este modo la capacidad de resistir o tolerar altas concentraciones de MP es esencial para bacterias utilizadas en la biorremediación (Deary et al., 2022). Dentro de los mecanismos de tolerancia, se encuentran funciones asociadas al transporte de metales mediante bombas de expulsión -uniporte y/o simporte- que regulan las concentraciones intracelulares del metal (Giller et al., 1998). Las principales proteínas reportadas con esta función pertenecen a la familia RND (*Resistance Nodulation Division*), proteínas de expulsión activa ATPasas, proteínas tipo ABC (*ATP-Binding Cassettes*), y proteínas transportadoras tipo P. En cuanto a mecanismos de resistencia encontramos principalmente unión de los metales mediante proteínas de unión, polímeros extracelulares y pared celular que son capaces de secuestrar los metales en cuestión y mecanismos de precipitación mediante

producción de H<sub>2</sub>S. Otro de los mecanismos de resistencia corresponde reacciones de oxidación y/o reducción de los metales, comandados por reductasas y/o oxidasas (Hao et al., 2021).

Uno de los metales pesados de mayor importancia para nuestro país es el cobre, ya que es uno de los más abundantes. Se ha reportado que la resistencia a cobre está determinada por la presencia de los genes *cop*, que usualmente están en plásmidos y organizados en operones (Dupont et al., 2011; Nies and Silver, 2007). En el operón *cop* se encuentran codificadas las enzimas multi cobre oxidasa (*copA*), proteína de resistencia a cobre (*copB*), proteína sensora (*copS*) y proteínas de unión a cobre (Mellano and Cooksey, 1988; Monchy et al., 2006; Rensing and Grass, 2003; Tetaz and Luke, 1983; Voloudakis et al., 2005). Un segundo sistema de detoxificación reportado en *Escherichia coli* es la oxidasa multicobre CueO, que oxida el cobre de Cu<sup>+1</sup> a Cu<sup>+2</sup>. También se ha descrito un sistema de expulsión codificado por el operón *cusCFAB*, que expulsa el Cu<sup>+1</sup> desde el citoplasma al medio extracelular. Numerosas bacterias poseen resistencia al cobre basado en el gen *copA*, como las pertenecientes a los géneros, *Ralstonia*, *Xylella*, *Xanthomonas*, *Pseudomonas*, *Aeromonas* y *Caulobacter* (Rensing and Grass, 2003; Rojas et al., 2011). En 1985 se identifica el plásmido pRJ1004 perteneciente a *E. coli* el cual codifica el operón *pcoABCDRS* (Brown et al., 1995); unos años después en 1989 en la misma especie se identifican genes cromosomales de resistencia a cobre, conocidos como genes *cut*: *cutAB* participan en el ingreso de cobre a la célula, *cutE* y *cutF* comandan el almacenamiento y transporte intracelular del metal y *cutC* y *cutD* son los encargados del transporte extracelular del cobre. Los genes *cutE*, *copA* y *pcoD* presentan en diferentes especies.

Considerando la respuesta biológica de las bacterias éstas pueden ser clasificadas en organismos tolerantes y/o resistentes (Dopson et al., 2014). Los primeros se caracterizan por tener respuestas generales, comandadas por genes localizados en el cromosoma y que pueden ser utilizados frente diversos estímulos. Por otro lado, las bacterias resistentes presentan una respuesta más contundente, especializada para una identidad metálica y asociada a la presencia de plásmidos específicos.

### **Bacterias hidrocarbonoclásticas y tolerantes a metales en Chile**

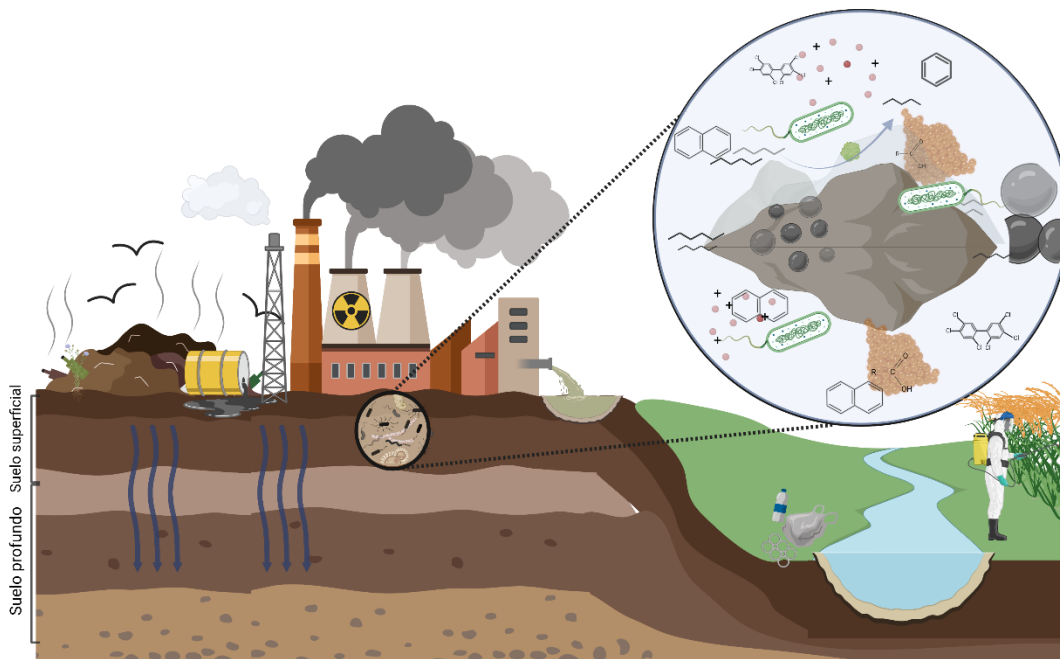
Conocer el repertorio metabólico de las bacterias que se desean utilizar en procesos de biorremediación se ha vuelto imperativo para asegurar la efectividad del proceso de descontaminación (Head, 1998), la constante exposición de las bacterias a contaminantes ambientales aumenta su potencial de tolerancia y en algunos casos capacidad de degradación (Dopson et al., 2014), así es como el estudio funcional y molecular de aislados ambientales se vuelve una opción altamente recomendable para la obtención de cepas tolerantes y/o degradadoras de contaminantes útiles para procesos de biorremediación (Orellana et al., 2018). En Chile, durante los últimos 15 años se han aislado diferentes especies bacterianas nativas desde suelos y sedimentos marinos afectados por contaminación de HC, principalmente en la región de Valparaíso, Magallanes y Antofagasta (Fuentes et al., 2015; Méndez et al., 2017; Zadjelovic et al., 2020). Algunos de estos estudios han caracterizado el comportamiento de cepas aisladas de suelos contaminados con HC como *Stutzerimonas* sp. cepas DN34 y DN36, y *Acinetobacter* sp. cepas AF53 y AA64 las cuales han reportado crecimiento en *n*-octano, ciclohexano y *n*-hexadecano como única fuente de carbono (Fuentes, 2014). Incluso se han realizado ensayos a



nivel de microcosmos utilizando las cepas mencionadas como consorcio degradador alcanzando hasta un 60% de remoción de diésel en suelo (Fuentes, 2014). Desde el estuario de Aconcagua una zona altamente contaminada con metales pesados se han aislado cepas de los géneros *Sphingomonas*, *Stenotrophomonas* y *Arthrobacter* (Altimira et al., 2012), en este mismo sitio se han aislado cepas pertenecientes a los géneros *Stutzerimonas* y *Acinetobacter*, que presentan alta tolerancia a metales como cobre, plomo y cadmio, además de ser cepas hidrocarbonoclasticas (Méndez et al., 2017). El estudio a profundidad de estas bacterias ha permitido su identificación y posterior secuenciación, teniendo así disponible el genoma completo de la cepa *Acinetobacter radioresistans* DD78 (Macaya et al., 2019b).

### Monitoreo del proceso de biorremediación en suelo

Monitorear el proceso de biorremediación puede ser una tarea compleja, ya que como hemos mencionado, no solo se ve involucrada la comunidad bacteriana, sino que también es importante considerar las interacciones de los contaminantes con el suelo y la interacción de las mismas bacterias con esos contaminante en el suelo (Chikere et al., 2011) (**Figura 5**).



**Figura 5 | Interacción bacterias, contaminantes y componentes del suelo**

La concentración total del contaminante en el suelo, es una medida directa de la tasa de remoción, para esto se han empleado diferentes métodos que estiman la concentración de contaminantes como los HC, en general encontramos técnicas como cromatografía de gases, cromatografía líquida de alta resolución, análisis de aceite y grasas, gravimetría, entre otros (Singh and Ward, 2004), estos métodos nos permiten cuantificar por ejemplo la concentración total de HC presentes en el suelo (TPH).

Otro importante factor en el proceso de biorremediación tiene relación con la comunidad microbiana y sus interacciones, el seguimiento de las bacterias hidrocarbonoclasticas se ha

llevado a cabo por diferentes técnicas, dentro de ellas, número más probable o recuento de unidad formadoras de colonias, análisis de ácidos grasos fosfolípidicos, 16S ADNr y otras técnicas basadas en ácidos nucleicos (Chikere et al., 2011). Se pueden agrupar estas técnicas de seguimiento en dos grandes grupos i) caracterización fenotípica, la cual es cultivo dependiente y ii) monitoreo molecular. Las técnicas fenotípicas, se han basado principalmente en el cultivo de especies hidrocarbonoclasticas mediante el enriquecimiento de cultivos. Existen estudios en los cuales se han usado medios minerales como Bushnell Hass (BH) con agar para la numeración y aislamiento de bacterias degradadoras de HC (Evans et al., 2004; Rodríguez-Castro et al., 2022). Sin embargo, estas técnicas no suelen ser útiles por si solas, dado que se ha estimado que menos de 1% de los aislados ambientales son cultivables, de este modo se sugiere que los resultados fenotípicos sean confirmados utilizando técnicas cultivo independientes. Es así como técnicas emergentes de ecología microbiana molecular toman lugar y se vuelven útiles en el proceso de biorremediación (Brons and van Elsas, 2008; Kloos et al., 2006). Dentro de las técnicas de monitoreo molecular para la comunidad microbiana encontramos: PCR, con seguimientos por 16S ADNr y 16S – 23S (ITS), hibridación fluorescente *in situ* y otras. A pesar de contar con numerosas técnicas que caracterizan la comunidad bacteriana, el poder estimar la diversidad ambiental presente en el suelo ha sido desafiante. Se estima que tan solo 1 g de suelo posee más de 1000 especies bacterianas diferentes (Chikere et al., 2011), de este modo la era metagenómica ha permitido una mejor comprensión del potencial genómico de las comunidades bacterianas ambientales. En general la amplificación de genes de 16S y la construcción de librerías, han sido seguidas por el monitoreo de genes específicos, y luego análisis filogenéticos (Chikere et al., 2011; Rajendhran and Gunasekaran, 2011).

La exposición a compuestos de origen antropogénico y la aparición de nuevas condiciones ambientales promueve la creación de nuevos nichos ecológicos, los cuales solo pueden ser colonizados por organismos con un resistoma que lo permita (Honorato Ricardo, 1994; Rivera-Mendoza et al., 2020; Toro et al., 2005). El estudio de los determinantes genéticos que comandan los procesos de respuesta y adaptación, nos permite entender los cambios estructurales de una comunidad bacteria o un género particular (Kumar and Khanna, 2010). La disponibilidad técnica y económica de nuevos métodos como el PCR, en sus diversas formas, han permitido el seguimiento de genes de degradación como *alkB* en muestras de suelo, identificando diferentes homólogos (Kloos et al., 2006), también otras dioxigenasas han sido cuantificadas en tiempo real en muestras de suelo contaminado con HC, obteniendo valores cercanos a  $10^2$ - $10^3$  copias/g suelo (Mesarch et al., 2000). La medición del número de copias de genes funcionales por qPCR ha sido utilizada en numerosos estudios (Maphosa et al., 2010; Mesarch et al., 2000; Shahi et al., 2016). Por otro lado, el seguimiento de genes de respuesta a metales en procesos de biorremediación es un campo menos explotado; sin embargo, existen algunas experiencias que dan cuenta de la cuantificación exitosa de estos genes. Un estudio realizado en 2020, cuantificó exitosamente el gen *merG* de respuesta a mercurio por qPCR desde suelos agrícolas, éste se encontraba codificado en un plásmido de *Cupriavidus metallidurans* MSR33 e interesantemente este estudio demostró la transferencia horizontal de este elemento, al encontrar copias de *merG* en parte de la comunidad nativa del suelo analizado (Bravo et al., 2020), también se han realizado estudios de los genes *cop* y la diversidad microbiana asociada a un suelo contaminado con cobre (Altimira et al., 2012). Como se puede apreciar el desarrollo de nuevas tecnologías de

secuenciación masiva, PCR y el avance de las ómicas, ha permitido el levantamiento de una gran cantidad de información valiosa para la genómica ambiental (Gupta et al., 2020)

La validez de los resultados que se desprenden de las técnicas basadas en genómica y metagenómica, se encuentra supeditada a la obtención de datos representativos de la comunidad bacteriana completa, por lo cual no tan solo dependen de la especificidad de las detecciones y de la efectividad de la extracción de material genético del suelo, sino también de referentes de comparación, es decir, grandes volúmenes de información disponible a partir de muestras ambientales (Malik et al., 2022). Es en este sentido que la recopilación de genes bacterianos de respuesta a contaminantes como HC y metales, se vuelve un tópico de gran importancia y con alto potencial biotecnológico. El acceso a bases de datos robustas y actualizadas de genes de respuesta permiten el estudio de manera más expedita de los resistomas bacterianos. Se pueden encontrar genes de degradación de HC en bases de datos como EAWAG y RHObase las cuales recopilan genes pertenecientes a rutas metabólicas y enzimas de degradación de HC (Chakraborty et al., 2014; Gao et al., 2010). Por otro lado, BacMet es una base de datos que recopila genes de resistencia a biocidas antibacterianos y metales pesados (Pal et al., 2014). La aparición de base de datos especializadas es concomitante con el creciente avance de las tecnologías de secuenciación y análisis bioinformático (Gilbert, 2004)

### **Contaminación en Chile: Sitio Las Salinas**

Uno de los tantos casos de contaminación urbana crónica que aquejan a nuestro país, es el caso “Las Salinas”, terreno emplazado en la región de Valparaíso, que cuenta con porciones de terreno co-contaminadas con HC y metales pesados (**Tabla 2**), producto de actividades petroleras y petroquímicas que tuvieron lugar en el terreno durante los años 1919-2003. Este terreno ha sido sometido a diversos procesos de evaluación ambiental, en el año 2004 se ingresó al Ministerio del Medio Ambiente (MMA) el proyecto “Recuperación del terreno Las Salinas” siendo aprobado y obteniéndose la Resolución de Calificación Ambiental (RCA) N°203/2004, luego en el año 2018 se ingresó el proyecto “Saneamiento del terreno Las Salinas”, en este último se propone una estrategia de remediación del terreno mediante herramientas biológicas para responder a la alta contaminación por HC en el sitio. A partir de este último proyecto se han realizado algunos monitoreos y tomas de muestras, que han permitido aislar cepas con potencial hidrocarbonoclástico como *Rhodococcus* sp. ICB2 (Cumsille, Orellana, Seeger, (2020). LabMMBA No publicado).

La línea base presentada en el estudio de impacto ambiental RCA 203/2004 (Anexo, Capítulo 3) se reporta que para HC Totales (TPH) el sitio presenta una contaminación superficial de suelo de 5000 mg/kg aproximadamente y a mayor profundidad estos valores son aún mayores alcanzando una concentración de 23000 mg/kg. Los HC presentes corresponden a moléculas de cadena media (87%), cadena larga (9%) y cadena corta (4%). Con respecto a la contaminación por metales pesados, se presentan excedencias con respecto a la normativa plomo y zinc, con una excedencia cercana al 3% y para metales como cobre, mercurio, cromo VI y vanadio, la excedencia fue cercana al 1% (SEIA, 2018).

El sitio Las Salinas es uno de los 3300 sitios contaminados en Chile (Rivas, 2021), este lugar tiene un alto valor inmobiliario pues se ubica en la costa en una de las ciudades turísticas más importantes de Chile (S.A.P, 2016), la recuperación de este terreno se ha vuelto una actividad de gran importancia para sus propietarios, pero además, este proyecto se posiciona como uno de los primeros procesos de biorremediación a gran escala, regulado y aprobado mediante un estudio de impacto ambiental en una zona urbana en Chile.

Tabla 2 | Concentraciones de HC y metales detectados en el sitio Las Salinas y sus alrededores.

| Grupo      | Compuesto               | Suelo superficial del sitio  |                      | Suelo superficial del sitio y alrededores |                      |
|------------|-------------------------|------------------------------|----------------------|---|----------------------|
|            |                         | Máxima concentración (mg/kg) | N° muestra analizada | Máxima concentración (mg/kg)              | N° muestra analizada |
| BTEX       | Benceno                 | <0,2                         | 88                   | 2   | 609                  |
|            | Etilbenceno             | <0,1                         | 88                   | 190                                       | 609                  |
|            | Tolueno                 | <0,2                         | 88                   | 63  | 609                  |
|            | Xileno total            | <0,2                         | 88                   | 1.400                                     | 609                  |
| PAH        | Antraceno               | <0,5                         | 88                   | 0,52                                      | 609                  |
|            | Benzo(a)antraceno       | <0,5                         | 88                   | 1,6                                       | 609                  |
|            | Benzo(k)fluoranteno     | 0,4                          | 88                   | 1,1                                       | 609                  |
|            | Benzo(a)pireno          | 0,99                         | 88                   | 1,8                                       | 609                  |
|            | Benzo(g,h,i)perileno    | 0,98                         | 88                   | 1,3                                       | 609                  |
|            | Criseno                 | 1,36                         | 88                   | 1,9                                       | 609                  |
|            | Fluoranteno             | 1,85                         | 88                   | 3,4                                       | 609                  |
|            | Indeno (1,2,3-cd)pireno | 0,24                         | 88                   | 1   | 609                  |
|            | Naftaleno               | <0,5                         | 88                   | 100                                       | 609                  |
| Fenantreno | 0,66                    | 88                           | 15                   | 609                                       |                      |
| TPH        | TPH GRO                 | 1.130                        | 88                   | 8.000                                     | 609                  |
|            | TPPH DRO+ORO            |                              | 88                   | 23.980                                    | 609                  |
| METALES    | Bario                   | 185                          | 88                   | 410                                       | 609                  |
|            | Cromo III               | 83,5                         | 88                   | 320                                       | 609                  |
|            | Cromo VI                | 2,87                         | 88                   | 32  | 609                  |
|            | Cobre                   | 1406                         | 88                   | 650                                       | 609                  |
|            | Plomo                   | 203                          | 88                   | 1.200                                     | 609                  |
|            | Mercurio                | 1,155                        | 88                   | 0,49                                      | 609                  |
|            | Níquel                  | 17                           | 88                   | 140                                       | 609                  |
|            | Vanadio                 | 90,5                         | 88                   | 250                                       | 609                  |
| Zinc       | 181,75                  | 88                           | 96                   | 609                                       |                      |
| PCB        | PCB total               | 0,43                         | 88                   | 0,26                                      | 458                  |

\*Adaptado del Anexo, Línea Base, Capítulo 3.5.6.3 Estudio de Impacto Ambiental Saneamiento Terreno Las Salinas, RCA N°203/2004 (SEIA, 2018).

### Motivación de estudio

El uso responsable de los suelos se ha vuelto cada día más importante, también es de conocimiento mundial que el ritmo de crecimiento actual proyecta una pérdida irrecuperable de los recursos naturales, es así como la recuperación del suelo, recurso finito, depende de la activa preocupación que como sociedad le otorguemos. Esta tesis abordó desde la realidad en Chile la problemática de contaminación ambiental del suelo, con la intención de ser un aporte para la implementación de tecnologías de biorremediación en suelos contaminados por HC y metales pesados, para esto se realizó la caracterización *in silico* y funcional de un consorcio bacteriano para su uso en la biorremediación del suelo del sitio Las Salinas, Viña del Mar, Chile, a escala piloto.

## Hipótesis

1. La identificación *in silico* de genes de respuesta a metales pesados en bacterias de los géneros *Acinetobacter*, *Stutzerimonas* y *Rhodococcus* permite predecir su nivel de tolerancia a metales pesados
2. El consorcio bacteriano hidrocarbonoclástico conformado por *Acinetobacter* sp. AA64, *Acinetobacter radioresistens* DD78, *Stutzerimonas* sp. DN36 y *Rhodococcus* sp. ICBD2 es capaz de biorremediar en escala piloto hidrocarburos alifáticos en suelos co-contaminados con cobre

## Objetivo general

Caracterizar en forma bioinformática y funcional la tolerancia a metales pesados y crecimiento en HC alifáticos de cepas bacterianas de *Stutzerimonas*, *Rhodococcus* y *Acinetobacter* y su aplicación en la biorremediación de suelos co-contaminados con metales pesados e hidrocarburos del petróleo en escala piloto

### Objetivos específicos

**Objetivo específico 1:** Identificar y caracterizar *in silico* los genes de resistencia/tolerancia a metales pesados y genes de degradación de HC de bacterias nativas de suelo de los géneros *Stutzerimonas*, *Rhodococcus* y *Acinetobacter*

**Objetivo específico 2:** Determinar la resistencia/tolerancia a metales pesados y el crecimiento en HC alifáticos de bacterias nativas de suelo de los géneros *Stutzerimonas*, *Rhodococcus* y *Acinetobacter*

**Objetivo específico 3:** Evaluar la degradación de HC alifáticos por un consorcio bacteriano en suelo co-contaminado con cobre

**Objetivo específico 4:** Cuantificar en suelo co-contaminado el número de copias de genes de resistencia a cobre y genes de degradación de HC alifáticos del consorcio bacteriano

## Materiales y métodos

### Materiales

HC alifáticos, *n*-hexano, *n*-octano, *n*-dodecano, *n*-hexadecano, ciclohexano (Sigma Aldrich, USA), estándares analíticos con un 98,5% de pureza. También se utilizó diésel comercial filtrado.

Para la determinación de la concentración mínima inhibitoria se utilizaron soluciones stock 1 M y 100 mM de CdCl<sub>2</sub>, CuSO<sub>4</sub> × 5H<sub>2</sub>O, K<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub>, HgCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O, NiSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O, ZnSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O, AgNO<sub>3</sub>, CoCl<sub>2</sub> × 6H<sub>2</sub>O, Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (Merck, Alemania). También se utilizó una solución de NaCl 0,85% v/v.

### Cepas bacterianas

Se utilizaron las cepas bacterianas *Acinetobacter* sp. AA64, *Acinetobacter radioresistens* DD78, *Stutzerimonas* sp. DN36, *Stutzerimonas* sp. DN34, *Achromobacter* sp. B7, *Acinetobacter* sp. AF53 que fueron aisladas previamente del estuario de Aconcagua (Región de Valparaíso, 32°55'S, 71°29'W) (Fuentes et al., 2015; Macaya et al., 2019b; Méndez et al., 2017, 2018). Las bacterias se almacenaron a -20°C en 50% v/v glicerol + TSB. La cepa *Rhodococcus* sp. ICBD2 fue aislada desde el sitio Las Salinas (Viña del Mar, Región de Valparaíso, 33°00'03.8"S, 71°32'49.0"), en estudios previos (Cumsille, Orellana, Seeger, Resultados no publicados). Las cepas pertenecen a la colección del Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología Ambiental (LabMMBA) y sus genomas se encuentran secuenciados (Tabla 3), (Anexo 1). La cepa *Escherichia coli* DH5α fue utilizada como control de ensayos de CIM de metales, y para el clonamiento de los genes de tolerancia/resistencia de metales (LabMMBA, Chile).

Tabla 3| Cepas hidrocarbonoclasticas pertenecientes a la colección LabMMBA.

| AISLADO | LUGAR                  | CEPAS                                    | TAMAÑO GENOMA (Mpb) |
|---------|------------------------|--|---------------------|
| Suelo   | Estuario Río Aconcagua | <i>Stutzerimonas</i> sp. DN36            | 4,3                 |
| Suelo   | Estuario Río Aconcagua | <i>Stutzerimonas</i> sp. DN34            | 4,3                 |
| Suelo   | Estuario Río Aconcagua | <i>Acinetobacter radioresistens</i> DD78 | 3,2                 |
| Suelo   | Estuario Río Aconcagua | <i>Acinetobacter tandoii</i> AA64        | 3,9                 |
| Suelo   | Estuario Río Aconcagua | <i>Acinetobacter</i> sp. AF53            | 3,7                 |
| Suelo   | Estuario Río Aconcagua | <i>Achromobacter</i> sp. B7              | 6,2                 |
| Suelo   | Sitio Las Salinas      | <i>Rhodococcus</i> sp. ICBD2             | 6,35                |

\*Se presenta la matriz de la cual fueron aisladas las cepas y el lugar al cual pertenecen, su identificación taxonómica y el tamaño del genoma.

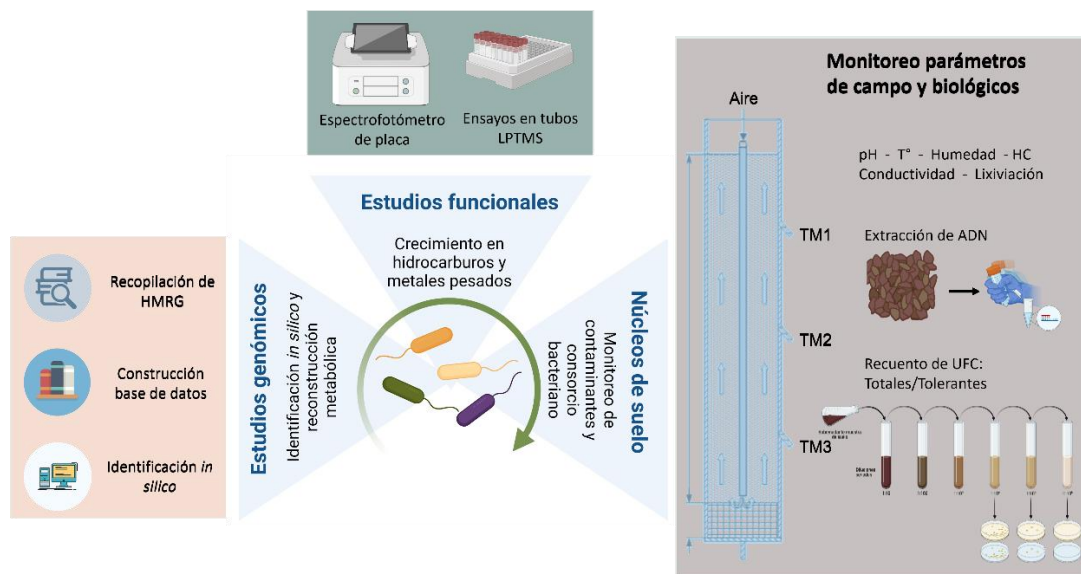
## Medios y condiciones de cultivo

El cultivo de las cepas del consorcio se realizó en medio rico Agar Triptona de Soja (TSA). Su crecimiento fue realizado en la solución mineral tampón Tris baja en fosfato (LPTMS) la cual contiene Tris 6,06 g/L, NaCl 4,68 g/L, NH<sub>4</sub>Cl 1,07 g/L, KCl 1,49 g/L, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> × 10 H<sub>2</sub>O 0,98 g/L, MgCl<sub>2</sub> × 6H<sub>2</sub>O 0,2 g/L, CaCl<sub>2</sub> × 2 H<sub>2</sub>O 0,003 g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,085 g/L, citrato de amonio férrico (C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>FeNO<sub>7</sub>) 0,005 g/L, succinato 20 mM, y solución traza SL7 0,005 g/L. También fueron cultivadas en Medio no convencional (MNC), que contiene harina de garbanzo 5 g/L, azúcar de mesa 5 g/L, aceite de cocina 1 % v/v y acetato de sodio 4 g/L. Se utilizó LPTMS con agar 50% para cultivar las cepas en medio sólido.

Para el recuento de cepas tolerantes a diésel se utilizaron placas del medio mineral BHB, el cual contiene MgSO<sub>4</sub> 0,20 g/L, CaCl<sub>2</sub> 0,02 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,00 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,00 g/L, nitrato de amonio 1,00 g/L, FeCl<sub>2</sub> 0,05 g/L y agar 20,00 g/L. El crecimiento de la cepa *E. coli* DH5α se hizo en medio de cultivo Luria- Bertani (LB) que contiene 10 g/L de triptona, 5 g/L de extracto de levadura y 10 g/L de NaCl, se añadió además 3,5 g/L de agar para el cultivo en medio sólido. Para los clones transformados de está cepa se trabajó con medio LB con ampicilina (LB/Amp) a una concentración de 125 mg/L debido al marcador de selección del plásmido utilizado. La preparación de *E. coli* DH5α competente utilizó el caldo súper óptimo con represión catabólica (SOC), compuesto por 0,5% de extracto de levadura, 2% de triptona, 10 mM de NaCl, 3,5 mM KCL, 10 mM MgCl<sub>2</sub> × 6H<sub>2</sub>O, 10 mM MgSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O y 20 mM de glucosa. Se utilizó también una solución de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M a 4°C.

## Estudios genómicos

Para la caracterización bioinformática del cepario LabMMBA, se preformaron estudios genómicos (**Figura 6**) que contemplaron la identificación de genes de resistencia/tolerancia a diferentes entidades metálicas.



**Figura 6 | Estrategias metodológicas empleadas para la caracterización bacteriana.** Se presentan las tres dimensiones abordadas: estudios genómicos, estudios funcionales y núcleos de suelo. En cada uno de los cuadros explicativos (rosado, verde y gris) se insertaron las metodologías que responden a cada dimensión.

### Identificación *in silico* de genes de resistencia y tolerancia a metales pesados

La recopilación de genes de resistencia y tolerancia a metales pesados se realizó una búsqueda extensiva en literatura primaria y bases de datos especializadas, como Bacmet (Pal et al., 2014), NCBI (Clark et al., 2016), Google Scholar, Pubmed, Swissprot/Uniprot y MetaCyC (Caspi et al., 2007) para recopilar genes relacionados con la tolerancia y/o resistencia a metales. Se buscaron publicaciones que contuvieran las palabras claves: “*bacteria*”, “*metal resistance*”, “*heavy metal gene*”, “*metal tolerance*”, desde las publicaciones se extrajeron genes de resistencia y/o tolerancia y se complementó esta información con metadata como la localización genómica, organismos y mecanismos general de resistencia asociadas a cada gen. Esta información se consolidó en una base de datos nombrada como HMR\_gen.

El análisis de mejor *hit* bidireccional se realizó a través de la herramienta de identificación BLAST, se realizó un análisis de mejor *hit* bidireccional (BBH), para esto se utilizaron como consulta los genes dispuestos en HMR\_gen y como base de datos los genomas de las cepas de interés. Se filtraron los resultados obtenidos definiendo parámetros de cobertura  $\geq 70\%$  e identidad  $\geq 40\%$ , con un código script (Saona Urmeneta, V. (2021), Memoria Ingeniería Civil Informática. UTFSM)

La anotación manual de genes y análisis del contexto genómico se realizó la curación manual de los resultados obtenidos en el Análisis de mejor *hit* bidireccional, para esto se extrajeron las secuencias nucleotídicas de los genes identificados desde el genoma anotado DFAST (Tanizawa et al., 2018) (versión 1.2.13) de cada una de las cepas. Se realizó un alineamiento local por BLAST (Altschul, et al., 1990) (consultado online, marzo 2022) verificando la identidad de los genes y su correspondencia. Luego de corroborar su anotación se evaluó el contexto genómico de cada uno de los genes identificados de manera manual utilizando un visualizador de texto las secuencias codificantes (cds) río arriba y río abajo considerando +/- cds, estas se utilizaron en anotación formato *genbank* (*gbk extention*).

### Estudios funcionales

Los estudios funcionales (**Figura 6**) que se llevaron a cabo para la caracterización bacteriana, consideraron la i) determinación de la concentración mínima inhibitoria frente a diversos metales y ii) crecimiento bacteriano en diferentes HC alifáticos.

#### Determinación de concentración mínima inhibitoria

La determinación de concentración mínima inhibitoria de metales en las cepas bacterianas se realizó sembrando las cepas bacterianas en placas de TSA y se incubaron a 30°C durante 12-16 h. Luego, se inocularon 5 mL de LPTMS suplementado con succinato 20 mM para cada una de las cepas de manera independiente y se dejó en agitación a 120 RPM por 18 h a 30°C. El inóculo se ajustó a una densidad óptima medida a 600 nm de 0,2. A partir de las soluciones madres de metales se prepararon diluciones seriadas a una concentración final 2X (**Tabla 4**).



Tabla 4 | Soluciones metálicas y su uso para la determinación CIM.

| Forma metálica iónica | Compuesto                             | Tiempo (h) | Número de replicas | Concentración mínima (mM) | Concentración máxima (mM) |
|-----------------------|---------------------------------------|------------|--------------------|---------------------------|---------------------------|
| Cd <sup>+2</sup>      | CdCl <sub>2</sub>                     | 38-71      | 2                  | 0,002                     | 4,2                       |
| Cu <sup>+2</sup>      | CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O | 38-71      | 2                  | 1,24                      | 22                        |
| Cr <sup>+6</sup>      | K <sub>2</sub> CrO <sub>4</sub>       | 71         | 2                  | 0,1                       | 5                         |
| Hg <sup>+2</sup>      | HgCl <sub>2</sub>                     | 71         | 2                  | 0,1                       | 5                         |
| Mg <sup>+2</sup>      | MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O | 71         | 2                  | 1                         | 20                        |
| Ni <sup>+2</sup>      | NiSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O | 71         | 2                  | 0,5                       | 12                        |
| Zn <sup>+2</sup>      | ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O | 54         | 2                  | 1                         | 20                        |
| Ag <sup>+1</sup>      | AgNO <sub>3</sub>                     | 71         | 2                  | 0,001                     | 20                        |
| Co <sup>+2</sup>      | CoCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O | 50         | 2                  | 0,006                     | 10                        |
| Pb <sup>+2</sup>      | Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>     | 70         | 2                  | 0,005                     | 1                         |

\* Se presenta la forma metálica de cada uno de los metales analizados y su origen químico (compuesto), la cantidad de horas de duración del experimento y el número de réplicas biológicas, aparte de mostrar el rango de concentraciones mínimas y máximas utilizadas.

En cada pocillo de una microplaca de 96 se incorporaron 100 µL de inóculo y 100 µL de la dilución correspondiente de solución metálica, diluyendo así cada una de las soluciones a la mitad, se aseguró la homogeneización en cada uno de los pocillos y un blanco analítico de cada una de las concentraciones. Fue considerado además un control negativo, sin adición de inóculo. Luego se midió la OD 600 nm en el lector de placa cada 15 minutos de agitación (155 RPM) y lectura a 30°C, por 48 h y 75 h. Ésta experiencia se realizó en duplicado y con una réplica biológica, para todas las soluciones metálicas. Para el metal seleccionado CuSO<sub>4</sub> se repitió la experiencia en duplicado y con 3 réplicas biológicas.

El crecimiento de las cepas bacterianas en diferentes concentraciones de cobre se realizó sembrando las cepas bacterianas en placas de TSA de manera independiente y se incubaron a 30°C durante 12-16 h. Se inoculó cada una de las cepas en 5 mL de LPTMS suplementado con succinato 20 mM y a diferentes concentraciones de CuSO<sub>4</sub> y se mantuvieron en agitación a 120 RPM por 18 h a 30°C, para luego medir su turbidez a 600 nm, esto se realizó a partir de una réplica biológica y en duplicado.

Por otro lado, la caracterización de la respuesta del consorcio bacteriano en cobre se realizó sembrando de manera independiente las cepas bacterianas *Acinetobacter* sp. AA64, *Acinetobacter radioresistens* DD78, *Stutzerimonas* sp. DN36 y *Rhodococcus* sp. ICB2 en medio rico sólido TSA durante 12-18 h a 30°C. Luego fueron resuspendidas en NaCl 0,85%, se midió la OD a 600 nm y se ajustó a 0,1 para cada una de las cepas. Se añadieron partes iguales de cada uno de los preinóculos y se inocularon en 1% v/v en 3 mL de medio de cultivo LPTMS suplementado con succinato 20 mM, para tres concentraciones diferentes de CuSO<sub>4</sub> 5 mM, 10

mM y 15 mM. Se midió OD a 600 nm luego de 48 h, esto se realizó a partir de una muestra biológica en duplicado.

El crecimiento de las cepas bacterianas en medio sólido en presencia de cobre se realizó con la siembra de manera independiente las cepas bacterianas en placas de LPTMS suplementado con 2 mM CuSO<sub>4</sub> y se incubaron durante 12-18 h a 30°C. Transcurrido el tiempo se evaluó de forma cualitativa el crecimiento de las cepas en el medio. Esto se realizó dos veces a partir de diferentes muestras biológicas.

#### **Crecimiento de cepas bacterianas en HC alifáticos de cadena media**

El crecimiento de las cepas bacterianas se realizó en placas de TSA, las cuales fueron sembradas y se incubaron durante la noche a 30°C para luego, tomar una colonia e inocularla en LPTMS suplementado con acetato 20 mM. Se dejaron crecer por 18 h a 30°C con agitación constante 110 RPM. Se midió la OD a 600 nm y fue ajustada a 0,4.

#### *Medio sólido*

Se sembraron en césped 20 µL de inóculo en placas LPTMS-Agar, se dispuso sobre un trozo de papel filtro estéril en la cara inferior de la placa el hidrocarburo alifático a una concentración de 20 mM, se tuvo la precaución de sellar rápidamente la placa con Parafilm y cinta de papel para evitar la volatilización.

Se incluyeron como control positivo una placa LPTMS-Agar suplementada con acetato 20 mM y una placa de LPTMS-Agar suplementada con succinato 20 mM. Como control negativo se agregó una placa LPTMS-Agar sin ninguna fuente de carbono. Se observó el crecimiento bacteriano y fue categorizado de manera cualitativa, para esto se utilizó una pantalla de iluminación, se definió una escala de crecimiento de 3 a 1, siendo 3 alto crecimiento y 1 pobre crecimiento, de este modo placas con más de la mitad de su superficie con crecimiento fueron catalogadas con un 3 (alto crecimiento). Se mantuvo la incubación de las placas por 14 días. Se realizó con 2 réplicas técnicas y 2 réplicas biológicas.

#### *Medio líquido*

En tubos de ensayo de 30 mL con tapas de PTFE/ (teflón) para evitar la volatilización del HC, se dispusieron 3 mL de medio de cultivo LPTMS con el hidrocarburo alifático correspondiente a una concentración final de 20 mM. Se agregó un 1% v/v de inóculo y se mantuvo en agitación constante a 140 rpm y 30°C durante 7 días, para finalmente medir la OD a 600 nm, como control positivo se utilizó el medio LPTMS suplementado con 20 mM acetato, también se utilizó como control negativo LPTMS sin fuente de carbono. Este ensayo se realizó en duplicado biológico y dos réplicas técnicas.

#### **Sobrevivencia a cobre del consorcio en suelo co-contaminado con diésel**

Se montaron 8 microcosmos, disponiendo 80 g de suelo esterilizado proveniente del sitio Las Salina en cada matraz Erlenmeyer de 200 mL con tapa de PTFE (teflón) para evitar la volatilización del HC. El suelo se sometió a 4 ciclos de esterilización por autoclave, con 12 h de secado en estufa estéril a 60°C entre cada uno de los ciclos, siendo el último ciclo de secado de

48 h. Se contaminó el suelo con un 1% v/v de diésel y con 5 mM, 15 mM y 30 mM de CuSO<sub>4</sub>. Luego se inoculó al 1% con el consorcio siguiendo la metodología para bioaumentación (página 37). Se mantuvieron a temperatura ambiente en un lugar oscuro por 144 h. Se midió la sobrevivencia del consorcio, mediante recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) en placas de TSA, incubadas por 24 h 30°C. Para esto se tomó un gramo de suelo y se llevó a un volumen de 15 mL con NaCl 0,85%, se agitó por 10 minutos a máxima revolución, en un agitador orbital y luego se tomó 1 mL de solución. Ésta se sometió a 6 diluciones seriadas, en base 10, las cuales fueron dispuestas en triplicado en una placa de TSA. Esta experiencia se realizó en duplicado por condición considerando además un control negativo sin cobre.

