



UNIVERSIDAD DE CHILE -FACULTAD DE CIENCIAS -ESCUELA DE PREGRADO

“Estudio de comunidades microbianas provenientes de suelos antárticos capaces de biodegradar hidrocarburos del petróleo en presencia de metales pesados”

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

Paula Rivas Álvarez

Director del Seminario de Título: Dr. José Manuel Pérez Donoso
Patrocinante: Dr. Ricardo Cabrera

Mayo 2021

Santiago – Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el o (la) candidato (a):

PAULA GABRIELA RIVAS ÁLVAREZ

“Estudio de comunidades microbianas provenientes de suelos antárticos capaces de biodegradar hidrocarburos del petróleo en presencia de metales pesados”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

Director Seminario de Título: Dr. José Manuel Pérez Donoso

Profesor patrocinante: Dr. Ricardo Cabrera

COMISIÓN REVISORA Y EVALUADORA

Presidente Comisión: Dra. Julieta Orlando

Evaluador: Dra. Marcelo Baeza

Santiago de Chile, mayo 2021

BIOGRAFÍA



Nací en el campamento de Chuquicamata y a los 10 años me fui a vivir a Calama. Desde pequeña fui muy curiosa por comprender como funciona nuestro entorno. Me gustaba jugar a hacer experimentos debajo de mi cama imaginando que era un laboratorio secreto. A los 18 mis juegos de niña se convirtieron algo real, cuando me fui a estudiar a Santiago, Ingeniería en Biotecnología Molecular. Asustada porque era una carrera poco conocida sin saber bien lo que me esperaba, comencé a hacer ciencia y me encantó. El 2018 tuve la oportunidad de participar en la competencia iGEM, Gracias a aquella experiencia conocí ciencia de todo el mundo, pero por sobre todo aprendí una de las cosas más valiosas para mi futuro; el trabajo en Equipo. El 2019 ingresé al laboratorio de Bionanotecnología y Microbiología de la UNAB, motivada por aprender sobre nanotecnología. Aquí conocí todo un mundo relacionado con los organismos extremófilos, lo que me llevó a cambiar de línea de investigación. Hoy terminando mi carrera de pregrado y primera investigación, más encantada que nunca con la microbiología, no me queda más que agradecer a la vida por lo afortunada que soy.

En mis tiempos libres de ciencia, me gusta el practicar Ballet, danza contemporánea y pedalear hasta donde me lleven las patitas y me aguante la rodilla.

DEDICATORIA

Las Araucarias son árboles que pueden vivir cientos de años. Las Araucarias me recuerdan al sur, me recuerdan a mi familia, me recuerdan a mi abuelita. Noventa y seis años con nosotros, siento que fueron muy pocos.

Dedicado a mi querida Tía Ruthy y a mi abuelita Juana. Aún las siento vivas en nuestros corazones, en nuestras memorias, en su legado, en la familia. Y vivirán por cientos de años más, como la Araucaria.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar al Dr. José Manuel Pérez por aceptarme en su laboratorio, por confiar en mí y por todo lo que pude aprender gracias mi estadía ahí. También quiero agradecer a todo el nanoequipo, por su infinita paciencia, buena disposición y las infaltables risas que muchas veces me motivaron a seguir adelante pese a las dificultades y frustraciones. En especial quiero agradecer a las chiquillas del laboratorio por su tremendo apoyo emocional, su calidad humana y profesional. A Seba por su buena gestión y disposición. A Bruna, Mati y Javier por las eternas conversaciones científicas y las infaltables risas. A Enzo, por haber sido mi pilar durante todo el proceso, por acompañarme a comer los postres que no merecíamos, simplemente por estar ahí para prestarme su hombro siempre que lo necesité.

A mis amigas del colegio por su fundamental apoyo, por estar siempre para mí pese a la distancia y a que cada una tomó su propio camino. A mis amigo/as de la U, quienes bien saben que no podría haber sacado esta carrera sin su apoyo en lo académico y en lo personal. Infinitas gracias por soportarme, por quererme como soy y por siempre estar. Por último y lo más importante, quiero agradecer a mi familia. A mi papá por su infinita paciencia y por incentivar mis ganas de aprender desde que era muy niña, por ayudarme a convencerme a mí misma de la locura de estudiar esta carrera, por ayudarme a confiar en mí, y por todo su esfuerzo para que pudiera estudiar lo que me hiciera feliz. A mi mami, quien con solo escuchar un “hola” mío, sabe lo que me pasa y lo que necesito, por apoyarme en mis locuras, por enseñarme a ser positiva y salir adelante. Finalmente, agradecer a mis hermanas, quienes siempre han sido mis cómplices, mis compañeras, mis mejores amigas.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Contenido

BIOGRAFÍA	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	v
ÍNDICE DE TABLAS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Antártica.....	1
1.2 Impacto Antropogénico.....	2
1.3 Contaminación por hidrocarburos.....	3
1.4 Biorremediación de diésel	4
1.5 Efecto de los metales sobre la biodegradación de diésel	8

1.6 Estudios previos	9
1.7 Hipótesis	12
1.8 Objetivo general	12
1.9 Objetivos específicos	12
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
2.1 Sitios de muestreo.....	13
2.2 Preparación de medios de cultivo.....	13
2.3 Selección de microorganismos degradadores de diésel y fenantreno a 28°C y 4°C.	14
2.4 Secuenciación masiva del gen ARNr 16S	15
2.5 Aislamiento de microorganismos degradadores de fenantreno y diésel.	16
3. RESULTADOS	17
3.1 Selección de microorganismos a diferentes temperaturas.....	17
3.2 Aislamiento de microorganismos.....	24
3.3 Análisis de diversidad bacteriana de las muestras de suelo	25
3.4 Análisis de diversidad bacteriana después del proceso de selección	30
4. DISCUSIÓN Y PROYECCIONES	41

4.1 Relevancia de la investigación	41
4.2 Selección microbiana a diferentes temperaturas	41
4.3 Análisis de diversidad bacteriana de las muestras de suelo	43
4.4 3.4 Análisis de diversidad bacteriana después del proceso de selección	48
4.5 Proyecciones.....	55
5. CONCLUSIONES	56
6. BIBLIOGRAFÍA.....	57
ANEXO	69

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Bacterias biodegradadoras de hidrocarburos de diésel en territorio antártico.	7
Tabla 2. Muestras de suelo analizadas.	13
Tabla 3. Microorganismos aislados a partir de los cultivos enriquecidos.	25

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Sitios de muestreo.	10
Figura 2. Esquema del proceso de selección de microorganismos a 28°C.	17
Figura 3. Crecimiento a 28°C de microorganismos de muestras de suelo antártico en presencia de distintas fuentes de carbono y metales.....	20
Figura 4. Esquema del proceso de selección de microorganismos a 4°C..	21
Figura 5. Crecimiento a 4°C de microorganismos de muestras de suelo antártico en presencia de distintas fuentes de carbono y metales.....	23
Figura 6. Índices de diversidad Alpha para muestras de suelo.....	27
Figura 7. Secuenciación masiva del gen ARNr 16S de muestras de suelo antártico..	29
Figura 8. Secuenciación masiva del gen ARNr 16S después de los procesos de selección microbiana	35
Figura 9. Comparación entre las comunidades microbianas antes y después del proceso de selección.....	37
Figura 10. Índices de diversidad Alpha obtenidos a partir de la secuenciación masiva del gen ARNr 16S luego de los procesos de selección bacteriana	40

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARNr: Ácido ribonucleico ribosomal

BaP: Benzo[a]pireno

Cd: Cadmio

Cr: Cromo

EPA: Agencia de protección ambiental, Estados Unidos (por las siglas en inglés "Environmental Protection Agency")