### **Núcleos de suelo**

Los ensayos de biorremediación a escala se realizaron en núcleos de suelo, en donde se monitorearon parámetros fisicoquímicos y biológicos (**Figura 6**). Dentro de los parámetros biológicos se hizo un seguimiento de la comunidad bacteriana cultivable y de marcadores moleculares.

Para realizar las mediciones se tomaron muestras desde los núcleos de suelo utilizando tanto las tomas de muestra superior (TM1) como inferior (TM3) de cada columna (**Figura 7B**) para monitorear en un perfil transversal los parámetros de estudio. Cada toma de muestra contó con herramientas independientes, con el fin de evitar contaminaciones. Previo a cada toma de muestra, se lixivió el núcleo de suelo completamente y se recuperó el sobrenadante en una fuente externa. Se midieron parámetros fisicoquímicos, biológicos y moleculares, la medición de temperatura, fue realizada todos los días por el tiempo que se operaron las columnas, la medición de parámetros como pH, conductividad y humedad se midieron todas las semanas de operación, una vez por semana y los parámetros biológicos y moleculares midieron cada dos semanas

### **Montaje núcleos de suelo**

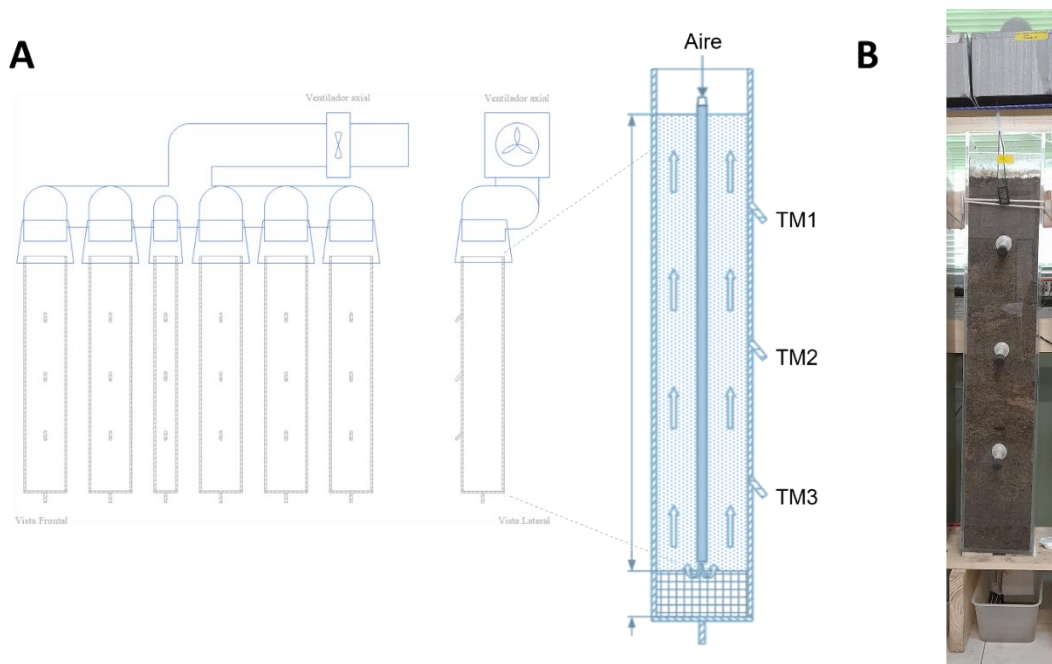
Para poder evaluar el comportamiento del consorcio en suelo contaminado real, se planificaron tres tratamientos utilizando suelo desde el sitio Las Salinas con historial de contaminación elevado. Los tres tratamientos evaluados consistieron en: control de tratamiento al cual se le asigno el código C1, suelo control; el segundo tratamiento corresponde a bioestimulación (enmienda orgánica 10% p/p) y bioaumentación (consorcio bacteriano: *Stutzerimonas* DN36, *Acinetobacter* sp. AA64, *A. radioresistens* DD78 y *Rhodococcus* sp. ICBD2) código C3; y el tercer tratamiento corresponde a bioestimulación, bioaumentación y contaminación con cobre denominado C5. Para evaluar de mejor manera el efecto de co-contaminación con un metal pesado, el núcleo C5 fue re-contaminado con cobre, para esto se preparó una solución hiperconcentrada 2 M de CuSO<sub>4</sub>, se incorporó 1 L de solución en el suelo mediante atomización, teniendo una concentración en suelo teórica de 17 mM.

Tabla 5 | Descripción tratamientos evaluados en núcleos de suelo

| Tratamiento  | Código |
|--|--------|
| Control  | C1     |
| Bioestimulación y Bioaumentación                               | C3     |
| Bioestimulación y bioaumentación con re-contaminación de cobre | C5     |

Los núcleos de suelo (**Figura 7B**) fueron rellenos con suelo extraído del sitio Las Salinas, Región de Valparaíso (33°00'03.8"S, 71°32'49.0") y se operaron por 8 semanas. Los tres tratamientos fueron sometidos a condiciones iguales de aireación, para asegurar la disponibilidad de aire al interior del núcleo.

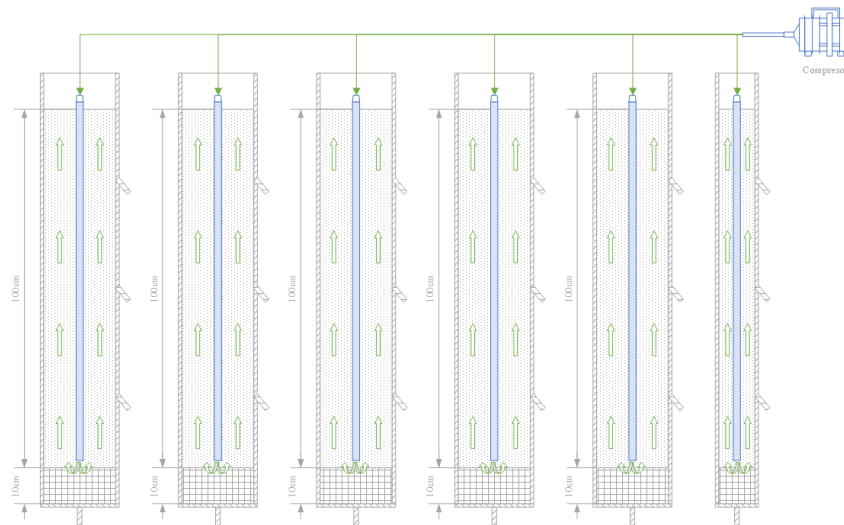
Se utilizaron tres columnas de acetato transparente de 20 cm de ancho, 20 cm profundidad y 120 cm de largo, las cuales poseen 3 tomas de muestras distribuidas en el perfil transversal. En la base se conecta mediante una manguera de 3 cm de diámetro un recipiente que almacena cualquier filtración líquida. En la porción inferior se dispuso 10 cm de grava y al interior de la columna se dispuso un conducto de PVC de 1 m de largo, así también a 1 m de profundidad se puso un termómetro de capilar, para censar la temperatura al interior del núcleo. Las columnas de acetato se montaron sobre una estructura de madera a 15 cm del piso, en un lugar seco y protegido de la luz solar. Todos los núcleos de suelo se distribuyeron equidistantes en la estructura de madera bajo un sistema de extracción.



**Figura 7| Esquema de representación del montaje de los núcleos de suelo.** A) Se presentan los núcleos de suelo montados con el sistema de extracción de aire y cada una de las tomas de muestra, en su vista frontal y axial (Macaya et al., 2022). B) Se presenta una fotografía del núcleo de suelo.

El sistema de aireación se montó gracias a una bomba de flujo con una capacidad de 200 L/min, la cual se conectó de manera equidistante para cada una de las columnas (**Figura 8**), mediante

manguera plásticas de 1,5 cm de diámetro se distribuyó el flujo de manera equitativa. Al interior de la columna se dispuso de manera transversal un tubo de PVC agujereado en su porción final, el cual actúa como fuente central de aireación.



**Figura 8 | Esquema del sistema de aireación utilizado en el montaje de los núcleos de suelo.** Se presentan el sistema de flujo de aire al interior de los núcleos, en líneas verdes se representa el sentido del flujo de aire, desde la porción inferior hacia la superior, en azul se encuentran los pilares de soporte y conducción de aire internos de cada núcleo. También se indica la presencia del compresor o bomba de flujo (Macaya et al., 2022).

Se ensambló un sistema de ventilación (**Figura 7A**), el cual constó de un cámara cubicular revestido con cinta impermeabilizante individual por columna en su porción superior, la estructura de extracción se conectó de manera hermética a una única salida alimentada por un ventilador fijo, asegurando así la correcta ventilación. Este sistema operó durante las tres semanas iniciales de la experiencia.

El suelo se recolectó desde el sitio Las Salinas, se almacenó por 5 días y luego se dispuso en las columnas. La porción inferior de cada columna se rellenó con 10 cm de grava, para luego disponer el suelo a tratar, además al llegar al centro de la columna se dejó un termómetro de capilar. El núcleo de suelo C1 se montó con 51,8 kg de suelo proveniente del sitio Las Salinas, el núcleo de suelo C3 se rellenó con 51,8 kg de suelo proveniente del sitio Las Salinas y 5,12 kg de enmienda orgánica (**Biofert, Armony Sustentable**). El núcleo de suelo C5 se rellenó con 46,7 Kg de suelo contaminado con HC del sitio Las Salinas, 5,12 kg de enmienda orgánica y se contaminó con 57,120 g de  $\text{CuSO}_4$ .

#### **Preparación del consorcio para la bioaumentación**

Las cepas pertenecientes al consorcio fueron cultivadas en medio no convencional de bajo costo, todas a 30°C con agitación constante. Cada cepa bacteriana posee tasas de crecimiento específicas en el medio no convencional (**Tabla 6**), por lo cual se realizaron cultivos diferenciados hasta alcanzar la fase exponencial media. El consorcio fue preparado al momento de inocular los núcleos, disponiendo partes iguales de las soluciones de crecimiento en medio no convencional en fase exponencial.

Tabla 6 | Tiempos de crecimiento específicos por cepa para bioaumentación.

| Cepas                                    | Tiempo de crecimiento en medio no convencional (h) a 30°C |
|--|---|
| <i>Acinetobacter radioresistens</i> DD78 | 12  |
| <i>Acinetobacter</i> sp. AA64            | 12  |
| <i>Stutzerimonas</i> sp. DN36            | 24  |
| <i>Rhodococcus</i> sp. ICBD2             | 36  |

### Medición de parámetros fisicoquímicos

#### pH y conductividad

La determinación de conductividad y pH se realizó una vez por semana. Para cada núcleo de suelo se tomaron 2 gr de muestra por cada toma de muestra. Se le añadió agua desionizada a la muestra siguiendo la proporción 1 [gr suelo] / 4,5 [mL de agua]. Se llevó a agitación por 5 min a 7,5 de potencia en agitador orbital. Se realizaron las mediciones de conductividad y pH con el equipo multiparámetro Edge ([Hanna instruments, USA](#)). Se realizó una renovación del equipo luego de 6 semanas transcurrida la experiencia.

#### Temperatura

El registro de la temperatura se realizó todos los días. La temperatura interna del núcleo se obtuvo a través de un termómetro capilar situado a 1 m de profundidad de cada núcleo. La temperatura ambiental se registró ubicando un capilar del mismo tipo cercano a las columnas.

#### Humedad y lixiviado

La medición de humedad se realizó una vez por semana en las tomas de muestras TM1 y TM3 de los núcleos de suelo. Se tomó 1 gr de muestra en TM1 y TM3 en triplicado, se dispuso en un pocillo de aluminio previamente pesado y se llevó a la estufa a 80°C durante un día, luego se pesó nuevamente. El traslado entre la estufa y la balanza se realizó en desecadora para evitar la rehidratación, utilizando pinzas y guantes, para evitar la transferencia de masa.

Para la determinación del porcentaje de humedad se aplicó (**Fórmula 1**)

$$\text{Humedad} [\%] = \frac{\text{Peso húmedo} - \text{Peso Seco}}{\text{Peso Seco}} * 100$$

Fórmula 1 | Porcentaje de humedad

### Concentración de HC

Se dispusieron 25 gr de suelo por cada una de las tomas de muestras (TM1 y TM3) para cada núcleo de. La determinación de HC en suelo fue externalizada a la empresa de servicios análisis químicos ALS (ALS Life Sciences Chile S. A, Chile). Se analizaron las fracciones de HC F2 (C<sub>10</sub>-C<sub>16</sub>) y F3 (C<sub>16</sub> y C<sub>34</sub>) utilizando la metodología de análisis químico “QWI-ORG-ANA-14 Emisión B mod. 3, Method for the, Canada-Wide Standard for petroleum Hydrocarbons in Soil-Tier 1 Method, Canadian Council of Ministers of the Environment 2001”. Los límites de cuantificación para este método corresponden a 21,44 mg/kg y 15,14 mg/kg para F2 y F3 respectivamente. Además, durante las primeras dos semanas se analizaron HC volátiles BTEX (benceno, tolueno, Etilbenceno, p/m-Xileno, o-Xileno, xilenos totales) bajo la metodología “QWI-ORG-ANA-04, Emisión B, mod. 3. US EPA SW-846. Test methods for Evaluation solid Waste Physically/Chemicals Methods. Versión 2, 1997. Adaptación método US EPA 8260B, 5035A. Cromatografía Gaseosa (CG-Masa) y sistema de purga y trampa”. Los límites de cuantificación para este método corresponden a 0,4 mg/kg.

### Análisis de datos: Degradación de HC

Posteriormente, los datos fueron modelados siguiendo un comportamiento semejante a la ecuación de Gompertz, pero modificada **Fórmula 2**:

$$TPH(t) = TPH_0 \left( 1 - \exp \left( -\exp \left( \frac{R_m e}{TPH_0} (\lambda - t) + 1 \right) \right) \right)$$

Fórmula 2 | Ecuación de Gompertz modificada

Donde  $TPH(t)$  [mg/kg] corresponde a la concentración de HC en el tiempo  $t$  [d],  $TPH_0$  [mg/kg] corresponde a la concentración inicial de HC,  $R_m$  [mg/ kg d] corresponde a la tasa máxima de degradación de HC y  $\lambda$  [d] es el tiempo inicial de latencia, que indica si existe un desfase desde que se monta el experimento hasta que se detecta una baja en las concentraciones de HC, a modo de aclimatación.

Para el cálculo del porcentaje de remoción de HC se consideraron los promedios de las concentraciones de las tomas superiores e inferiores de cada núcleo en la porción inicial del experimento.

### Macronutrientes

El análisis de los macronutrientes fue realizado por el Laboratorio de Análisis Químico e Instrumental del Departamento de Química de la Universidad Técnica Federico Santa María Valparaíso (UTFSM, Chile). Para la determinación de nitrógeno total, se utilizó el método de Kjeldahl, en cuanto al fósforo soluble, se determinó por extracción acuosa/básica y medición colorimétrica. Para los minerales potasio, calcio, magnesio, zinc, manganeso, hierro y cobre, se realizó el tratamiento de digestión con HNO<sub>3</sub>/HClO<sub>4</sub>/HF y su concentración se determinó por

absorción atómica, con el espectrómetro de absorción atómica Agilent 240AA (Agilent Technologies, USA). La toma de muestra se realizó al inicio y final del ensayo, considerando al menos un triplicado técnico por condición.

### **Densidad y porosidad del suelo**

Se determinó la densidad aparente del suelo siguiendo la relación de volumen de 30 g de suelo en una probeta de 10 mL, de este modo se obtuvieron las densidades aparentes del suelo control, suelo más enmienda orgánica y suelo más enmienda orgánica y cobre. Luego se dispusieron 100 mL de H<sub>2</sub>O en la probeta para calcular la porosidad (fracción de hueco o espacio poroso) en cada una de las condiciones de suelo, por diferencia de volumen. De este modo, se obtuvo el espacio intersticial total del suelo.

### **Monitoreo de la comunidad bacteriana cultivable**

Se realizaron mediciones de heterótrofos totales cultivables, tolerantes a HC y tolerantes a cobre e HC cada 15 días, registrando las unidades formadoras de colonias (UFC) por gr de suelo seco para cada uno de los tratamientos en duplicado. Para esto se dispusieron 5 g de suelo de los núcleos de suelo y se le adicionaron 45 mL de NaCl 0,85% p/v, luego se llevó con agitación por 30 min en agitador orbital y se realizaron diluciones seriadas 1:10. Para determinar heterótrofos totales y tolerantes a HC se sembraron las diluciones en medio rico TSA y medio mínimo BHA con diésel 1% v/v como única fuente de carbono. Para el caso de los microorganismos tolerantes a HC, las placas se sellaron con Parafilm y se colocaron dentro de bolsas plásticas selladas, con el fin de evitar la volatilización del diésel. Por otra parte, la determinación de los heterótrofos tolerantes al cobre y degradadores de HC, se sembraron las diluciones en medio mínimo LPTMS con 2 mM de cobre y 1% v/v de diésel. Se realizó el mismo procedimiento para los heterótrofos tolerantes en presencia de cobre, utilizando como fuente de carbono 20 mM de acetato. Las placas se incubaron a 30°C hasta la aparición de colonias, se realizó el recuento a las 24 y 48 h. A partir de la semana 2, se añadió cicloheximida 200 mg/L a las placas de heterótrofos totales para evitar el crecimiento de hongos y levaduras.

### **Seguimiento molecular de las cepas bacterianas**

#### **Extracción de material genético de suelo**

Se realizó la extracción de ADN de las muestras de suelo con el sistema comercial FastDNA Spin Kit for Soil (MP Biomedicals, USA). Se siguieron las instrucciones del fabricante; sin embargo, se realizaron modificaciones en el protocolo, utilizando 1 g de suelo y 2 ciclos de lisis mecánica por 40 s a 6,0 m/s. Se eluyó la muestra en 75 µl de DES y esta fue diluida 1:100, para aminorar las posibles interferencias de elementos propios del suelo en los análisis posteriores. Luego se cuantificó mediante el sistema comercial de fluorescencia Qubit dsDNA HS Assay (Invitrogen, USA) y se conservaron las muestras a -22°C hasta su posterior procesamiento.



## Extracción ADN genómico cepas

La extracción de ADN genómico para la cepa *Rhodococcus* sp. ICBD2, se realizó siguiendo una versión modificada del protocolo de Marmur (Salvà Serra et al., 2018). El ADN genómico de las cepas *Acinetobacter* sp. AA64, *Acinetobacter radioresistens* DD78, y *Stutzerimonas* sp. DN36, se realizó utilizando el sistema comercial Wizard Genomic DNA Purification (Promega, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se cuantificó mediante fluorescencia con el sistema comercial Qubit HS dsDNA Assay (Invitrogen, USA).

## Preparación de curva estándar de calibración

### Diseño de partidores

Se diseñaron los partidores de clonamiento y de qPCR utilizando el programa Geneious prime (versión. 2022.1.1, licencia gratuita, 2022). Se utilizaron las secuencias de los genes de interés para la construcción de los partidores de clonamiento, y para los casos en los cuales los partidores perdían especificidad se utilizaron segmentos intergénicos y parte de la secuencia del gen de interés. Los partidores se diseñaron con una temperatura de alineamiento similar, con 18-22 pb de largo. Los partidores de clonamiento determinan un amplicón de entre 1015-2185 pb (**Tabla 7**) y los amplicones de qPCR 50-200 pb (**Tabla 8**). Se diseñaron los partidores de modo que fueran específicos para la cepa definida dentro del consorcio, esto se corroboró al realizar una prueba *in silico* mediante Primer Blast (consultado online, marzo 2022) definiendo como base de datos personalizada un consenso de las secuencias genómicas de las cepas del consorcio. Para los partidores degenerados, se realizaron alineamientos múltiples y se seleccionaron las cepas con mayor porcentaje de consenso, permitiendo una degeneración de +/- 3 nucleótidos. Además, se utilizaron partidores de qPCR para los genes de degradación de HC *alkM*, *alkB* y *alkB2*, para las cepas DD78, DN36, AA64 y ICBD2 respectivamente (Macaya et al., 2022) (Dorochesi, (2022). Tesis doctoral. UFSTV. No publicado), estos alcanzan una especificidad taxonómica de género o especie dependiendo del partidador, y poseen sus propias curvas de calibración (Macaya et al., 2022).

**Tabla 7 | Partidores diseñados para el clonamiento de genes de respuesta a cobre de las cepas del consorcio hidrocarbonoclástico**

| Gen clonamiento           | Ubicación | Sentido | Amplicon (pb) | Sequence              |
|---------------------------|-----------|---------|---------------|-----------------------|
| acrD_ac_64_cloning        | 51        | F       | 1,510         | GGTCATTATGCTGGCGGGTA  |
| acrD_ac_64_cloning        | 1,561     | R       |               | AAACCAACGGAAGAAACGCG  |
| acrD_ps_cloning_inout     | 4,273     | R       | 1,656         | CGTGACGCGCAATCCCAAG   |
| acrD_ps_cloning_inoutgene | 2,617     | F       |               | GATCACACCCGGTGGAGCC   |
| actP_ps_ac_64_cloning     | 1,538     | R       | 1,282         | ACGATCGAATACAGGGCGTC  |
| actP_ps_ac_64_cloning     | 256       | F       |               | ACTGCCGATGCACATACACA  |
| copA_ac_64_cloning        | 1,725     | R       | 1,535         | AACTGTTTTCCCTGGTGGCA  |
| copA_ac_64_cloning        | 190       | F       |               | TGATGAGGCCGTTATCCGTG  |
| copA_ps_cloning           | 1,450     | R       | 1,016         | AGTCGCCATAGGTCAGGACT  |
| copA_ps_cloning           | 434       | F       |               | CAGGCCTACAAGAGCAGCTT  |
| copB_ps_cloning           | 132       | F       | 860           | TCAAGCCCCTGCATCTTCTG  |
| copB_ps_cloning           | 992       | R       |               | CAAAGCCTGATGCCAGCAAC  |
| copB_rh_cloning(2)        | 1,552     | R       | 1,407         | GAACACCGCGAGCGTGGAGTG |
| copB_rh_cloning(2)        | 145       | F       |               | CTGGTAATCGCAGTTCGGTT  |
| golT_ac_64_cloning        | 2,476     | R       | 2,396         | GCAAGGGGGGCTTTAAAACG  |
| golT_ac_64_cloning        | 80        | F       |               | GGCCGTGTGGAAAAAGCTTT  |
| golT_ps_cloning_b         | 1547      | F       | 1272          | GACGATCAGCGTGTGCATCT  |
| golT_ps_cloning_b         | 2819      | R       |               | CGGGCACGATTACCACTTCT  |

\*Ubicación y/o posición genómica en los genomas de las respectivas cepas bacterianas

**Tabla 8 | Partidores degenerados para la cuantificación de genes de respuesta a cobre**

| Gen     | Ubicación | Sentido | Amplicon (pb) | Secuencia               | Degeneración |
|---------|-----------|---------|---------------|-------------------------|--------------|
| acrD_ac | 503       | F       | 157           | CGTGTTCAGGTGTGGGYGA     | 2            |
| acrD_ac | 660       | R       |               | CCTAACTGACCMACTGCCAC    | 2            |
| acrD_ps | 1,043     | R       | 71            | ATGGCCTCGAACAGAGTGTG    |              |
| acrD_ps | 972       | F       |               | CTATCCGTACGACACCTCGC    |              |
| actP    | 464       | F       | 196           | CGCTTCTGGTGGACMCTGCC    | 2            |
| actP    | 660       | R       |               | CCACATGTTCCGGGCTGCGMT   | 2            |
| copA_ac | 639       | F       | 145           | MWATGTGGAATCAGATGCGK    | 8            |
| copA_ac | 784       | R       |               | WGCATTMAYAAAACGWAGGCG   | 16           |
| copA_ps | 974       | F       | 146           | CCGAGGAGGCTTACACGATC    |              |
| copA_ps | 1,120     | R       |               | GATCCATCCCCATGTCGTCC    |              |
| copB_ps | 829       | F       | 125           | GCAAATACAGAGGTGGGGCT    |              |
| copB_ps | 954       | R       |               | GTCTTCGCCCTCATCTCTCG    |              |
| copB_rh | 192       | F       | 122           | TCTGGTCGGGTACACATTGC    |              |
| copB_rh | 314       | R       |               | GAACGTATTTCCGGCGACAGC   |              |
| golT_ac | 649       | F       | 69            | MATWTTTCCAGGCCGACG      | 4            |
| golT_ac | 718       | R       |               | ATTCATGTCTGGTGCYAARCGGA | 4            |
| golT_ps | 360       | F       | 158           | GATCCCCGAAGTGGAGGAAC    |              |
| golT_ps | 518       | R       |               | AGCAGTTCACCCAGTTCTG     |              |

\*Ubicación y/o posición genómica en los genomas de las respectivas cepas bacterianas

Se resuspendieron los partidores de clonamiento en el volumen indicado por el fabricante (IDT, USA) y se alicuotaron a una concentración de 10 nM.

### ***Temperatura óptima***

Se realizó un PCR en gradiente de temperatura para definir la temperatura óptima de funcionamiento (**Anexo, Programa 1**), se evaluó la temperatura promedio de los partidores +/- 6°C en un volumen de reacción de 12,5 µL. Se corroboró por gel de agarosa 1% con tinción ácidos nucleicos GelRed (Biotium) (**Sigma Aldrich, USA**) y se le aplicó 70 V por 120 min, se utilizó como patrón de peso molecular de ADN 1 Kb *Plus* (**New England BioLabs, USA**).

### ***Purificación producto PCR inserto clonamiento***

Se realizó una reacción de PCR con los partidores de clonamiento a un volumen final de 75 µL (**Anexo, Programa 1**), utilizando como templado el ADN genómico de las cepas en cuestión. El producto PCR se dispuso en un gel de agarosa 1% al cual se le aplicaron 70 V por 120 minutos, luego se tiñó en una solución de GelRed 1X por 20 minutos en agitación constante. Se realizó la purificación del inserto mediante el sistema comercial DNA Gel Extraction (**Norgen, Canadá**). Se cuantificó la concentración de ADN mediante el sistema comercial Qubit HS dsDNA Assay (**Invitrogen, USA**).

### ***Ligación del inserto al vector de transformación***

Se utilizó como vector de transformación el plásmido comercial pGEM-T Easy (**Promega, USA**). Se dispuso el inserto a una concentración mínima de 50 ng respetando la relación de inserción/vector 1:3, se utilizaron además tanto los controles negativos (sin inserto) como positivos, propios del sistema comercial. Luego de realizar la reacción de ligación en un volumen final de 10 µL se dejó durante toda la noche a 4°C.

### ***Preparación y transformación de células competentes***

Se sembraron 10 µL del glicerol *E. coli* DH5α en placa LB y se dejó creciendo a 30°C durante 14-16 h. Luego se preparó un inóculo el cual se dejó en agitación a 174 RPM a 37°C por 3-5 h, hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0,4. Se dispusieron 3 mL de cultivo y se centrifugaron a 8000 RPM por 5 min a 4°C para posteriormente descartar el sobrenadante y resuspender suavemente en 200 mL de CaCl<sub>2</sub> frío, se realizó una segunda centrifugación a 10000 RPM por 3 min a 4°C para finalmente resuspender en 100 µL de CaCl<sub>2</sub> frío. Se incubaron las células competentes por 10 min en hielo para luego ser transformadas con 4 µL de producto de ligación, se añadió además un control negativo sin producto de ligación y un control positivo de transformación pGEM-T Easy\_alkB<sub>2</sub>. Se movió suavemente el tubo de reacción y se puso en hielo por 20 min, para luego darle un golpe de calor en baño termostático a 42°C por 50 s, dejar en hielo nuevamente por 2 min y luego añadir 950 µL de SOC. Luego se incubaron por 1,5 h a 37 °C y con agitación constante de 174 RPM.

Luego, se sembró en césped 200 µL del inóculo transformado y controles en placas de LB-Agar/Amp 125 mg/mL, se incubó a 37°C por 14-16 h.

### **Purificación de plásmido**

Se seleccionaron 10 clones transformados con el inserto de interés de cada placa y 3 clones de cada uno de los controles, éstos se sometieron a una lisis térmica con un ciclo de calor a 96°C en un baño seco por 15 min, y un ciclo en hielo por 15 min, se centrifugaron a 13000 RPM por 15 min. Se realizó una reacción de PCR (**Anexo, Programa M13**), con partidores M13, propios del vector de clonamiento, a un volumen final de 12,5 µL. La inserción del plásmido se corroboró mediante un gel de agarosa 1%, el cual se tiñó con GelRed (**Bioutium, USA**) y se dejó correr por 120 m a 70V, se utilizó peso molecular de ADN 1 Kb *Plus* (**New England BioLab, USA**).

Los clones que incorporaron el plásmido verificado por PCR y electroforesis en gel de agarosa se inocularon en 4 mL de medio LB/Amp 125 mg/mL y se incubaron a 37°C con agitación constante a 176 RPM por 14-16 hrs. Se realizó la purificación de plásmido con el sistema comercial QIAprep Spin Miniprep (**QIAGEN, Alemania**) siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. La concentración del plásmido se determinó con el kit comercial Qubit HS dsDNA Assay (**Invitrogen, USA**).

A modo de confirmación se realizó una reacción de PCR con los partidores de clonamiento, para amplificar el inserto presente en los plásmidos, ésta se realizó a un volumen final de 12,5 µL (**Anexo, Programa 1**).

### **Digestión del plásmido**

Para verificar cada plásmido, se realizó un tratamiento con enzimas de digestión (**New England BioLab, USA; Tabla 9**). Se utilizaron 300 ng de plásmido y se emplearon 10 U de enzima. La reacción se dejó por 1 h a 37°C en baño seco y luego 20 min a 65°C, se observó el producto de la digestión mediante gel de agarosa.

Tabla 9 | Enzimas de restricción utilizadas para la digestión del plásmido

| Plásmido                   | Enzima de restricción | N° sitios | Largo producto digerido (pb) |      |
|----------------------------|-----------------------|-----------|------------------------------|------|
| pGEM-T Easy <i>_actP</i>   | <i>NdeI</i>           | 1         | 4293                         |      |
| pGEM-T Easy <i>_acrD64</i> | <i>EcoRI</i> -HF      | 2         | 1525                         | 2997 |
| pGEM-T Easy <i>_golT64</i> | <i>NdeI</i>           | 1         | 5202                         |      |
| pGEM-T Easy <i>_acrD36</i> | <i>NdeI</i>           | 1         | 4674                         |      |
| pGEM-T Easy <i>_copB2</i>  | <i>EcoRI</i> -HF      | 1         | 4425                         |      |
| pGEM-T Easy <i>_copA36</i> | <i>NdeI</i>           | 1         | 4033                         |      |
| pGEM-T Easy <i>_golT36</i> | <i>NdeI</i>           | 1         | 5178                         |      |
| pGEM-T Easy <i>_copB36</i> | <i>NdeI</i>           | 1         | 3878                         |      |
| pGEM-T Easy <i>_copA64</i> | <i>NdeI</i>           | 1         | 4532                         |      |

### **Diluciones para curva de calibración**

Luego de corroborar la inserción y la integridad del plásmido, se cuantificó la cantidad de ADN nuevamente mediante el sistema comercial Qubit HS dsDNA Assay (Invitrogen, USA). A partir de este valor se definió la concentración necesaria para obtener  $5 \times 10^8$  copias del gen en la primera dilución, esto se realizó mediante la siguiente ecuación (**Fórmula 3**):

$$N^{\circ} \text{ de copias} = \frac{\text{Largo del plásmido} * \text{Factor de conversión} * \text{Peso promedio ADN doble hebra}}{\text{Cantidad de ADN (ng)} * \text{Número de Avogadro}}$$

Fórmula 3 | Número de copias del gen de interés

Se realizó la primera dilución y se volvió a cuantificar su concentración. Luego se realizaron 8 diluciones en base 10.

### **qPCR curva de calibración**

Se realizó una reacción de PCR cuantitativa con el sistema comercial KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2x) Universal (Sigma Aldrich, USA), midiendo la fluorescencia en el equipo Stratagene Mx3000pTM (Agilent Technologies, USA). Se utilizó como referencia ROX Low 50 mM, como templado de reacción las diluciones (2.11.3.7) y los partidores de qPCR (**Tabla 7**). El perfil térmico que se utilizó fue de 40 ciclos siguiendo las instrucciones del fabricante, se respetó la temperatura de alineamiento de cada uno de los respectivos partidores.

De este modo, a partir de la señal fluorescente (Ct) obtenida se estableció una relación con el número de copias presente en cada pocillo. Esta experiencia fue desarrollada con una réplica técnica igual a 6.

### **Cuantificación absoluta de genes cobre**

Se realizó el mismo procedimiento descrito en qPCR, no obstante, como templado se utilizó el extracto de ADN de suelo obtenido en (Extracción de ADN, pág. 43). Luego a partir de las curvas de calibración de cada uno de los partidores se determinó el número de copias de genes en cada uno de los núcleos de suelo. Se añadió como control interno la dilución D4 1:10000.

### **Análisis estadístico**

Los análisis estadísticos correspondientes se realizaron utilizando el programa GraphPad Prisma (versión 8.0.2), para los ensayos con una réplica técnica mayor a 3.

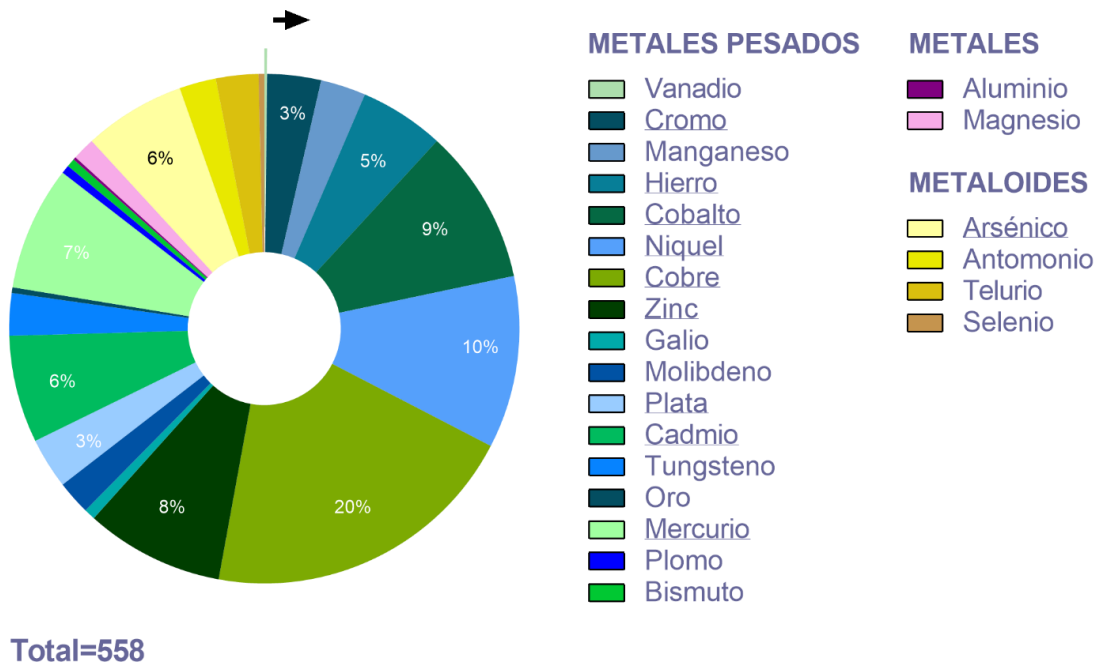
Se emplearon las pruebas estadísticas ANOVA de dos vías, pruebas de comparaciones múltiples Tukey's y Sidak's.

## Resultados

### Identificación *in silico* de genes de resistencia/ tolerancia a metales pesados

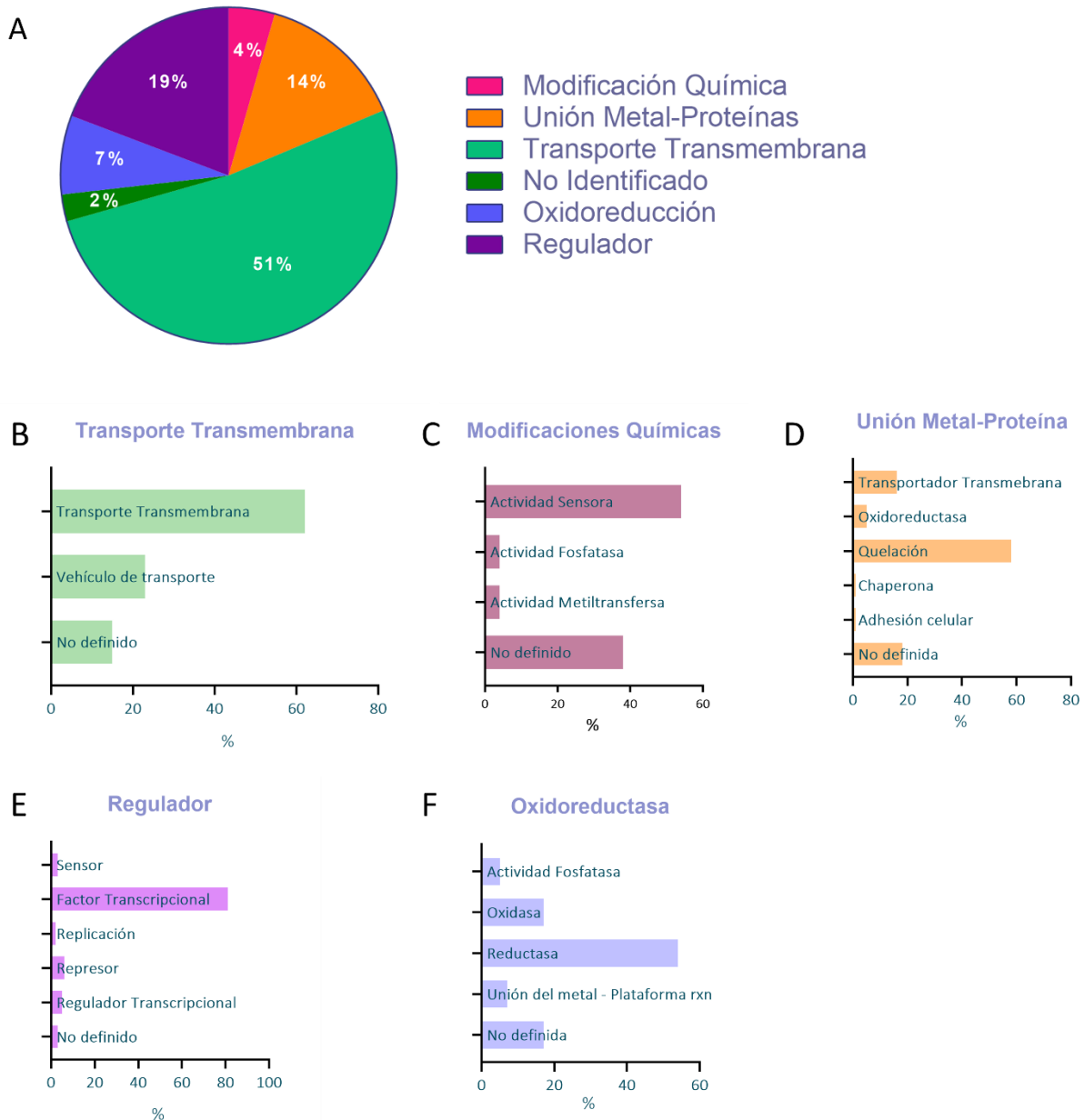
#### Construcción base de datos

Tal como se indicó en la metodología (página 34) de recopilación de genes de resistencia y tolerancia a metales pesados, se realizó la búsqueda en diferentes bases de datos especializadas y literatura primaria (2014-2022), para la construcción de una base de datos actualizada como resultado se recopilaron 558 genes totales relacionados a la tolerancia y/o resistencia a vanadio, cromo, manganeso, hierro, cobalto, níquel, cobre, zinc, galio, molibdeno, plata, cadmio, tungsteno, oro, mercurio, plomo, bismuto, aluminio, magnesio, arsénico, antimonio, telurio y selenio, con evidencia experimental. 23 genes fueron obtenidos de la literatura primaria y 535 de la base de datos BacMet (Pal et al., 2014), se complementó la información de cada uno de estos genes con el código de acceso correspondiente a UniProt, la localización genómica, mecanismo de respuesta general (5 clasificaciones) y mecanismo de respuesta detallado (**Figura 10**). Se clasificaron los genes de acuerdo con la identidad de los compuestos metálicos a los que responden. Se crearon tres grandes categorías en base a sus propiedades químicas, teniendo metales pesados, metales y metaloides (**Figura 9**). Es importante mencionar que la identidad metálica de respuesta que se asignó a cada uno de los HMRG puede ser múltiple, es decir, considera que un gen puede responder a más de un metal. Se nombró la base de datos que recopila estos genes de respuesta a metales pesados como HMR\_gen, en ésta destacan en número genes relacionados a la tolerancia/resistencia de cobre, níquel, cobalto, zinc, cadmio, mercurio y arsénico.



**Figura 9 | Genes de respuesta a cobre componen en mayor porcentaje a HMR\_gen.** Se construyó la base de datos con genes que responden a metales, son presentados en paleta de colores verde los metales pesados, colores rosa para metales y metaloides en paleta de colores amarillo, se encuentran subrayados los metales que poseen una participación mayor a 3% en la base de datos. La flecha negra superior presenta el inicio del listado de metales.

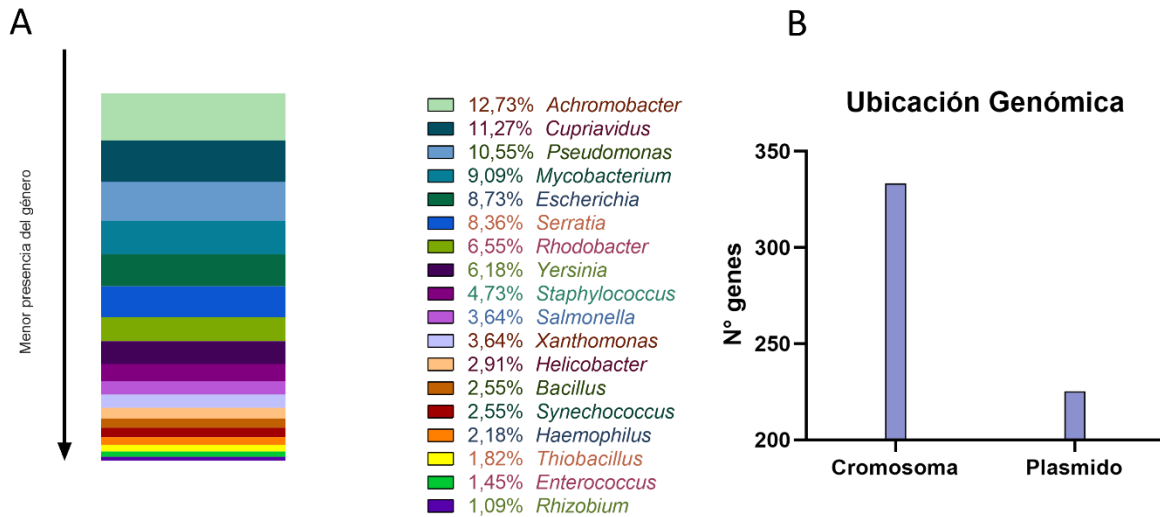
Además, se clasificaron los genes recopilados según su mecanismo general de respuesta, de este modo se definieron cinco grandes grupos: Modificaciones químicas (4,4 %), Metales unidos a proteínas (14,2%), Transporte transmembrana del metal (52%), Oxidoreductasa (7,58%), Regulación (19,2%) y No clasificados (2,59%) (**Figura 10A**). Cada una de estas clasificaciones fue desglosada en submecanismos (**Figura 10 B-F**).



**Figura 10 | Transporte transmembrana es el mecanismo preponderante en HMR\_gen.** Se presentan la participación porcentual dentro de la base de datos HMR\_gen de los 5 principales mecanismos generales de resistencia/tolerancia (A), con sus respectivos submecanismos Transporte transmembrana (B), Modificaciones químicas (C), Unión Metal-Proteína (D), Regulador (E) y Oxidoreductasa (F).



También se organizó la base de datos en base a la taxonomía de las bacterias presentes en HMR\_gen, se destaca la participación porcentual de géneros como *Achromobacter*, *Cupriavidus*, *Pseudomonas* (**Figura 11A**). Se incluyó además la localización genómica de los GRTM, de los cuales 333 se encuentran en el cromosoma bacteriano y 225 en elementos móviles como plásmidos y/o transposones (**Figura 11B**).



**Figura 11 | Géneros correspondientes a bacterias ambientales se encuentran en mayor proporción en HMR\_gen.** Composición taxonómica a nivel de género bacteriano y su localización genómica. (A) Se presentan en orden de participación porcentual los géneros bacterianos presentes en la base de datos HMR\_gen (B) Se presenta la localización genómica de los genes presentes en la base de datos.

### Identificación de genes asociados a resistencia a metales en genomas de cepas hidrocarbonoclasticas

Mediante la herramienta tBLASTn se realizó un análisis BBH de los genomas de las cepas hidrocarbonoclasticas de suelo (**Tabla 3; Anexo, Figura 10**) contra la base de datos HMR\_gen, para evaluar la presencia de posibles genes de respuesta a metales pesados de las cepas. Los resultados se clasificaron por identidad de metal, teniendo así que metales pesados como cobre, zinc y cobalto, presentan un mayor número de genes de respuesta en las cepas pertenecientes al cepario LabMMBA (**Tabla 10**). Así también, destacó *Stutzerimonas*, siendo el género con mayor número de genes de resistencia/tolerancia a metales identificados (**Tabla 10**).



Tabla 10 | Número de genes de resistencia/tolerancia identificados en los genomas bacterianos de las cepas hidrocarbonoclasticas de suelo.

| Número de genes identificados en Bacteria | Metales pesados |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | M | Metaloides |    |    |    | Total |    |     |
|---|-----------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|---|------------|----|----|----|-------|----|-----|
|   | Cu              | Zn | Co | Ni | Cd | Ag | Fe | Cr | Mo | W  | Au | Hg | Ga |   | Va         | Mn | Pb | Mg |       | As | Te  |
| <i>Stutzerimonas</i> sp. DN34             | 19              | 17 | 12 | 9  | 10 | 5  | 5  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2  | 1  | 1 | 0          | 0  | 3  | 4  | 3     | 2  | 101 |
| <i>Stutzerimonas</i> sp. DN36             | 19              | 17 | 12 | 9  | 10 | 5  | 5  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2  | 1  | 1 | 0          | 0  | 3  | 4  | 3     | 2  | 101 |
| <i>Achromobacter</i> sp. B7               | 15              | 10 | 5  | 3  | 5  | 7  | 7  | 5  | 4  | 4  | 2  | 0  | 1  | 0 | 1          | 0  | 1  | 8  | 3     | 2  | 83  |
| <i>Acinetobacter</i> sp. AA64             | 11              | 13 | 7  | 5  | 8  | 6  | 1  | 3  | 2  | 2  | 1  | 0  | 0  | 0 | 0          | 0  | 1  | 4  | 5     | 2  | 71  |
| <i>Acinetobacter</i> sp. AF53             | 10              | 10 | 8  | 8  | 8  | 6  | 3  | 3  | 2  | 2  | 1  | 0  | 0  | 0 | 0          | 0  | 1  | 4  | 4     | 2  | 72  |
| <i>Acinetobacter radioresistens</i> DD78  | 9               | 10 | 8  | 5  | 8  | 5  | 3  | 2  | 2  | 2  | 1  | 0  | 0  | 0 | 0          | 0  | 1  | 5  | 5     | 2  | 68  |
| <i>Rhodococcus</i> sp. ICBD2              | 9               | 0  | 13 | 14 | 0  | 0  | 0  | 6  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0 | 0          | 0  | 12 | 10 | 7     | 4  | 75  |
|   | 92              | 77 | 65 | 53 | 49 | 34 | 24 | 23 | 14 | 14 | 9  | 4  | 3  | 2 | 1          | 0  | 22 | 39 | 30    | 16 |     |

\* Se presenta en escala de color el número total de GRTM identificados por metal, se respetaron los parámetros de cobertura e identidad.

En base a estos resultados y la importancia que posee el cobre en Chile se decidió realizar una identificación centrada en los genes relacionados a resistencia/tolerancia al cobre.

### Análisis de genes asociados a la tolerancia/resistencia a cobre en genomas de cepas hidrocarbonoclasticas de suelo

Se analizaron los genomas bacterianos disponibles mediante la herramienta de visualización GenoVi (Cumsille et al., 2022), se construyeron representaciones gráficas de los genomas para ver su tamaño y diversidad (Anexo, Figura 9), se seleccionaron 4 cepas bacterianas para su mayor estudio, siendo estas las cepas pertenecientes al consorcio de degradación aprobado para su uso en suelo; las cepas no presentan antagonismo entre ellas (Macaya, LabMMBA, No publicado). Las cepas del consorcio pertenecientes al género *Acinetobacter* presentaron 9 genes identificados de resistencia a cobre, *Stutzerimonas* por su parte 14 y *Rhodococcus* tan solo 3 (Anexo, Tabla 4).

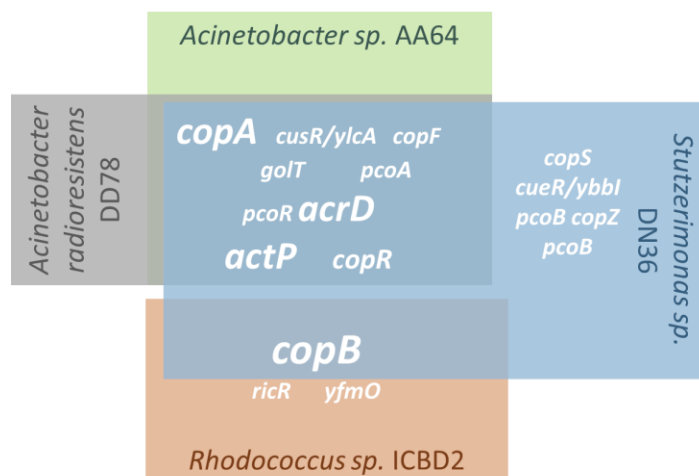
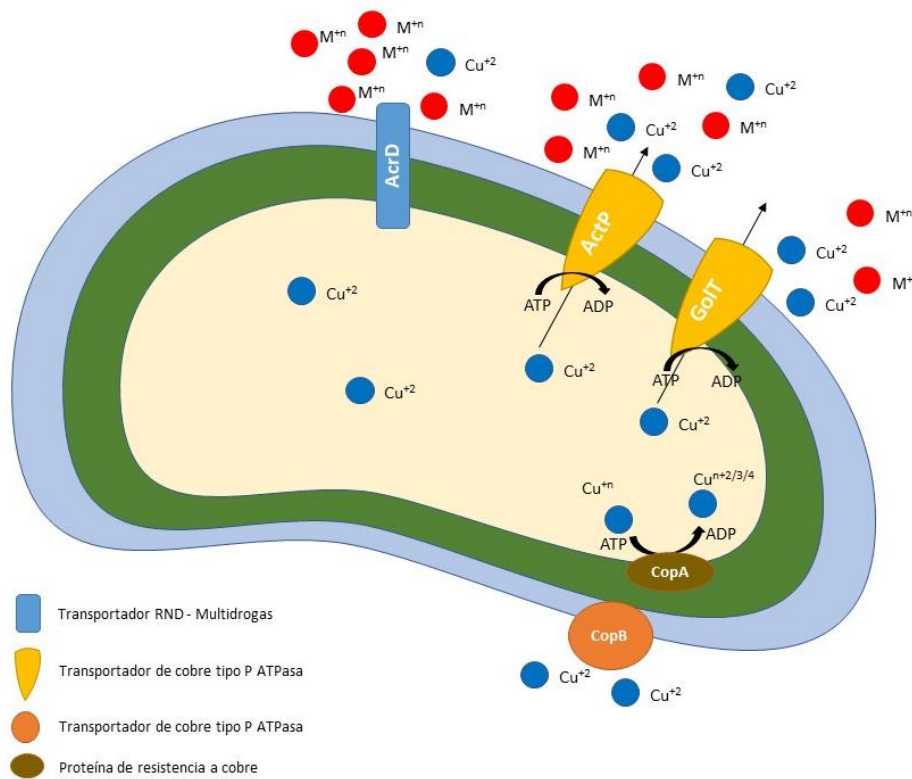


Figura 12 | *Stutzerimonas* sp. DN36 presenta el mayor número de genes de respuesta a cobre. Diagrama de Venn de los genes de resistencia/tolerancia a cobre identificados y compartidos por *Acinetobacter* sp. AA64 (verde), *A. radioresistens* DD78 (gris), *Stutzerimonas* sp. DN36 (azul) y *Rhodococcus* sp. ICBD2 (naranja).

Se identificaron 17 genes de resistencia/tolerancia al cobre con una identidad mayor al 45%. Los genes *copA*, *cusR/ylcA*, *copF*, *golT*, *pcoA*, *pcoR*, *acrD*, *actP* y *copR* fueron identificados en las cepas *A. radioresistens* DD78, *Acinetobacter* sp. AA64 y *Stutzerimonas* sp. DN36. Por otro lado,

la cepa *Stutzerimonas* sp. DN36 presentó los genes *copS*, *cueR/ybbI*, *pcoB* y *copZ* en su genoma, mientras que en la cepa *Rhodococcus* sp. ICBD2 se identificaron los genes *ricR* y *yfmO*. Tanto *Stutzerimonas* sp. DN36 como *Rhodococcus* sp. ICBD2 presentaron el gen *copB* (**Figura 12**).

Los genes identificados se corroboraron de forma manual contra la base de datos de NCBI mediante BLASTp (*online*), no se encontraron diferencias con respecto a la anotación reportada por HMR\_gen (**Anexo, Tabla 5**). Considerando la presencia de los genes de resistencia/tolerancia a cobre identificados en el consorcio (**Figura 12**) y sus mecanismos de acción (**Figura 13**), se seleccionaron 5 genes para ser estudiados en mayor profundidad, los criterios de selección se basaron principalmente en la especificidad del mecanismo de respuesta, los valores de identidad y la distribución dentro de las cepas del consorcio. Los genes seleccionados corresponden a 1. *acrD*: Transportador RND permeasa – Multidrogas, 2. *actP*: Transportador de cobre tipo P- ATPasa, 3. *golT*: Transportador tipo P- ATPasa – Cobre, 4. *copA*: oxidasa y 5. *copB*: Translocador de cobre tipo P. Todos los genes seleccionados se encuentran localizados en el cromosoma.

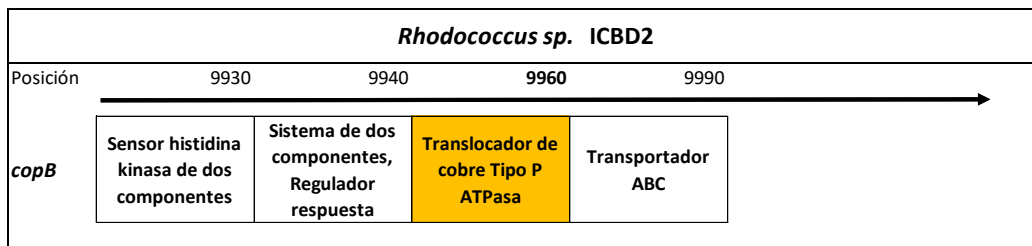


**Figura 13 | Transporte transmembrana como mecanismo principal de respuesta a cobre.** Representación gráfica de la función codificada en los genes *acrD*, *actP*, *golT*, *actP*, *golT*, *copA* y *copB* identificados en las cepas pertenecientes al consorcio. Se presentan las proteínas AcrD, ActP, GolT, CopA y CopB, en su contexto celular correspondiente, círculos azules representan a la forma iónica del cobre, en rojo se representan otros metales ionizados, se presentan moléculas energéticas como ATP y ADP.

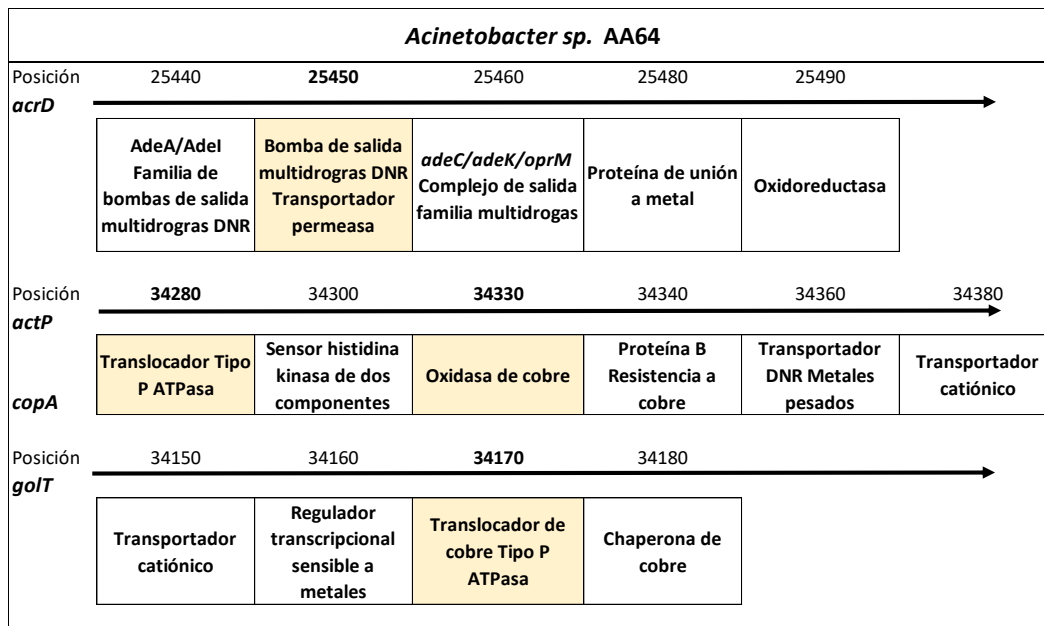
## Caracterización del contexto genómico de los genes de resistencia/ tolerancia a cobre

Se analizó el contexto genómico de los genes de resistencia/tolerancia a cobre identificados y seleccionados, esto nos permitió realizar un acercamiento predictivo de la funcionalidad de cada gen. Para *Acinetobacter* sp. AA64 destacan genes asociados al transporte, transportadores de la familia RND, bombas de expulsión, genes asociados a la respuesta de óxido reducción y sistemas de sensor de dos componentes, dentro de su vecindad genómica, se observa también que los genes *actP* y *copA* se encuentran a tan solo +/-3 posiciones de distancia (**Figura 14B**). El mecanismo de unión a proteína se presenta fuertemente en el contexto genómico de la cepa *Stutzerimonas* sp. DN36, para ésta cepa notamos que la identificación de *golT* y *actP* corresponde al mismo gen y por lo tanto la misma proteína, se seleccionó el gen *actP* ya que poseía una mayor identidad (**Figura 14D**). Por otro lado, se identificó parte del operon *cop*, los genes *copA* y *copB* están en la misma vecindad (**Figura 14 B**). Se observa que para la cepa *A. radioresistens* DD78 los genes en la vecindad genómica se asocian a mecanismos de respuesta a metales, tal como oxidorreducción, unión de metal a proteínas, transporte transmembrana y de regulación (**Figura 14C**). El contexto genómico de la cepa *Rhodococcus* sp. ICBD2 se encuentra fuertemente representado por mecanismos de transporte (**Figura 14A**).

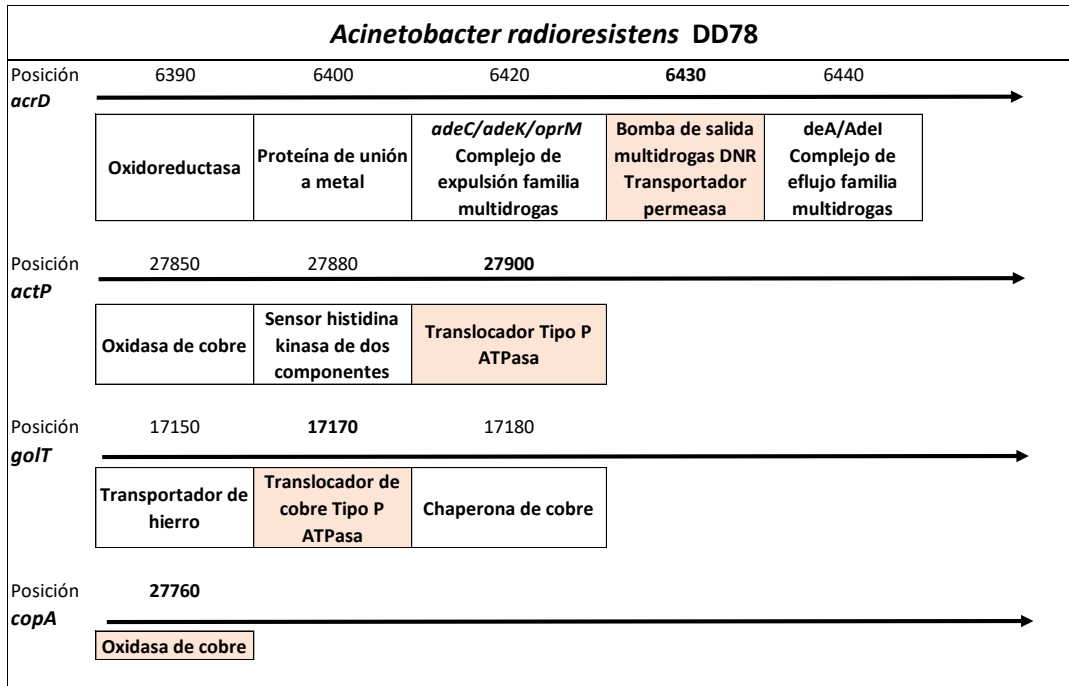
A



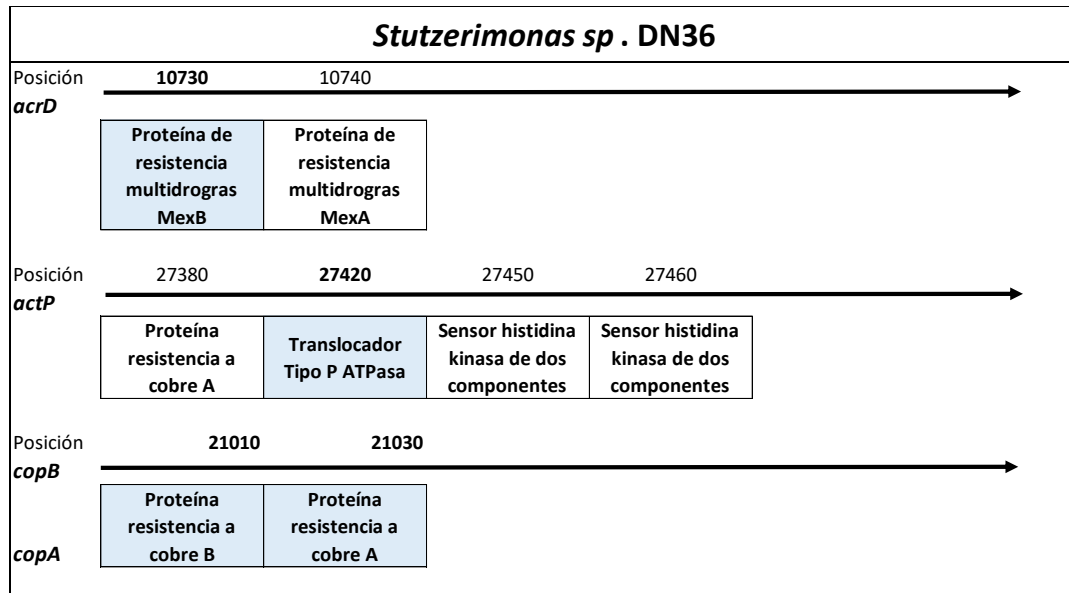
B



C



D



**Figura 14 | Contexto genómico de genes identificados y seleccionados de resistencia/tolerancia a cobre para cada una de las especies bacterianas pertenecientes al consorcio hidrocarbonoclastico.** Se presentan en la figura los genes relacionados a la resistencia/tolerancia al cobre localizados en la cercanía genómica al gen de interés (destacado con color). Se indica la posición genómica (locus tag) y el gen vecino. A) Contexto genómico de *Rhodococcus sp.* ICB2 para *copB*. B) Contexto genómico de *Acinetobacter sp.* AA64 para los genes *acrD*, *actP*, *golT* y *copA*. C) Contexto genómico de *A. radioresistens* DD78 para los genes *acrD*, *actP*, *golT* y *copA*. D) Contexto genómico de *Stutzerimonas sp.* DN36 para los genes *acrD*, *actP*, *copA* y *copB*.

## Resistencia/tolerancia a metales pesados de las cepas hidrocarbonoclasticas de suelo

De manera de evaluar experimentalmente las capacidades de las cepas pertenecientes al consorcio se midió la tolerancia a distintas soluciones metálicas (2. 6). Al determinar la concentración mínima inhibitoria (CIM) para los compuestos iónicos  $\text{Cd}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{CrO}_4^{-2}$ ,  $\text{Hg}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Ni}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Ag}^{+2}$ ,  $\text{Co}^{+2}$ ,  $\text{Pb}^{+2}$  se evidenció que la mayor tolerancia fue registrada frente a cobalto, seguida por cobre, magnesio y zinc, en menor medida de tolerancia se registró plomo con una CIM de  $<0,005$  mM, cromo con una CIM de  $<0,01$  mM y mercurio con una CIM de  $<0,1$  mM (**Tabla 11**). No se pudieron informar valores CIM para plata, dado que su contraíón mostró interacciones de precipitación con el medio de cultivo LPTMS.

Tabla 11 | Concentración mínima inhibitoria de las cepas *Stutzerimonas* sp. DN36, *A. radioresistens* DD78, *Acinetobacter* sp. AA64 y *Rhodococcus* sp. ICBD2 frente a diferentes metales y metaloides.

| Forma metálica iónica | Compuesto                                  | CIM (mM) |          |           |          |
|-----------------------|--|----------|----------|-----------|----------|
|                       |  | AA64     | DD78     | DN36      | ICBD2    |
| $\text{Cd}^{+2}$      | $\text{CdCl}_2$                            | $<0,2$   | $<0,2$   | 0,02-0,05 | $<0,002$ |
| $\text{Cu}^{+2}$      | $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ | 2,48     | 7-8      | 6,2       | 1        |
| $\text{Cr}^{+6}$      | $\text{K}_2\text{CrO}_4$                   | $<0,01$  | $<0,01$  | $<0,01$   | $<0,01$  |
| $\text{Hg}^{+2}$      | $\text{HgCl}_2$                            | $<0,1$   | $<0,1$   | $<0,1$    | $<0,1$   |
| $\text{Mg}^{+2}$      | $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ | 1        | 1        | 2         | 2--1     |
| $\text{Ni}^{+2}$      | $\text{NiSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ | $<0,5$   | $<0,5$   | 2,3       | $<0,5$   |
| $\text{Zn}^{+2}$      | $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ | $<1$     | $<1$     | -         | $<1$     |
| $\text{Ag}^{+1}$      | $\text{AgNO}_3$                            | -        | -        | -         | -        |
| $\text{Co}^{+2}$      | $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ | $>9$     | $>9$     | $>9$      | $>9$     |
| $\text{Pb}^{+2}$      | $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$                 | $<0,005$ | $<0,005$ | $<0,005$  | $<0,005$ |

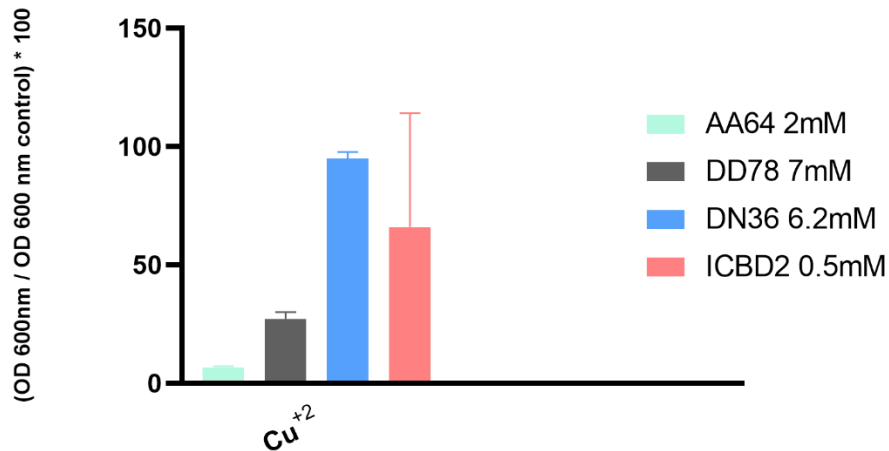
\* Se indica en la tabla la forma iónica y compuesta de cada metal analizado y se informa en rango y/o promedio la concentración [mM] máxima que toleran cada una de las cepas, n=3.

### Tolerancia a cobre de las cepas hidrocarbonoclasticas de suelo

A partir de la evaluación inicial que se realizó (**Tabla 11**) y considerando la identificación *in silico* de genes realizada, se seleccionó el cobre como metal pesado de estudio.

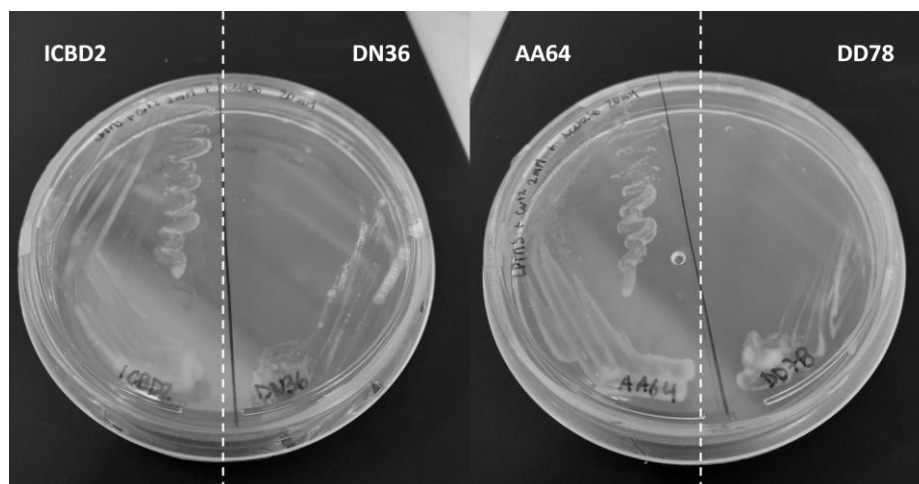
Se evaluó el crecimiento de las cepas en medio líquido LPTMS pertenecientes al consorcio durante 75 h a diferentes concentraciones de  $\text{CuSO}_4$  cercanas al valor CIM reportado en la primera experiencia (**Tabla 11**). Se obtuvieron resultados coincidentes y cercanos al valor CIM reportado en esta tesis, para las cepas *Stutzerimonas* sp. DN36, *Acinetobacter* sp. AA64, *A. radioresistens* DD78, *Rhodococcus* sp. ICBD2, se registraron los valores CIM 6,5 mM, 2 mM, 6 mM y 0,3 mM respectivamente, el control negativo de una cepa sin tolerancia reportada a cobre *E. coli* DH5 $\alpha$  presentó una CIM cercana a 1 mM (**Anexo, Figura 10**).

El crecimiento en medio mínimo líquido en tubos se realizó para una sola concentración a modo de corroboración (**Figura 15**); solo para *Stutzerimonas* sp. *DN36* no se observó una diferencia reportada por el *screening* inicial (**Tabla 11**). Las cepas ICBD2, AA64 y DD78, presentaron una diferencia en su capacidad de crecimiento con respecto al control, por lo cual se espera que la CIM sea una concentración menor a lo reportado (**Tabla 11**), las concentraciones menores probadas para estas cepas fueron 0,3 mM, 2 mM y 6 mM respectivamente (**Anexo, Figura 10**).



**Figura 15 | *Stutzerimonas* sp. *DN36* presenta la mayor CIM de cobre en medio líquido LPTMS comprobada.** Crecimiento de las cepas *Acinetobacter* sp. AA64, *A. radioresistens* DD78, *Stutzerimonas* sp. *DN36* y *Rhodococcus* sp. ICBD2 en 2, 7, 6,2 y 0,5 mM CuSO<sub>4</sub> respectivamente. Se reporta la OD 600<sub>nm</sub> normalizada por la condición control, es decir crecimiento sin metal, alcanzada por cada una de las cepas en su concentración CIM. Esta experiencia fue llevada en un volumen final de 5 mL, por 72 h con n=2 y con su respectivo control negativo (C).

Al evaluar el crecimiento de las cepas del consorcio en un medio sólido con 2 mM de CuSO<sub>4</sub>, se observó que las cepas *Rhodococcus* sp. ICBD2 y *Acinetobacter* sp. AA64 tuvieron la mayor capacidad de crecimiento (**Figura 16**).



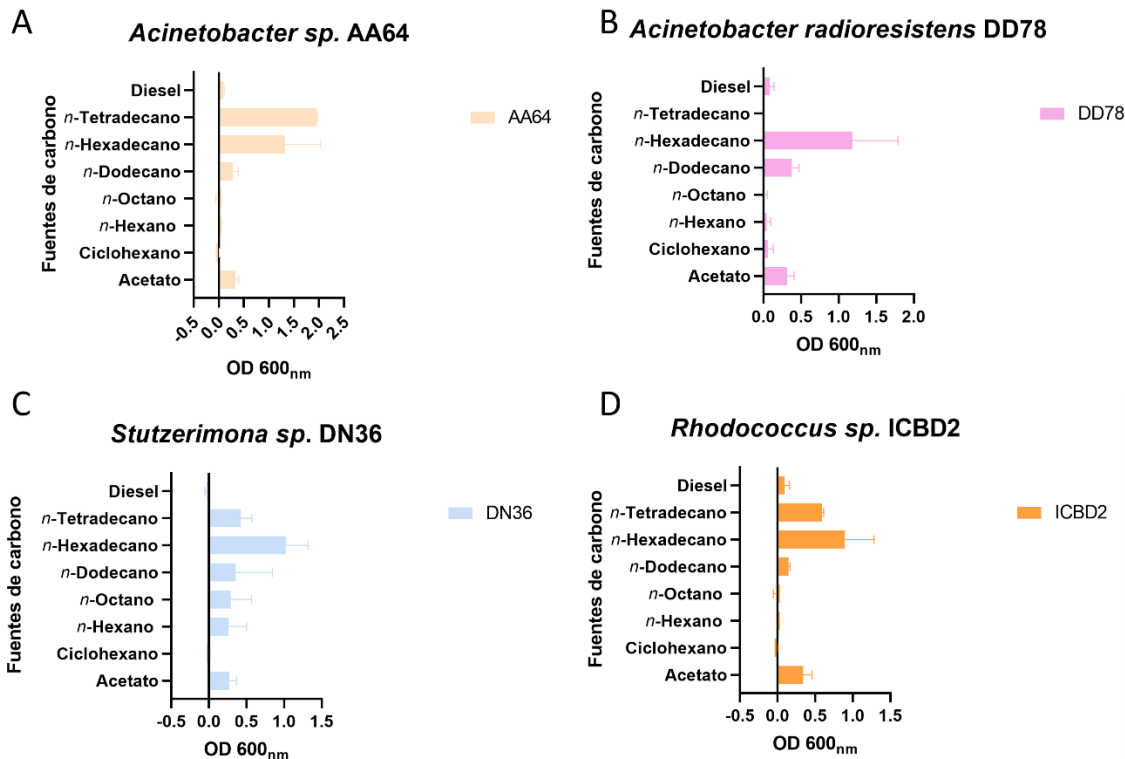
**Figura 16 | Crecimiento de las cepas *Acinetobacter* sp. AA64, *A. radioresistens* DD78, *Stutzerimonas* sp. *DN36* y *Rhodococcus* sp. ICBD2 en medio sólido con 2 mM CuSO<sub>4</sub>.** Se presentan las fotografías de las placas en A) placas de LPTMS + 2mM CuSO<sub>4</sub>, con siembra de izquierda a derecha ICBD2 y DN36. B) placas de LPTMS + 2 mM CuSO<sub>4</sub> + Acetato 20 mM, con siembra de izquierda a derecha AA64 y DD78, luego de 18 h de crecimiento a 30°C. Esta experiencia fue realizada en dos replicas biológicas diferentes.

## Crecimiento en HC alifáticos de cadena media y/o larga como única fuente de carbono

### Crecimiento bacteriano en medio líquido suplementado con HC alifáticos

Previo al crecimiento en medio líquido con HC como única fuente de carbono, se evaluó el potencial de crecimiento de cada una de las cepas del consorcio en fuentes de carbono conocidas, como acetato y succinato, fueron enfrentadas a diferentes concentraciones durante 38 h. En términos generales, cuando el acetato fue su única fuente de carbono se consiguieron los mejores crecimientos (**Anexo, Figura 11**).

Con el fin de caracterizar experimentalmente la capacidad degradativa de cada una de las cepas se siguió la metodología propuesta. Al exponer a las cepas del consorcio de manera independiente a diferentes HC alifáticos, siendo éstos su única fuente de carbono, se evidenció que el compuesto *n*-hexadecano, corresponde a la fuente de carbono predilecta, dado que favorece el crecimiento de todas las cepas (**Figura 17**), cuando son expuestas a *n*-dodecano las cepas AA64, DD78 y DN36 presentan un crecimiento similar a su control positivo acetato.



**Figura 17 | *n*-Hexadecano es la fuente de carbono que reporta mayor crecimiento en las cepas DN36, AA64, DD78, e ICBD2.** Crecimiento de las cepas DN36, AA64, DD78 e ICBD2 teniendo como única fuente de carbono HC alifáticos de cadena media (Diésel, *n*-Tetradecano, *n*-Hexadecano, *n*-Dodecano, *n*-Octano, *n*-Hexano y ciclohexano), *n*=2 con 3 réplicas biológicas.

Por otro lado, cuando éstas se enfrentan a una mezcla compleja como el diésel, tan solo ICBD2 presenta crecimiento el cual no logra superar al control positivo. Por otra parte, solo la cepa DD78



no fue capaz de crecer cuando fue expuesta a *n*-tetradecano en las condiciones evaluadas (Figura 17).

### Crecimiento bacteriano en medio sólido suplementado con HC alifáticos

La disponibilidad de carbono se puede ver afectada por tipo de medio, por lo que se realizaron pruebas de crecimiento en medio líquido y sólido. Se observa que en medio sólido al igual que en medio líquido el compuesto *n*-hexadecano es un compuesto predilecto entre las cepas pertenecientes al consorcio. No obstante, es en medio sólido donde el hidrocarburo *n*-dodecano figura también como una buena fuente de carbono para el crecimiento bacteriano. Cuando observamos el comportamiento de las cepas, *Rhodococcus sp.* ICBD2 es la cepa con mayor capacidad de crecimiento en diferentes HC alifáticos, junto con *A. radioresistens* DD78 presentan crecimiento en eicosano, *n*-hexadecano y *n*-dodecano, en éstos últimos dos compuestos son fuentes de carbono que permiten el crecimiento tanto en *Acinetobacter sp.* AA64 y *Stutzerimonas sp.* DN36. AA64 es la única cepa en la cual se observó crecimiento en *n*-hexano (Tabla 12).