FEN: Fenantreno

HAPs: Hidrocarburos aromáticos policíclicos

HTPs: Hidrocarburos totales de petróleo

Pb: Plomo

RESUMEN

La Antártica es un continente de condiciones climáticas extremas que ha sido escasamente explorado y habitado, situación que ha cambiado en las últimas décadas debido a la instalación de bases científicas. La principal fuente de energía utilizada en estas instalaciones es la combustión de petróleo. Esto se ha convertido en una problemática ambiental debido a constantes derrames de combustibles como el diésel, lo que por sus componentes nocivos resulta muy dañino para los microorganismos, flora y fauna. La biorremediación de hidrocarburos es una alternativa que permite la descontaminación de los suelos con bajo costo e impacto ambiental. Sin embargo, de acuerdo con lo establecido en el Tratado Antártico, se requiere de microorganismos endógenos que sean capaces de biodegradar los hidrocarburos del diésel. Junto con ello, a pesar de que se sabe que el diésel contiene concentraciones importantes de metales pesados tóxicos y que éstos afectan la eficiencia del proceso, su efecto ha sido escasamente estudiado a la fecha.

En este trabajo, se estudiaron dos muestras de suelo antártico provenientes de las Islas Shetland del Sur, contaminadas con diésel, Pb y Cd, y dos muestras provenientes de áreas no contaminadas del mismo lugar. Estas muestras se analizaron mediante una secuenciación masiva del gen ARNr 16S y posteriormente se realizaron dos procesos de selección microbiana en medio mínimo; a 28 °C y a 4°C durante 5 y 8 semanas respectivamente. Se utilizó glucosa (control), diésel, fenantreno, fenantreno con Cd y fenantreno con Pb como fuentes de carbono. Al final de este proceso se compararon las comunidades microbianas presentes en los suelos con las obtenidas luego de los procesos de selección. Por un lado, se encontró que la presencia de los contaminantes provoca un cambio en la estructura y composición microbiana de los suelos, con un

enriquecimiento de bacterias biodegradadoras de hidrocarburos del petróleo, principalmente de los géneros *Pseudomonas*, *Pedobacter*, *Sphingomonas*, *Sphingobium*, *Burkholderia*, *Alkanindiges*, *Sulfuritalea*, *Pseudoxanthomonas*, *Paenibacillus*, *Mucilaginibacter*, *Immundisolibacter*, *Taibaiella*, *Chryseobacterium*, *Dyadobacter* y *Williamsia*, con los 11 primeros asociados con resistencia a metales pesados. Al realizar la selección, la biodegradación y crecimiento microbiano se observó principalmente en los cultivos inoculados con las muestras de suelo contaminado, donde se seleccionaron bacterias pertenecientes a géneros asociados a la biodegradación de hidrocarburos del petróleo. En los cultivos con diésel se encontraron principalmente *Pseudomonas*, mientras que en los cultivos que contenían fenantreno como fuente de carbono, se encontró una mayor diversidad de bacterias, donde se favorecieron representantes de los géneros *Pseudomonas*, *Pigmentiphaga*, *Variovorax*, *Sphingobium*, *Burkholderia*, *Mucilaginibacter*, *Polaromonas* y *Pedobacter*. En presencia de los metales se encontraron resultados similares, observándose principalmente un favorecimiento de representantes de los géneros *Variovorax* en presencia de Cd y *Sphingobium* en presencia de Pb. Estos resultados recalcan la importancia de estudiar el efecto de la co-contaminación de hidrocarburos con metales sobre las comunidades microbianas de zonas tan sensibles como los suelos antárticos, y también la relevancia de considerar los metales pesados al seleccionar los microorganismos óptimos para una biorremediación eficiente.

ABSTRACT

Antarctica is a continent of extreme climatic conditions that has been scarcely explored and inhabited, a situation that has changed in the recent decades due to the installation of scientific stations. The main source of energy used in these facilities is the combustion of oil. This has become an environmental problem due to constant spills of fuels such as diesel, which due to its noxious components is harmful to microorganisms, flora and fauna. Bioremediation of hydrocarbons is an alternative that allows the decontamination of soils with low cost and environmental impact. However, in accordance with the Antarctic Treaty, endogenous microorganisms that are capable of biodegrading diesel hydrocarbons are required. Along with this, even though diesel is known to contain significant concentrations of toxic heavy metals and that these affect the efficiency of the process, its effect has been scarcely studied to date.

In the present work, we studied two samples of Antarctic soil from the South Shetland Islands, contaminated with diesel, Pb and Cd, and two samples from uncontaminated areas of the same place. These samples were analyzed by 16S metagenomics and later two microbial selection processes were carried out in minimum medium: at 28°C and 4°C, during 5 and 8 weeks, respectively. It was used glucose (control), diesel, phenanthrene, phenanthrene with Cd and phenanthrene with Pb as carbon sources. At the end of this process, the microbial communities present in the soils were compared with those obtained after the selection processes. It was found that the presence of the contaminants causes a change in the microbial structure of the soil, with an enrichment of oil hydrocarbon biodegrading bacteria. The bacteria found were mainly of the genus *Pseudomonas*, *Pedobacter*, *Sphingomonas*, *Sphingobium*, *Burkholderia*, *Alkanindiges*, *Sulfuritalea*, *Pseudoxanthomonas*, *Paenibacillus*, *Mucilaginibacter*, *Immundisolibacter*,

Taibaiella, *Chryseobacterium*, *Dyadobacter* and *Williamsia*, with the first 11 associated with resistance to heavy metals. When carrying out the selection process, biodegradation and microbial growth was observed mainly in cultures inoculated with contaminated soil samples. In these cultures, bacteria belonging to genera associated with petroleum hydrocarbon biodegradation were selected. In the cultures with diesel were found mainly *Pseudomonas*, while in the cultures containing phenanthrene as carbon source, a greater diversity of bacteria was found, where bacteria belonging to *Pseudomonas*, *Pigmentiphaga*, *Variovorax*, *Sphingobium*, *Burkholderia*, *Mucilaginibacter*, *Polaromonas* and *Pedobacter* genus were favored. Similar results were found in the presence of the metals, being mainly observed a favoring of bacteria belonging to *Variovorax* genus in the presence of Cd and from *Sphingobium* genus in the presence of Pb. These results highlight the relevance of studying the effect of hydrocarbon co-contamination with metals on microbial communities in sensitive areas such as antarctic soils, and the relevance of considering heavy metals when selecting optimal microorganisms for an efficient bioremediatio

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antártica

La Antártica es el continente más austral del planeta, caracterizado por sus condiciones ambientales extremas. Posee el clima más frío de la Tierra con temperaturas sumamente bajas durante todas las estaciones del año, las cuales van en promedio desde -90°C a -10°C en invierno, y desde -40 a 0°C en verano. Las temperaturas más altas se encuentran en zonas costeras y la Península Antártica donde ocasionalmente la temperatura supera los 0°C , de acuerdo a los estudios realizados por el European Centre for Medium-Range Weather Forecasts (ECMWF) (Jones & Lister, 2015). El continente se encuentra rodeado de océano frío y su superficie cubierta permanentemente en más de un 95% por una gruesa capa de hielo, concentrando parte importante del agua dulce del planeta (Lee y col., 2017). Además, durante los meses de verano presenta constante exposición a radiación UV, zonas expuestas a fuertes vientos, recibe escasas precipitaciones y por ende existe una baja disponibilidad de agua (Bargagli, 2005).