Tabla 12 | Crecimiento de cepas hidrocarbonoclasticas en medio sólido con HC alifáticos como única fuente de carbono.

| Cepa                 | AA64 | DN36 | DD78 | ICBD2 |
|----------------------|------|------|------|-------|
| Eicosano             | -    | -    | +++  | ++    |
| <i>n</i> -Hexadecano | +++  | ++   | ++   | +++   |
| <i>n</i> -Dodecano   | +++  | +    | ++   | +     |
| <i>n</i> -Octano     | -    | -    | -    | -     |
| <i>n</i> -Hexano     | +    | -    | -    | -     |
| Ciclohexano          | -    | +    | -    | +     |

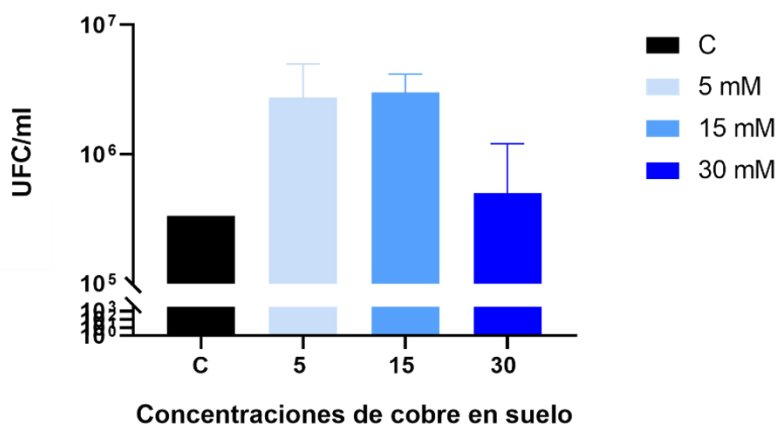
\* Se presentan de forma cualitativa los crecimientos de las cepas AA64, DN36, DD78 e ICBD2 en distintas fuentes de carbono, la medición se realizó luego de 120 h, n=2. La escala de crecimiento se construyó en referencia a las imágenes obtenidas (Anexo, Imagen 1).

### Capacidad de crecimiento del consorcio bacteriano en microcosmo de suelo contaminado con HC alifáticos y CuSO<sub>4</sub>

Con el fin de evaluar preliminarmente el comportamiento del consorcio bacteriano en suelo, se montaron 4 condiciones de microcosmo. El suelo proveniente del sitio Las Salinas se mantuvo a 30°C paralelamente a la experiencia, para evaluar su esterilidad, resultando sin presencia de microorganismos cultivables al final de la experiencia. Los ensayos se trabajaron en tres condiciones, se re-contaminaron con un 1% v/v de diésel y 5, 15 y 30 mM de CuSO<sub>4</sub>, fueron inoculados con el consorcio previamente cultivado en MNC, así también el control. Se mantuvieron los microcosmos por 144 h a temperatura ambiente y alejados de la luz. Se incluyó un control sin cobre, esta experiencia se llevó a cabo en duplicado. Se observó que los suelos bioaumentados para las tres condiciones de contaminación presentaron recuentos mayores de



UFCs versus el control sin co-contaminación, se observó una disminución en el recuento de UFC a mayores concentraciones de cobre (**Figura 18**).



**Figura 18 | El consorcio bacteriano es detectable en suelo co-contaminado por recuento de heterótrofos totales.** Logaritmo en base 10 del recuento de heterótrofos totales (UFC) en suelo co-contaminado control (negro), 5 mM (celeste claro), 15 mM (celeste) y 30 mM (azul) de CuSO<sub>4</sub> con un 1% v/v de diésel, por 144 h, n=2.

### Caracterización de parámetros generales del suelo

Luego de medir la densidad aparente, se determinó la porosidad (fracción de hueco) (**Tabla 13**). La presencia de enmienda orgánica disminuye la densidad de la mezcla sólida, por lo cual tanto C3 como C5, presentan una densidad menor. Por otro lado, el núcleo 5 presenta la más alta fracción de hueco 45,5 %.

**Tabla 13 | Características de la composición de suelo de experimentos de núcleos de suelo.**

| Núcleo    | Densidad aparente [g/L] | Fracción de hueco [%] |
|-----------|-------------------------|-----------------------|
| Núcleo C1 | 1,43                    | 33,3%                 |
| Núcleo C3 | 1,18                    | 33,3%                 |
| Núcleo C5 | 1,09                    | 45,5%                 |

\* Se presentan los promedios de las mediciones de densidad y cálculo de fracción de hueco, n=3

En términos de macronutrientes al comparar los valores promedio en el tiempo de la semana 0 y 8, el suelo control (C1) presentó una disminución en macronutrientes como zinc, manganeso, hierro y cobre; el suelo bioestimulado y bioaumentado (C3) sigue el mismo comportamiento con una pequeña variación en la relación N:P. El suelo co-contaminado (C5) reportó una concentración inicial de cobre de 9,47 mM (548 mg/kg), diferente a la estimación teórica de 17 mM. Para el suelo bioestimulado, bioaumentado y co-contaminado (C5), no se detectó nitrógeno total al inicio de la experiencia. Con respecto a la concentración de cobre se observó que no hay diferencia en el tiempo en el núcleo C5, dada la alta desviación estándar de la medición (**Tabla 14**).

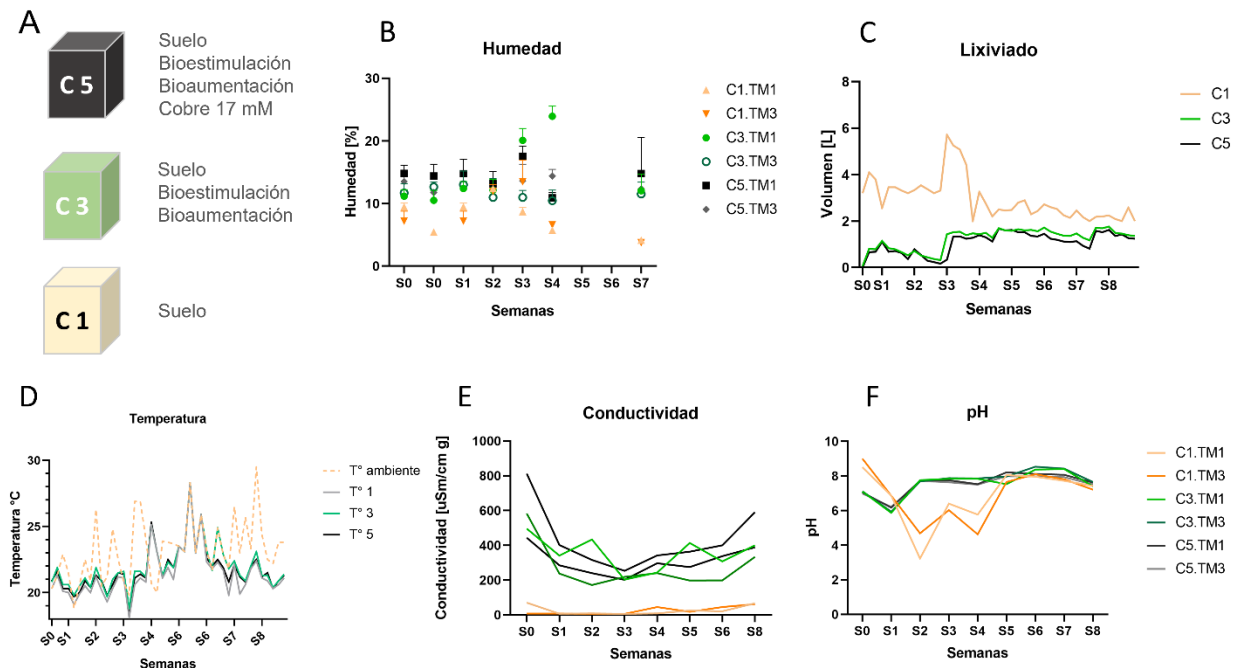
**Tabla 14 | Concentración de macronutrientes en los núcleos de suelo control, bioestimulado y bioaumentado con co-contaminación.**

| Macronutrientes | Unidad               | Semana 0 |      |      |      |      |      | Semana 8 |      |      |      |      |      |
|-----------------|----------------------|----------|------|------|------|------|------|----------|------|------|------|------|------|
|                 |                      | C1       | SD   | C3   | SD   | C5   | SD   | C1       | SD   | C3   | SD   | C5   | SD   |
| Nitrógeno total | g N/100 g muestra    | 0        | 0    | 0.12 | 0.01 | 0    | 0    | 0        | 0    | 0.11 | 0.01 | 0.12 | 0.01 |
| Fósforo soluble | mg P/Kg muestra seca | 0        | 0    | 43   | 3    | 43   | 4    | 0        | 0    | 47   | 1    | 47   | 3    |
| Potasio         | g K/100 g muestra    | 1.42     | 0.05 | 1.48 | 0.03 | 1.1  | 0.1  | 1.5      | 0.1  | 1.39 | 0.03 | 1.49 | 0.06 |
| Calcio          | g Ca/100 g muestra   | 1.66     | 0.05 | 1.51 | 0.03 | 1.78 | 0.02 | 1.46     | 0.05 | 1.61 | 0.02 | 1.66 | 0.05 |
| Magnesio        | mg Mg/ 100 g muestra | 340      | 25   | 326  | 12   | 365  | 6    | 301      | 11   | 294  | 14   | 371  | 24   |
| Zinc            | mg Zn/Kg muestra     | 18       | 1    | 31   | 1    | 34   | 2    | 10.4     | 0.3  | 32   | 2    | 34   | 2    |
| Manganeso       | mg Mn/Kg muestra     | 227      | 12   | 233  | 22   | 220  | 3    | 186      | 8    | 190  | 0.3  | 217  | 10   |
| Hierro          | g Fe/100 g muestra   | 1.23     | 0.05 | 1.3  | 0.1  | 1.27 | 0.05 | 1.06     | 0.03 | 1.18 | 0.01 | 1.4  | 0.1  |
| Cobre           | mg Cu/Kg muestra     | 13       | 1    | 28.6 | 0.4  | 548  | 49   | 0        | 0    | 28.5 | 0.6  | 491  | 11   |
| N:P             |                      | 0        |      | 27   |      | 0    |      | 0        |      | 23.4 |      | 26   |      |

\* Se presentan los valores promedio de las concentraciones en al inicio (semana 0) y final (semana 8), se indican la desviación estándar (SD) de la medición, n=3. Además, se presenta la relación Nitrógeno: Fósforo para cada uno de los núcleos.

### Monitoreo de parámetros fisicoquímicos del núcleo de suelo

Los núcleos de suelo C5, C3 y C1 fueron operados por 8 semanas, durante este tiempo se siguieron parámetros fisicoquímicos de cada uno de ellos. La humedad se midió todas las semanas y se determinó el porcentaje de humedad relativa presente en cada núcleo en su respectiva toma de muestra (superior e inferior). Se observó una diferencia significativa entre el promedio de humedad del suelo reportada en núcleo C1 con respecto a C3 y C5, estos últimos presentaron menor variación y más estabilidad en el tiempo (**Figura 19 B**). El volumen de lixiviado se encuentra directamente relacionado a la humedad, se registró un mayor volumen de lixiviado en C1, evidenciado una menor capacidad de retención de líquido en el suelo control, los núcleos C3 y C5 presentan un comportamiento similar, sin superar nunca los 2 L de lixiviado, todos los núcleos de suelo (C1, C3, y C5) presentaron un período de estabilización entre la semana S0 y S2 (**Figura 19 C**). En este período se mantuvo el sistema de ventilación continuo, para luego de la semana 2 ser apagado.



**Figura 19 | Resumen parámetros fisicoquímicos de los núcleos de suelo C1, C3 y C5.** Se presenta en la gráfica en **A**) Condiciones experimentales, núcleo C5, suelo bioestimulado, bioaumentado y contaminado con 17 mM de cobre, núcleo C3, suelo bioestimulado y bioaumentado y núcleo 1, suelo control. **B**) Promedio de humedad de los núcleos por toma de muestra durante su operación, n=3 **C**) Volumen de lixiviado obtenido de cada núcleo durante su operación **D**) Temperatura de los núcleos y temperatura ambiente **E**) Conductividad de los núcleos por toma de muestra durante su operación **F**) pH de los núcleos por toma de muestra durante su operación.

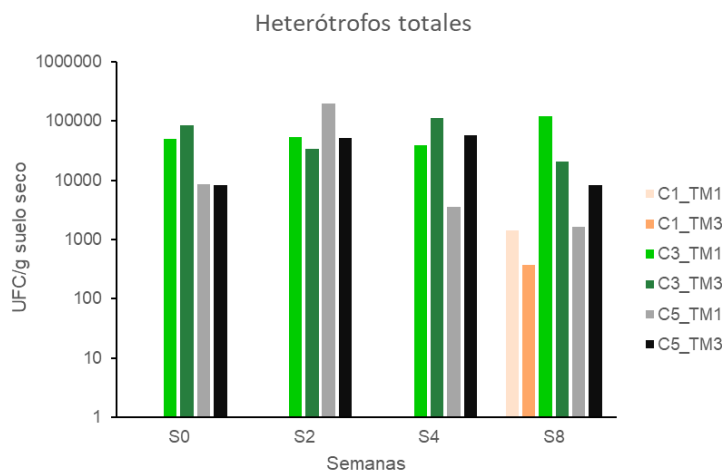
La temperatura de cada núcleo se registró durante todos los días hábiles de. La temperatura interior de cada núcleo guarda estricta relación con la temperatura ambiental registrada y no existen diferencias entre cada uno de ellos. Se mantuvieron en el rango de 20°C a 28°C (**Figura 19 D**). Los núcleos se operaron durante los meses de enero y febrero del año 2022.

Con respecto a la conductividad y pH de los núcleos de suelo, podemos observar que el suelo control C1, presenta un comportamiento diferente a los núcleos C3 y C5, siendo la principal diferencia entre éstos la presencia de enmienda orgánica. C1 presenta valores de conductividad menores a 200 uS/cm g, mientras que C3 y C5 se mantienen en el rango de 200-800  $\mu$ S/cm g (**Figura 19 E**). En cuanto al pH (**Figura 19 F**) C3 y C5, se alinean y mantienen un comportamiento idéntico en el tiempo, mientras que C1 no logra estabilizar sus valores de pH.

### Monitoreo de parámetros biológicos del núcleo de suelo

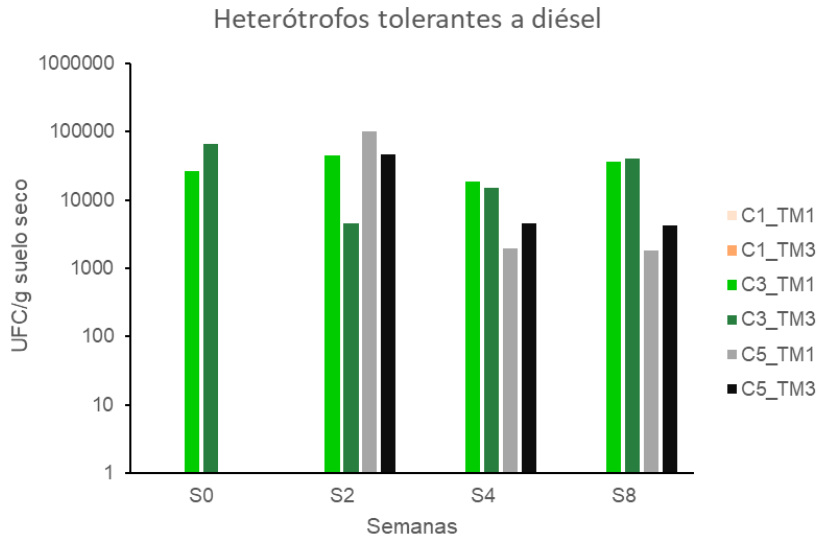
Con el objetivo de mantener un seguimiento de los núcleos de suelo y la comunidad bacteriana presente en ellos, se realizaron mediciones de heterótrofos totales en suelo. Luego de la primera medición (S0) se decidió utilizar ciclohexitida 200 mg/L, para restar el efecto de los hongos y levaduras al hacer el recuento. En el núcleo C1, no se reportaron unidades formadoras de

colonias hasta la S8 en las condiciones evaluadas, es decir, 56 días desde el inicio de la experiencia (**Figura 20**), el núcleo C3 y C5 presentaron un número de colonias similares entre sus tomas superiores (TM1) y sus tomas inferiores (TM3), el promedio del recuento se encontró en  $10^4$  y  $10^5$  UFC/ g de suelo seco. Sin embargo, en el núcleo C5 se observó que en la TM1 hubo un máximo reportado en la S2 luego solo disminuyó en el tiempo, no así en TM3 donde el recuento fue similar en el tiempo. Se pudieron detectar bacterias cultivables desde la S0 en adelante para los núcleos C3 y C5, durante la S2 (14 días) C5 presentó el mayor número de unidades formadoras de colonias. Los heterótrofos totales disminuyeron lentamente su número a lo largo del tiempo (**Figura 20**).



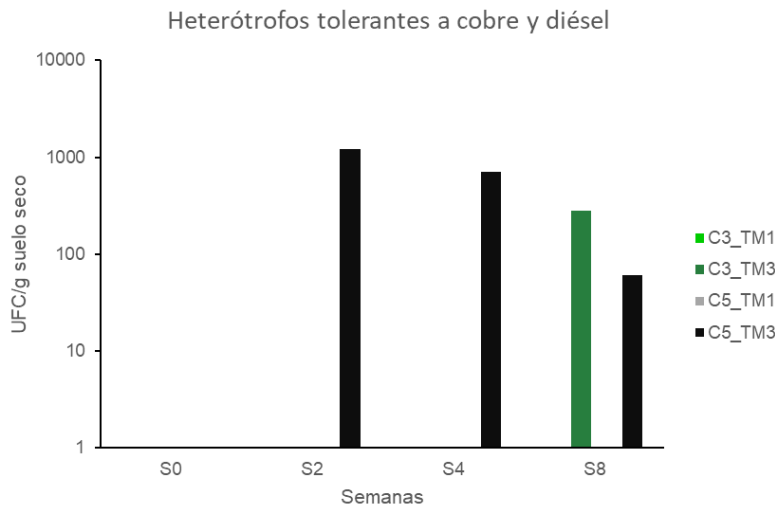
**Figura 20 | Los tratamientos de bioestimulación y bioaumentación estimulan el crecimiento de bacterias cultivable en el suelo.** Recuento de heterótrofos totales en suelo, se presenta el recuento de heterótrofos totales por gramo de suelo en escala logarítmica en medio TSA para la toma de muestra superior (TM1) y toma de muestra inferior (TM3), durante 8 semanas (S0-S8). Los ensayos fueron realizados con un n=2. Se presenta en colores naranjos C1, colores verdes C3 y colores grises C5.

También se determinaron las unidades formadoras de colonias tolerantes a diésel, en este caso en el núcleo C1 no se identificaron colonias durante la operación de los núcleos (**Figura 21**). En los núcleos C3 y C5, se observa una tendencia similar entre tomas de muestras, la presencia de bacterias se reporta desde el inicio de la experiencia y se mantiene durante las 8 semanas, con un promedio de  $10^4$  UFC/g suelo seco el cual disminuye lentamente; sin embargo, la comunidad bacteriana hidrocarbonoclástica requiere de mayor tiempo para asentarse y ser detectable en el núcleo C5. Para el núcleo C5, se observa que el mayor recuento de unidades formadoras de colonias ocurre en S2, punto en el cual se empieza a detectar y de ahí en adelante disminuye su presencia. Se observa de este modo que la comunidad bacteriana hidrocarbonoclástica requiere de la bioestimulación para su desarrollo y su consecuente detección (**Anexo, Figura 13**).



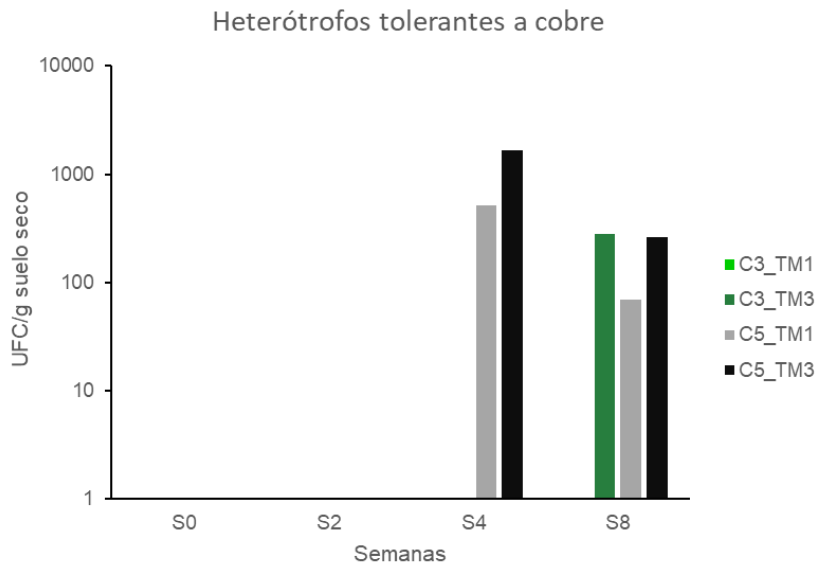
**Figura 21 | La comunidad bacteriana del suelo proveniente del sitio Las Salinas no reporta crecimiento en medios selectivos para degradadoras de HC.** Recuento de heterótrofos tolerantes a diésel en suelo, se presenta el logaritmo en base 10 del recuento de heterótrofos totales tolerantes a diésel, crecidos en medio BHB + diésel para la toma de muestra superior (TM1) y toma de muestra inferior (TM3), durante 56 días. Los ensayos fueron realizados con un n=2. Se presenta en colores crema C1, colores verdes C3 y colores grises C5.

Al evaluar el comportamiento de la comunidad bacteriana tolerante a cobre y diésel, se observa que el recuento es mucho menor, en el orden de  $10^3$  UFC por gramo de suelo seco (**Figura 22**), un orden de magnitud menor que los recuentos en diésel (**Figura 21**), siendo detectados desde S2 hasta S8 en el núcleo C5 en su toma inferior (TM3). No se observan unidades formadoras de colonias en el núcleo C1. El núcleo C3, solo reporta recuento de UFC en el tiempo S8, en la toma inferior (TM3).



**Figura 22 | La comunidad nativa del suelo Las Salinas no reporta bacterias cultivables tolerantes a cobre y diésel.** Recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de suelo en escala logarítmica durante 8 semanas, crecidos en LPTMS + 2 mM  $\text{CuSO}_4$  + diésel (S0-S8). Los ensayos fueron realizados con un n=2. Se presenta en colores crema C1, colores verdes C3 y colores grises C5.

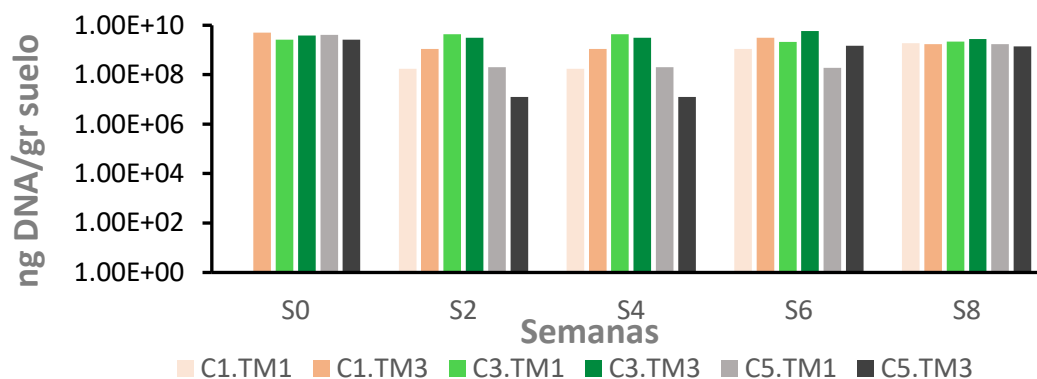
También se midieron las unidades formadoras de colonias tolerantes exclusivamente a cobre, en este caso solo obtuvimos recuento desde la S4 para los núcleos bioaumentados C3 y C5, este último presentó niveles similares entre sus tomas de muestras en un promedio de  $10^{2.5}$ , no así C3 que solo presentó bacterias en su toma inferior en S8 (**Figura 23**).



**Figura 23 | La exposición a cobre permite la selección efectiva de heterótrofos cultivables tolerantes a cobre en suelo.** Se presenta el recuento de heterótrofos tolerantes a cobre por gramo de suelo en escala logarítmica, crecidos en medio LPTMS + 2 mM CuSO<sub>4</sub>. Los ensayos fueron realizados con un n=2. Se presenta en colores crema C1, en colores verdes C3 y en colores grises C5.

### Monitoreo de parámetros moleculares

El monitoreo de parámetros moleculares se realizó en los núcleos control (C1), bioestimulado y bioaumentado (C3) y bioestimulado y bioaumentado en suelo co-contaminado con cobre (C5), para esto se extrajo el ADN de las muestras. Se logró extraer ADN de todos los núcleos de suelo, en todas las semanas (**Figura 24**). C5 en las semanas 2, 4 y 6 reportó una menor cantidad en comparación a C1 y C3, siendo la S0 y S8 las semanas donde la cantidad de ADN extraído fue similar (**Figura 24**).



**Figura 24 | Extracción de DNA efectiva en todos los tratamientos evaluados.** Se presenta la cantidad de ADN extraído por gramo de suelo [ng/g suelo] en todos los núcleos y sus tomas de muestras superior (TM1) e inferior (TM3) por semana. El eje vertical se ajustó en escala logarítmica en base 10. En colores naranjos se presenta C1, en colores verdes C3 y en colores grises C5.

Con el fin de evaluar el proceso de biorremediación se realizó seguimiento de los genes de degradación de HC, *alkM* de DD78 (*alkM\_ac78*), *alkB* de AA64 (*alkB\_ac64*), *alkB2* de ICBD2 (*alkB2\_rh*), los partidores utilizados tienen una especificidad taxonómica hasta el nivel de especie, por lo cual además de dar cuenta de la distribución y cantidad de los genes en sí, permiten hacer un seguimiento de las especies *A. radioresistens*, *A. tandoii* y *R. erythropolis*. También se hizo seguimiento del gen *alkB* de DN36 (*alkB\_ps*), el partidor utilizado para este gen posee especificidad taxonómica hasta género. Para cada uno de estos genes se construyó su respectiva curva de calibración (**Anexo, Figura 7**). Otra medida de monitoreo de la comunidad bacteria fue la cuantificación de los genes de respuesta a cobre frente a un suelo con co-contaminación, para esto se midió el número de copias por gramo de suelo de los genes *acrD* de DN36 (*acrD\_ps*), *actP* de DD78, AA64 y DN36, *copA* de DN36 (*copA\_ps*) y para AA64 y DD78 (*copA\_ac*) los partidores de estos genes fueron diseñados para alcanzar una especificidad taxonómica de género. También se diseñaron partidores para cuantificación de *copB* de ICBD2 (*copB\_rh*), siendo estos específicos a nivel de especie. Al realizar una simulación *in silico* mediante primerBLAST (*online*) resultó que los presentan un solo un amplicón cuantificable cuando se utiliza como genoma de referencia el concatenado de las cepas pertenecientes al consorcio (**Anexo, Tabla 5**). La determinación absoluta del número de copias se realizó mediante la construcción de curvas de calibración (**Anexo, Figura 8**).

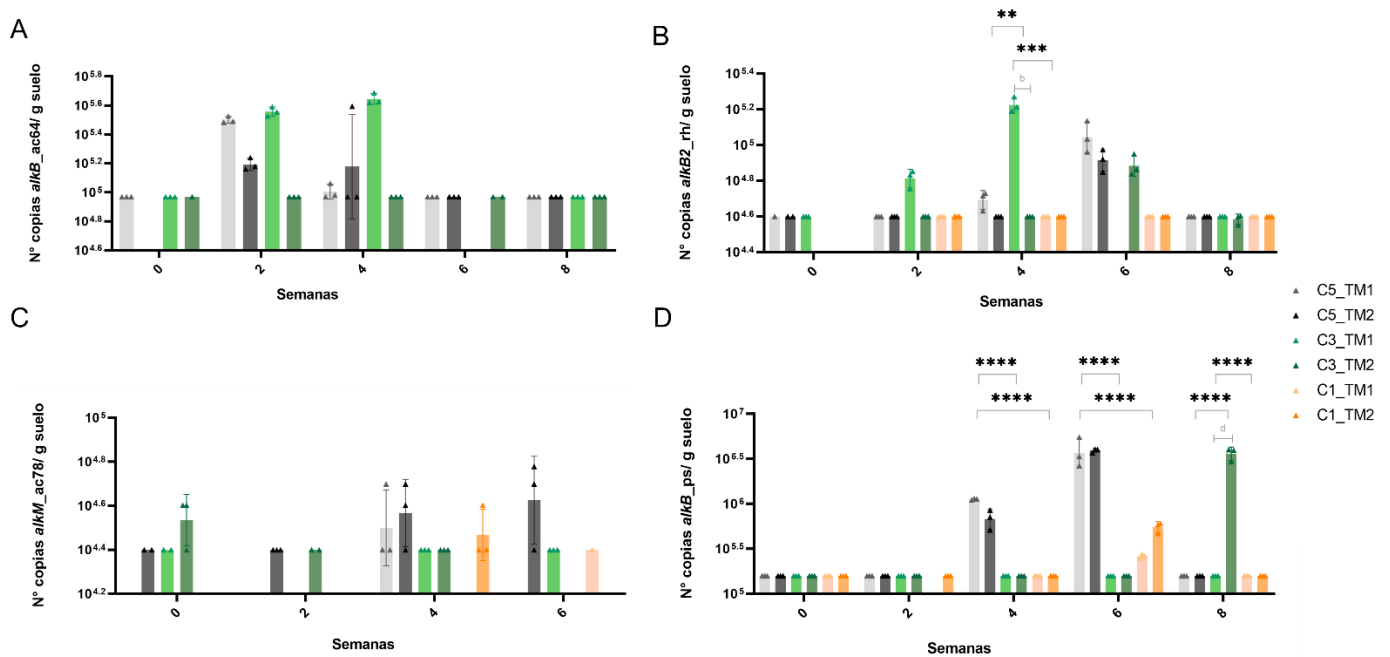
Se cuantificó el número de copias presentes en el suelo para cada uno de estos genes con una periodicidad de 15 días durante 8 semanas, las muestras fueron analizadas por triplicado a partir de una réplica biológica. La relevancia de los datos se determinó mediante una prueba estadística ANOVA de dos vías, el efecto del cada uno de los tratamientos se evaluó por Tukey's, con un valor alfa 0,05. Así también las posibles diferencias por toma de muestra (inferior y superior) se evaluó por la prueba Sidak's, donde se analizaron los datos por mediciones repetidas.

### Cuantificación absoluta genes de degradación de HC

Los genes de degradación de HC se monitorearon para hacer un seguimiento molecular de la comunidad bacteriana con potencial degradador. Se observó una clara distribución entre condiciones de estudio, de este modo los núcleos bioaumentados (C3 y C5) son los únicos en los cuales se pudo realizar la cuantificación de los genes de degradación *alkB\_ac64*, *alkM\_ac78* y *alkB2\_rh* (**Figura 25**).

La cuantificación de *alkB* para *Acinetobacter* AA64, se registró en gran cuantía durante la semana 2 en los núcleos C3 y C5, llegando a las  $10^5$  copias/g suelo. Para el caso de *alkM* hubo una diferencia en el comportamiento reportando un orden de magnitud menor en C5 entre S4 y S8. Tanto *alkB\_ac64* como *alkM\_ac78*, no pudieron ser cuantificados de manera de cumplir con las exigencias mínimas para aplicar pruebas estadísticas (**Figura 25 A y C**). La cuantificación de *alkB2\_rh* no fue posible el núcleo C1, dado que sus valores solo fueron detectados y no superaron el límite de cuantificación (4,6); sin embargo, fue detectado desde S2-S8, en la S4 se evidenciaron diferencias significativas entre los núcleos bioaumentados y el suelo control (**Figura 25 B**). Con respecto a *Stutzerimonas* se realizó el seguimiento a través del gen *alkB*, este fue el único gen que pudo ser cuantificado en el suelo control en la S6, en el núcleo C3 el número de copias se encontró se registró menor al límite de cuantificación, por lo cual fue solo detectado. El mayor número de copias fue registrado en la S6 en el núcleo C5, durante las semanas 4 y 6 se evidenciaron diferencias significativas entre los núcleos bioaumentados y el control, el número de copias en C3 hacia el final de la experiencia tuvo un incremento significativo (**Figura 25 D**).



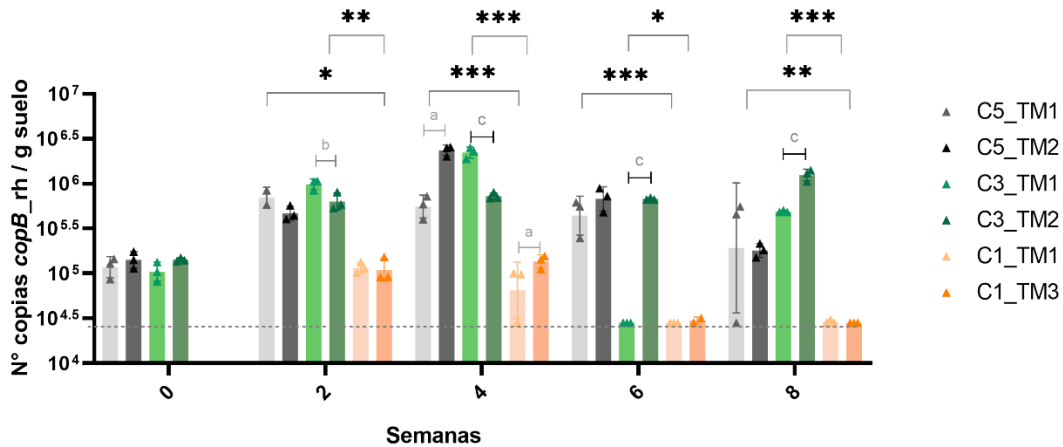


**Figura 25 | | Monitoreo de genes de *alkB*, *alkB2*, *alkM* y *alkB\_ps* durante el proceso de biorremediación.** Se presenta el número de copias de cada uno de los genes por gramo de suelo en escala logarítmica **A)** Cuantificación de *alkB* representando *Acinetobacter* sp. AA64 **B)** Cuantificación de *alkB2* representando *Rhodococcus* sp. ICBD2 **C)** Cuantificación de *alkM* representando a *A. radioresistens* DD78 **D)** Cuantificación de *alkB* representando a *Stutzerimonas* sp. DN36. En la gráfica se presentan los valores individuales de cada medición  $n=3$ , y su desviación estándar. Con asterisco se presentan los resultados de la prueba de comparación múltiple Turkey's, \*\*\*\*=  $P: <0,0001$ , \*\*\* =  $P: 0,0001$ , \*\* =  $P: 0,0014$ . Con letras se presentan los resultados de la prueba de Sidak's a=0,0298, b=0,0057, c=0,0002 y d<0,00001. En colores rosados se presentan la toma muestra superior (TM1) e inferior (TM3) del núcleo C1, colores verdes se presentan la toma muestra superior (TM1) e inferior (TM3) del núcleo C3 y colores grises se presentan la toma muestra superior (TM1) e inferior (TM3) del núcleo C5.

### Quantificación absoluta genes de resistencia a cobre

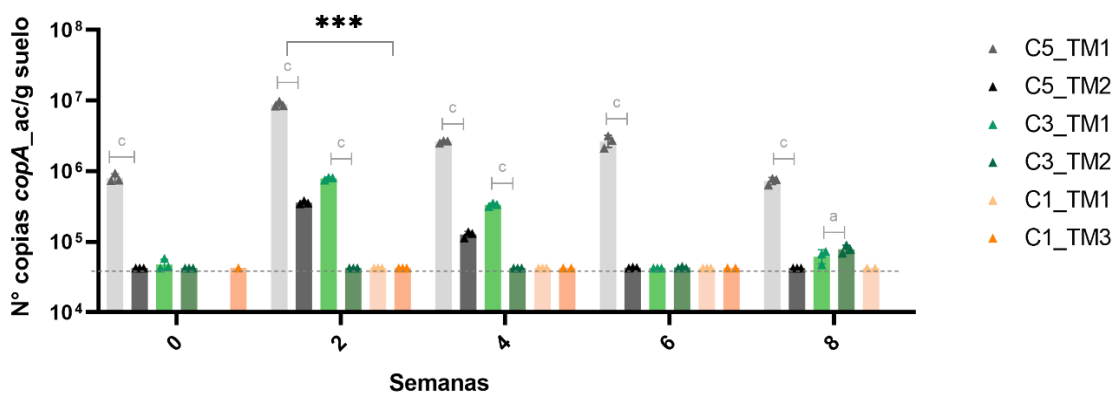
La respuesta de la comunidad bacteriana frente a un contaminante metálico como lo es el cobre, se monitoreo siguiendo los géneros *Stutzerimonas*, *Acinetobacter* y *Rhodococcus*, para esto se cuantificaron los genes *copA*, *copB*, *actP* y *acrD* en todos los tratamientos (C1, C2 y C3) durante el tiempo que se operaron los núcleos. Los genes de respuesta a cobre se detectaron y cuantificaron en mayor abundancia que los genes de degradación de HC y fue posible detectar todos los genes en los núcleos (**Figura 26-30**).

La cuantificación de *copB* indicó cambios significativos entre los núcleos desde la semana 2 en adelante, los núcleos C5 y C3 presentaron significativas diferencias en el número de copias con su control C1; el mínimo de copias por gramo de suelo cuantificado fue de aproximadamente  $10^5$  copias/g suelo. Se observaron diferencias entre las tomas de muestras superior e inferior desde la semana 2 en adelante, para los núcleos C3, el núcleo C5 solo presentó diferencias entre sus tomas de muestras en la semana 4 al igual que C1. En el núcleo C1 *copB* fue detectado desde la semana 2 en adelante y esto se mantuvo siempre en menor magnitud que en los núcleos C3 y C5, los cuales presentaron su mayor nivel de cuantificación en la semana 4. El límite de cuantificación estimado a partir de la curva de calibración fue menor a 22.387 copias por gramo de suelo (**Figura 26**).



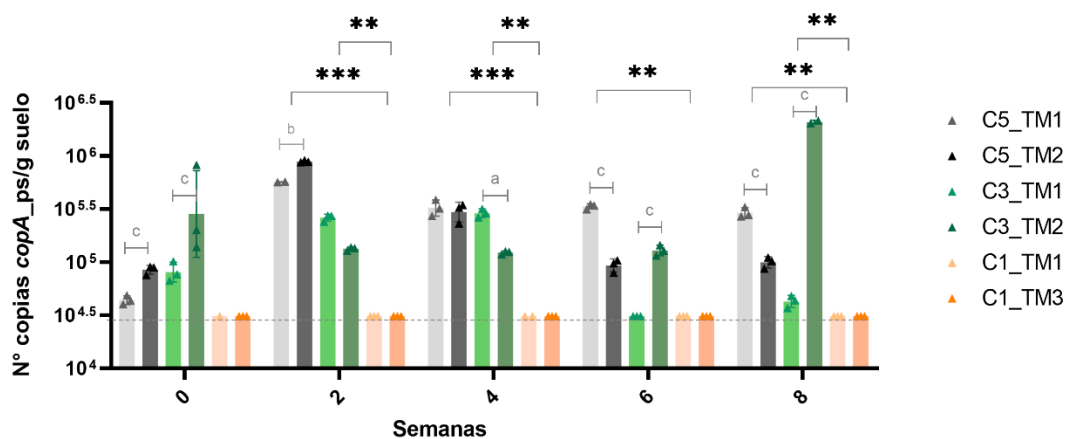
**Figura 26 | Cuantificación absoluta por qPCR de *copB\_rh* en suelo.** Promedio del número de copias de *copB\_rh* por gramo de suelo, presentado en su forma logarítmica en base 10, se indican los valores individuales de cada medición ( $\Delta$ ) y su desviación estándar, n=3. En colores naranja se presentan el núcleo C1, en colores verdes núcleo C3 y en colores grises núcleo C5, con línea punteada se representa el límite de cuantificación igual a 4,35. Los valores P de la prueba de comparación múltiple Tukey's, 0,12 (ns), 0,033 (\*), 0,002 (\*\*), <0,001 (\*\*\*). Con letras se presentan los resultados de la prueba de Sidak's 0,12 (a), 0,033 (b), 0,002 (c), <0,001 (d).

La cuantificación de *copA\_ac* no mostró tantas diferencias significativas entre los núcleos, solo en la semana 2 C5 presentó diferencias significativas con el control C1. Desde la semana 0 en adelante, se reportaron diferencias significativas entre las tomas de muestras superiores e inferiores del núcleo C5. *copA\_ac* fue cuantificado principalmente en el núcleo C5, desde la semana 0 hasta la semana 8, siendo la semana 2 el tiempo de mayor cuantía. En el núcleo C3 fue detectado desde el inicio de la experiencia, pero sólo en las semanas 2, 4 y 8 supero el límite de cuantificación. *copA\_ac* no fue cuantificado en C1; sin embargo, si detectado (**Figura 27**). El límite de cuantificación estimado de la curva de calibración fue menor a 31.622 copias por gramo de suelo.



**Figura 27 | Cuantificación absoluta por qPCR de *copA\_ac* en suelo.** Promedio del número de copias de *copA\_ac* por gramo de suelo, presentado en su forma logarítmica en base 10, se indican los valores individuales de cada medición ( $\Delta$ ) y su desviación estándar, n=3. En colores naranja se presentan el núcleo C1, en colores verdes núcleo C3 y en colores grises núcleo C5, con línea punteada se representa el límite de cuantificación igual a 4,55. Los valores P de la prueba de comparación múltiple Tukey's, 0,12 (ns), 0,033 (\*), 0,002 (\*\*), <0,001 (\*\*\*). Con letras se presentan los resultados de la prueba de Sidak's 0,12 (a), 0,033 (b), 0,002 (c), <0,001 (d).

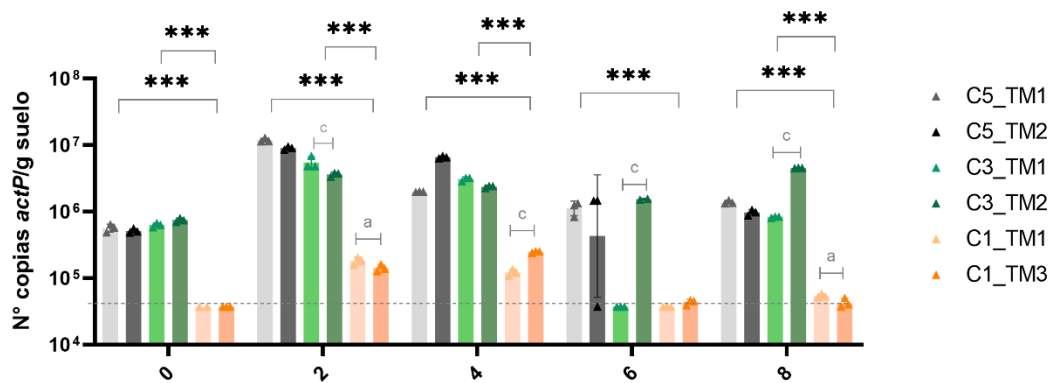
A diferencia de la cuantificación de *copA* en *Acinetobacter*, en el género *Stutzerimonas copA\_ps* fue cuantificado desde la semana 0 en los núcleos C5 y C3, alcanzando el mayor número de copias en la semana 8 por el núcleo C3. La distribución de este gen en el núcleo C5 fue con un gran aumento en la parte inicial de la experiencia, llegando a las 316.227 copias por gramo de suelo, para luego disminuir en el tiempo, teniendo una cuantificación final de aproximada de 100.000 copias/g suelo; en este núcleo el número de copias/g suelo varió entre tomas de muestras, especialmente en las semanas 0, 6 y 8. Para C3 se reportaron un número máximo de copias en la semana 8 de cerca de 2 millones de copias/g suelo en la toma de muestra inferior. Se indican diferencias significativas en el recuento de copias en la semana 2, 4 y 8 con respecto al suelo control, así también las semanas 0, 6 y 8 reportan una mayor diferencia entre tomas de muestras (**Figura 28**). El gen *copA\_ps* fue detectado, pero no cuantificado en suelo control durante todo el experimento.



**Figura 28 | Cuantificación absoluta por qPCR de *copA\_ps* en suelo.** Promedio del número de copias de *copA\_ps* en suelo Promedio del número de copias por gramo de suelo, presentado en su forma logarítmica en base 10, se indican los valores individuales de cada medición ( $\Delta$ ) y su desviación estándar,  $n=3$ . En colores verdes núcleo C3 y en colores grises núcleo C5, con línea punteada se representa el límite de cuantificación igual a 4,4. Los valores P de la prueba de comparación múltiple Tukey's, 0,12 (ns), 0,033 (\*), 0,002 (\*\*), <.001 (\*\*\*)). Con letras se presentan los resultados de la prueba de Sidak's 0,12 (a), 0,033 (b), 0,002 (c), <0,001 (d).

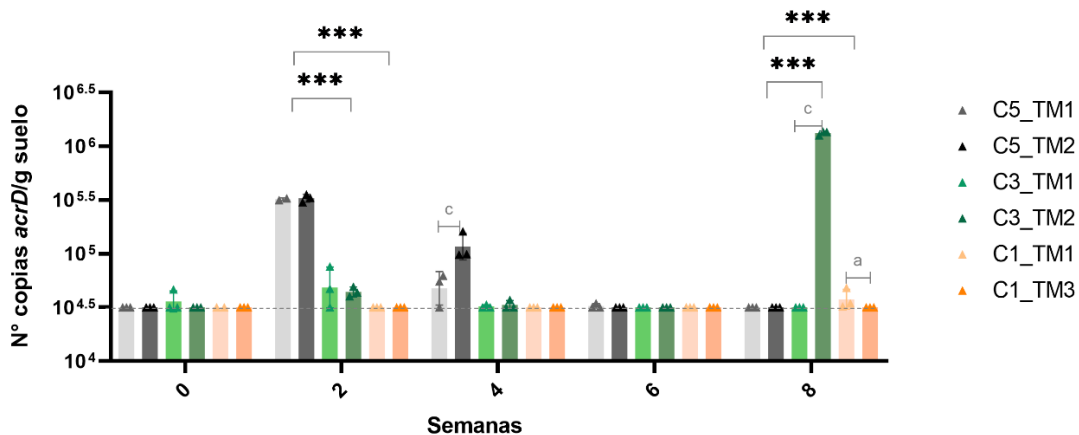
El gen *actP* codifica un transportador de cobre tipo P y fue el gen que se vio mayormente detectado en los tratamientos C5, C3 y C1, con un promedio de cuantificación de  $10^{6.3}$ ,  $10^6$  y  $10^{4.8}$  copias por gramo de suelo respectivamente. Se observaron diferencias significativas entre los tratamientos en todas las semanas, donde los núcleos bioestimulados y bioaumentados reportaron más copias del gen que su respectivo suelo control. El núcleo C5 reportó una cuantificación de 10 millones de copias/g suelo en la semana 2, durante las siguientes semanas la disminución de *actP* fue paulatina hasta finalizar en un orden de magnitud menor. En el tratamiento con co-contaminación con cobre no se reportaron diferencias entre las tomas de muestras para el número de copias de *actP*. El núcleo C3 alcanzó su punto máximo de cuantificación en la S8 en la TM3; sin embargo, niveles similares de cuantificación se reportaron durante la semana 2 y 4, en el orden de  $10^{6.5}$  copias/g suelo. Se identificaron diferencias entre las tomas de muestras para la semana 2, 6 y 8. Para el caso del suelo control C1, éste fue

detectado desde la semana 0, y cuantificado desde la semana 2 hasta la semana 4. El límite de cuantificación obtenido para *actP* fue de 31.622 copias por gramo de suelo (**Figura 29**).



**Figura 29 | Cuantificación absoluta por qPCR de *actP* en suelo.** Promedio del número de copias de *actP* por gramo de suelo, presentado en su forma logarítmica en base 10, se indican los valores individuales de cada medición ( $\Delta$ ) y su desviación estándar, n=3. En colores naranjas se presentan el núcleo C1, en colores verdes núcleo C3 y en colores grises núcleo C5, con línea punteada se representa el límite de cuantificación igual a 4,5. Los valores P de la prueba de comparación múltiple Tukey's, 0,12 (ns), 0,033 (\*), 0,002 (\*\*), <0,001 (\*\*\*). Con letras se presentan los resultados de la prueba de Sidak's 0,12 (a), 0,033 (b), 0,002 (c), <0,001 (d).

La cuantificación de *acrD\_ps* fue la menor en promedio de los genes de respuesta a cobre, en términos generales la cuantificación entre núcleos fue bastante similar; sin embargo, existieron diferencias en las semanas 2, 4 y 8, con respecto al control. Siendo en esta cuantificación la única en la que se reportaron diferencias significativas entre C3 y C5. En las semanas 2 y 4 en el núcleo C5 fueron detectados los más altos niveles de *acrD\_ps* llegando a  $10^5$  copias por gramo de suelo (**Figura 23**). El límite de cuantificación estimado de la curva de calibración fue menor a 5,47 copias por gramo de suelo.



**Figura 30 | Cuantificación absoluta por qPCR de *acrD\_ps* en suelo.** Promedio del número de copias de *acrD\_ps* por gramo de suelo, presentado en su forma logarítmica base 10, se indican los valores individuales de cada medición ( $\Delta$ ) y su desviación estándar, n=3. En colores naranjas se presentan el núcleo C1, en colores verdes núcleo C3 y en colores grises núcleo C5, con línea punteada se representa el límite de cuantificación igual a 4,5. Los valores P de la prueba de comparación múltiple Tukey's, 0,12 (ns), 0,033 (\*), 0,002 (\*\*), <0,001 (\*\*\*). Con letras se presentan los resultados de la prueba de Sidak's 0,12 (a), 0,033 (b), 0,002 (c), <0,001 (d).

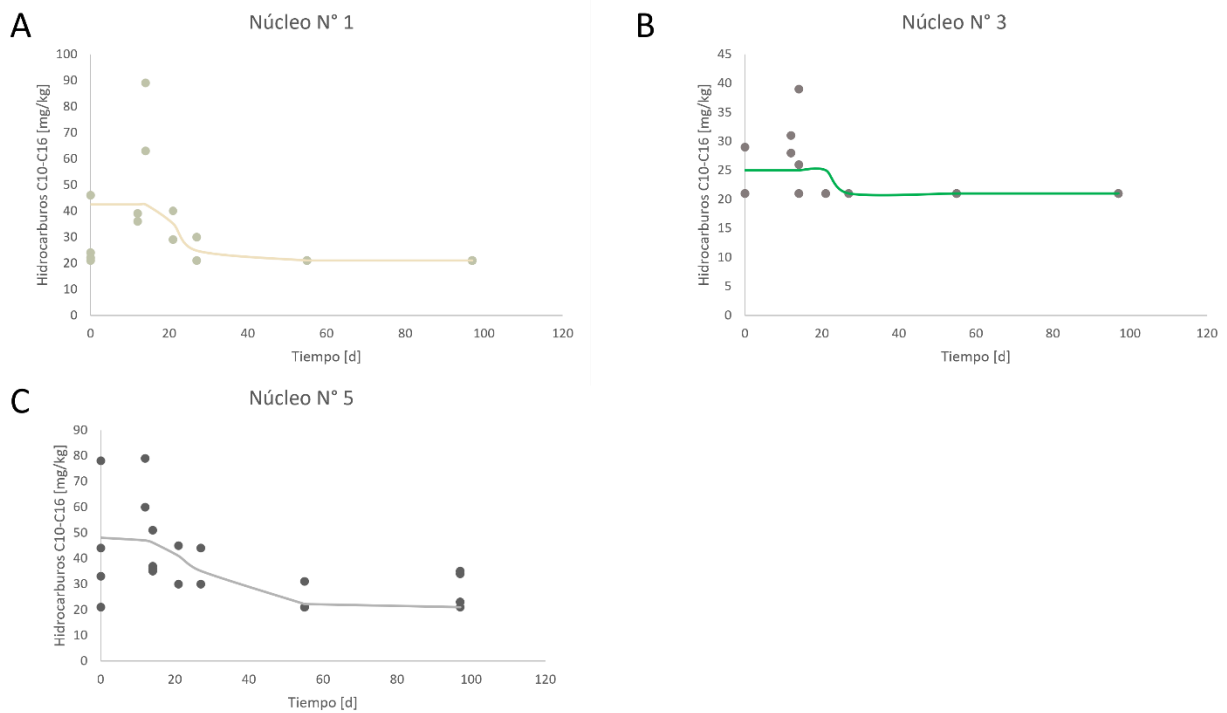
Los análisis estadísticos nos indican que para *copA\_ps* y *copB\_rh*, existe una interacción positiva extremadamente significativa entre las variables tratamiento y tiempo, con un valor P igual a  $P < 0,001$  e  $P = 0,001$ , con 8 y 6 grados de libertad respectivamente. Así también para el caso de estos genes el tipo de tratamiento es extremadamente significativo, solo hay un 0,001% de probabilidades de observar este fenómeno aleatoriamente. Para los genes *actP* y *acrD\_ps* la interacción entre el tiempo y el tratamiento también es positiva, con 8 grados de libertad y un valor  $P = 0,003$  para *actP* y  $P < 0,001$  para *acrD\_ps* tanto el tipo de tratamiento como el tiempo son extremadamente significativas. No así para *copA\_ac* donde no hay significancia para la interacción entre tiempo y tipo de tratamiento, no obstante, el tipo de tratamiento por sí solo es de gran relevancia, con un 0,001% de probabilidad aleatoria.

En términos generales, se puede observar que la cuantificación de genes de respuesta a cobre en el suelo proveniente del suelo Las Salinas, es mucho menor que en el mismo suelo bioestimulado y bioaumentado. El gen *copA* poseen una distribución diferente entre los géneros *Stutzerimonas* y *Acinetobacter*, siendo en el primer género la cuantificación más abundante y contundente que en el segundo. *acrD* es el gen que se cuantifica en menor medida y es éste el que representa tan solo a *Stutzerimonas*. Por otro lado, *actP* es el gen con mayor cuantificación, siendo este el gen con el diseño de partidores más degenerado, representando tanto a *Acinetobacter* como a *Stutzerimonas*, la segunda mayor cuantificación fue para el gen *copB\_rh*. Curiosamente la TM3 del núcleo C3 en la semana 8 presenta una alta cuantía de los genes *actP*, *copA\_ps*, *copB\_rh* y *acrD\_ps*.

### Degradación de HC en el núcleo de suelo

La concentración de HC presente en los núcleos fue determinada por la empresa de servicios analíticos ALS Limitada (Santiago), se analizaron dos fracciones de TPH: una fracción liviana, que considera HC de cadenas de carbono del rango  $C_{10}$  a  $C_{16}$ , y una fracción media, con HC en el rango de  $C_{16}$  a  $C_{34}$ . Se observó que luego de 8 semanas de operación algunos núcleos no habían alcanzado su límite de cuantificación por lo cual se mantuvo en operación hasta tomar un punto final luego de 14 semanas de operación.

Los núcleos C1 y C5 reportaron mayores niveles de contaminación de HC de cadena corta, siendo las concentraciones iniciales aproximadas 40 y 45 mg/kg respectivamente (**Figura 31 A y C**). Luego de 5 semanas de operación todos los núcleos reportaron concentraciones en límite de cuantificación (21 mg/kg).



**Figura 31** | | Tasa de remoción de HC de fracción C10-C16 de los núcleos de suelo según modelo de Gompertz modificado. Se muestra la tasa de remoción de HC por día de los núcleos C1 (A), C3 (B) y C5 (C) [mg/kg d]. Se presentan los valores individuales de cada muestra y una línea de tendencia que representa la tasa de remoción.

La determinación del porcentaje de remoción para los HC de cadena media y/o larga se realizó comparando la fase inicial de operación con la porción final, de este modo se obtuvo que el núcleo C1 ocurrió un 50% de remoción, C3 un 77% de remoción y C5 un 84% (**Tabla 15**).

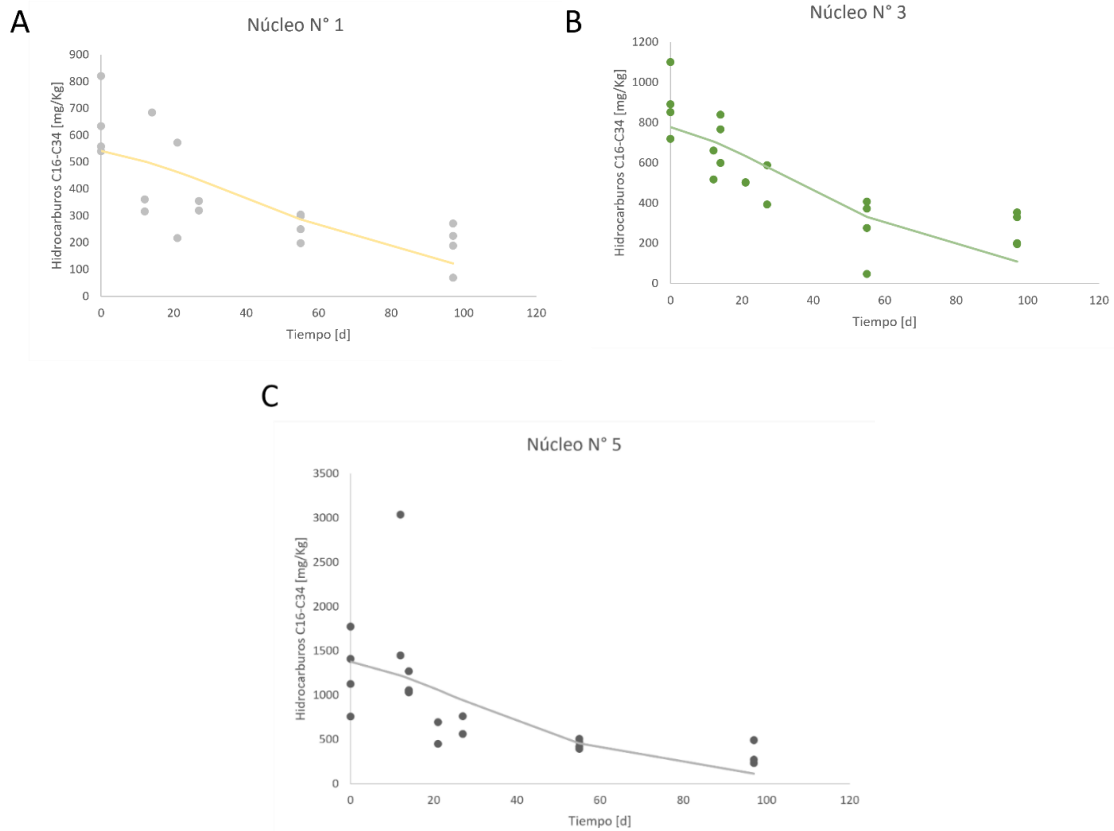
**Tabla 15** | Remoción de HC C<sub>16</sub>-C<sub>34</sub> en los núcleos de suelo.

| Núcleo   | Remoción semana<br>S8 [%] | Remoción semana<br>14 [%] | Rm   |
|----------|---------------------------|---------------------------|------|
| Núcleo 1 | 26,6                      | 50,3                      | 5,4  |
| Núcleo 3 | 77,1                      | 77,1                      | 9,4  |
| Núcleo 5 | 80,7                      | 83,8                      | 19,7 |

\* Se presentan los porcentajes de remoción luego de 8 y 14 semanas de operación de los núcleos de suelo y la tasa máxima de remoción Rm.

La regresión no lineal que sigue el modelo de Gompertz modificado arrojo como valor de Rm para el núcleo C1 5,4 [mg/kg d], núcleo C3 9,4 [mg/kg d] y núcleo C5 19,7 [mg/kg d] (**Figura 32**), de este modo el núcleo C5 es el que presenta una tasa de remoción más alta para HC de cadena

larga. Las concentraciones de HC iniciales fueron diferentes entre cada uno de los núcleos, siendo C3 y C5 los suelos con mayor contaminación (**Figura 32 B y C**).



**Figura 32 | Tasa de remoción de HC de fracción C16-C34 de los núcleos de suelo según modelo de Gompertz modificado.** Se muestra la tasa de remoción de HC por día de los núcleos C1 (A), C3 (B) y C5 (C) [mg/kg d]. Se presentan los valores individuales de cada muestra y una línea de tendencia que representa la tasa de remoción.

## Discusión

Los metales pesados (MP) que se encuentran en el suelo pueden tener un origen natural según su composición geoquímica o antropogénico. En el caso de Chile las características del suelo se ven fuertemente influenciadas por la actividad industrial, principalmente de la minería, siendo el cobre el metal que más presencia tiene por sobre los límites establecidos. La presencia de los MP es tóxica para los organismos del suelo, disruptiendo los procesos de degradación de la materia orgánica, fijación de nitrógeno, respiración, entre otros, afectando severamente el potencial urbano o productivo de las áreas afectadas (Acevedo et al., 2005).

El cobre es el 25° metal más abundante en la corteza terrestre, el 99,8 % de las muestras de suelo contienen más de 50 mg de cobre y se estima que la concentración promedio mundial de cobre en suelo es de 20 mg/kg (Adriano, 2001).

### Base de datos HMR\_gen

Hoy en día este metal levanta muchísimo interés, siendo el segundo después del zinc en cantidad de publicaciones en el área de genética molecular, al buscar “*copper gen*” aparecen 1,82 millones de artículos científicos (Google Scholar, consultado online 10/2022). En ese sentido la disponibilidad de información que se recaba día a día adquiere más importancia, sobre todo al momento de crear bases de datos recopiladas con información validada experimentalmente. HMR\_gen se posiciona como una base de datos de genes de resistencia a metales curada manualmente que responde al conocimiento actual disponible. El estudio de los genes de resistencia a metales pesados (HMRG), se ha visto estrechamente relacionado con los genes de resistencia a antimicrobianos (ARGs), por lo cual las bases de datos existentes también se han visto fuertemente ligadas a biocidas como los antibióticos. Bases de datos recientemente desarrolladas como MEGARes 2.0 mantienen esta tendencia siendo además una adaptación de BacMet para el uso en metagenómica. Esta base de datos, además de incluir ARGs y HMRG incorpora mecanismos de respuesta y nuevos grupos de clasificación de HMRG (Doster et al., 2020). BacMet (Pal et al., 2014) es la base de datos más actualizada y extensa disponible actualmente, recopila genes de respuesta frente a biocidas en general, incluyendo HMRG y ARGs, y ha sido utilizada en numerosas publicaciones como fuente de referencia (Doster et al., 2020; Majumdar et al., 2022; Wang et al., 2023; Zhu et al., 2022).

A diferencia de otras bases de datos existentes, HMR\_gen esta enriquecida con HMRG descritos en bacterias ambientales. Géneros como *Cupriavidus*, *Achromobacter* y *Pseudomonas* componen mayormente a HMR\_gen (**Figura 11**), a diferencia de bases de datos establecidas, siendo llamativo que estos géneros bacterianos se han descrito fuertemente en la degradación de HC y otros contaminantes orgánicos (Chikere et al., 2011; Leahy and Colwell, 1990). La incorporación de géneros aislados desde matrices ambientales y la inclusión de genes con evidencia experimental aumenta las posibilidades y proyecciones al ser utilizadas por estudios asociados a microbiología ambiental. Esta base de datos además considera la clasificación de HMRG en función de sus mecanismos de respuesta generales: transporte transmembrana, incluyendo tanto entrada (*intake*) como salida (*efflux*) de estos iones, regulación de los componentes involucrados respuesta por metales (transcripción), unión de proteínas (secuestro), oxidorreducción (redox) y modificaciones químicas (*cleavage*, *methyl/phosphatase*). Estas



clasificaciones responden al acuerdo implícito que se ha generado en la literatura (Blindauer, 2011; Nies, 2003; Zhu et al., 2022). Además, la base de datos se ha categorizado incluyendo submecanismos de acción, detallando aún más la participación de estos genes en los procesos celulares.

### **Cepas bacterianas y determinantes genéticos de respuesta a cobre**

Al emplear HMR\_gen para la identificación *in silico* de genes de respuesta a cobre (*query*) en los genomas de cepas bacterianas ambientales, se obtuvieron datos contundentes y robustos (**Figura 12**), que al ser comparados con bases de datos más generales como NCBI o UniprotKB/SwissProt no presentaron diferencias en la anotación, validando así las entradas contenidas en HMR\_gen. Además, la estrategia de identificación mediante un análisis BBH con un alineamiento de tipo tBLASTn permite excluir las limitaciones propias de la anotación automática de los genomas y las diferencias que éstas podrían presentar con respecto a las entradas disponibles en la base de datos (Médigue and Moszer, 2007; Salzberg, 2019; Tanizawa et al., 2018).

La correlación entre número de genes identificados y la tolerancia experimental a cobre, obtenidas en este trabajo, son un ejemplo de lo ventajosas que pueden llegar a ser las herramientas computacionales y las predicciones *in silico* (Bhatt and Barh, 2018). *Stutzerimonas* sp. DN36 fue la cepa que presentó el mayor número de genes de respuesta a cobre (**Figura 12**) y a su vez presentó una de las tolerancias más altas frente a este mismo metal (**Figura 15**). *A. radioresistens* DD78 y *Acinetobacter* sp. AA64 siguieron en número de identificación de genes, correlacionándose con que *A. radioresistens* DD78 presentó la segunda CIM más alta. Así también *Rhodococcus* sp. ICBD2 cepa con el menor número de genes de respuesta cobre tuvo la menor CIM reportada; siendo este uno de los primeros resultados interesantes en este trabajo. No se encontraron publicaciones que mencionaran la identificación *in silico* de genes de respuesta a cobre en bacterias ambientales con su consiguiente comprobación experimental. Sin embargo, durante los últimos años la identificación *in silico* se ha utilizado ampliamente para la categorización de determinantes genéticos y la definición de nuevos grupos enzimáticos a partir de muestras ambientales (Marques de Oliveira et al., 2007). En otros estudios, la comunidad bacteriana presente en suelos crónicamente contaminados con HC han permitido identificar ARGs y de respuesta a metales pesados en metagenomas bacterianos, reportando la presencia de una miríada de genes de respuesta a metales (Salam, 2020).

### **Caracterización del consorcio bacteriano**

Se ha reportado que *Acinetobacter* sp. AA64, *A. radioresistens* DD78, *Stutzerimonas* sp. DN36 y *Rhodococcus* sp. ICBD2 no presentan antagonismo entre ellas (Macaya, LABMMBA, No publicado), permitiendo así su uso en conjunto. La caracterización de las capacidades individuales de cada cepa bacteriana es importante para estimar su comportamiento en un suelo co-contaminado. Dos de las cepas pertenecientes al consorcio presentan una alta tolerancia al cobre (**Figura 15**), y observamos que el conjunto de especies al verse expuestas a concentraciones entre 5 y 15 mM de cobre- en suelo aumentan su capacidad de crecimiento (**Figura 18**). Este comportamiento es coherente con su origen ambiental; las cepas pertenecientes a los géneros *Acinetobacter* y *Stutzerimonas* fueron aisladas de la ribera del río Aconcagua, este sector se ha visto fuertemente afectado por la actividad minera y por la

presencia de fundiciones en su cercanía, altos niveles de metales pesado como el cobre, zinc, cromo y plomo, fueron medidos en este sitio, siendo el cobre el metal más abundante con concentraciones de 300 mg/kg (4,76 mM) a 700 mg/kg (11 mM) (Fuentes et al., 2016; Méndez et al., 2017). La exposición frecuente en el ambiente a agentes considerados estresores, desencadena el desarrollo de mecanismos de respuesta que facultan a las especies para habitar estos ambientes contaminados (Hassen et al., 1998). Cada una de las cepas del consorcio tiene determinantes genéticos de respuesta a cobre (**Figura 12**), los cuales se sitúan en un contexto genómico afín a la detoxificación celular o transformación del metal (**Figura 14**). Prevalen mecanismos asociados al transporte destacando bombas de flujo de expulsión, éste pareciera ser el mecanismo predilecto para la resistencia a cobre dentro de las bacterias ambientales pertenecientes a los géneros *Stutzerimonas* y *Acinetobacter* (Zhu et al., 2022). Sin embargo, el conglomerado de genes de respuesta a cobre de cada una de las especies bacterianas es particular y único, la localización genómica también lo es, por lo cual, el contexto genómico puede ser determinante y a pesar de tener grandes similitudes, por ejemplo, entre géneros esto puede definir una respuesta general totalmente diferente entre especies (Nature, 2019). Es así, como encontramos que dos cepas pertenecientes a un mismo género -*Acinetobacter*- pueden tener perfiles de tolerancia muy diferentes. En el estudio de Méndez *et al.*, dónde se realizó el aislamiento de *A. radioresistens* DD78, se observó que al someter a diferentes especies a un ensayo de tolerancia a metales en medio LPTMS sólido suplementado con 0,2% de succinato de sodio, especies identificadas dentro de un mismo género como *A. radioresistens* DD79 y *A. radioresistens* DD75, presentaban una CIM  $\text{Cu}^{+2}$  ( $\text{CuCl}_2$ ) de 0,8 y 1,5 mM respectivamente. Por otro lado, en este mismo estudio se observó que dos cepas pertenecientes al género de *Pseudomonas*, *P. stutzeri* DD74 y *P. stutzeri* DM88, tenían una CIM  $\text{Cu}^{+2}$  ( $\text{CuCl}_2$ ) de 1,6 y 0,53 mM respectivamente. Situación similar se observó con respecto a la tolerancia a cadmio y plomo (Méndez et al., 2017).

El cobre es un metal muy interesante ya que es considerado un micronutriente que participa en el metabolismo bacteriano, siendo parte de la célula a nivel estructural y funcional (Argüello et al., 2013), pero que a la vez a altas concentraciones inhibe la actividad enzimática, actuando como biocida (Borkow and Gabbay, 2005). Este trabajo ha permitido la caracterización de cada una de las cepas pertenecientes al consorcio frente a cobre, catalogándolas como cepas de alta tolerancia (*Stutzerimonas* sp. DN36 y *A. radioresistens* DD78) y cepas de baja tolerancia (*Acinetobacter* sp. AA64 y *Rhodococcus* sp. ICBD2). Se ha reportado en la literatura el aislamiento de cepas tolerantes a cobre en suelo chileno contaminado con concentraciones desde los 349 a 752 mg/kg de cobre (Altimira et al., 2012). Según las directivas de Kelly la concentración de cobre disponible en suelo agrícola superior a 500 mg/kg, es considerada alta (Edmundo Acevedo et al., 2005). Curioso es el comportamiento del consorcio el cual ha demostrado ser tolerante a cobre, pues a concentraciones de 1800 mg/kg (30 mM) es detectado a niveles similares que su situación control (**Figura 18**). Habría sido interesante evaluar el comportamiento del consorcio en concentraciones de cobre aún más altas en suelo.

Las técnicas empleadas para la caracterización del consorcio fueron muy útiles; sin embargo, los resultados obtenidos no fueron totalmente consistentes y es interesante detenerse brevemente en esto. El análisis de tolerancia a cobre inicialmente se realizó mediante un lector de placas, en pocillos de 200  $\mu\text{L}$  de volumen, lo cual permitió el análisis de todas las cepas frente

a diversos metales en un breve período, mediante esta metodología se obtuvieron los valores CIM tentativos de cada una de las cepas del consorcio. No obstante, al determinar la capacidad de crecimiento en un volumen de 3 mL la tolerancia de las cepas no fue coincidente, se reportaron diferencias para todas las cepas, menos *Stutzerimonas* sp. DN36 (**Figura 15**). La determinación de CIM, se ha enmarcado en dos grandes estrategias: i) determinación en pocillos y ii) determinación en placa, si bien existen numerosas publicaciones que reportan la determinación de CIM para biocidas, antimicrobianos, metales y otras drogas, no existe un método único el cual permita la determinación de CIM, ya que ésta dependiera de las habilidades del microorganismo, como la organización en películas, producción de surfactantes y también del medio de cultivos seleccionado (Agarwal et al., 2020; Heydari et al., 2022; Hulankova, 2022; Mounaouer et al., 2014; Teitzel and Parsek, 2003). No obstante, existen instituciones como *Clinical and Laboratory Standards Institute* que han encargado de estandarizar estas técnicas desarrollando guías orientadoras para la determinación CIM. Por otro lado, se observó un interesante comportamiento cuando se enfrentó a las cepas a cobre en medio sólido, las cepas que registraron una alta tolerancia a cobre en medio líquido mostraron un menor crecimiento en medio sólido LPTM suplementado con 2 mM de cobre (**Figura 16**). Con la información recabada, no es posible determinar si esto corresponde a un efecto intrínseco de la respuesta bacteriana, es decir, activación de mecanismos distintos dependiendo del tipo de medio o si es un artefacto de la metodología seleccionada. El medio sólido a diferencia del medio líquido, limita la motilidad y comunicación bacteriana (Kearns, 2010). Es importante mencionar que el tratamiento metodológico consideró el uso de los tiempos y temperaturas óptimas de crecimiento conocidas para las cepas en cuestión.

Por otro lado, la capacidad de crecimiento en distintas fuentes de carbono -HC alifáticos- de las cepas del consorcio, entregan una noción con respecto a su capacidad degradativa (Asperger and Kleber, 1991; Di Cello et al., 1997; Liu et al., 2014; Zampolli et al., 2014). El *n*-hexadecano es un compuesto modelo para el estudio de degradación de HC alifáticos de cadena media, debido a la gran diversidad de microorganismos capaces de degradarlo (Morovati et al., 2022). Se han empleado consorcios bacterianos con cepas *A. radioresistens* y cepas pertenecientes al género *Pseudomonas* para caracterizar la degradación de *n*-hexadecano a nivel de laboratorio en biorreactores (Nozari et al., 2014). A pesar de la baja solubilidad de este compuesto su degradación es rápida (Volke-Sepúlveda et al., 2003). En el año 2003, un estudio midió la diversidad bacteriana capaz de degradar *n*-hexadecano, en éste se identificaron los géneros bacterianos *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes* y otros (Bouchez Naitali et al., 2003). Considerando que el *n*-hexadecano es una molécula de fácil degradación y que se ha reportado que diversos géneros bacterianos son capaces de degradarla, no es sorprendente que todas las cepas del consorcio sean capaces de utilizarlo como fuente de carbono (**Figura 17**). Con respecto a la degradación de *n*-tetradecano un HC alifático de 14 carbonos, encontramos en la literatura una interesante experiencia donde se logra una remoción del 77% de *n*-tetradecano en suelo, utilizando una cepa de *Acinetobacter venetianus* inmovilizada (Lin et al., 2015). La ruta de degradación de C<sub>14</sub>H<sub>30</sub> consta en la activación del HC mediante la acción de una monooxigenasa seguida de la oxidación por una hidroxilasa, la acción consecutiva de estas enzimas permite la degradación del *n*-tetradecano hasta un ácido dicarboxílico simple (Li et al., 2021; van Beilen et al., 2003).

### **Ensayos pilotos de biorremediación**

El estudio de las dinámicas de suelo debe considerar los innumerables procesos que éste alberga -desarrollo de ciclos geobiológicos esenciales, interacción de sustancias orgánicas, afinidad/repulsión de cargas- y a sus diferentes componentes (Honorato, 1994). La caracterización física del suelo, mediante parámetros como la densidad y espacio intersticial permite clasificar el suelo y así estimar la interacción suelo-contaminante, estos parámetros se relacionan directamente con el tamaño de poro del suelo, el cual a su vez condiciona la permeabilidad y transferencia de masa en el suelo (Iturbe and Silva, 2015). Por otro lado, es reconocido que el suelo contiene una gran diversidad microbiana, como se mencionó 1 g de suelo puede contener más de 1000 especies bacterianas diferentes (Chikere et al., 2011). La determinación de la diversidad microbiana es un gran desafío, dada la heterogeneidad del suelo y el reducido número de bacterias ambientales cultivables, por lo cual se ha discutido ampliamente que la mejor manera de hacer seguimiento de especies bacterianas en suelo y de caracterizar a la comunidad que éste alberga, es complementando técnicas microbiológicas y moleculares (Chikere et al., 2011; J. et al., 2002; Shahi et al., 2016).

### **Monitoreo de la comunidad bacteriana cultivable**

En este trabajo se han integrado tanto técnicas microbiológicas tradicionales, como el recuento de heterótrofos totales, y técnicas moleculares como la cuantificación absoluta de genes específicos por qPCR en suelo. La exitosa detección del consorcio en suelo previamente esterilizado, válida la técnica de detección por recuento de UFC y además nos asegura que es posible detectar al consorcio bacteriano desde una muestra de suelo (**Figura 15**). Por otro lado, el uso de partidores especie específicos también nos garantizó la detección del consorcio en el suelo (**Figura 25**). El monitoreo biológico de los núcleos de suelo, entrega interesantes apreciaciones, se observa que la comunidad nativa del suelo proveniente del sitio Las Salinas no es detectable por cultivo hasta luego de 56 días iniciada la biorremediación, la aparición de heterótrofos totales en el suelo control es coincidente con la disminución de los niveles de TPH (**Figura 26-30**). Tampoco se observan heterótrofos tolerantes a diésel en el suelo control a ningún tiempo. Al observar la comunidad bacteriana, se encuentra una correlación muy interesante entre el número de UFC reportado para los heterótrofos resistentes a diésel y los heterótrofos resistentes a cobre y diésel, éstos presentan un patrón de crecimiento similar desde la S2 a la S8. Más interesante aún es el registro de heterótrofos tolerantes a diésel y a cobre exclusivamente en el núcleo C5. Este tratamiento fue el único que tuvo una alta exposición a cobre desde el inicio de la experiencia, además en este núcleo fue en el cual se registraron las más altas cuantificaciones de genes de respuesta a cobre (**Figura 26-30**). Considerando el nivel de exposición a cobre y los niveles de TPH, que se registran en la S2 y S4, es sorprendente la distribución de la capacidad de crecimiento de estos microorganismos en el ambiente co-contaminado, y cómo su mantención en el tiempo se relaciona con la drástica disminución de los HC. Se sugiere que la comunidad bacteriana podría activar un mecanismo de co-resistencia a HC estimulado por la exposición a cobre. Existe un estudio que evaluó la degradación de benceno bajo condiciones de co-contaminación con plomo y cadmio, en este no se observaron diferencias en la tasa de remoción de benceno; sin embargo, si notaron que la presencia de otros co-contaminantes impactaba en la composición bacteriana del suelo, para el caso del cadmio se observó una disminución en la diversidad bacteriana y para el plomo se observó la prevalencia de algunos géneros como *Ralstonia*, *Cupravidus* y *Rhodococcus* (Konya et al., 2022). Una

experiencia similar se llevó a cabo haciendo el seguimiento de la remoción de diésel en suelo co-contaminado con plomo y zinc, se inocularon 12 cepas nativas previamente aisladas de un sitio altamente contaminado con HC y metales en dos condiciones de microcosmos, suelo contaminado con diésel y suelo contaminado con diésel y metales, éstas fueron capaces de disminuir en un 75% la concentración de HC del suelo co-contaminado con metales (Sprocati et al., 2012).

#### **Seguimiento molecular del consorcio bacteriano**

Novedosamente, en 2022 se lanzó un *chip* de detección de elementos de respuesta a metales a nivel de comunidad bacteriana, MGR-Chip cuenta con la posibilidad detectar 56 genes de resistencias a metales, dentro de ellos cobre, mercurio, plata y plomo, entre otros, para esto diseñaron un amplio repertorio de partidores degenerados, los cuales fueron estandarizados y puestos a prueba mediante qPCR de alto rendimiento con muestras de suelo de montaña, de cultivos de arroz y sedimentos (Zhu et al., 2022). Las diferentes perspectivas que puede entregar el diseño de partidores, es un interesante aspecto para considerar al momento de realizar seguimiento de especies bacterianas, partidores de alta especificidad taxonómica brindan la posibilidad de hacer el seguimiento de cepas particulares, la disminución de la especificidad del partidador nos entregara luces con respecto al desempeño de géneros y/o la comunidad bacteriana (Trajanovska et al., 1997). Es así como al analizar la distribución de los genes *alk* podemos estudiar el comportamiento de una especie bacteriana específica. El partidador para el gen *alkB2* fue diseñado en base a la secuencia de *Rhodococcus sp.* ICB2, esta cepa corresponde a una especie nativa del suelo, el género *Rhodococcus* fue detectado, pero no cuantificado en C1 (suelo control) desde la S2 a la S8, lo cual es consistente con la procedencia de esta cepa. Por otro lado, los partidores del gen *alkB* dan cuenta del comportamiento del género *Stutzerimonas*, al ser estos partidores de menor especificidad es esperable encontrar señales en el suelo, aunque este carezca de la inoculación del consorcio (**Figura 25D**).