Pese a sus condiciones climáticas extremas, en este territorio se encuentran organismos de todos los reinos; pequeños invertebrados, musgos, líquenes, microorganismos, y algunos vertebrados y plantas vasculares, mayoritariamente en zonas terrestres libres de hielo y en agua no congelada (Convey & Stevens 2007; Chown y col., 2015). En específico, la diversidad microbiana que se encuentra en este continente ha sido el foco de investigación de muchos científicos alrededor del mundo. Se ha descrito que en esta zona habitan microorganismos únicos que poseen metabolismos particulares que no

solo les permiten permanecer en el lugar pese a las inhóspitas condiciones climáticas, sino que también participar en los procesos biogeoquímicos que ahí se llevan a cabo (Convey y col., 2014; Cowan y col., 2014; Makhalanyane y col., 2016).

1.2 Impacto Antropogénico

La Antártica es fundamental para el mantenimiento del ecosistema global, puesto que juega un rol importante en la circulación de océanos y la atmósfera terrestre (Bargagli 2005), lo cual se ha visto afectado debido al cambio climático y el calentamiento global (Turner y col., 2013). Sumado a ello, la actividad humana tanto en la Antártica como en otras partes del mundo, ha perturbado el ecosistema de este territorio.

Por un lado, dado que existen grandes movimientos de masas de agua y aire entre la Antártica y el resto de la Tierra, han llegado a esta zona contaminantes producidos en otras partes del mundo, muchos de los cuales son persistentes (Szopińska y col., 2016).

Por otro lado, la llegada del ser humano al continente ha tenido un fuerte impacto principalmente por la contaminación de ecosistemas costeros terrestres y marinos. Si bien, la Antártica es uno de los territorios con menos intervención humana de la Tierra, desde hace unos 50 años esto ha ido en aumento tanto en el ámbito turístico, económico (explotación de recursos marítimos), y científico, dado el creciente interés mundial en variadas disciplinas por explorar este continente (Chown y col., 2015). Lo anterior ha tenido como consecuencia una alta combustión para producción de energía y transporte, incineración de residuos, generación de aguas residuales y derrames accidentales de petróleo (Bargagli, 2008). La contaminación por petróleo es uno de las más preocupantes dada la persistencia del contaminante y sus consecuencias medioambientales (Chang y col., 2014).

1.3 Contaminación por hidrocarburos

Durante décadas, combustibles derivados del petróleo han sido utilizados en bases científicas ubicadas en distintas zonas de la Antártica, para generar energía, calefacción y para el funcionamiento de vehículos y aviones (Jesus y col., 2015). Esto se ha convertido en una problemática ambiental debido a reiterados derrames del producto en suelos y aguas, principalmente desde tanques de almacenaje, tuberías o navíos que transportan el combustible, por lo que es usual encontrar hidrocarburos del petróleo en zonas costeras donde se encuentran las bases o en sus cercanías (Aislabie y col., 2004).

El gasóleo o diésel es uno de los combustibles derivados del petróleo más utilizado en la Antártica, principalmente con una formulación que le permite funcionar a bajas temperaturas. Posee una composición compleja que lo hace muy nocivo cuando es derramado al medioambiente. Está constituido principalmente por moléculas de origen orgánico, incluyendo mayoritariamente hidrocarburos alcanos tipo parafinas en alrededor del 80% (n-alcanos, iso y ciclo alcanos) y también compuestos aromáticos (aproximadamente 20%). Dentro de estos últimos se encuentran los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), que se caracterizan por ser de los componentes del gasóleo más recalcitrantes en el medio ambiente (Lee y col., 1992; Košnář y col., 2018). Además, son muy tóxicos dado que han sido descritos como teratogénicos, cancerígenos y mutagénicos para bacterias y células animales (Wilson & Jones 1993; Li y col., 2019), por lo cual varios de ellos como el fenantreno, el benzo[a]pireno, el naftaleno y el antraceno, han sido catalogados como prioridad para la EPA (Agencia de protección ambiental, Estados Unidos).

El diésel también contiene algunos compuestos inorgánicos como agentes estabilizantes, isoprenoides, compuestos oxigenados, azufre y nitrógeno (Lee y col., 1992). Además, contiene algunas impurezas dañinas para el medioambiente como metales pesados, encontrándose comúnmente cadmio (Cd), plomo (Pb) y cromo (Cr) en concentraciones importantes (Can der Gon & Appelman 2009; Owamah, 2013).

La contaminación por hidrocarburos del petróleo en zonas costeras terrestres libres de hielo tiene consecuencias medioambientales importantes, principalmente sobre la composición de los suelos. Los efectos incluyen cambios en el pH, temperatura, humedad, concentración de carbono/nitrógeno (Aislabie y col., 2004) y en la composición microbiana de los suelos. Respecto a este último, no solo implica un enriquecimiento de bacterias biodegradadoras de estos hidrocarburos, sino que también trae consigo una disminución en la diversidad microbiana (Delille, 2000; Aislabie y col., 2001; Saul y col., 2005). Los derrames de petróleo además significan un riesgo para la flora y fauna que circunda el lugar, dado que tiende a bioacumularse y puede ser muy dañino debido a su toxicidad (Adams y col., 2015; Ruoppolo y col., 2013).

1.4 Biorremediación de diésel

Los antecedentes anteriormente expuestos generan una preocupación por la conservación del continente Antártico, surgiendo la necesidad de encontrar métodos que permitan la descontaminación de los hidrocarburos del petróleo presentes en este territorio por contaminación de diésel.

La biorremediación es un método que permite transformar contaminantes orgánicos del petróleo en compuestos inocuos mediante la acción enzimática de microorganismos (bacterias u hongos) (Thapa & Ghimire 2012). Esta estrategia posee varias ventajas; es

de bajo costo, no tiene grandes requerimientos tecnológicos y puede ser aplicada *in situ* sin producir perturbaciones importantes en el lugar del tratamiento, convirtiéndola en una forma de descontaminación amigable con el medioambiente (Vidali, 2001).

Existen microorganismos heterótrofos de diferentes géneros capaces de biodegradar los componentes orgánicos del diésel, tanto hidrocarburos alcanos como los HAPs (Wilson & Jones 1993; Bento y col., 2005; Clarkson & Abubakar 2015). En condiciones aeróbicas, la capacidad para biodegradar estos compuestos está determinada por la presencia de enzimas oxigenasas que permiten introducir moléculas de oxígeno en el hidrocarburo generando intermediarios que luego irán a las vías de producción de energía y también se utilizarán para la generación de biomasa permitiendo el crecimiento del organismo (Peixoto y col., 2011; Thapa & Ghimire, 2012). Varios HAPs que se encuentran en el diésel generan estrés oxidativo en los microorganismos debido a su toxicidad, por lo cual aquellos que son capaces de biodegradar estas moléculas, poseen mecanismos que les permiten contrarrestar este daño (Peng y col., 2008).

El fenantreno es uno de los HAPs más utilizados como modelo de estudio para evaluar el potencial biorremediador de diésel en microorganismos. Éste puede ser utilizado como única fuente de carbono en presencia de oxígeno por algunos géneros de bacterias heterótrofas (Peng y col., 2008), es menos tóxico que otros HAPs lo cual se asocia a una mayor solubilidad, haciendo posible su uso en el laboratorio (Di Toro y col., 2007). Además, permite hacer un seguimiento cualitativo del proceso, puesto que al ser biodegradado genera un subproducto llamado 2-hidroxi mucónico- semialdehído, fácilmente identificable por su coloración amarilla en el medio de cultivo (Treccani, 1965; Gran-Scheuch y col., 2017; Liu y col., 2019). Sumado a lo anterior, se ha reportado que microorganismos capaces de biodegradar fenantreno también pueden degradar otros

HAPs de prioridad para la EPA, tales como antraceno, naftaleno y benzo[a]pireno (Fernández-Luqueño y col., 2011). Debido a esto, el fenantreno se considera representativo en los estudios de determinación de la capacidad de biodegradación de compuestos aromáticos policíclicos.

En este contexto, durante las últimas décadas se han llevado a cabo búsquedas de microorganismos nativos que puedan ser de utilidad para la biorremediación de suelos antárticos (Jesus y col., 2015). Esto último es fundamental puesto que el Tratado Antártico restringe la posibilidad de trasladar material biológico desde otros continentes hacia la Antártica. Utilizar microorganismos endógenos produce un bajo impacto ambiental y es imprescindible dado que los microbios que habitan esos suelos poseen metabolismos que le permiten sobrevivir a las condiciones climáticas hostiles del lugar (Boyd y col., 1966; Cowan y col., 2014).

Se han reportado distintos géneros de bacterias heterótrofas cultivables que provienen de variados puntos contaminados en la Antártica, que son capaces de biodegradar distintos hidrocarburos encontrados en el diésel. Algunos de los más representativos se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Bacterias biodegradadoras de hidrocarburos de diésel en territorio antártico.

Compuesto(s) biodegradado(s)	Cepa reportada	Sitio de muestreo	Referencia
Queroseno n-hexadecano n-dodecano ciclohexano	<i>Acinetobacter</i> ADH-1	Estación científica Jubany Isla Rey Jorge (Islas Shetland del sur)	Mac Cormack & Fraile 1997
HTPs	<i>Acinetobacter</i> B-2- 2	Estación científica Jubany Isla Rey Jorge (Islas Shetland del sur)	Ruberto y col., 2003
Alcanos C16, C17, C18, C19, C20	<i>Pseudomonas</i> ST41	Isla Signy	Stallwood y col., 2005
Naftaleno y Fenantreno	<i>Pseudomonas</i> LCY12 y LCY16	Estación Great Wall	Ma y col., 2006
Alcanos C6, C20.	<i>Rhodococcus spp.</i>	Scott Base, Antártica	(Bej y col., 2000)
Fenantreno	<i>Rhodococcus</i> <i>erythropolis</i> , <i>Sphingobium</i> <i>xenophagum</i> , <i>Pseudomonas</i> <i>guineae</i>	Isla Rey Jorge (Islas Shetland del Sur)	Gran-Scheuch y col., 2017

Cabe destacar que la biorremediación en el territorio antártico presenta una serie de dificultades que es necesario considerar: las bajas temperaturas de los suelos durante todas las estaciones del año, la escasa biodisponibilidad de agua líquida y las bajas concentraciones de nutrientes esenciales (Michaud y col., 2004; Coulon y col., 2005; Stallwood y col., 2005).

Por otro lado, para aumentar la eficiencia del proceso en pruebas de biorremediación *in situ*, se han aplicado dos estrategias: la bioaumentación y la bioestimulación (Ruberto y col., 2003; Walworth. y col., 2007). La bioaumentación consiste en incrementar la carga microbiana del suelo agregando microorganismos nativos crecidos previamente, y la

bioestimulación consiste en agregar nutrientes u otros suplementos al suelo que favorezcan el proceso de biodegradación por las comunidades microbianas presentes (Adams y col., 2015).

1.5 Efecto de los metales sobre la biodegradación de diésel

A pesar de las consideraciones que han tenido los distintos estudios en torno a esta problemática para optimizar el proceso de biorremediación, existe un factor ambiental escasamente explorado en la Antártica; la co-contaminación de metales pesados por derrames de diésel.

Los metales pesados se encuentran normalmente en la corteza terrestre, sin embargo, es común encontrarlos en la Antártica como contaminantes de origen antropogénico (Boutron & Wolff 1989; Ahn y col., 1996; Suttie & Wolff 1993; Santos y col., 2005). Metales como el Cd, Cr, Al, Pb, y Cu han llegado producto de las actividades humanas desde otros continentes y también dentro del mismo. Esto último se ha asociado entre otras cosas, al uso de combustibles derivados del petróleo como gasolina, diésel y queroseno (Boutron & Wolff 1989; Suttie & Wolff 1993).

Los metales pesados, a diferencia de los hidrocarburos, son escasamente eliminados de forma natural del medioambiente al no ser biodegradables, por lo cual tienden a acumularse (Kelepertzis, 2014). Esta acumulación no solo tiene efectos tóxicos y cancerígenos para humanos y animales (Tchounwou y col., 2012), sino que además pueden ser muy nocivos para algunos microorganismos, causando en ellos estrés oxidativo y daño celular, pudiendo incluso impedir su crecimiento (Gadd & Griffiths 1977). Debido a esto, los microorganismos han desarrollado mecanismos que les permiten contrarrestar los efectos nocivos de los metales, otorgándoles resistencia y

permitiéndoles vivir en presencia de ellos (Bruins y col., 2000; Hussein & Joo 2013; Naik & Dubey 2013).

Por otro lado, se ha descrito que la presencia de metales pesados puede afectar la capacidad de microorganismos para biodegradar hidrocarburos derivados del petróleo (Jensen 1977; Moreira y col., 2013; Olaniran y col., 2013). Estudios han demostrado que esto se debe a que metales como el Pb, Cd, Cr entre otros pueden afectar el funcionamiento de enzimas involucradas en los procesos de biodegradación de HAPs, llegando a provocar incluso su inactivación (Sandrin y col., 2003; Thavamani y col., 2012; Muthusamy y col., 2016).

A pesar de que se ha descrito que la presencia de metales pesados afecta la biodegradación microbiana de hidrocarburos del petróleo, esta problemática ha sido escasamente estudiada en la Antártica (Gran-Scheuch y col., 2017; Abdulrasheed y col., 2020; Gran-Scheuch y col., 2020; Zakaria y col., 2020).

1.6 Estudios previos

Durante la Expedición Científica Antártica N° 55 (ECA 55, 2018) llevada a cabo por el Instituto Antártico Chileno (INACH), se obtuvieron muestras desde variados sitios pertenecientes a las Islas Shetland del Sur y la Península Antártica (Figura 1), (coordenadas detalladas en el anexo, Tabla 1). Se muestrearon suelos contaminados con diésel a causa de derrames desde almacenajes del combustible y además sitios aledaños no contaminados para ser utilizados como condiciones control.