En cuanto al monitoreo de genes de respuesta a cobre hay algunos estudios que a partir de suelo agrícolas realizaron el seguimiento de *copA* y *pcoR* en suelos contaminados con diferentes concentraciones de cobre, en esta experiencia se reportaron  $4 \times 10^9$  copias de genes/g suelo seco en la comunidad bacteriana para una contaminación de 500 mg/kg de cobre (Kang et al., 2018). En la misma línea a partir de suelos de cultivo de arroz contaminados con cobre en concentraciones de 400 a 800 mg/kg, se logró cuantificar *copA* en el orden de  $10^{4.5}$  copias de genes/ng DNA (Li et al., 2012).

En este trabajo observamos que los genes de respuesta a cobre son detectados en todos los núcleos; sin embargo, los núcleos bioaumentados y bioestimulados reportan un mayor número de copias, si consideramos que el consorcio cuenta con estos genes, es coherente que se cuantifique en mayor medida en el suelo donde se encuentra presente el consorcio (**Figura 26-30**). La cuantificación de *copB* fue máxima en la S2 y seguido a eso, en la S4 *alkB2* -gen de degradación de HC- aumento su número de copias. Situación similar se reportó para *copA*\_ac. El número de copias de *copA*\_ps es mucho mayor, esto sugiere que dentro de la comunidad bacteriana el gen *copA* en *Stutzerimonas* esta mayormente distribuido que en *Acinetobacter*. Los genes a *copA* y *copB*, son parte del operón *copABCDRSZ* (Brown et al., 1995). Estos genes sólo fueron identificados en la misma vecindad genómica en la *Stutzerimonas sp.* DN36, pero

lamentablemente no se pudo conseguir la estandarización del partidador para *copB*\_ps, impidiendo establecer alguna relación en la cuantificación de estos genes.

Existe evidencia que soporta la acción del gen *actP* como regulador de la homeostasis del cobre, la creación de mutantes pertenecientes al género *Rhizobium* y *Sinorhizobium* al deleccionar su única copia de *actP* se volvieron sensibles a cobre (Reeve et al., 2002). El alto número de copias que se reportó para el gen *actP* puede ser justificado por dos motivos principales, el primero es que el partidador diseñado para su seguimiento representa el comportamiento de dos géneros bacterianos, *Acinetobacter* y *Stutzerimonas*, por su menor especificidad y el segundo se relaciona con la función celular que desempeña este gen, el cual codifica un transportador tipo P de cobre, la delección de este gen ha resultado en la pérdida de la homeostasis del cobre y la sensibilización frente al metal (Reeve et al., 2002); como se mencionó el mecanismo de expulsión es uno de los más ampliamente utilizados por bacterias para la detoxificación celular. A pesar de identificar una gran participación del género *Stutzerimonas* en la comunidad del suelo, la cuantificación del gen *acrD*\_ps arrojó un bajo número de copias; este gen codifica un transportador multidrogas tipo RND (Rosenberg et al., 2000), su bajo número de copias podría sugerir que el género *Stutzerimonas* no responde a cobre por mecanismos generales de transporte, sino, por mecanismos más sofisticados como las reacciones de oxidorreducción mediadas por CopA. En la S8 observamos un comportamiento interesante, curiosamente se registra un alto número de copias de los genes *alkB*, *acrD*, *copA*\_ps y *actP* (que representan a *Stutzerimonas*) en la TM3 del núcleo C3, esto podría indicar que en este núcleo existió un florecimiento específico de *Stutzerimonas* demostrando la estratificación de un género en particular, existen casos similares donde se observó la selección particular de un género durante las semanas tardías de una experiencia de biorremediación (Fuentes et al., 2016). En términos generales, las diferencias entre tomas de muestras fueron pocas, en algunos casos se pudo observar que el número de copias difería significativamente lo cual podría ser un indicio de estratificación, sin embargo, esta tendencia no fue generalizada.

### **Remoción de hidrocarburos alifáticos**

Paralelamente la degradación de HC registró una rápida disminución de los HC de cadena corta (**Figura 31**) entre las semanas 0 y 4. Los HC de cadena media tomaron un poco más de tiempo para ser llevados hasta el límite de cuantificación, se observó que la tasa de remoción de HC fue muy pronunciada entre las S2 y S4 (**Figura 32**), siendo en este punto donde los genes *copA*, *copB* y *actP* se cuantificaron en mayor medida. De este modo, se observa que diferentes especies bacterianas se ven involucradas en el proceso de descontaminación, reforzando los principios de la técnica de biorremediación, donde se defiende que los organismos involucrados no simplemente transfieren el contaminante a otros espacios, sino que son capaces de transformarlos (Singh and Ward, 2004) y esto no puede ser conseguido exitosamente por una sola especie (Chikere et al., 2011).

Uno de los cometidos de la biotecnología es la resolución de problemas y creación de soluciones atingente con la realidad social y económica (Lynch, 1997), como se introdujo, la biorremediación es una técnica de bajo impacto ambiental y bajo costo, que permite la efectiva remoción de contaminantes. En este trabajo se observa que los tratamientos seleccionados -bioestimulación y bioaumentación- son efectivos y reportan un mayor porcentaje de remoción de HC que la

situación control; sin embargo, también se observa que el suelo control solo por atenuación natural en condiciones de laboratorio controladas (aireación y recirculación de lixiviado) es capaz de remover un 26 % de los HC de cadena media y este valor aumenta con el transcurso del tiempo (**Tabla 15**). La atenuación natural comprende tanto los procesos naturales como la acción de la comunidad microbiológica nativa (Singh and Ward, 2004), según los resultados obtenidos en este estudio podemos inferir que la comunidad nativa del suelo proveniente del sitio Las Salinas no participa activamente en la remoción de HC, esto se sustenta en dos resultados i) nula detección por cultivo tradicional y ii) no cuantificación de genes de degradación en suelo, lo que posiblemente indica la ausencia de activación de rutas de degradación de HC en la comunidad nativa. La disminución de los HC en C1 se atribuye principalmente a las propiedades intrínsecas del suelo, al ser este un suelo costero de alta densidad y baja fracción de hueco (**Tabla 13**), la lixiviación del contaminante es muy probable, de igual modo la evaporación de este por una baja retención (Tahir and Marschner, 2017). Se han reportado altos niveles de remoción de contaminantes por atenuación natural en suelos costeros y/o suelos arenosos; sin embargo, su tasa de remoción no ha superado la remoción bajo un tratamiento de bioaumentación (Bento et al., 2005). Por otro lado, observamos que la adición de enmienda orgánica modifica parcialmente los parámetros físicos del suelo, se observa además que el tratamiento de bioestimulación estabiliza todos los parámetros fisicoquímicos medidos en este trabajo (pH, conductividad, humedad y volumen de lixiviado). Por lo cual se infiere que la adición de materia orgánica favorece la creación de un ambiente propicio para el crecimiento bacteriano, actuando además de fuente de nutrientes como medio de reacción.

Finalmente, se puede observar que el consorcio bacteriano estimulado por la co-contaminación del suelo con HC y cobre, es capaz de remover un 83,8% de HC alifáticos de cadena media en tan solo 8 semanas. De este modo, podemos inferir que el consorcio bacteriano utilizado no ve afectada su capacidad de degradación de HC por la exposición a concentraciones cercanas a los 10 mM de cobre y que, en el proceso de descontaminación y respuesta a metales, se encuentran involucrados distintos determinantes genéticos, los cuales pudieran jugar un rol fundamental en la biorremediación de suelos co-contaminados.

## Conclusiones

El trabajo de tesis desarrollado ha permitido levantar valiosa información, dentro de las principales aseveraciones que podemos sostener se encuentran:

1. La base de datos HMR\_gen, es una base de datos amplia y diversa que permite la identificación de determinantes genéticos asociado con la respuesta a metales en cepas ambientales.
2. El número de genes de respuesta a cobre obtenidos por identificación *in silico* se ha correlacionado positivamente con la capacidad funcional bacteriana, reflejado en los valores de concentración mínima inhibitoria obtenidos, a mayor número de genes identificados, mayor es la tolerancia experimental de las cepas pertenecientes a los géneros *Acinetobacter*, *Stutzerimonas* y *Rhodococcus*.
3. La selección por identificación de genes albergados en HMR\_gen que poseen alta identidad con elementos bacterianos pueden ser candidatos como biomarcadores para el monitoreo de procesos de biorremediación.
4. Las estrategias de bioestimulación y bioaumentación seleccionadas permiten una efectiva remoción de HC alifáticos desde suelos costeros como lo es el sitio Las Salinas.
5. El consorcio bacteriano conformado por las cepas *Stutzerimonas* sp. DN36, *Acinetobacter* sp. AA64, *Acinetobacter radioresistens* DD78 y *Rhodococcus* sp. ICBD2 es detectable en suelo mediante técnicas convencionales de cultivo y técnicas moleculares utilizando los partidores específicos que permiten su seguimiento.
6. Las cepas *Stutzerimonas* sp. DN36, *Acinetobacter* sp. AA64, *Acinetobacter radioresistens* DD78 y *Rhodococcus* sp. ICBD2 son tolerantes a cobre y su actividad hidrocarbonoclástica no se ve disminuida cuando se enfrentan a procesos de biorremediación en suelos co-contaminados con HC de petróleo y cobre.
7. El consorcio bacteriano promueve la remoción de HC en un suelo contaminado, además no disminuye su efectividad en casos de co-contaminación con cobre, donde la concentración puede ser de hasta 550 mg/kg.



## Bibliografía

- Abbasian, F., Lockington, R., Mallavarapu, M., Naidu, R., 2015. A Comprehensive Review of Aliphatic Hydrocarbon Biodegradation by Bacteria. *Appl Biochem Biotechnol* 176, 670–699. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1603-5>
- Adriano, D.C., 2001. *Trace Elements in Terrestrial Environments*. Springer, New York, NY. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-21510-5>
- Agarwal, M., Rathore, R.S., Chauhan, A., 2020. A Rapid and High Throughput MIC Determination Method to Screen Uranium Resistant Microorganisms. *MPs* 3, 21. <https://doi.org/10.3390/mps3010021>
- Ahumada, R., González, E., Neira, J., 2004. Especiación de zinc en sedimentos marinos del fiordo Aysén. *Investig. mar.* 32. <https://doi.org/10.4067/S0717-71782004000100001>
- Alisi, C., Musella, R., Tasso, F., Ubaldi, C., Manzo, S., Cremisini, C., Sprocati, A.R., 2009. Bioremediation of diesel oil in a co-contaminated soil by bioaugmentation with a microbial formula tailored with native strains selected for heavy metals resistance. *Science of The Total Environment* 407, 3024–3032. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.01.011>
- Alrumman, S.A., Standing, D.B., Paton, G.I., 2015. Effects of hydrocarbon contamination on soil microbial community and enzyme activity. *Journal of King Saud University - Science* 27, 31–41. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2014.10.001>
- Altimira, F., Yáñez, C., Bravo, G., González, M., Rojas, L.A., Seeger, M., 2012. Characterization of copper-resistant bacteria and bacterial communities from copper-polluted agricultural soils of central Chile. *BMC Microbiol* 12, 193. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-193>
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990) "Basic local alignment search tool." *J. Mol. Biol.* 215:403-410.
- Argüello, J.M., Raimunda, D., Padilla-Benavides, T., 2013. Mechanisms of copper homeostasis in bacteria. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 3. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00073>
- Asperger, O., Kleber, H.-P., 1991. Metabolism of Alkanes by *Acinetobacter*, in: Towner, K.J., Bergogne-Bérézin, E., Fewson, C.A. (Eds.), *The Biology of Acinetobacter*. Springer US, Boston, MA, pp. 323–350. [https://doi.org/10.1007/978-1-4899-3553-3\\_22](https://doi.org/10.1007/978-1-4899-3553-3_22)
- Atlas, R.M., Philp, J. (Eds.), 2005. *Bioremediation: applied microbial solutions for real-world environmental cleanup*. ASM press, Washington, D.C.
- Azubuiké, C.C., Chikere, C.B., Okpokwasili, G.C., 2016. Bioremediation techniques—classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. *World J Microbiol Biotechnol* 32, 180. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2137-x>
- Bardgett, R.D., van der Putten, W.H., 2014. Belowground biodiversity and ecosystem functioning. *Nature* 515, 505–511. <https://doi.org/10.1038/nature13855>
- Batista, N.J.C., de Carvalho Melo Cavalcante, A.A., de Oliveira, M.G., Medeiros, E.C.N., Machado, J.L., Evangelista, S.R., Dias, J.F., dos Santos, C.E.I., Duarte, A., da Silva, F.R., da Silva, J., 2016. Genotoxic and mutagenic evaluation of water samples from a river under the influence of different anthropogenic activities. *Chemosphere* 164, 134–141. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.08.091>
- Bento, F.M., Camargo, F.A.O., Okeke, B.C., Frankenberger, W.T., 2005. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Bioresource Technology* 96, 1049–1055. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.09.008>
- Bhatt, P., Barh, A., 2018. Bioinformatic Tools to Study the Soil Microorganisms: An In Silico Approach for Sustainable Agriculture, in: Choudhary, D.K., Kumar, M., Prasad, R., Kumar,

- V. (Eds.), *In Silico Approach for Sustainable Agriculture*. Springer Singapore, Singapore, pp. 169–182. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-0347-0\\_10](https://doi.org/10.1007/978-981-13-0347-0_10)
- Blindauer, C.A., 2011. Bacterial metallothioneins: past, present, and questions for the future. *J Biol Inorg Chem* 16, 1011–1024. <https://doi.org/10.1007/s00775-011-0790-y>
- Boonmak, C., Takahashi, Y., Morikawa, M., 2014. Cloning and expression of three *ladA*-type alkane monooxygenase genes from an extremely thermophilic alkane-degrading bacterium *Geobacillus thermoleovorans* B23. *Extremophiles* 18, 515–523. <https://doi.org/10.1007/s00792-014-0636-y>
- Borkow, G., Gabbay, J., 2005. Copper as a Biocidal Tool. *CMC* 12, 2163–2175. <https://doi.org/10.2174/0929867054637617>
- Bouchez Naitali, M., Rakatozafy, H., Marchal, R., Leveau, J.Y., Vandecasteele, J.P., 2003. Diversity of bacterial strains degrading hexadecane in relation to the mode of substrate uptake. *J Appl Microbiol* 86, 421–428. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00678.x>
- Bravo, G., Vega-Celedón, P., Gentina, J.C., Seeger, M., 2020. Bioremediation by *Cupriavidus metallidurans* Strain MSR33 of Mercury-Polluted Agricultural Soil in a Rotary Drum Bioreactor and Its Effects on Nitrogen Cycle Microorganisms. *Microorganisms* 8, 1952. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8121952>
- Brons, J.K., van Elsas, J.D., 2008. Analysis of Bacterial Communities in Soil by Use of Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and Clone Libraries, as Influenced by Different Reverse Primers. *Appl Environ Microbiol* 74, 2717–2727. <https://doi.org/10.1128/AEM.02195-07>
- Brown, N.L., Barrett, S.R., Camakaris, J., Lee, B.T.O., Rouch, D.A., 1995. Molecular genetics and transport analysis of the copper-resistance determinant (*pco*) from *Escherichia coli* plasmid pRJ1004. *Mol Microbiol* 17, 1153–1166. [https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.mmi\\_17061153.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.mmi_17061153.x)
- Callaghan, A.V., Morris, B.E.L., Pereira, I.A.C., McInerney, M.J., Austin, R.N., Groves, J.T., Kukor, J.J., Sufliata, J.M., Young, L.Y., Zylstra, G.J., Wawrik, B., 2012. The genome sequence of *Desulfatibacillum alkenivorans* AK-01: a blueprint for anaerobic alkane oxidation. *Environmental Microbiology* 14, 101–113. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02516.x>
- Carreón, T., Herrick, R.L., 2012. Aliphatic Hydrocarbons, in: Bingham, E., Cohnsen, B., Powell, C.H. (Eds.), *Patty's Toxicology*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, pp. 1–102. <https://doi.org/10.1002/0471435139.tox049.pub2>
- Caspi, R., Foerster, H., Fulcher, C.A., Kaipa, P., Krummenacker, M., Latendresse, M., Paley, S., Rhee, S.Y., Shearer, A.G., Tissier, C., Walk, T.C., Zhang, P., Karp, P.D., 2007. The MetaCyc Database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of Pathway/Genome Databases. *Nucleic Acids Research* 36, D623–D631. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm900>
- Chakraborty, J., Jana, T., Saha, S., Dutta, T.K., 2014. Ring-Hydroxylating Oxygenase database: a database of bacterial aromatic ring-hydroxylating oxygenases in the management of bioremediation and biocatalysis of aromatic compounds. *Environ Microbiol Rep* 6, 519–523. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12182>
- Chikere, C.B., Okpokwasili, G.C., Chikere, B.O., 2011. Monitoring of microbial hydrocarbon remediation in the soil. *3 Biotech* 1, 117–138. <https://doi.org/10.1007/s13205-011-0014-8>
- Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J., Sayers, E.W., 2016. GenBank. *Nucleic Acids Res* 44, D67–D72. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1276>
- Deary, M.E., Ekumankama, C.C., Cummings, S.P., 2022. Structural Selectivity of PAH Removal Processes in Soil, and the Effect of Metal Co-Contaminants. *Environments* 9, 23. <https://doi.org/10.3390/environments9020023>
- Di Cello, F., Pepi, M., Baldi, F., Fani, R., 1997. Molecular characterization of an n-alkane-degrading bacterial community and identification of a new species, *Acinetobacter*

- venetianus*. *Research in Microbiology* 148, 237–249. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(97\)85244-8](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(97)85244-8)
- Dopson, M., Ossandon, F.J., Lavgren, L., Holmes, D.S., 2014. Metal resistance or tolerance? Acidophiles confront high metal loads via both abiotic and biotic mechanisms. *Front. Microbiol.* 5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00157>
- Doran, J.W., Parkin, T.B., 2015. Defining and Assessing Soil Quality, in: Doran, J.W., Coleman, D.C., Bezdicek, D.F., Stewart, B.A. (Eds.), *SSSA Special Publications*. Soil Science Society of America and American Society of Agronomy, Madison, WI, USA, pp. 1–21. <https://doi.org/10.2136/sssaspecpub35.c1>
- Doster, E., Lakin, S.M., Dean, C.J., Wolfe, C., Young, J.G., Boucher, C., Belk, K.E., Noyes, N.R., Morley, P.S., 2020. MEGARes 2.0: a database for classification of antimicrobial drug, biocide and metal resistance determinants in metagenomic sequence data. *Nucleic Acids Research* 48, D561–D569. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1010>
- Dupont, C.L., Grass, G., Rensing, C., 2011. Copper toxicity and the origin of bacterial resistance—new insights and applications. *Metallomics* 3, 1109. <https://doi.org/10.1039/c1mt00107h>
- Duran, R., Cumsille, A., Saona, V., Rodriguez, A., Camara, B., Seeger, M., Araya, M., Jara, N., Buil-Aranda, C., 2022. Genome Visualizer (GenoVi): An automated circular genome visualizer for bacteria and archaea.
- Dutta, K., Shityakov, S., Khalifa, I., 2021. New Trends in Bioremediation Technologies Toward Environment-Friendly Society: A Mini-Review. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 9, 666858. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.666858>
- Edmundo Acevedo, M. Adriana Carrasco, Olga León, Paola Silva, Gabriela Castillo, Inés Ahumada, Gilda Borie, Paola Silva, Gabriela Castillo, Inés Ahumada, Gilda Borie, Sergio González, 2005. Criterios de Calidad de Suelos y Aguas de Riego: Metales pesados en suelo [WWW Document]. Biblioteca digital SAG. URL [http://biblioteca-digital.sag.gob.cl/documentos/medio\\_ambiente/criterios\\_calidad\\_suelos\\_aguas\\_agricolas/inicio.htm](http://biblioteca-digital.sag.gob.cl/documentos/medio_ambiente/criterios_calidad_suelos_aguas_agricolas/inicio.htm) (accessed 9.12.22).
- Ellis, E.C., 2011. Anthropogenic transformation of the terrestrial biosphere. *Phil. Trans. R. Soc. A.* 369, 1010–1035. <https://doi.org/10.1098/rsta.2010.0331>
- Evans, F.F., Rosado, A.S., Sebastián, G.V., Casella, R., Machado, P.L.O.A., Holmstram, C., Kjelleberg, S., Elsas, J.D., Seldin, L., 2004. Impact of oil contamination and biostimulation on the diversity of indigenous bacterial communities in soil microcosms. *FEMS Microbiology Ecology* 49, 295–305. <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2004.04.007>
- FAO, ITPS, GSBI, SCBD, EC, 2020. State of knowledge of soil biodiversity - Status, challenges and potentialities. FAO, Rome, Italy. <https://doi.org/10.4060/cb1928en>
- Fuentes, S., 2014. Bioaumentación de suelos contaminados con hc y su efecto sobre las comunidades microbianas. Pontificia universidad católica de valparaíso y universidad tecnica federico santa maria, Valparaíso.
- Fuentes, S., Barra, B., Caporaso, J.G., Seeger, M., 2016. From Rare to Dominant: a Fine-Tuned Soil Bacterial Bloom during Petroleum Hydrocarbon Bioremediation. *Appl Environ Microbiol* 82, 888–896. <https://doi.org/10.1128/AEM.02625-15>
- Fuentes, S., Ding, G.-C., Cárdenas, F., Smalla, K., Seeger, M., 2015. Assessing environmental drivers of microbial communities in estuarine soils of the Aconcagua River in Central Chile. *FEMS Microbiology Ecology* 91, fiv110. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiv110>
- Gao, J., Ellis, L.B.M., Wackett, L.P., 2010. The University of Minnesota Biocatalysis/Biodegradation Database: improving public access. *Nucleic Acids Research* 38, D488–D491. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp771>
- Gennadiev, A.N., Pikovskii, Yu.I., Tsi bart, A.S., Smirnova, M.A., 2015. Hydrocarbons in soils: Origin, composition, and behavior (Review). *Eurasian Soil Sc.* 48, 1076–1089. <https://doi.org/10.1134/S1064229315100026>

- Gilbert, D., 2004. Bioinformatics software resources. *Briefings in Bioinformatics* 5, 300–304. <https://doi.org/10.1093/bib/5.3.300>
- Giller, K.E., Witter, E., Mcgrath, S.P., 1998. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. *Soil Biology and Biochemistry* 30, 1389–1414. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(97\)00270-8](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(97)00270-8)
- Girvan, H.M., Munro, A.W., 2016. Applications of microbial cytochrome P450 enzymes in biotechnology and synthetic biology. *Current Opinion in Chemical Biology* 31, 136–145. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.02.018>
- Godoy-Faúndez, A., Antizar-Ladislao, B., Reyes-Bozo, L., Camaño, A., Sáez-Navarrete, C., 2008. Bioremediation of contaminated mixtures of desert mining soil and sawdust with fuel oil by aerated in-vessel composting in the Atacama Region (Chile). *Journal of Hazardous Materials* 151, 649–657. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.06.038>
- Gomiero, T., 2016. Soil Degradation, Land Scarcity and Food Security: Reviewing a Complex Challenge. *Sustainability* 8, 281. <https://doi.org/10.3390/su8030281>
- González, P., 2020. Leyes y decretos relacionados con el suelo: Desertificación y degradación del suelo. Biblioteca del Congreso Nacional. [https://obtienearchivo.bcn.cl/obtienearchivo?id=repositorio/10221/29253/1/Regulacion\\_d\\_el\\_Suelo\\_\\_\\_desertificacion.pdf](https://obtienearchivo.bcn.cl/obtienearchivo?id=repositorio/10221/29253/1/Regulacion_d_el_Suelo___desertificacion.pdf)
- Gupta, K., Biswas, R., Sarkar, A., 2020. Advancement of Omics: Prospects for Bioremediation of Contaminated Soils, in: Shah, M.P. (Ed.), *Microbial Bioremediation & Biodegradation*. Springer Singapore, Singapore, pp. 113–142. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-1812-6\\_5](https://doi.org/10.1007/978-981-15-1812-6_5)
- Hall, C., Tharakan, P., Hallock, J., Cleveland, C., Jefferson, M., 2003. Hydrocarbons and the evolution of human culture. *Nature* 426, 318–322. <https://doi.org/10.1038/nature02130>
- Hamamura, N., Olson, S.H., Ward, D.M., Inskeep, W.P., 2006. Microbial Population Dynamics Associated with Crude-Oil Biodegradation in Diverse Soils. *Appl Environ Microbiol* 72, 6316–6324. <https://doi.org/10.1128/AEM.01015-06>
- Hamamura, N., Yeager, C.M., Arp, D.J., 2001. Two Distinct Monooxygenases for Alkane Oxidation in *Nocardioides* sp. Strain CF8. *Appl Environ Microbiol* 67, 4992–4998. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.11.4992-4998.2001>
- Hao, X., Zhu, J., Rensing, C., Liu, Y., Gao, S., Chen, W., Huang, Q., Liu, Y.-R., 2021. Recent advances in exploring the heavy metal(loid) resistant microbiome. *Computational and Structural Biotechnology Journal* 19, 94–109. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.12.006>
- Haro, V., 2007. Legislación de suelos y su protección ambiental. Universidad de Chile, Punta Arena.
- Hassen, A., Saidi, N., Cherif, M., Boudabous, A., 1998. Resistance of environmental bacteria to heavy metals. *Bioresource Technology* 64, 7–15. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(97\)00161-2](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(97)00161-2)
- Head, I.M., 1998. Bioremediation: towards a credible technology. *Microbiology* 144, 599–608. <https://doi.org/10.1099/00221287-144-3-599>
- Heitzer, A., 1993. Monitoring the efficacy of bioremediation. *Trends in Biotechnology* 11, 334–343. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(93\)90156-4](https://doi.org/10.1016/0167-7799(93)90156-4)
- Henríquez, M., Becerra, J., Barra, R., Rojas, J., 2006. Hydrocarbons and organochlorine pesticides in soils of the urban ecosystem of chillán and chillán viejo, chile. *J. Chil. Chem. Soc.* 51. <https://doi.org/10.4067/S0717-97072006000300002>
- Heydari, A., Kim, N.D., Horswell, J., Gielen, G., Siggins, A., Taylor, M., Bromhead, C., Palmer, B.R., 2022. Co-Selection of Heavy Metal and Antibiotic Resistance in Soil Bacteria from Agricultural Soils in New Zealand. *Sustainability* 14, 1790. <https://doi.org/10.3390/su14031790>
- Hoff, R.Z., 1993. Bioremediation: an overview of its development and use for oil spill cleanup. *Marine Pollution Bulletin* 26, 476–481. [https://doi.org/10.1016/0025-326X\(93\)90463-T](https://doi.org/10.1016/0025-326X(93)90463-T)

- Honorato Ricardo, 1994. Manual de edafología | ISBN 978-956-14-0325-3 - Libro, Ciencia del suelo.
- Hulankova, R., 2022. The Influence of Liquid Medium Choice in Determination of Minimum Inhibitory Concentration of Essential Oils against Pathogenic Bacteria. *Antibiotics* 11, 150. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11020150>
- Iturbe, R., Silva, A.E., 2015. Revisión bibliográfica sobre contaminación de suelos y acuíferos.
- J. Widada, H. Nojiri & T. Omori, 2002. Recent developments in molecular techniques for identification and monitoring of xenobiotic-degrading bacteria and their catabolic genes in bioremediation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 60, 45–59. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1072-y>
- Kang, W., Zhang, Y.-J., Shi, X., He, J.-Z., Hu, H.-W., 2018. Short-term copper exposure as a selection pressure for antibiotic resistance and metal resistance in an agricultural soil. *Environ Sci Pollut Res* 25, 29314–29324. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2978-y>
- Kearns, D.B., 2010. A field guide to bacterial swarming motility. *Nat Rev Microbiol* 8, 634–644. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2405>
- Kloos, K., Munch, J.C., Schloter, M., 2006. A new method for the detection of alkane-monooxygenase homologous genes (*alkB*) in soils based on PCR-hybridization. *Journal of Microbiological Methods* 66, 486–496. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.01.014>
- Konya, A., Fiddler, B., Bunch, O., Hess, K., Ferguson, C., Krzmarzick, M., 2022. Lead or Cadmium Co-Contamination Alters Benzene and Toluene Degrading Bacterial Communities (preprint). In Review. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1950617/v1>
- Kumar, A., Meena, V.S. (Eds.), 2019. Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Agricultural Sustainability: From Theory to Practices. Springer Singapore, Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-7553-8>
- Kumar, M., Khanna, S., 2010. Diversity of 16S rRNA and dioxygenase genes detected in coal-tar-contaminated site undergoing active bioremediation. *Journal of Applied Microbiology* 108, 1252–1262. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04523.x>
- Kuppusamy, S., Raju Maddela, N., Megharaj, M., Venkateswarlu, K., 2020. Total petroleum hydrocarbons: environmental fate, toxicity, and remediation. Springer, Cham, Switzerland.
- Lal, R., 2009. Laws of Sustainable Soil Management, in: Lichtfouse, E., Navarrete, M., Debaeke, P., Véronique, S., Alberola, C. (Eds.), Sustainable Agriculture. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 9–12. [https://doi.org/10.1007/978-90-481-2666-8\\_2](https://doi.org/10.1007/978-90-481-2666-8_2)
- Lam, E.J., Carle, R., González, R., Montofré, Í.L., Veloso, E.A., Bernardo, A., Cánovas, M., Álvarez, F.A., 2020. A Methodology Based on Magnetic Susceptibility to Characterize Copper Mine Tailings. *Minerals* 10, 939. <https://doi.org/10.3390/min10110939>
- Leahy, J.G., Colwell, R.R., 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol Rev* 54, 305–315. <https://doi.org/10.1128/mr.54.3.305-315.1990>
- Li, X., He, W., Du, M., Zheng, J., Du, X., Li, Y., 2021. Design of a Microbial Remediation Inoculation Program for Petroleum Hydrocarbon Contaminated Sites Based on Degradation Pathways. *IJERPH* 18, 8794. <https://doi.org/10.3390/ijerph18168794>
- Li, X.-F., Yin, H.-B., Su, J.-Q., 2012. An Attempt to Quantify Cu-Resistant Microorganisms in a Paddy Soil from Jiaying, China. *Pedosphere* 22, 201–205. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(12\)60006-X](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(12)60006-X)
- Lin, J., Gan, L., Chen, Z., Naidu, R., 2015. Biodegradation of tetradecane using *Acinetobacter venetianus* immobilized on bagasse. *Biochemical Engineering Journal* 100, 76–82. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.04.014>
- Liu, H., Xu, J., Liang, R., Liu, J., 2014. Characterization of the Medium- and Long-Chain n-Alkanes Degrading *Pseudomonas aeruginosa* Strain SJTD-1 and Its Alkane Hydroxylase Genes. *PLoS ONE* 9, e105506. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105506>
- Lynch, J.M., 1997. Has biotechnology a role in soil science? *Soil Res.* 35, 1049. <https://doi.org/10.1071/S96104>

- Macaya, C.C., Durán, R.E., Hernández, L., Rodríguez-Castro, L., Barra-Sanhueza, B., Dorochesi, F., Seeger, M., 2019a. Bioremediation of Petroleum, in: Reference Module in Life Sciences. Elsevier, p. B9780128096338209000. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20810-8>
- Macaya, C.C., Méndez, V., Durán, R.E., Aguila-Torres, P., Salvà-Serra, F., Jaén-Luchoro, D., Moore, E.R.B., Seeger, M., 2019b. Complete Genome Sequence of Hydrocarbon-Degrading Halotolerant *Acinetobacter radioresistens* DD78, Isolated from the Aconcagua River Mouth in Central Chile. *Microbiol Resour Announc* 8, e00601-19. <https://doi.org/10.1128/MRA.00601-19>
- Macaya, Constanza C., Durán, Roberto E., G.Rivera, Ester, Salazar-Tapia, Felipe Báez-Matus, Ximena, Dorochesi, Flavia, Espinoza-Tofalos, Anna, Franzetti, Andrea, Seeger, Michael, 2022. Evaluación de estrategias de biorremediación para la descontaminación de suelos costeros impactados con HC. Presented at the XLV Reunion Anual Sociedad de Biología de Chile, Pucon.
- Maier, T., Förster, H.-H., Asperger, O., Hahn, U., 2001. Molecular Characterization of the 56-kDa CYP153 from *Acinetobacter* sp. EB104. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 286, 652–658. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5449>
- Majumdar, R., Mohandass, R., Manickam, R., Dharshini, R.S., Sugumar, S., 2022. Isolation and genomic characterization of metal-resistant *Stenotrophomonas maltophilia* SRM01 from the marine environment (preprint). In Review. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2036023/v1>
- Malik, G., Arora, R., Chaturvedi, R., Paul, M.S., 2022. Implementation of Genetic Engineering and Novel Omics Approaches to Enhance Bioremediation: A Focused Review. *Bull Environ Contam Toxicol* 108, 443–450. <https://doi.org/10.1007/s00128-021-03218-3>
- Maphosa, F., de Vos, W.M., Smidt, H., 2010. Exploiting the ecogenomics toolbox for environmental diagnostics of organohalide-respiring bacteria. *Trends in Biotechnology* 28, 308–316. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.03.005>
- Marín, M.M., Yuste, L., Rojo, F., 2003. Differential Expression of the Components of the Two Alkane Hydroxylases from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 185, 3232–3237. <https://doi.org/10.1128/JB.185.10.3232-3237.2003>
- Marques de Oliveira, I., Henriques, J.A.P., Bonatto, D., 2007. In silico identification of a new group of specific bacterial and fungal nitroreductases-like proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 355, 919–925. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.02.049>
- Médigue, C., Moszer, I., 2007. Annotation, comparison and databases for hundreds of bacterial genomes. *Research in Microbiology* 158, 724–736. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2007.09.009>
- Mellano, M.A., Cooksey, D.A., 1988. Nucleotide sequence and organization of copper resistance genes from *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *J Bacteriol* 170, 2879–2883. <https://doi.org/10.1128/jb.170.6.2879-2883.1988>
- Méndez, V., Fuentes, S., Morgante, V., Hernández, M., González, M., Moore, E., Seeger, M., 2017. Novel hydrocarbonoclastic metal-tolerant *Acinetobacter* and *Pseudomonas* strains from Aconcagua river oil-polluted soil. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 17, 1074–1087. <https://doi.org/10.4067/S0718-95162017000400017>
- Méndez, V., Hernández, L., Salvà-Serra, F., Jaén-Luchoro, D., Durán, R.E., Barra, B., Piñeiro-Iglesias, B., Moore, E.R.B., Seeger, M., 2018. Complete Genome Sequence of the Hydrocarbon-Degrading Strain *Achromobacter* sp. B7, Isolated during Petroleum Hydrocarbon Bioremediation in the Valparaíso Region, Chile. *Microbiol Resour Announc* 7, e01326-18. <https://doi.org/10.1128/MRA.01326-18>
- Mercurio, C.D., 2013. Chile País Minero. *El Mercurio* 22.