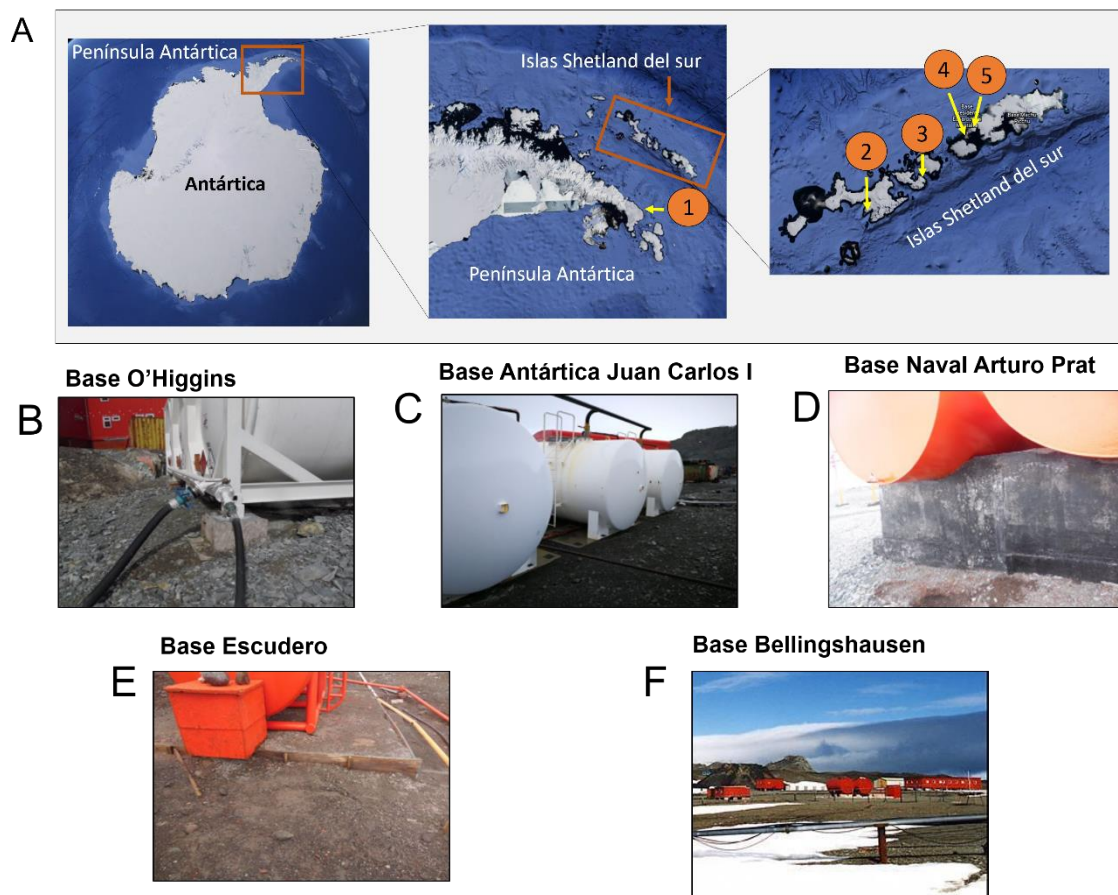


Figura 1. Sitios de muestreo. A) En la imagen de la derecha se muestra un mapa del continente Antártico, en la imagen del centro un acercamiento de la Península Antártica y en la imagen derecha, un acercamiento de las Islas Shetland del Sur, donde se encuentran ubicados los sitios de muestreo: 1. Base O'Higgins (Islote Isabel Riquelme), 2. Base Antártica Juan Carlos I (Isla Livingston), 3. Base Naval Arturo Prat (Isla Greenwich), 4. Base escudero (Isla Rey Jorge), 5. Base Bellingshausen (Isla Rey Jorge). En B, C, D, E y F se muestran fotografías de los sitios 1, 2, 3, 4 y 5, respectivamente. Las imágenes de los mapas fueron obtenidas desde la plataforma Google Earth y las fotografías de la expedición.

Las muestras obtenidas fueron caracterizadas en el laboratorio de BioNanotecnología y Microbiología de la Universidad Andrés Bello. Se estudió la abundancia de dos HAPs (fenantreno y benzo[a]pireno) mediante cuantificación por espectroscopía de fluorescencia y se analizó la composición de metales de algunas de las muestras

obtenidas, mediante espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS).

Se encontró que todas las muestras analizadas provenientes de sitios contaminados con petróleo presentaron una mayor concentración de fenantreno respecto a benzo[a]pireno, mientras que ninguna de las muestras no expuestas al combustible mostró presencia de estos compuestos (Figura 1. A, anexo). Se encontraron 4 muestras (R1A, R1B, P2A, y O5A) con diferencias significativas entre fenantreno y benzo[a]pireno teniendo las concentraciones más altas de fenantreno: 752,6 – 375,0 – 318,0 y 402,5 ppm respectivamente. Además, todas estas presentaron concentraciones significativamente superiores a las muestras control provenientes de sitios no expuestos a diésel (R2A, P3B, y O3A, respectivamente). Por otra parte, las muestras provenientes de sitios contaminados además mostraron contaminación por Pb y Cd, y especialmente tres muestras mostraron contaminación de Pb sobre los 100 ppm (R1A, P2A, y O5A), mientras que las no contaminadas presentaron concentraciones mínimas de estos metales (Tabla 2, anexo). De acuerdo con estos antecedentes, para los estudios correspondientes a la presente investigación se decidió analizar las muestras R1A y P2A, provenientes de la Base Escudero (Isla Rey Jorge) y la Base Naval Capitán Arturo Prat (Isla Greenwich) respectivamente. La muestra R1A presenta el mayor índice de contaminación por fenantreno entre todas las muestras (752,6 ppm) y además contiene Pb en concentraciones importantes (105 ppm). La muestra P2A además de estar altamente contaminada por fenantreno (318,0 ppm), también presenta una alta contaminación de Pb (390 ppm) y Cd (0,2 ppm).

Dado los antecedentes planteados resulta relevante comprender el efecto de la presencia de los metales pesados y la temperatura del ambiente, al estudiar la

biodegradación de hidrocarburos por parte de comunidades microbianas provenientes de suelos antárticos contaminados con diésel. Por esto, se planteó la siguiente hipótesis y objetivos:

1.7 Hipótesis

Microorganismos provenientes de suelos antárticos contaminados con diésel, son capaces de crecer con hidrocarburos del petróleo como única fuente de carbono en presencia de metales pesados a diferentes temperaturas.

1.8 Objetivo general

Evaluar las comunidades microbianas provenientes de muestras de suelo antártico contaminadas con diésel y aislar los microorganismos capaces de crecer con hidrocarburos del combustible en presencia de metales pesados.

1.9 Objetivos específicos

1. Seleccionar microorganismos desde muestras de suelo antártico capaces de biodegradar diésel o fenantreno en presencia de Pb o Cd, a diferentes temperaturas.
2. Analizar la composición y estructura de las comunidades bacterianas antes y después del proceso de selección mediante secuenciación masiva del gen ARNr 16S.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Sitios de muestreo

Las muestras de suelo utilizadas en esta investigación fueron obtenidas el año 2018 desde las Islas Shetland de Sur (62°10 S, 58°49 W), durante la Expedición Científica Antártica la N°55 (ECA 55), patrocinada por el Instituto Antártico Chileno (INACH), en el marco del proyecto INACH RT-25_16 del Dr. José Pérez Donoso. Para esta investigación, se seleccionaron dos sitios de muestreo contaminados con diésel y dos suelos libres de diésel. Las muestras fueron rotuladas de la siguiente forma:

Tabla 2. Muestras de suelo analizadas.

Nombre	Sitio de muestreo	Contaminación con diésel	Concentración de fenantreno [mg/kg]
R1A	Base Escudero, Isla Rey Jorge	Si	752,6
R2A	Base Escudero, Isla Rey Jorge	No	0,0
P2A	Base Naval Capitán Arturo Prat, Isla Greenwich	Si	318,0
P3B	Base Naval Capitán Arturo Prat, Isla Greenwich	No	0,0

2.2 Preparación de medios de cultivo.

Medios líquidos:

Para la selección de microorganismos degradadores de fenantreno y diésel, se utilizó medio mínimo M9 sin fuente de carbono (Na_2HPO_4 42,2 mM, KH_2PO_4 22 mM, NaCl 8,56 mM, NH_4Cl 18,7 mM, MgSO_4 1 mM, y CaCl_2 0,1 mM). Posteriormente, dependiendo de la condición, el medio se suplementó con: glucosa 0,2%, diésel 0,2%, fenantreno (Merck

®) 0,2%, fenantreno 0,2% con CdCl₂ (Sigma-Aldrich ®) 0,025 µg/mL o fenantreno 0,2% con Pb(C₂H₃O₂)₂ (Winkler ®) 10 µg/mL. Las soluciones de CaCl₂, MgSO₄, glucosa y diésel fueron esterilizados utilizando filtros de 0,22 µm (Jet Biofil ®), mientras que las sales de CdCl₂, Pb(C₂H₃O₂)₂ y el fenantreno fueron esterilizadas utilizando radiación UV-C (15 minutos de exposición).