- Mesarch, M.B., Nakatsu, C.H., Nies, L., 2000. Development of Catechol 2,3-Dioxygenase-Specific Primers for Monitoring Bioremediation by Competitive Quantitative PCR. *Appl Environ Microbiol* 66, 678–683. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.2.678-683.2000>
- Ministerio de Minería, 2018. “Historia de La Minería En Chile.” [WWW Document]. URL [https://www.minmineria.cl/que-es-la-mineria/historia-de-la-mineria-en-chile/#El\\_boom\\_de\\_los\\_\\_90](https://www.minmineria.cl/que-es-la-mineria/historia-de-la-mineria-en-chile/#El_boom_de_los__90).
- Ministerio de Salud, 2004. Decreto 148 aprueba reglamento sanitario sobre manejo de residuos peligrosos. Biblioteca del Congreso Nacional. URL <https://www.bcn.cl/leychile> (accessed 11.18.22).
- Ministerio del Medio Ambiente, 2012. Decreto 3 aprueba reglamento para el manejo de lodos provenientes de plantas de tratamiento de efluentes de la industria procesadora de frutas y hortalizas. Biblioteca del Congreso Nacional. URL <https://www.bcn.cl/leychile> (accessed 11.18.22).
- Monchy, S., Benotmane, M.A., Wattiez, R., van Aelst, S., Auquier, V., Borremans, B., Mergeay, M., Taghavi, S., van der Lelie, D., Vallaey, T., 2006. Transcriptomic and proteomic analyses of the pMOL30-encoded copper resistance in *Cupriavidus metallidurans* strain CH34. *Microbiology* 152, 1765–1776. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28593-0>
- Morovati, R., Abbasi, F., Samaei, M.R., Mehrazmay, H., Lari, A.R., 2022. Modelling of n-hexadecane bioremediation from soil by slurry bioreactors using artificial neural network method. *Sci Rep* 12, 19662. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-21996-6>
- Mounaouer, B., Nesrine, A., Abdennaceur, H., 2014. Identification and characterization of heavy metal-resistant bacteria selected from different polluted sources. *Desalination and Water Treatment* 52, 7037–7052. <https://doi.org/10.1080/19443994.2013.823565>
- Mracnova, R., Soják, L., Kubinec, R., Kraus, A., Eszényiová, A., Ostrovsky, I., 2002. Analysis of petroleum hydrocarbons in soil from view of bioremediation process.
- Natalia, I., de Oliveir, V.M., 2013. Microbial Hydrocarbon Degradation: Efforts to Understand Biodegradation in Petroleum Reservoirs, in: Chamy, R. (Ed.), *Biodegradation - Engineering and Technology*. InTech. <https://doi.org/10.5772/55920>
- Nature, 2019. In genetics, context matters. *Nature Genetics* 51, 1425–1425.
- Nies, D.H., 2003. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev* 27, 313–339. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(03\)00048-2](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(03)00048-2)
- Nies, D.H., Silver, S. (Eds.), 2007. *Molecular microbiology of heavy metals*, Microbiology monographs. Springer, Berlin ; New York.
- Nozari, M., Samaei, M.R., Dehghani, M., 2014. The Effect of Co-Metabolism on Removal of Hexadecane by Microbial Consortium from Soil in a Slurry Sequencing Batch Reactor 2, 12.
- Omuto, C., Nachtergaele, F., Vargas Rojas, R., 2013. State of the art report on global and regional soil information: where are we? where to go?, Global Soil Partnership technical report. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- Orellana, R., Macaya, C., Bravo, G., Dorochesi, F., Cumsille, A., Valencia, R., Rojas, C., Seeger, M., 2018. Living at the Frontiers of Life: Extremophiles in Chile and Their Potential for Bioremediation. *Front. Microbiol.* 9, 2309. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02309>
- Pal, C., Bengtsson-Palme, J., Rensing, C., Kristiansson, E., Larsson, D.G.J., 2014. BacMet: antibacterial biocide and metal resistance genes database. *Nucl. Acids Res.* 42, D737–D743. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1252>
- Palma-Fleming, H., Cornejo, C., González, Myriam, Pérez, V., González, Marta, Gutierrez, E., Sericano, J.L., Seeger, M., 2008. Polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in coastal environments of valdivia and valparaíso, chile. *J. Chil. Chem. Soc.* 53. <https://doi.org/10.4067/S0717-97072008000200020>

- Pan, L., Ma, J., Wang, X., Hou, H., 2016. Heavy metals in soils from a typical county in Shanxi Province, China: Levels, sources and spatial distribution. *Chemosphere* 148, 248–254. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.12.049>
- Pascucci, S., 2011. Soil Contamination. <https://doi.org/10.5772/927>
- Rajasekhar, B., Nambi, I.M., Govindarajan, S.K., 2018. Human health risk assessment of ground water contaminated with petroleum PAHs using Monte Carlo simulations: A case study of an Indian metropolitan city. *Journal of Environmental Management* 205, 183–191. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.09.078>
- Rajendhran, J., Gunasekaran, P., 2011. Microbial phylogeny and diversity: Small subunit ribosomal RNA sequence analysis and beyond. *Microbiological Research* 166, 99–110. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2010.02.003>
- Ratnikova, M.S., Titok, M.A., 2020. Molecular Genetic Markers for Identification of *Rhodococcus erythropolis* and *Rhodococcus qingshengii*. *Microbiology* 89, 435–442. <https://doi.org/10.1134/S0026261720040116>
- Reeve, W.G., Tiwari, R.P., Kale, N.B., Dilworth, M.J., Glenn, A.R., 2002. ActP controls copper homeostasis in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* and *Sinorhizobium meliloti* preventing low pH-induced copper toxicity. *Mol Microbiol* 43, 981–991. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02791.x>
- Rensing, C., Grass, G., 2003. *Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing environment. *FEMS Microbiol Rev* 27, 197–213. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(03\)00049-4](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(03)00049-4)
- Rivas, P.C., 2021. Proteger nuestros suelos: otra tarea pendiente. CIPER Chile. URL <https://www.ciperchile.cl/2021/05/08/proteger-nuestros-suelos-otra-tarea-pendiente/> (accessed 11.29.22).
- Rivera-Mendoza, D., Martínez-Flores, I., Santamaría, R.I., Lozano, L., Bustamante, V.H., Pérez-Morales, D., 2020. Genomic Analysis Reveals the Genetic Determinants Associated With Antibiotic Resistance in the Zoonotic Pathogen *Campylobacter spp.* Distributed Globally. *Front. Microbiol.* 11, 513070. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.513070>
- Rodríguez-Castro, L., Durán, R.E., Macaya, C.C., Dorochesi, F., Hernández, L., Salazar-Tapia, F., Ayala-Espinoza, V., Santis-Cortés, P., Báez-Matus, X., Seeger, M., 2022. Novel Insights into Bioremediation of Petroleum-Polluted Environments and Bacterial Catabolic Pathways, in: *Hydrocarbon Biotechnology*. Apple Academic Press, New York, pp. 65–112. <https://doi.org/10.1201/9781003277354-3>
- Rodríguez-Eugenio, McLaughlin, N., Pennock, D., 2018. La contaminación del suelo: una realidad oculta. FAO, Rome, Italy.
- Rojas, L.A., Yáñez, C., González, M., Lobos, S., Smalla, K., Seeger, M., 2011. Characterization of the Metabolically Modified Heavy Metal-Resistant *Cupriavidus metallidurans* Strain MSR33 Generated for Mercury Bioremediation. *PLoS ONE* 6, e17555. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017555>
- Rojo, F., 2009. Degradation of alkanes by bacteria. *Environmental Microbiology* 11, 2477–2490. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01948.x>
- Rosenberg, E.Y., Ma, D., Nikaido, H., 2000. AcrD of *Escherichia coli* Is an Aminoglycoside Efflux Pump. *J Bacteriol* 182, 1754–1756. <https://doi.org/10.1128/JB.182.6.1754-1756.2000>
- Salam, L.B., 2020. Unravelling the antibiotic and heavy metal resistome of a chronically polluted soil. *3 Biotech* 10, 238. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02219-z>
- Salvà Serra, F., Salvà-Serra, F., Svensson-Stadler, L., Busquets, A., Jaén-Luchoro, D., Karlsson, R., R. B. Moore, E., Gomila, M., 2018. A protocol for extraction and purification of high-quality and quantity bacterial DNA applicable for genome sequencing: a modified version of the Marmur procedure. *Protocol Exchange*. <https://doi.org/10.1038/protex.2018.084>
- Salzberg, S.L., 2019. Next-generation genome annotation: we still struggle to get it right. *Genome Biol* 20, 92, s13059-019-1715–2. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1715-2>



- S.A.P, E.M., 2016. Estas son las ciudades chilenas más atractivas para los extranjeros | Emol.com. URL <https://www.emol.com/noticias/Tendencias/2016/12/02/833823/Estas-son-las-ciudades-chilenas-mas-atractivas-para-los-extranjeros.html> (accessed 11.29.22).
- SEIA, 2018. Saneamiento del Terreno Las Salinas.
- Shahi, A., Aydin, S., Ince, B., Ince, O., 2016. Evaluation of microbial population and functional genes during the bioremediation of petroleum-contaminated soil as an effective monitoring approach. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 125, 153–160. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.11.029>
- Shuai, Y., Zhou, H., Mu, Q., Zhang, D., Zhang, N., Tang, J., Zhang, C., 2019. Characterization of a biosurfactant-producing *Leclercia* sp. B45 with new transcriptional patterns of *alkB* gene. *Ann Microbiol* 69, 139–150. <https://doi.org/10.1007/s13213-018-1409-0>
- Singh, A., Ward, O.P. (Eds.), 2004. Biodegradation and Bioremediation, Soil Biology. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-06066-7>
- Sprocati, A.R., Alisi, C., Tasso, F., Marconi, P., Sciallo, A., Pinto, V., Chiavarini, S., Ubaldi, C., Cremisini, C., 2012. Effectiveness of a microbial formula, as a bioaugmentation agent, tailored for bioremediation of diesel oil and heavy metal co-contaminated soil. *Process Biochemistry* 47, 1649–1655. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.10.001>
- Tahir, S., Marschner, P., 2017. Clay Addition to Sandy Soil Reduces Nutrient Leaching—Effect of Clay Concentration and Ped Size. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 48, 1813–1821. <https://doi.org/10.1080/00103624.2017.1395454>
- Tang, J., Lu, X., Sun, Q., Zhu, W., 2012. Aging effect of petroleum hydrocarbons in soil under different attenuation conditions. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 149, 109–117. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2011.12.020>
- Tani, A., Ishige, T., Sakai, Y., Kato, N., 2001. Gene Structures and Regulation of the Alkane Hydroxylase Complex in *Acinetobacter* sp. Strain M-1. *J Bacteriol* 183, 1819–1823. <https://doi.org/10.1128/JB.183.5.1819-1823.2001>
- Tanizawa, Y., Fujisawa, T., Nakamura, Y., 2018. DFAST: a flexible prokaryotic genome annotation pipeline for faster genome publication. *Bioinformatics* 34, 1037–1039. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx713>
- Tchounwou, P.B., Yedjou, C.G., Patlolla, A.K., Sutton, D.J., 2012. Heavy Metal Toxicity and the Environment, in: Luch, A. (Ed.), *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology, Experientia Supplementum*. Springer Basel, Basel, pp. 133–164. [https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8340-4\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8340-4_6)
- Teitzel, G.M., Parsek, M.R., 2003. Heavy Metal Resistance of Biofilm and Planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* 69, 2313–2320. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.4.2313-2320.2003>
- Tetaz, T.J., Luke, R.K., 1983. Plasmid-controlled resistance to copper in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 154, 1263–1268. <https://doi.org/10.1128/jb.154.3.1263-1268.1983>
- Throne-Holst, M., Wentzel, A., Ellingsen, T.E., Kotlar, H.-K., Zotchev, S.B., 2007. Identification of Novel Genes Involved in Long-Chain *n*-Alkane Degradation by *Acinetobacter* sp. Strain DSM 17874. *Appl Environ Microbiol* 73, 3327–3332. <https://doi.org/10.1128/AEM.00064-07>
- Toro, C.S., Farfán, M., Contreras, I., Flores, O., Navarro, N., Mora, G.C., Prado, V., 2005. Genetic analysis of antibiotic-resistance determinants in multidrug-resistant *Shigella* strains isolated from Chilean children. *Epidemiol. Infect.* 133, 81–86. <https://doi.org/10.1017/S0950268804003048>
- Trajanovska, S., Britz, M.L., Bhave, M., 1997. Detection of heavy metal ion resistance genes in Gram-positive and Gram-negative bacteria isolated from a lead-contaminated site. *Biodegradation* 8, 113–124. <https://doi.org/10.1023/A:1008212614677>

- Truskewycz, A., Gundry, T.D., Khudur, L.S., Kolobaric, A., Taha, M., Aburto-Medina, A., Ball, A.S., Shahsavari, E., 2019. Petroleum Hydrocarbon Contamination in Terrestrial Ecosystems—Fate and Microbial Responses. *Molecules* 24, 3400. <https://doi.org/10.3390/molecules24183400>
- Valenzuela, L., 2016. *Coppered Lives, The Chilean sacrifice zone of Quintero Bay*. The University of Sydney, Sydney.
- van Beilen, J.B., Funhoff, E.G., van Loon, A., Just, A., Kaysser, L., Bouza, M., Holtackers, R., Röthlisberger, M., Li, Z., Witholt, B., 2006. Cytochrome P450 Alkane Hydroxylases of the CYP153 Family Are Common in Alkane-Degrading Eubacteria Lacking Integral Membrane Alkane Hydroxylases. *Appl Environ Microbiol* 72, 59–65. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.1.59-65.2006>
- van Beilen, J.B., Li, Z., Duetz, W.A., Smits, T.H.M., Witholt, B., 2003. Diversity of Alkane Hydroxylase Systems in the Environment. *Oil & Gas Science and Technology - Rev. IFP* 58, 427–440. <https://doi.org/10.2516/ogst:2003026>
- van der Heijden, M.G.A., Bardgett, R.D., van Straalen, N.M., 2008. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecol Letters* 11, 296–310. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2007.01139.x>
- Varjani, S.J., Rana, D.P., Jain, A.K., Bateja, S., Upasani, V.N., 2015. Synergistic ex-situ biodegradation of crude oil by halotolerant bacterial consortium of indigenous strains isolated from on shore sites of Gujarat, India. *International Biodeterioration & Biodegradation* 103, 116–124. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.03.030>
- Volke-Sepúlveda, T.L., Gutiérrez-Rojas, M., Favela-Torres, E., 2003. Biodegradation of hexadecane in liquid and solid-state fermentations by *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology* 87, 81–86. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(02\)00207-9](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(02)00207-9)
- Voloudakis, A.E., Reignier, T.M., Cooksey, D.A., 2005. Regulation of Resistance to Copper in *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*. *Appl Environ Microbiol* 71, 782–789. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.2.782-789.2005>
- Wang, P., Yuan, Q., Wang, X., Hu, B., Wang, C., 2023. Metagenomic insight into the distribution of metal resistance genes within cascade reservoir waters: Synergic impacts of geographic variation and anthropogenic pollution. *Environmental Research* 216, 114682. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.114682>
- Yildirim, E., Ekinci, M., Turan, M., Açar, G., Dursun, A., Kul, R., Alim, Z., Argin, S., 2021. Humic + Fulvic acid mitigated Cd adverse effects on plant growth, physiology and biochemical properties of garden cress. *Sci Rep* 11, 8040. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86991-9>
- Zadjelovic, V., Gibson, M.I., Dorador, C., Christie-Oleza, J.A., 2020. Genome of *Alcanivorax* sp. 24: A hydrocarbon degrading bacterium isolated from marine plastic debris. *Marine Genomics* 49, 100686. <https://doi.org/10.1016/j.margen.2019.05.001>
- Zampolli, J., Collina, E., Lasagni, M., Di Gennaro, P., 2014. Biodegradation of variable-chain-length n-alkanes in *Rhodococcus opacus* R7 and the involvement of an alkane hydroxylase system in the metabolism. *AMB Expr* 4, 73. <https://doi.org/10.1186/s13568-014-0073-4>
- Zhu, J., Huang, Qiong, Peng, X., Zhou, X., Gao, S., Li, Y., Luo, X., Zhao, Y., Rensing, C., Su, J., Cai, P., Liu, Y., Chen, W., Hao, X., Huang, Qiaoyun, 2022. MRG Chip: A High-Throughput qPCR-Based Tool for Assessment of the Heavy Metal(loid) Resistome. *Environ. Sci. Technol.* 56, 10656–10667. <https://doi.org/10.1021/acs.est.2c00488>

## Anexo

### Molecular

#### 1. Programas de PCR

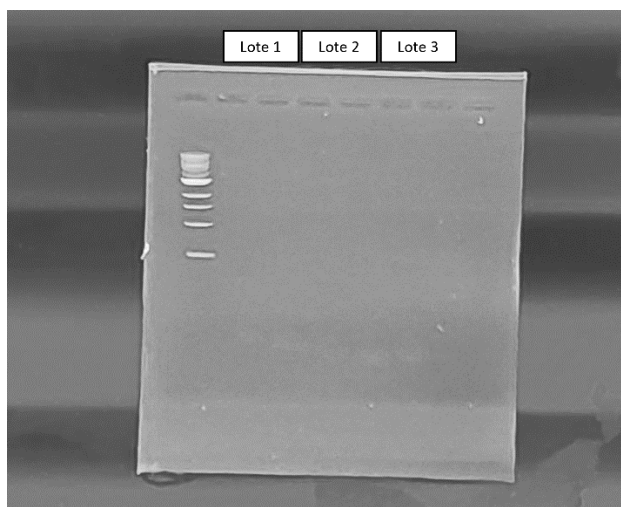
| Programas - Ciclos     | Temperatura (°C) | Tiempo (min) | Pasos                     |
|------------------------|------------------|--------------|---------------------------|
| <b>1</b> – 30 ciclos   | 95               | 5            | Desnaturalización inicial |
|                        | 95               | 1            | Desnaturalización         |
|                        | -                |              | Alineamiento              |
|                        | 72               | 0.10/Kbp     | Extensión                 |
|                        |                  |              |                           |
| <b>M13</b> - 30 ciclos | 95               | 3            | Desnaturalización inicial |
|                        | 95               | 0.20         | Desnaturalización         |
|                        | 55               | 0.20         | Alineamiento              |
|                        | 72               | 0.10/Kbp     | Extensión                 |
|                        | 4                | -            | Mantener                  |

#### 2. Programas de qPCR

| Programa- Ciclos | Temperatura (°C) | Tiempo (min) | Pasos                     |
|------------------|------------------|--------------|---------------------------|
|                  | 95               | 5            | Desnaturalización inicial |
|                  | 95               | 1            | Desnaturalización         |
|                  | -                |              | Alineamiento              |
|                  | 72               | 0.10/Kbp     | Extensión                 |

#### 3. Temperatura óptima partidores

Se evaluó la calidad del agua libre de nucleasas que se utilizó para la resuspensión de los partidores de clonamiento y qPCR analizados y todas las mediciones moleculares (**Fig. 1**). Para esto se utilizaron partidores generales y se hizo un PCR de 40 ciclos. Se observó que el agua utilizada en la experiencia está libre de contaminaciones.



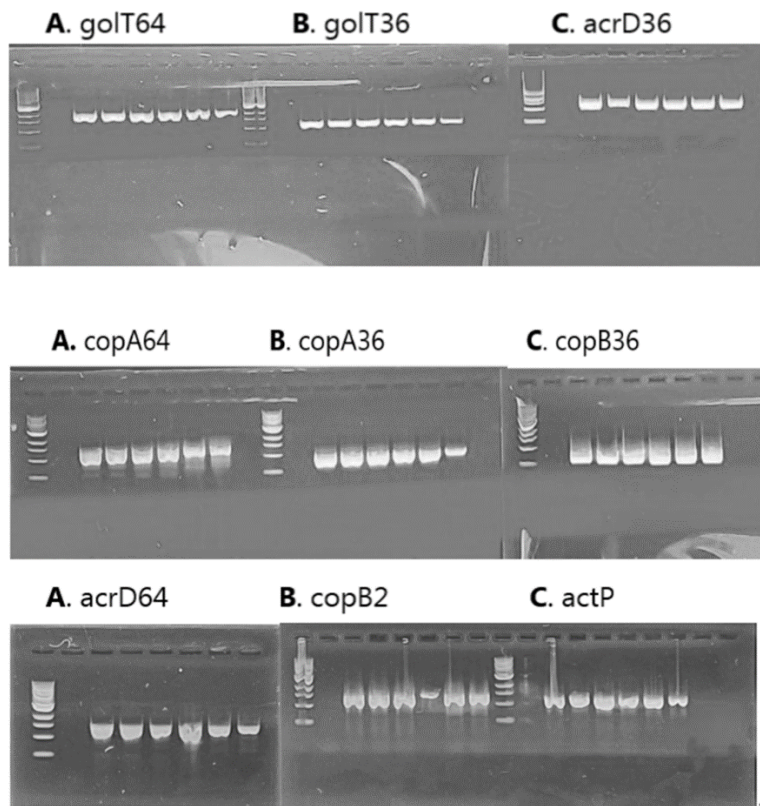
**Figura 1| Contaminación agua libre de nucleasas utilizada para las mediciones moleculares.** Se presentan el gel de los lotes 1, 2 y 3 de agua libre de nucleasas.

Se determinó la temperatura óptima de funcionamiento de los partidores diseñados para la fabricación de la curva estándar. Para esto se testearon diferentes temperaturas para los diferentes partidores (**Tabla 1**)

**Tabla 1| Temperatura testeada para los partidores de clonamiento.** Se presentan las diferentes temperaturas (°C) utilizadas para los respectivos partidores.

| Partidores          | Temperatura |      |      |      |      |      |      |
|---------------------|-------------|------|------|------|------|------|------|
|                     | 1           | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | C-   |
| <i>actP</i> (36/64) | 54.7        | 55.5 | 58   | 61.2 | 64.4 | 65.7 | 59.6 |
| <i>copA</i> (64)    | 54.7        | 55.5 | 58   | 61.2 | 64.4 | 65.7 | 59.6 |
| <i>copA</i> (36)    | 54.7        | 55.5 | 58   | 61.2 | 64.4 | 65.7 | 59.6 |
| <i>copB</i> (36)    | 54.7        | 55.5 | 58   | 61.2 | 64.4 | 65.7 | 59.6 |
| <i>copB</i> (rh2)   | 55.5        | 56.6 | 61.2 | 64.4 | 66.7 | 67.2 | 59.6 |
| <i>golT</i> (64)    | 55          | 56.1 | 57.5 | 60.7 | 63.9 | 65.2 | 59.1 |
| <i>golT</i> (36)    | 55          | 57.5 | 60.7 | 62.4 | 65.2 | 66.2 | 59.1 |
| <i>acrD</i> (36)    | 54.4        | 57.5 | 60.7 | 62.4 | 63.9 | 65.2 | 59.1 |
| <i>acrD</i> (64)    | 55          | 57.5 | 60.7 | 63.9 | 65.2 | 66.7 | 59.1 |

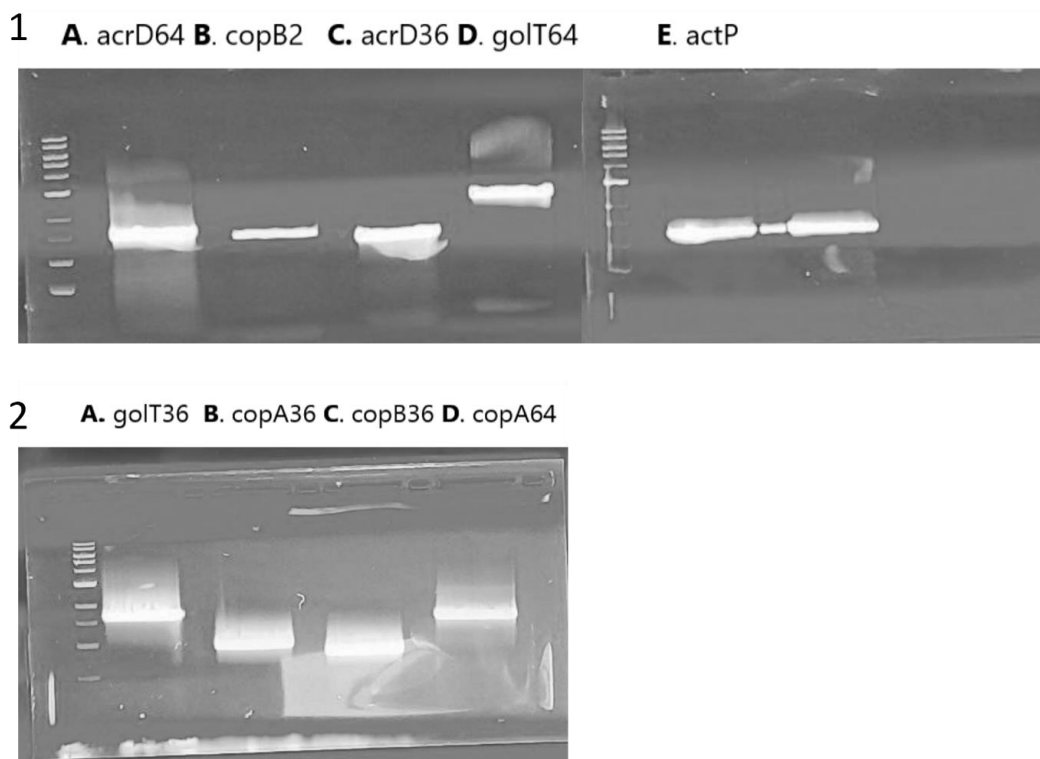
De este modo se determinó la temperatura óptima de funcionamiento, no se observaron dobles bandas, por lo cual, simplemente se seleccionó una de las temperaturas testeadas para cada partidor (**Figura 2**).



**Figura 2| Gel de determinación de temperatura óptima.** Se presentan los gels de agarosa de los respectivos partidores 1A) *golT64*, 2B) *golT36*, 3C) *acrD36*, 2A) *copA64*, 2B) *copA36*, 2C) *copB36*, 3A) *acrD64*, 3B) *copB2* y 3C) *actP*. En orden de izquierda a derecha, se cargó en patrón de peso y luego las posiciones de 1-6, teniendo en el último carril el control negativo.

#### 4. Purificación producto PCR

Para poder obtener el inserto necesario para poder realizar la transformación en el plásmido de interés fue necesario primero realizar la purificación del inserto, esta se realizó mediante purificación de banda, directamente desde el gel (**Figura 3**)



**Figura 3| Gel de determinación de purificación de producto PCR.** Se presentan los geles de agarosa de los respectivos partidores 1A) *acrD64*, 1B) *copB2*, 1C) *acrD36*, 1D) *golT64*, 1E) *actP*, 2A) *golT36*, 2B) *copA36*, 2C) *copB36* y 2D) *copA64*.

Se realizó la cuantificación del producto PCR purificado, mediante Qubit (**Tabla 2**)


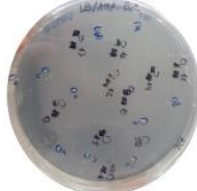



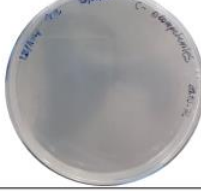
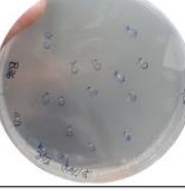

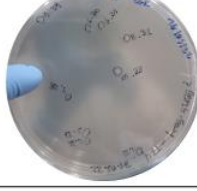
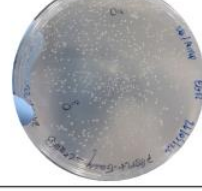
**Tabla 2| Cuantificación concentración producto PCR.**

| Partidores de clonamiento | Concentración ADN [ng/uL] |
|---------------------------|---------------------------|
| <i>actP</i>               | 15,4   21,924             |
| <i>acrD64</i>             | 32,28                     |
| <i>golT64</i>             | 17,72                     |
| <i>acrD36</i>             | 23,08                     |
| <i>copBrh2</i>            | 3,72                      |
| <i>copA36</i>             | 40,68                     |
| <i>golT36</i>             | 29,92                     |
| <i>copB36</i>             | 49,68                     |
| <i>copA64</i>             | 46,44                     |

\* Se presentan la concentración de cada uno de los futuros inserto (ng/μL).

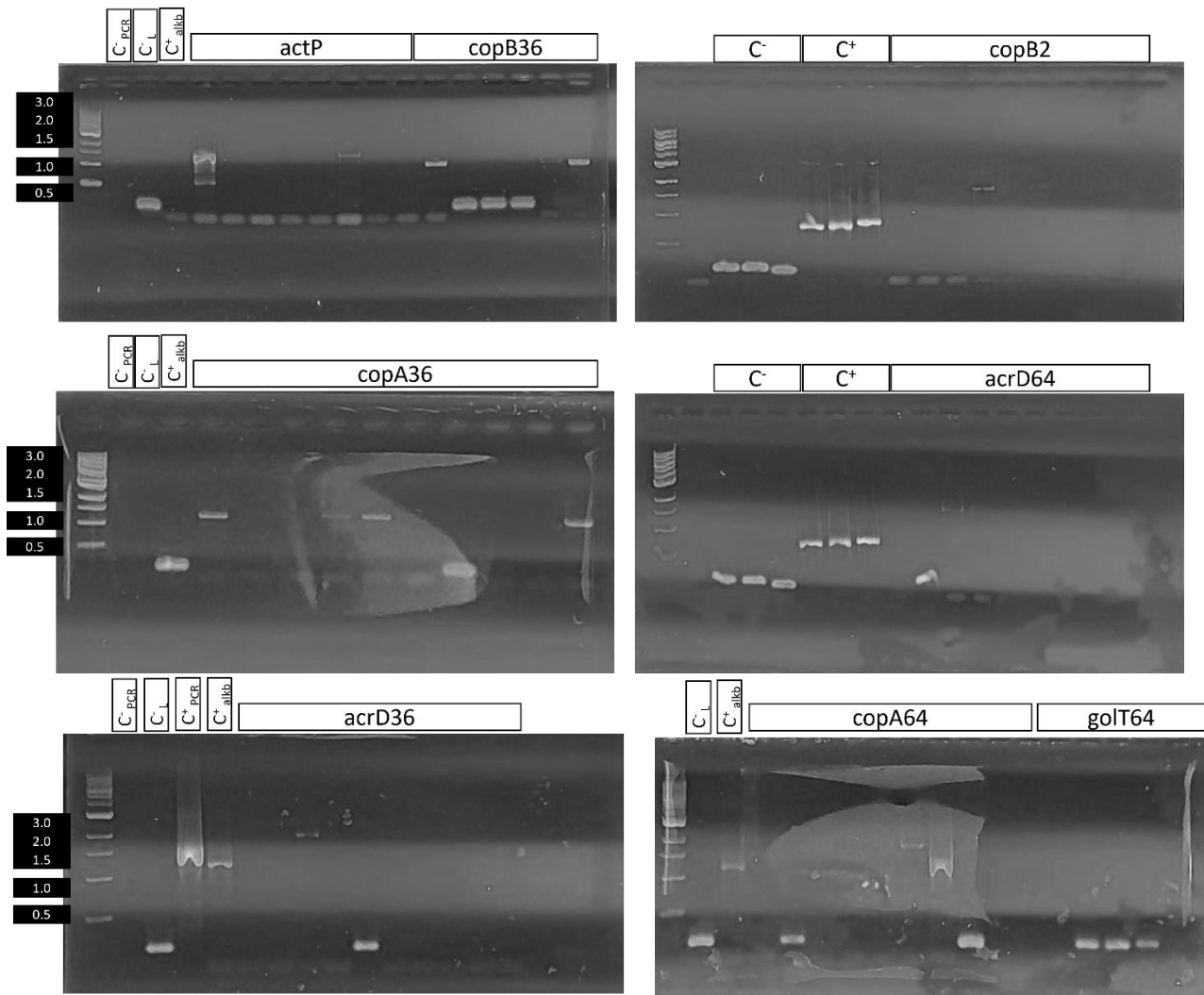
Luego de purificar el inserto este se ligó durante la noche con el plásmido comercial pGEMT\_Easy, fueron dispuestos en células competentes las cuales se sembraron y se dejaron durante 10 h a 37°C (**Imagen 1**).

5. Transformación

|  |  |   |  |
|--|--|---|--|
| pGEMT_Easy_acrD36  | pGEMT_Easy_acrD64  | pGEMT_Easy_copA36   | C - Ligación   |
|   | S.R  |   |   |
| pGEMT_Easy_copA64  | pGEMT_Easy_actP  | pGEMT_Easy_copB2  | C - Células competentes  |
|   |   | S.R   |   |
| pGEMT_Easy_copB36  | pGEMT_Easy_golT36  | pGEMT_Easy_golT64   | C + alkB2  |
|  |  |  |  |

**Imagen 1|Selección de clones transformados.** Se presentan las imágenes de las placas correspondientes cada una de las células transformadas con su plásmido correspondiente. S.R: Sin Registro. Se presentan además los controles negativos de ligación, control negativo sólo con células competentes y un control positivo con un plásmido conocido alkB2.

Se corroboró la inserción del plásmido realizando la extracción de ADN de cada uno de los clones, de este modo las marcas en las placas corresponden a la selección de 10 clones por transformación, luego se realizó un PCR confirmatorio de la inserción del plásmidos en los clones con los partidores M13



**Figura 4| Selección de clones partidores M13.** Se presentan los geles de agarosa de la identificación de la correcta transformación con pGEMT-Easy *actP*, *copB36*, *copB2*, *copA36*, *acrD64*, *acrD36*, *copA64* y *golT64*. De izquierda a derecha se presenta primero el patron de peso, luego control negativo de PCR, control negativo de ligación y control positivo plásmido *alkB2* (conocido).

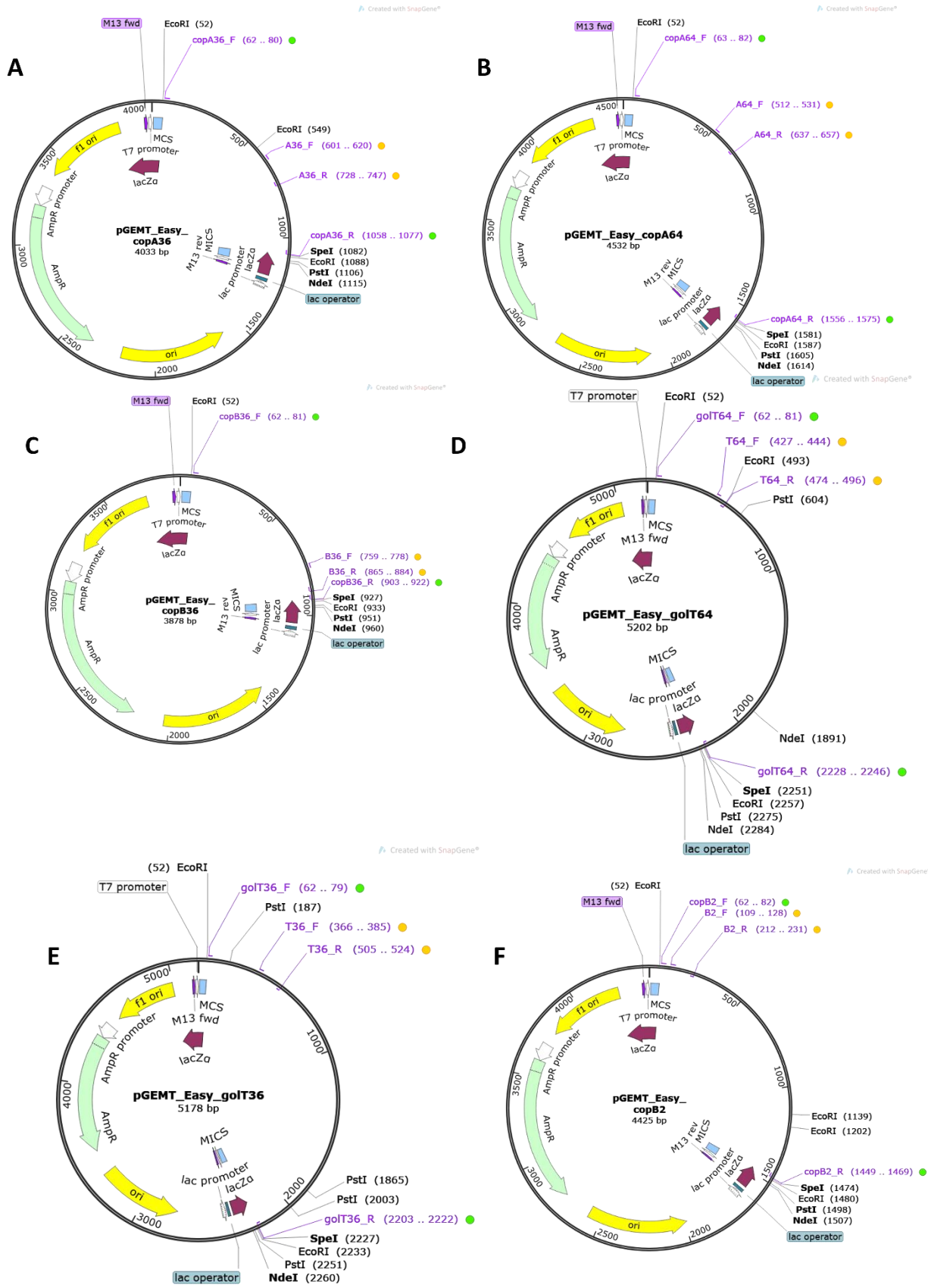
Los clones que fueron transformados con el plásmido PGEMT-Easy y su correspondiente inserto, fueron seleccionados y purificados para luego ser cuantificados (**Tabla 3**).

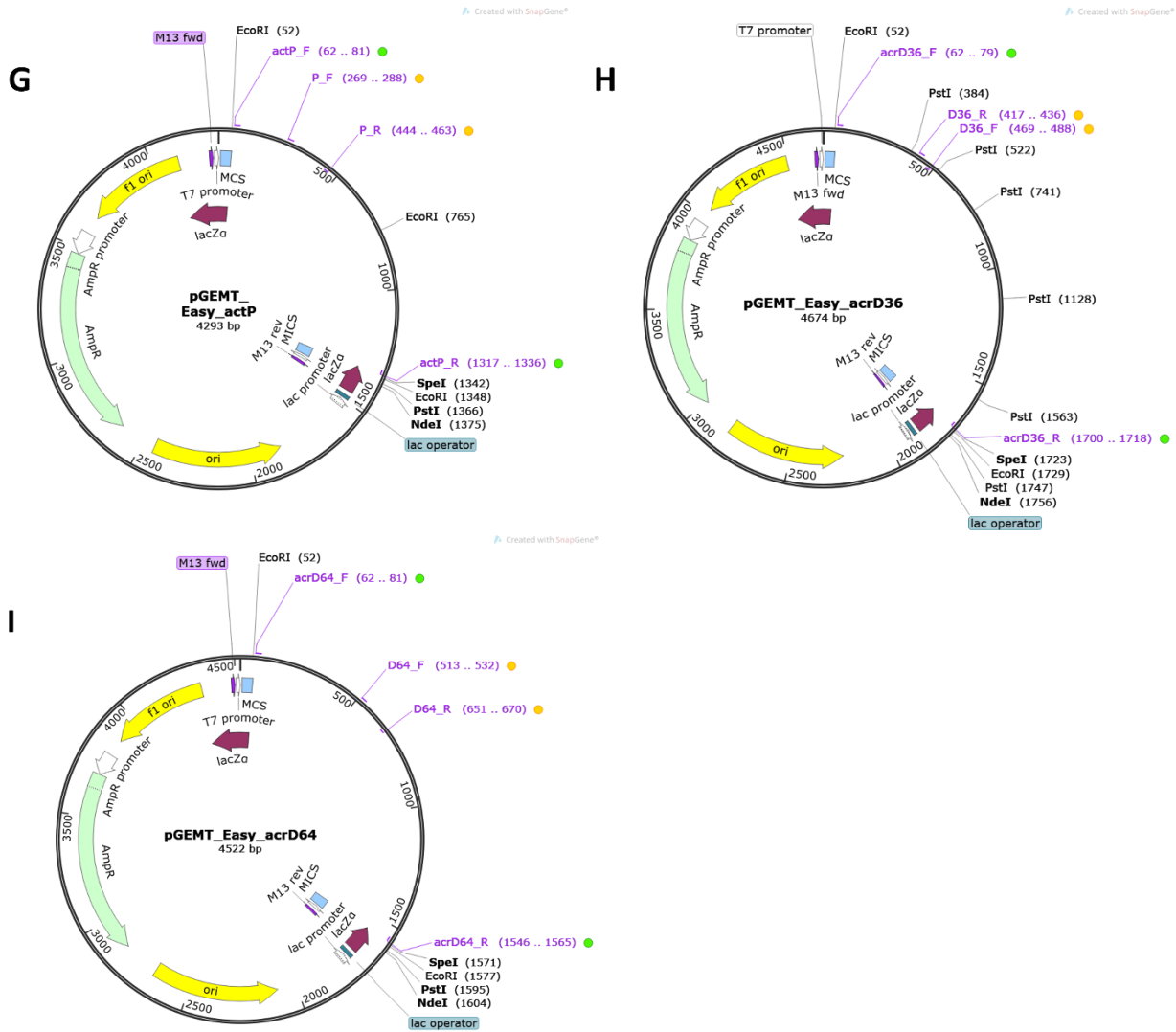


**Tabla 3|Cuantificación plásmidos pGEMT-Easy\_gen.** Se presentan la concentración de cada uno de los plásmidos purificados (ng/μL).

| Plásmido                              | Concentración ADN [ng/uL] |
|---------------------------------------|---------------------------|
| pGEM-T Easy <i>_actP_clon1</i>        | 164,2                     |
| pGEM-T Easy <i>_actP_clon6</i>        | 163,4                     |
| pGEM-T Easy <i>_acrD64_clon3</i> (12) | 123,76                    |
| pGEM-T Easy <i>_acrD64_clon4</i> (13) | 52,8                      |
| pGEM-T Easy <i>_acrD36_clon 3</i>     | 119                       |
| pGEM-T Easy <i>_acrD36_clon 2</i>     | 91,1                      |
| pGEM-T Easy <i>_copBrh2_clon4</i>     | 143,84                    |
| pGEM-T Easy <i>_copBrh2_clon6</i>     | 140,28                    |
| pGEM-T Easy <i>_copA36_clon4</i>      | 278                       |
| pGEM-T Easy <i>_copA36_clon9</i>      | 189,2                     |
| pGEM-T Easy <i>_golT36_clon2</i>      | 310                       |
| pGEM-T Easy <i>_golT36_clon4</i>      | 426                       |
| pGEM-T Easy <i>_copB36_clon1</i>      | 112                       |
| pGEM-T Easy <i>_copB36_clon6</i>      | 306                       |
| pGEM-T Easy <i>_copA64_clon</i>       | 150                       |

En base a estos resultados, se realizaron visualizaciones computacionales de los respectivos plásmidos (**Figura 5**). De este modo se puede observar el mapa del plásmido para una siguiente corroboración por digestión de este. Se incluyeron los siguientes elementos gráficos, partidores M13, enzimas de restricción de 1 o cortes, partidores de clonamiento y partidores de qPCR, operador *lac* y resistencia a ampicilina.