Medio sólido:

Para el aislamiento de microorganismos se utilizó medio M9 agar (Na₂HPO₄ 42,2 mM, KH₂PO₄ 22 mM, NaCl 8,56 mM, NH₄Cl 18,7 mM, MgSO₄ 1 mM, y CaCl₂ 0,1 mM). suplementado con glucosa 0,2% (como única fuente de carbono), MgSO₄ 1 mM, y CaCl₂ 0,1 mM.

2.3 Selección de microorganismos degradadores de diésel y fenantreno a 28°C y 4°C.

Los procesos de obtención y selección de microorganismos se realizaron a 28 y 4°C mediante un proceso de enriquecimiento microbiano en lote (Figura 2, anexo). Para esto, 3 g de cada muestra de suelo fueron resuspendidos en 30 mL de medio M9 sin fuente de carbono, para luego incubar en agitación (160 rpm) por 24 h a 28°C. Posteriormente, 5 mL de medio mínimo M9 fueron inoculados a partir del sobrenadante de la muestra de suelo incubada, utilizando un inóculo 1:100, bajo las siguientes condiciones: i) sin fuente de carbono, ii) glucosa 0,2%, iii) diésel 0,2%, iv) fenantreno 0,2%, v) fenantreno 0,2% + CdCl₂ 0,025 µg/mL, vi) fenantreno 0,2% + Pb(C₂H₃O₂)₂ 10 µg/mL. Este protocolo fue repetido dos veces (uno para el ensayo a 28 y otro para el de 4°C), con las 4 muestras de suelo.

Parte de los cultivos fueron incubados durante 1 semana a 28°C. Tras este tiempo, medio fresco fue reinoculado a partir del cultivo anterior con una dilución 1:1000, siendo incubado durante dos semanas. Este procedimiento fue repetido una vez más, obteniéndose un total de 3 traspasos en 5 semanas. En paralelo, la misma metodología descrita anteriormente se utilizó para el ensayo a 4°C. Los cultivos inoculados en los medios con distintas condiciones fueron renovados durante la tercera y sexta semana, finalizando el ensayo en la octava semana. En cada renovación, se determinó la densidad óptica a 600 nm (OD₆₀₀) (Synergy™) de los consorcios formados. Terminados ambos ensayos, 4 mL de los cultivos obtenidos fueron centrifugados a 14000 rpm por 5 min para la obtención de un pellet microbiano. El pellet fue utilizado para la extracción del ADN genómico.

2.4 Secuenciación masiva del gen ARNr 16S

Para la extracción de ADN genómico de las muestras de suelo se utilizó el kit “DNeasy PowerSoil” (Qiagen®). Por otro lado, el ADN genómico del pellet microbiano obtenido al final de los procesos de selección a 28 y 4°C, fue extraído mediante el protocolo descrito por Harju. y col., (2004). Para la identificación de las bacterias presentes se realizó una secuenciación masiva del gen ARNr 16S, mediante secuenciación Illumina MiSeq® utilizando el servicio del Argonne National Laboratory (Estados Unidos). Se amplificó la región V4 utilizando los partidores 515F y 806R (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA y 5'-GGACTACHVHHHTWTCTAAT). El análisis de las secuencias fue realizado utilizando la herramienta bioinformática dada2, ejecutada en el programa R (Callahan y col., 2016; Schloss y col., 2009). Para la asignación taxonómica se utilizó la base de datos SILVA SSU r132. De acuerdo con los perfiles de calidad arrojados por el programa, las secuencias fueron cortadas en 250 pb para las

secuencias *forward* y 200 pb para las secuencias *reverse*. Una vez obtenido el objeto “phyloseq” con la asignación taxonómica correspondiente, para realizar los análisis de diversidad se eliminaron todas secuencias con menos de dos lecturas.

2.5 Aislamiento de microorganismos degradadores de fenantreno y diésel.

A partir de los cultivos obtenidos luego de los procesos de selección, 30 µL de cultivo fueron plaqueados en medio M9 agar con glucosa 0,2% como única fuente de carbono. Se realizaron diluciones seriadas para obtener, al menos, 50 colonias por placa. Luego, se incubaron a la misma temperatura a la cual crecieron previamente en medio líquido hasta la aparición de colonias (2-3 días a 28°C, 1-2 semanas a 4°C). Posteriormente, se aislaron los microorganismos encontrados en medio M9 agar, utilizando como criterio de selección la morfología de colonias (elevación, color, borde, y textura).

3. RESULTADOS

3.1 Selección de microorganismos a diferentes temperaturas

Con el propósito de obtener microorganismos heterótrofos aeróbicos capaces de biodegradar diésel o fenantreno en presencia de Pb o Cd, a partir de las muestras de suelo antártico, se realizó un proceso de selección en medio líquido en una primera instancia a 28°C. Para ello se llevó a cabo una metodología de enriquecimiento microbiano en lote, con dos renovaciones en el medio de cultivo (Figura 2). Se utilizaron muestras de suelo provenientes de sitios contaminados (R1A, Base Escudero y P2A, Base Arturo Prat), y como control las muestras no contaminadas R2A y P3B provenientes de los mismos sitios.

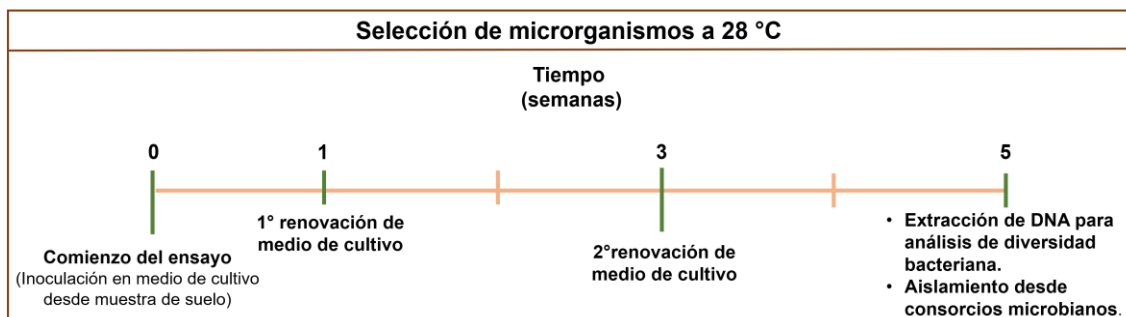


Figura 2. Esquema del proceso de selección de microorganismos a 28°C. Línea de tiempo de 5 semanas, que considera el inicio del ensayo desde que se hace la primera inoculación a partir de las 2 muestras de suelo contaminadas (R1A y P2A) y no contaminadas (R2A y P3B). Medios de cultivo, M9 i) sin fuente de carbono (control negativo de crecimiento), ii) con glucosa 0,2%, (control positivo) iii) con diésel 0,2%, iv) con fenantreno 0,2%, v) con fenantreno 0,2% y Cd 0,025 µg/mL, y vi) con fenantreno 0,2% y Pb 10 µg/mL.

Durante el proceso, se realizó un seguimiento del crecimiento bacteriano midiendo la densidad óptica del cultivo (absorbancia a 600 nm), y un seguimiento cualitativo del

consumo de fenantreno mediante el cambio en la coloración del medio de cultivo (Treccani, 1965; Gran-Scheuch y col., 2017; Liu y col., 2019).