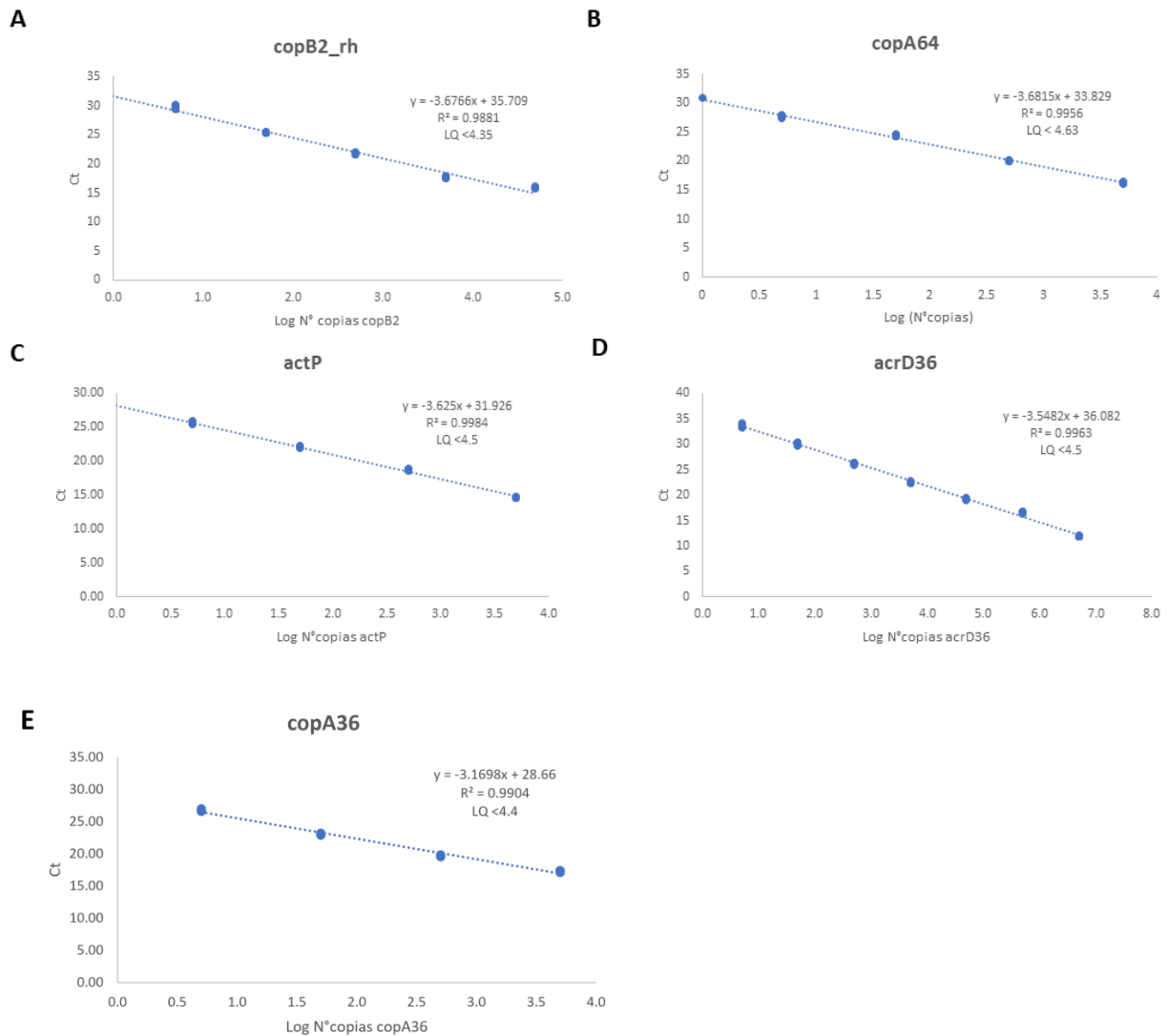
**Figura 5] Mapas de visualización de los plásmidos purificados.** Se presentan los mapas de los plásmidos A) pGEMT-Easy\_copA36, B) pGEMT-Easy\_copA64, C) pGEMT-Easy\_copB36, D) pGEMT-Easy\_golT64, E) pGEMT-Easy\_golT36, F) pGEMT-Easy\_copB2, G) pGEMT-Easy\_actP, H) pGEMT-Easy\_acrD36 e I) pGEMT-Easy\_acrD64. En color violeta se presentan los partidores M13, partidores de clonamiento y partidores de qPCR, en el centro de cada plásmido se encuentra su identificación y su tamaño total en pares de base.

### 6. Curvas de calibración

A partir de los plásmidos puros y cuantificados, se construyó la curva de calibración para cada uno de los genes de interés, para esto luego de ser dispuesto para la construcción de la curva y correspondiente alícuota se cuantificó la concentración y mediante la fórmula 3 se estimó el número de copias correspondiente a cada una de las concentraciones (**Figura 6**).



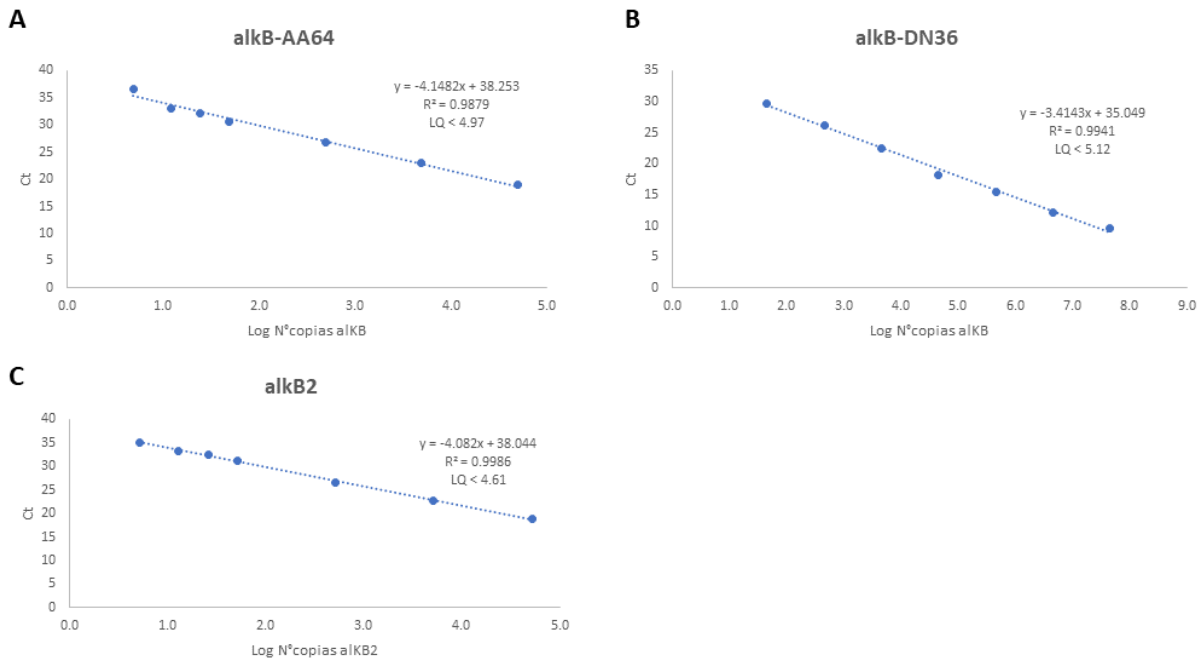
Se construyeron las respectivas curvas de calibración para los genes de respuesta a cobre, los cuales fueron exitosamente ingresados en el vector, transformados y corroborada su inserción. Se linealizaron los plásmidos mediante enzimas de restricción de un solo corte. De este modo se obtuvo la curva de calibración para *copB2\_rh*, *copA\_ac*, *actP*, *acrD\_ps* y *copA\_ps* (**Figura 7**), se calculó la ecuación de la recta que representa el comportamiento, el límite de cuantificación (LQ) y la linealidad ( $R^2$ ) (**Figura 7**).



**Figura 7| Curvas de calibración de los genes de respuesta a cobre.** Se presentan en A) *copB2\_rh*, B) *copA\_ac*, C) *actP*, D) *acrD\_ps* y E) *copA\_ps*

Se construyeron las respectivas curvas de calibración para los genes de degradación de HC, los cuales fueron exitosamente ingresados en el vector, transformados y corroborada su inserción. Se linealizaron los plásmidos mediante enzimas de restricción de un solo corte. De este modo se obtuvo la curva de calibración para *alkB\_ac64*, *alkB\_DN36* y *alkB2* (**Figura 8**), se calculó la

ecuación de la recta que representa el comportamiento, el límite de cuantificación (LQ) y la linealidad ( $R^2$ ) (**Figura 8**).



**Figura 8** | Curva de calibración de genes de degradación de HC. A) *alkB\_ac64*, B) *alkB\_DN36* y C) *alkB2*.

### Genómica computacional

Se utilizó el visualizador de genomas GenoVi para graficar de una manera sencilla y amigable los genomas pertenecientes a las cepas pertenecientes al consorcio, de este modo, se aprecia la cantidad de cromosomas en cada uno de ellos genomas y su número de plásmidos. De este modo DN36 presenta 1 sólo cromosoma de 4,21 Mb, AA64 tiene 1 cromosoma de 3,63 Mb y 3 plásmidos, DD78 similar con 1 cromosoma de 3,01 Mb y 3 plásmidos, finalmente ICBD2 presenta 1 cromosoma de 6,35 Mb y 1 plásmido (**Figura 9**).



## 1. Identificación in silico

**Tabla 4 | Identificación de los genes de respuesta a cobre de las cepas pertenecientes al consorcio presentes en la base de datos HMTR\_gen.**

| Gen          | Codigo de acceso Uniprot | Identificación    |  | Identidad  | Cobertura                                       |     |
|--------------|--------------------------|-------------------|--|--|---|-----|
|              |                          | Posición genómica | Nombre                                       |  |   |     |
| AA64<br>DD78 | acrD                     | Q8ZN77            | Prodigal_647                                 | Ar_DD78_06430 multidrug efflux RND transporter permease  | 56  | 102 |
|              | actP                     | Q9X5V3            | Prodigal_2805                                | Ar_DD78_27900 copper-translocating P-type ATPase         | 55  | 95  |
|              | copA                     | Q56795            | Prodigal_2800                                | Ar_DD78_27850 copper oxidase                             | 48  | 95  |
|              | copF                     | F4ZBY1            | Prodigal_2805                                | Ar_DD78_27900 copper-translocating P-type ATPase         | 68  | 94  |
|              | copR                     | C6FFR4            | Prodigal_2802                                | Ar_DD78_27870 DNA-binding response regulator             | 65  | 97  |
|              | copR                     | D4PBS0            | Prodigal_2802                                | Ar_DD78_27870 DNA-binding response regulator             | 63  | 98  |
|              | copR                     | Q7X4F8            | Prodigal_2802                                | Ar_DD78_27870 DNA-binding response regulator             | 67  | 100 |
|              | cusR/ylcA                | P0ACZ8            | Prodigal_2802                                | Ar_DD78_27870 DNA-binding response regulator             | 63  | 99  |
|              | golT                     | Q8ZRG7            | Prodigal_1727                                | Ar_DD78_17170 copper-translocating P-type ATPase         | 68  | 98  |
|              | pcoA                     | Q47452            | Prodigal_2800                                | Ar_DD78_27850 copper oxidase                             | 48  | 97  |
|              | pcoR                     | Q47456            | Prodigal_2802                                | Ar_DD78_27870 DNA-binding response regulator             | 59  | 100 |
|              | DN36                     | acrD              | Q8ZN77                                       | Prodigal_1073  | Ps_DN36_10730 multidrug resistance protein MexB | 62  |
| actP         |                          | Q9X5V3            | Prodigal_2745                                | Ps_DN36_27420 copper-translocating P-type ATPase         | 57  | 91  |
| copA         |                          | P59571            | Prodigal_2106                                | Ps_DN36_21030 copper resistance protein A                | 76  | 105 |
| copB         |                          | P12375            | Prodigal_2104                                | Ps_DN36_21010 copper resistance protein B                | 64  | 88  |
| copF         |                          | F4ZBY1            | Prodigal_2086                                | Ps_DN36_27440 hypothetical protein                       | 66  | 72  |
| copR         |                          | C6FFR4            | Prodigal_2747                                | Ps_DN36_27440 DNA-binding response regulator             | 85  | 98  |
| copS         |                          | C6FFR5            | Prodigal_2748                                | Ps_DN36_27450 two-component sensor histidine kinase      | 55  | 98  |
| cueA         |                          | Q8KWW2            | Prodigal_774                                 | Ps_DN36_07740 copper-transporting ATPase                 | 76  | 99  |
| cueR/ybbI    |                          | P0A9G4            | Prodigal_775                                 | Ps_DN36_07750 Cu(I)-responsive transcriptional regulator | 46  | 101 |
| cusA ybdE    |                          | P38054            | Prodigal_2091                                | Ps_DN36_20880 cation transporter                         | 70  | 99  |
| cusR/ylcA    |                          | P0ACZ8            | Prodigal_2747                                | Ps_DN36_27440 DNA-binding response regulator             | 63  | 100 |
| golT         |                          | Q8ZRG7            | Prodigal_2086                                | Ps_DN36_20830 hypothetical protein                       | 51  | 63  |
| pcoA         |                          | Q47452            | Prodigal_2106                                | Ps_DN36_21030 copper resistance protein A                | 74  | 102 |
| pcoB         |                          | Q47453            | Prodigal_2104                                | Ps_DN36_21010 copper resistance protein B                | 55  | 92  |
| pcoB         |                          | Q56796            | Prodigal_2104                                | Ps_DN36_21010 copper resistance protein B                | 54  | 81  |
| pcoR         | Q47456                   | Prodigal_2747     | Ps_DN36_27440 DNA-binding response regulator | 64   | 99  |     |
| ICBD2        | copB                     | O30085            | Prodigal_997                                 | ICBD2_09960 copper-translocating P-type ATPase           | 46  | 99  |
|              | copR                     | Q02540            | Prodigal_4301                                | ICBD2_42980 response regulator MprA                      | 46  | 98  |
|              | ricR                     | O07434            | Prodigal_1634                                | ICBD2_16330 hypothetical protein                         | 64  | 94  |
|              | vfmO                     | O06473            | Prodigal_1371                                | ICBD2_13700 MFS transporter                              | 57  | 99  |

\* Se presentan los genes identificados en cada especie *Acinetobacter* (AA64 y DD78), *Pseudomonas* (DN36) y *Rhodococcus* (ICBD2), su posición genómica (locus tag), el nombre por el cual fueron identificados según el anotador automático, los valores de identidad y cobertura de cada uno de los genes.

Se seleccionaron los genes con mayor identidad



**Tabla 5 | Anotación manual de los genes de respuesta a cobre en las cepas pertenecientes al consorcio.**

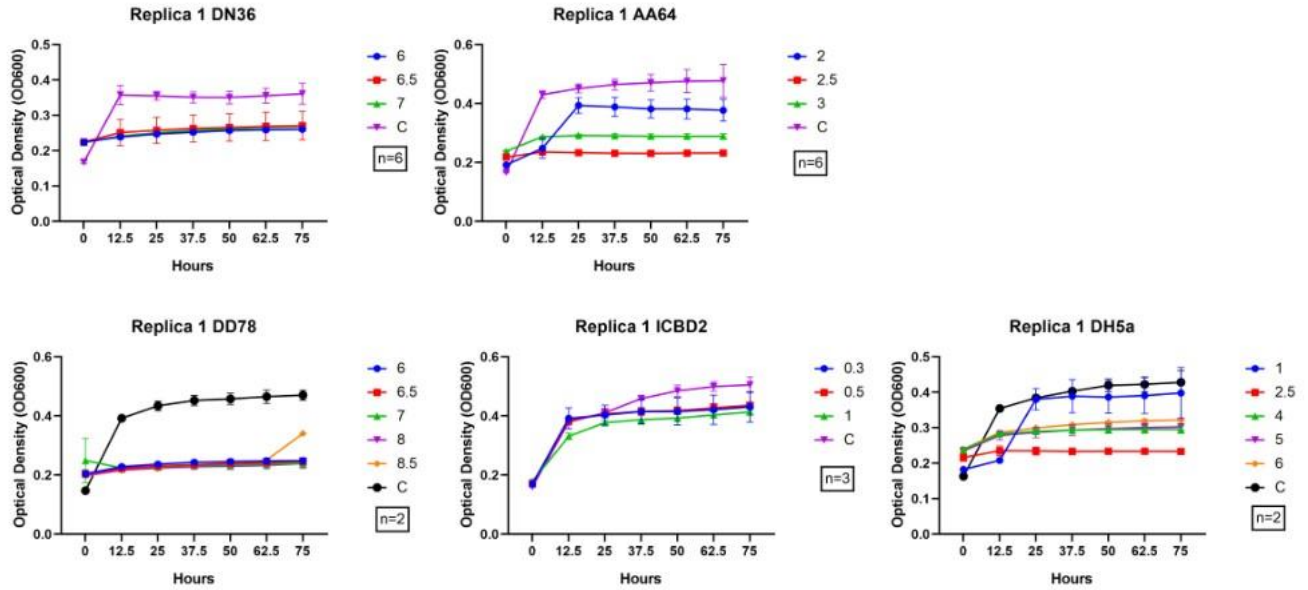
| <b>acrD</b> |               | Efflux pump membrane transporter          |          |  |          |  |
|-------------|---------------|---|----------|--|----------|--|
|             | locus tag     | Protein automatic anotation               | Identity | Blastp identification  | Identity |  |
| AA64        | AA64_25450    | multidrug efflux RND transporter permease | 57       | multidrug efflux RND transporter permease subunit AdeJ                       | 96.03%   |  |
|             | AA64_08440    | multidrug efflux RND transporter permease | 46       | multidrug efflux RND transporter permease subunit [Acinetobact               | 84.73%   |  |
|             | AA64_13600    | AdeB/AdeJ family multidrug efflux RND     | 46       | multidrug efflux RND transporter permease subunit [Acinetobact..             | 85.29%   |  |
| DN36        | Ps_DN36_10730 | multidrug resistance protein MexB         | 62       | efflux RND transporter permease subunit [Pseudomonas]                        | 94.74%   |  |
|             | Ps_DN36_00520 | multidrug resistance protein MexB         | 56       | efflux RND transporter permease subunit [Pseudomonas sagittaria]             | 88.65%   |  |
| DD78        | Ar_DD78_06430 | multidrug efflux RND transporter permease | 56       | multidrug efflux RND transporter permease subunit AdeJ.                      | 84.42%   |  |
| <b>actP</b> |               | Copper-transporting P-type ATPase         |          |  |          |  |
|             | locus tag     | Protein automatic anotation               | Identity | Blastp identification  | Identity |  |
| AA64        | AA64_34280    | copper-translocating P-type ATPase        | 55       | heavy metal translocating P-type ATPase [Acinetobacter] WP_004663996.1       | 99.6%    |  |
|             | AA64_34170    | copper-translocating P-type ATPase        | 47       | heavy metal translocating P-type ATPase [Acinetobacter] WP_005006349.1       | 99.30%   |  |
| DN36        | Ps_DN36_27420 | copper-translocating P-type ATPase        | 57       | heavy metal translocating P-type ATPase [Pseudomonas balearica]              | 95.88%   |  |
|             | Ps_DN36_07740 | copper-translocating ATPase               | 46       | heavy metal translocating P-type ATPase [Pseudomonas...                      | 84.97%   |  |
| DD78        | Ar_DD78_27900 | copper-translocating P-type ATPase        | 55       | heavy metal translocating P-type ATPase [Acinetobacter marinus]              | 98.99%   |  |
|             | Ar_DD78_27980 | copper-translocating P-type ATPase        | 46       | heavy metal translocating P-type ATPase [Acinetobacter]                      | 99.88%   |  |
|             | Ar_DD78_17170 | copper-translocating P-type ATPase        | 47       | heavy metal translocating P-type ATPase [Psychrobacter]                      | 83.15%   |  |
| <b>golT</b> |               | copper-translocating P-type ATPase        |          |  |          |  |
|             | locus tag     | Protein automatic anotation               | Identity | Blastp identification  | Identity |  |
| AA64        | AA64_34170    | copper-translocating P-type ATPase        | 66       | heavy metal translocating P-type ATPase [Acinetobacter]                      | 99.33%   |  |
|             | AA64_34280    | copper-translocating P-type ATPase        | 46       | heavy metal translocating P-type ATPase [Acinetobacter]                      | 99.62%   |  |
| DN36        | Ps_DN36_27420 | copper-translocating P-type ATPase        | 47       | heavy metal translocating P-type ATPase [Pseudomonas balearica]              | 95.88%   |  |
| DD78        | Ps_DN36_20830 | hypothetical protein                      | 51       | pirin-like bicupin family protein [Acinetobacter]                            | 76.75%   |  |
|             | Ar_DD78_17170 | copper-translocating P-type ATPase        | 68       | heavy metal translocating P-type ATPase [Psychrobacter]                      | 86.15%   |  |
| <b>copA</b> |               | Copper resistance protein A               |          |  |          |  |
|             | locus tag     | Protein automatic anotation               | Identity | Blastp identification  | Identity |  |
| AA64        | AA64_34330    | copper oxidase                            | 47       | copper resistance system multicopper oxidase [Alkanindiges..                 | 95.07%   |  |
| DN36        | Ps_DN36_21030 | copper resistance protein A               | 76       | copper resistance system multicopper oxidase [Pseudomonas]                   | 100.00%  |  |
|             | Ps_DN36_27380 | copper resistance protein A               | 72       | copper resistance system multicopper oxidase [Pseudomonas]                   | 87.06%   |  |
| DD78        | Ar_DD78_27850 | copper oxidase                            | 46       | multicopper oxidase domain-containing protein [Alkanindiges..                | 96.90%   |  |
|             | Ar_DD78_27760 | copper oxidase                            | 47       | multicopper oxidase domain-containing protein [Acinetobacter]                | 93.88%   |  |
| <b>copB</b> |               | Copper translocating P-type               |          |  |          |  |
|             | locus tag     | Protein automatic anotation               | Identity | Blastp identification  | Identity |  |
| ICBD2       | ICBD2_9960    | copper-translocating P-type ATPase        | 46       | Copper-exporting P-type ATPase B; Cu(+)-exporting ATPas [Enterococcus hirae] | 40       |  |
| DN36        | DN36_21010    | copper resistance protein B               | 64       | Copper resistance protein B [Pseudomonas syringae pv. Tomato]                | 64       |  |

\* Se presentan los genes identificados en cada especie *Acinetobacter* (AA64 y DD78), *Stutzerimonas* sp. (DN36) y *Rhodococcus* (ICBD2), su posición genómica (locus tag), el nombre por el cual fueron identificados según el anotador automático, identidad, identificación manual y porcentaje de identidad por BLASTp.

## Tolerancia a cobre

### 1. Determinación concentración mínima inhibitoria de CuSO<sub>4</sub>

Tolerancia a CuSO<sub>4</sub>\*5H<sub>2</sub>O – Medio Líquido



**Figura 10| Curvas de crecimiento en diferentes concentraciones de CuSO<sub>4</sub>.** Se presentan las curvas de crecimiento de las cepas pertenecientes al consorcio DN36, AA64, DD78, ICBD2 y el control negativo DH5α, con sus respectivos n, en la leyenda de cada gráfico se indica la concentración a la cual fueron sometidas, así mismo su control (C), es decir sin solución metálica.

**Tabla 6 |Resumen tolerancia a metales y comparación con una bacteria de resistencia modelo.**

| Metal Ionic Form | Formulation Compound                  | ILS Soil Contamination [mg/kg] | % Regulation | Time [h] | Replica number | mM                |                   | Model Resistance Bacteria | MIC (mM) |        |           |        |
|------------------|---------------------------------------|--------------------------------|--------------|----------|----------------|-------------------|-------------------|---------------------------|----------|--------|-----------|--------|
|                  |                                       |                                |              |          |                | Min. Tested range | Max. Tested range |                           | AA64     | DD78   | DN36      | ICBD2  |
| Cd <sup>+2</sup> | CdCl <sub>2</sub>                     | -                              | -            | 71       | 2              | 0.002             | 4.2               | 4                         | <0.2     | <0.2   | 0.02-0.05 | <0.002 |
| Cu <sup>+2</sup> | CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O | 1406                           | 1,1          | 71       | 2              | 1.24              | 22                | 3                         | 2.48     | 7-8    | 6.2       | 1      |
| Cr <sup>+6</sup> | K <sub>2</sub> CrO <sub>4</sub>       | 2,87                           | 1,1          | 71       | 2              | 0.1               | 5                 | 0.4                       | <0.01    | <0.01  | <0.01     | <0.01  |
| Hg <sup>+2</sup> | HgCl <sub>2</sub>                     | 1,155                          | 1,1          | 71       | 2              | 0.1               | 5                 | 0.0027                    | <0.1     | <0.1   | <0.1      | <0.1   |
| Mg <sup>+2</sup> | MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O | -                              | -            | 71       | 2              | 1                 | 20                | -                         | 1        | 1      | 2         | 2-1    |
| Ni <sup>+2</sup> | NiSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O | 17                             | 0,0          | 71       | 2              | 0.5               | 12                | 13                        | <0.5     | <0.5   | 2.3       | <0.5   |
| Zn <sup>+2</sup> | ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O | 181,75                         | 3,4          | 54       | 2              | 1                 | 20                | 12                        | <1       | <1     | -         | <1     |
| Ag <sup>+1</sup> | AgNO <sub>3</sub>                     | -                              | -            | 71       | 2              | 0.001             | 20                | 0.0005                    | -        | -      | -         | -      |
| Co <sup>+2</sup> | CoCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O | -                              | -            | 50       | 2              | 0.006             | 10                | 25                        | >9       | >9     | >9        | >9     |
| Pb <sup>+2</sup> | Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>     | 203                            | 3,4          | 70       | 2              | 0.005             | 1                 | 1                         | <0.005   | <0.005 | <0.005    | <0.005 |

\*ILS Soil Contamination [mg/Kg]. Superficial soil samples from "Las Salinas", south site.

\*% Percentage of excess with respect to the regulation.

\*Replica number: Technical replica number

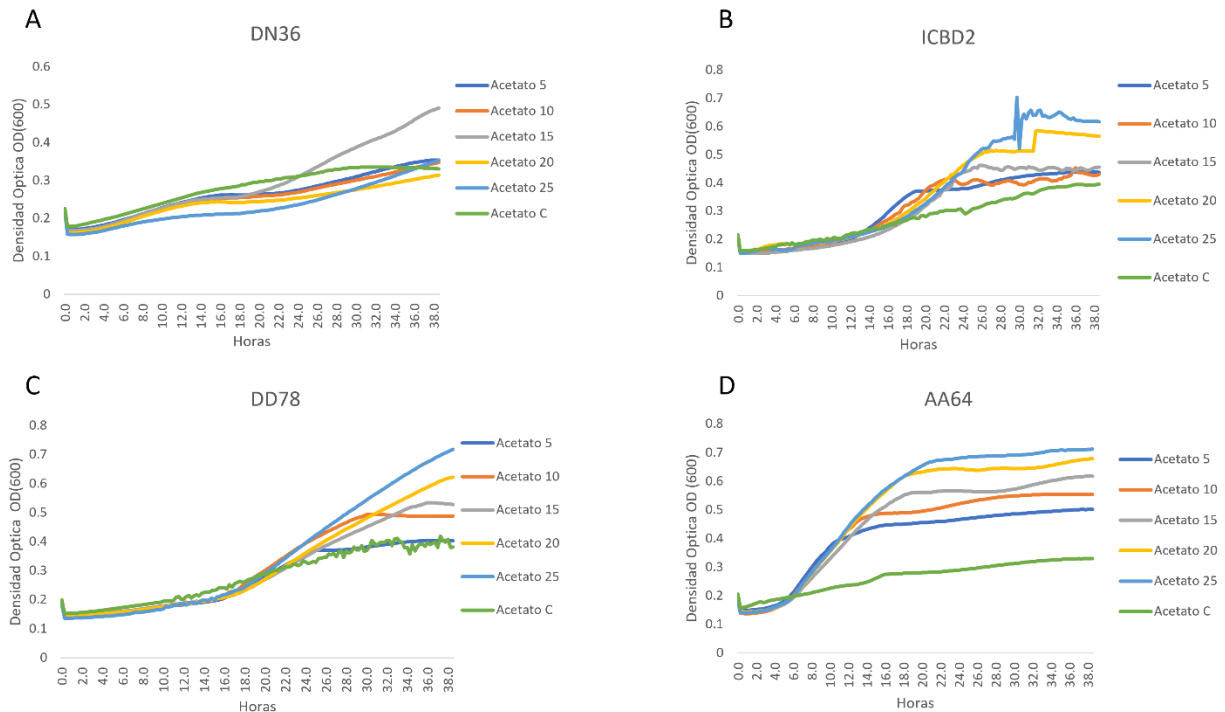
\*Model Resistance bacteria: *Ralstonia Metalliduran* CH34, reported MIC in Tris mineral medium

\*Se presentan además de los datos previamente informados, un resumen de las concentraciones contaminación del terreno a biorremediar y la capacidad de tolerancia de una cepa modelo como los es *Ralstonia metalliduran* CH34, su capacidad de tolerancia se extrajo de la literatura.

## Crecimiento en diversas fuentes de carbono

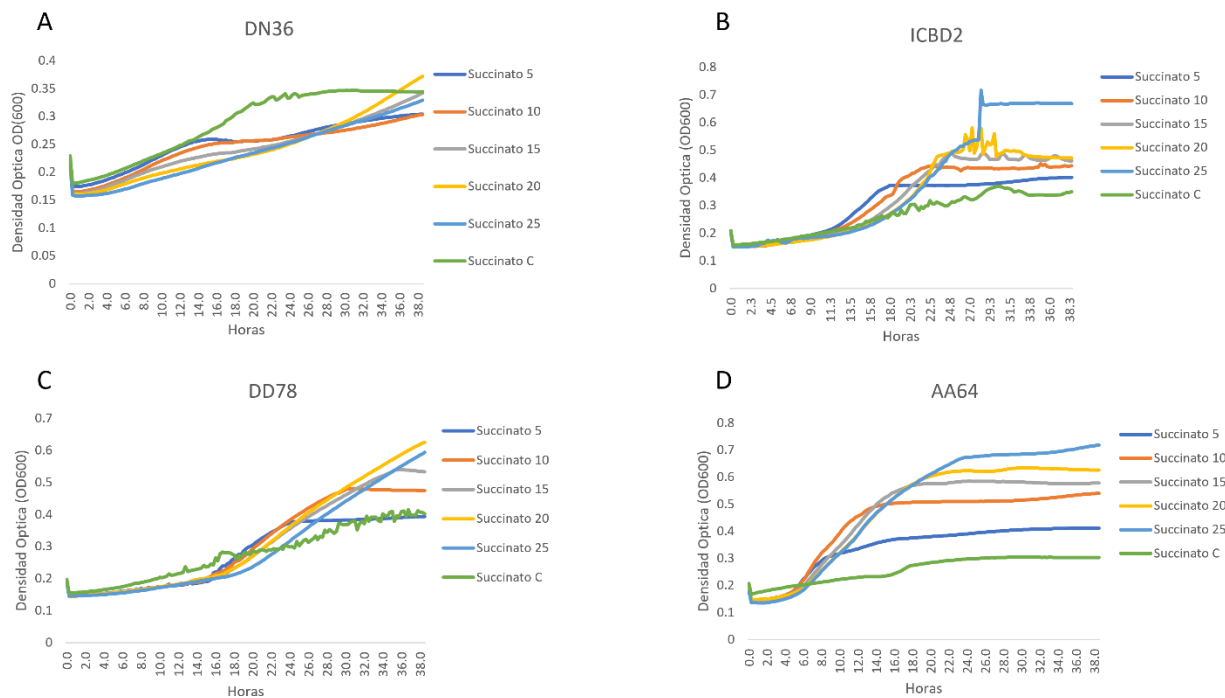
### 1. Crecimiento en fuentes de carbono convencionales

Se evaluó el crecimiento de las cepas pertenecientes al consorcio en un espectrofotómetro de placa, éstas se sometieron a diferentes concentraciones de acetato (**Figura 11**) y succinato (**Figura 12**), se realizaron mediciones en intervalos de 15 min por 38 h a una densidad óptica de 600nm. Se observó que el óptimo crecimiento, es decir, mayor nivel de turbidez se presentó para DN36, ICBD2, DD78 y AA64 con los valores de 15, 25, 25 y 25 respectivamente. La densidad óptica alcanzada a una concentración de 20 mM acetato fue para DN36, ICBD2, DD78 y AA64, alcanzó los rangos 0,2-0,3, 0,5-0,6, 0,5-0,6 y 0,6-0,7 respectivamente.



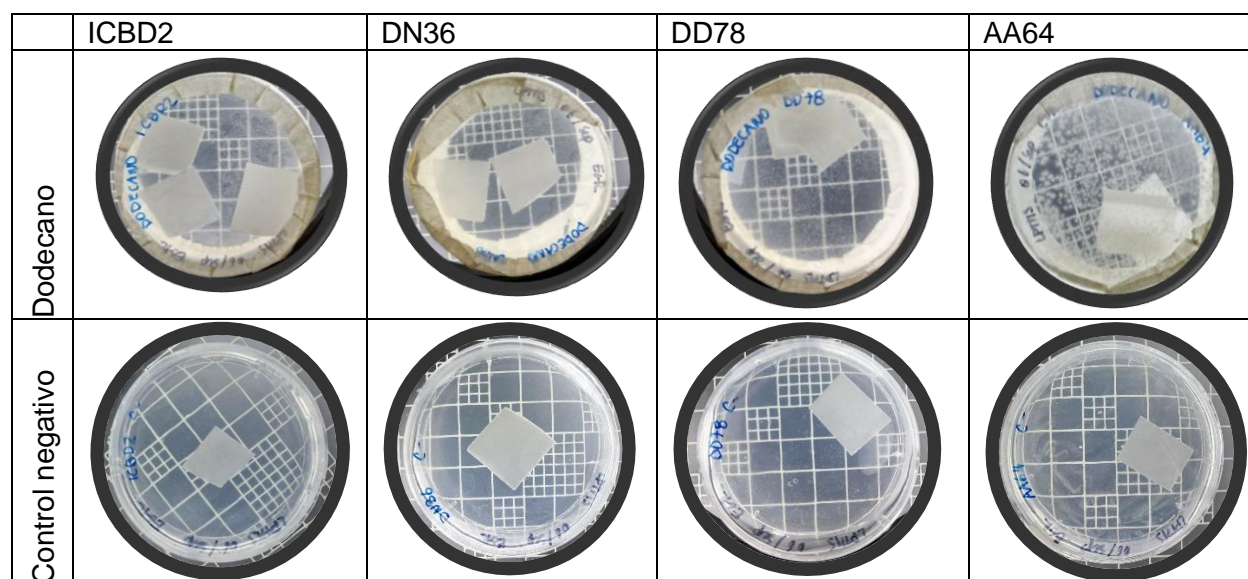
**Figura 11| Curvas de crecimiento en acetato.** Se presenta todos los puntos graficados pertenecientes a las curvas de crecimiento de las cepas pertenecientes al consorcio A) DN36, B) ICBD2, C) DD78 y D) AA64. En la leyenda de cada gráfico se indica la concentración a la cual fueron sometidas (5, 10, 15, 20 y 25 mM acetato), así mismo su control (C), es decir sin fuente carbono. n=2.

Se realizaron las mismas mediciones cambiando la fuente de carbono a succinato (**Figura 11**). Se observó que el óptimo crecimiento, es decir, mayor nivel de densidad óptica se presentó para DN36, ICBD2, DD78 y AA64 con los valores de 20, 25, 20 y 25 respectivamente. La turbidez alcanzada a una concentración de 20 mM para DN36, ICBD2, DD78 y AA64, alcanzo los rangos 0,3-0,35, 0,4-0,5, 0,5-0,6 y 0,6-0,7 respectivamente.



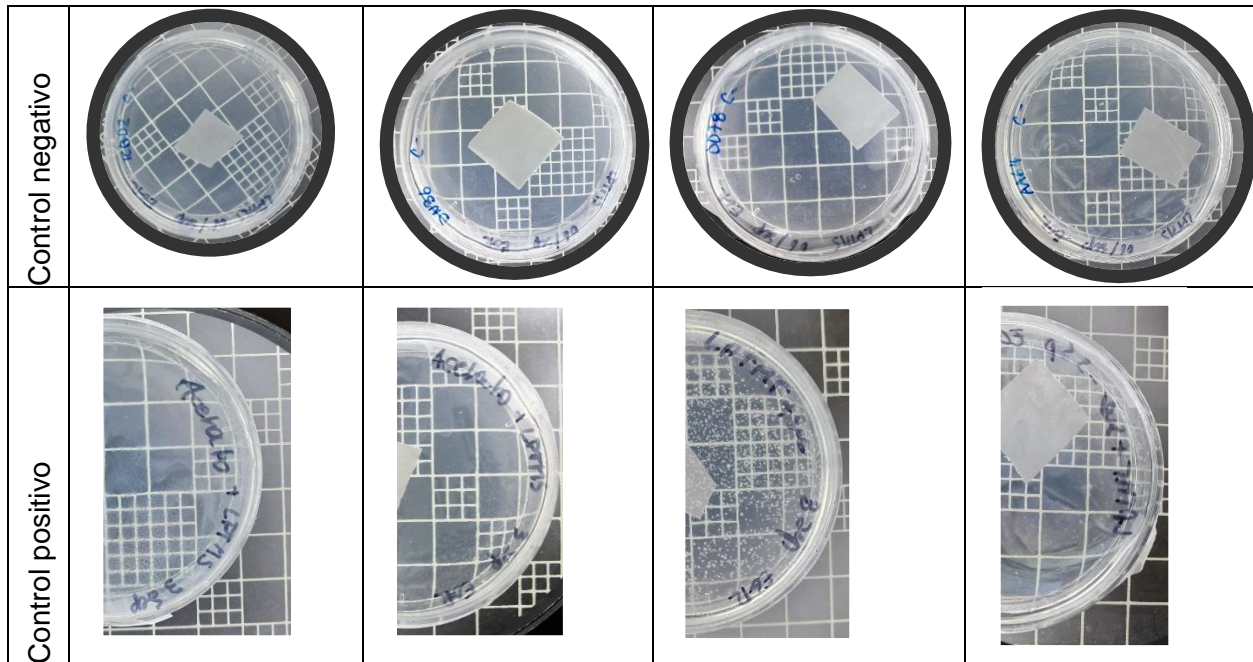
**Figura 12| Curvas de crecimiento en succinato.** Se presenta todos los puntos graficados pertenecientes a las curvas de crecimiento de las cepas pertenecientes al consorcio A) DN36, B) ICBD2, C) DD78 y D) AA64. En la leyenda de cada gráfico se indica la concentración a la cual fueron sometidas (5, 10, 15, 20 y 25 mM succinato), así mismo su control (C), es decir sin fuente carbono. n=2.

## 2. Crecimiento en medio sólido





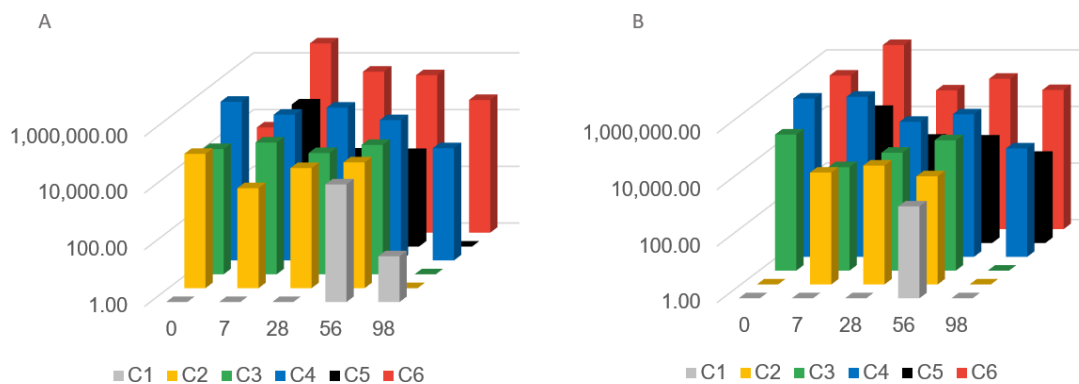
|                  |  |  |  |  |
|------------------|--|--|--|--|
| Control positivo |  |  |  |  |
| n-hexano         |  |  |  |  |
| Control negativo |  |  |  |  |
| Control positivo |  |  |  |  |
| ciclohexano      |  |  |  |  |



**Imagen 1| Crecimiento en medio sólido en diferentes hidrocarburos alifáticos de las cepas pertenecientes al consorcio.** Se presentan las imágenes de los crecimientos en medio sólido LPTMS con un 1% v/v de dodecano, n-hexano y ciclohexano, además de sus respectivos controles negativos y control positivo (acetato).

Comunidad bacteriana en suelo

### 1. Recuento de heterótrofos hidrocarbonoclasticos



**Figura 13| Recuento de heterótrofos tolerantes a diésel en los núcleos de suelo.** Se presenta el Log del recuento de unidades formadoras de colonias por gramo de suelo en el tiempo. Se incluyen las condiciones C1, suelo control, C2, suelo bioestimulado, C3, suelo bioestimulado y bioaumentado, C4, suelo bioestimulado y bioaumentado con células inmobilizadas, C5, suelo bioestimulado y bioaumentado co-contaminado con cobre y C6, suelo bioestimulado y bioaumentado con antioxidantes naturales. En A) observamos el promedio de la toma de muestra superior (TM1) y en B) promedio de la toma de muestra inferior (TM3), n=2. (LAMMBA, No publicado).

## 2. Recuento de heterótrofos en suelo estéril

### Suelo esterilizado

3 ciclos de autoclavado  
Ciclo 1-2 con 12 hrs secado 60°C  
Ciclo 3 con 48 hrs secado 60°C



Agitación 10 min, máxima potencia  
NaCl 0,85%

### Microcosmos

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  + Diésel 1% v/v



Figura 14| Suelo estéril y estrategia experimental.