Al final de la primera semana de incubación, los cultivos suplementados con fenantreno inoculados con muestras provenientes de los suelos contaminados R1A y P2A, presentaron un cambio de coloración en el medio desde traslúcido a amarillo (Figura 3B), indicio de la formación del subproducto de la biodegradación de fenantreno 2-hidroxi mucónico- semialdehído (Treccani, 1965). Además, la medición de OD 600 nm determinó que en estos cultivos hubo crecimiento de microorganismos, lo cual no se observó en los cultivos sin fuente de carbono. Por el contrario, los cultivos inoculados con las muestras control (R2A y P3B), se mantuvieron incoloros y no evidenciaron crecimiento bacteriano (Figura 3A). En los cultivos con fenantreno suplementados con Pb o Cd, se observó una disminución del crecimiento en R1A, mientras que en los cultivos inoculados con P2A el plomo favoreció el crecimiento. En el cultivo con diésel inoculado con los microorganismos de R1A, se observó un bajo crecimiento en comparación con el crecimiento en fenantreno. Por el contrario, en el cultivo inoculado con P2A incubado con diésel, el crecimiento fue mayor al observado en fenantreno. En esta fuente de carbono, nuevamente no se ve crecimiento en los cultivos inoculados con los controles R2A y P3B (Figura 3A).

En la tercera semana del proceso de selección, nuevamente hubo un cambio de coloración en los cultivos con fenantreno en R1A y P2A, y no se observó crecimiento en los controles sin fuente de carbono (Figura 3B). En presencia de metales, la muestra R1A y P2A mostraron un crecimiento similar al observado al final de la primera semana, asociado a un cambio de coloración en el medio (Figura 3D). En los cultivos con diésel también se observó crecimiento, aunque menor al observado con fenantreno (Figura

3B). Al final de la quinta semana, nuevamente hubo un aumento en la turbidez de los cultivos con diésel inoculados con R1A y P2A, el cual no fue observado en las muestras control R2A y P3B (Figura 3C). Además, en R1A y P2A, hubo un cambio de coloración y crecimiento similar en los cultivos con fenantreno y metales (Figura 3C). En la muestra P2A en cambio, la presencia de metales incrementó el crecimiento del cultivo (Figura 3F).

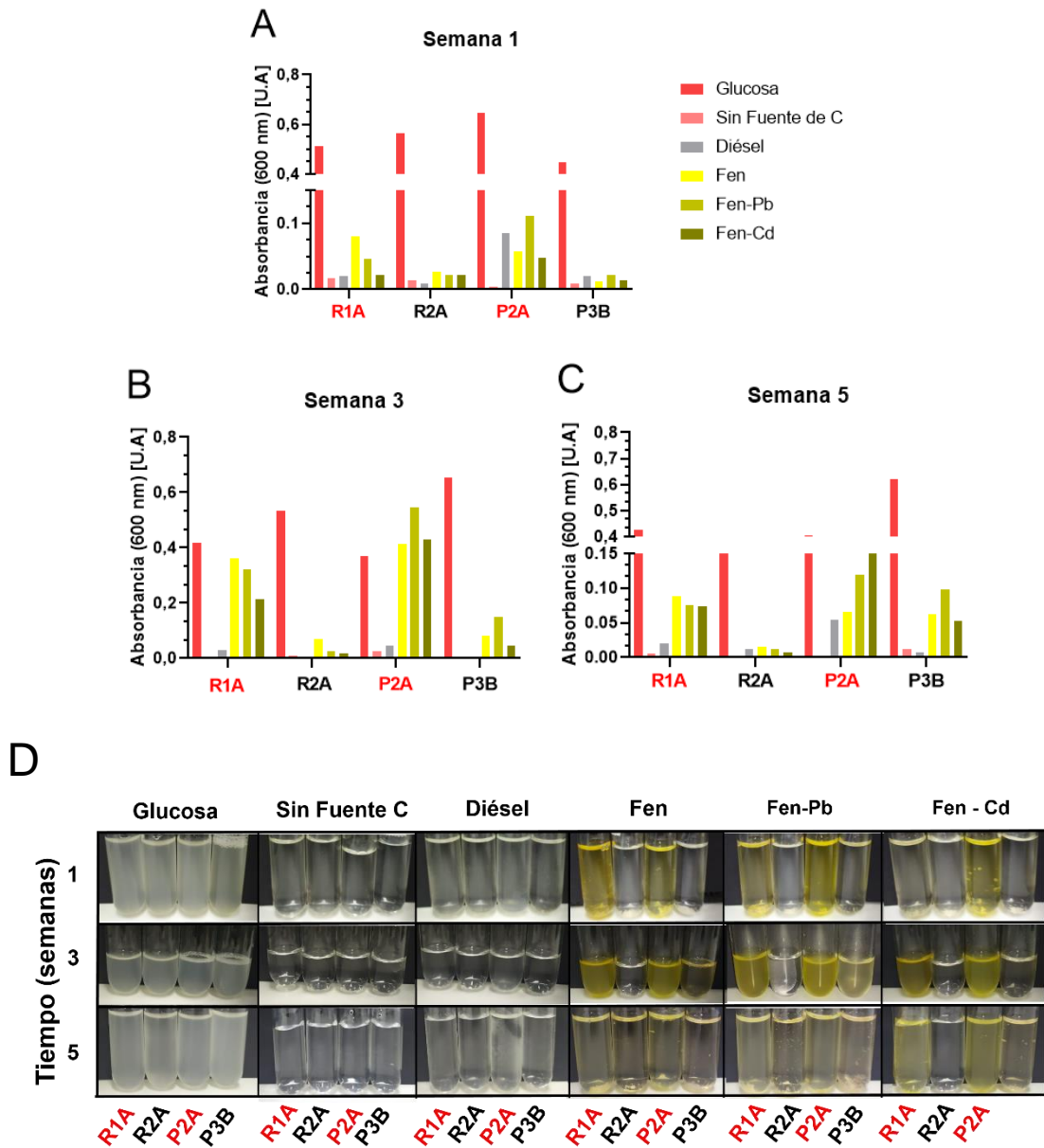


Figura 3. Crecimiento a 28°C de microorganismos de muestras de suelo antártico en presencia de distintas fuentes de carbono y metales. Se utilizó como inóculo los microorganismos presentes en 2 muestras de suelo contaminadas R1A y P2A (rojo) y dos controles R2A y P3B (negro) y se determinó el crecimiento bacteriano (OD 600 nm) luego de A) primera semana de incubación, B) tercera semana de incubación, C) quinta semana de incubación. D) Fotos de los distintos tubos donde se observa la coloración asociada a la degradación de fenantreno y formación de 2-hidroxi mucónico- semialdehído (Treccani, 1965).

En paralelo al experimento anterior, se realizó el mismo proceso de selección microbiana incubando a 4°C, con la finalidad de favorecer el crecimiento de microorganismos psicrófilos o psicrotolerantes, considerando la aplicación futura de la presente investigación. En este caso, el ensayo tuvo una duración de 8 semanas (Figura 4), dado que a esta temperatura fue necesario incubar los cultivos por más tiempo para obtener un cambio de coloración importante en el medio de cultivo.

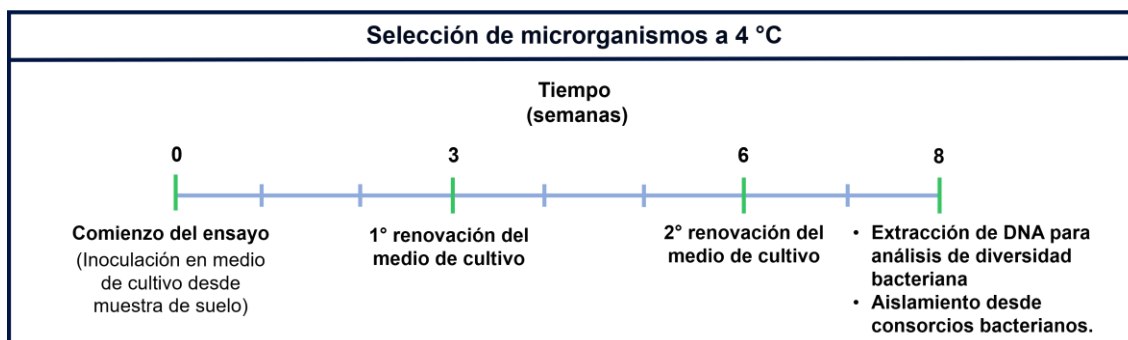


Figura 4. Esquema del proceso de selección de microorganismos a 4°C. Línea de tiempo de 8 semanas que considera el inicio del ensayo desde que se realizó la primera inoculación a partir de las 2 muestras de suelo contaminadas (R1A y P2A) y las 2 no contaminadas (R2A y P3B). Medios de cultivo, M9 i) sin fuente de carbono (control negativo de crecimiento), ii) con glucosa 0,2%, (control positivo) iii) con diésel 0,2%, iv) con fenantreno 0,2%, v) con fenantreno 0,2% y Cd 0,025 µg/mL, vi) con fenantreno 0,2% y Pb 10 µg/mL.

Luego de 3 semanas de incubación, las muestras R1A y P2A mostraron crecimiento en fenantreno y diésel acompañado de un cambio de coloración en el medio de cultivo (Figura 5A y D). En presencia de los metales, el crecimiento fue similar. En la sexta semana, hubo un crecimiento similar en fenantreno en los cultivos provenientes de R1A y P2A, con un aumento solo en presencia de Cd en R1A, y un aumento en Cd y plomo en P2A. En diésel se vio un menor crecimiento en relación con los cultivos con fenantreno (Figura 5B). En las muestras control, no hubo crecimiento ni cambio de coloración del medio. Al final de la octava semana del proceso, tanto en R1A como P2A

hubo crecimiento en diésel similar a lo observado con fenantreno, siendo mayor en P2A (Figura 5C). En fenantreno con Cd o Pb también hubo un cambio de coloración en el medio, asociado a un crecimiento similar al observado sin metales.

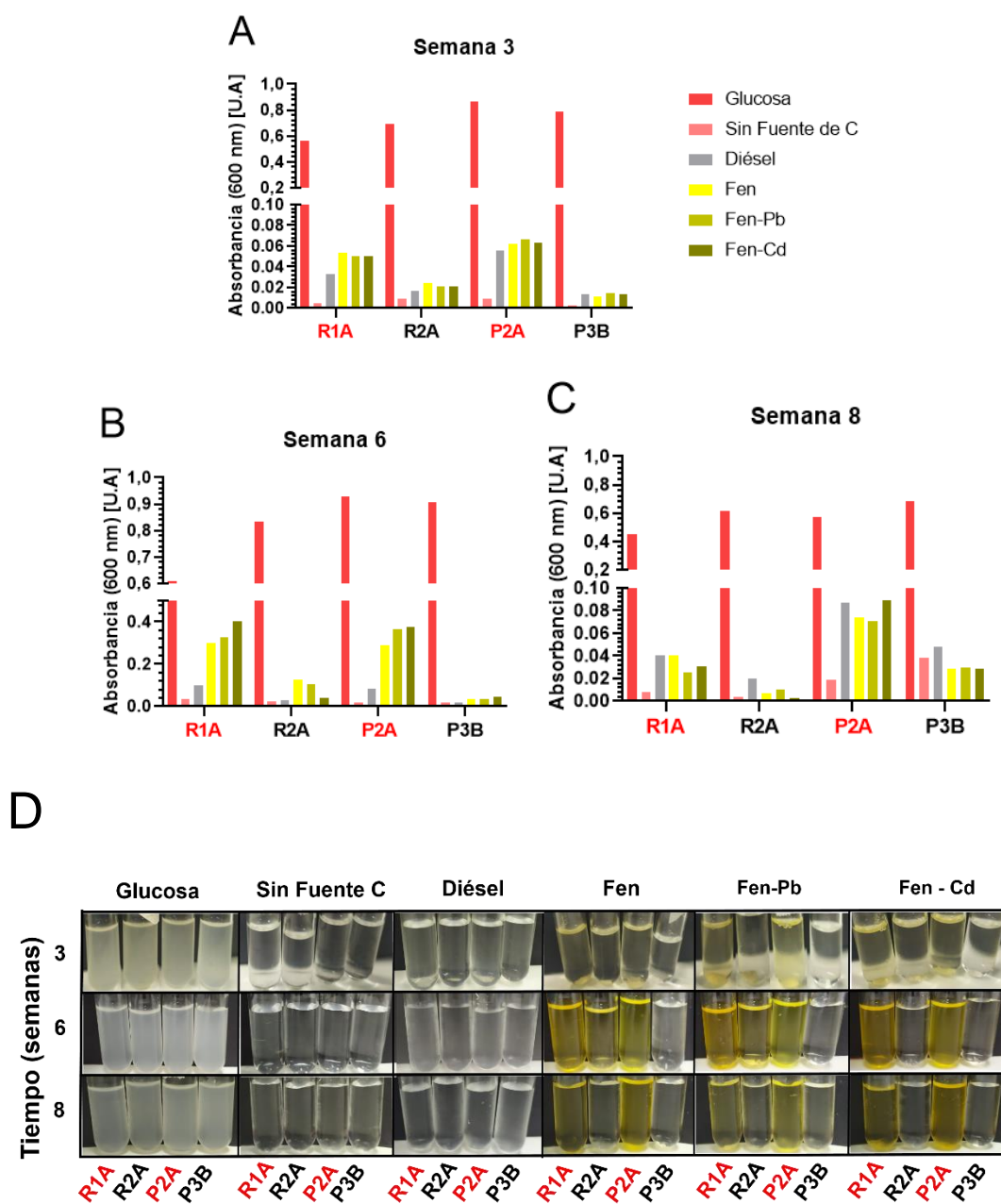


Figura 5. Crecimiento a 4°C de microorganismos de muestras de suelo antártico en presencia de distintas fuentes de carbono y metales. Se utilizó como inóculo los microorganismos presentes en 2 muestras de suelo contaminadas R1A y P2A (rojo) y dos controles R2A y P3B (negro) y se determinó el crecimiento bacteriano (OD 600 nm) luego de A) tercera semana de incubación, B) sexta semana de incubación, C) octava semana de incubación. D) Fotos de los distintos tubos donde se observa la coloración asociada a la degradación de fenantreno y formación de 2-hidroxi mucónico-semialdehído (Treccani, 1965).

Al comparar el crecimiento de los cultivos incubados a 28°C (Figura) con los incubados a 4°C (Figura 5), se ve que existe una tendencia en cuanto al crecimiento. Se observa tanto en diésel como en fenantreno un mayor crecimiento en los cultivos que fueron inoculados con las muestras provenientes de los sitios contaminados (R1A y P2A), en comparación con los inoculados con las muestras control (R2A y P3B). Además, se observa que los cultivos incubados a 4°C con fenantreno al final del proceso de selección presentan una mayor coloración amarilla, pero con un crecimiento menor a lo observado a 28°C lo que podría indicar una mayor eficiencia en la biodegradación de los hidrocarburos.

3.2 Aislamiento de microorganismos

A partir de los consorcios microbianos obtenidos al final de los procesos de selección realizados a 28 y a 4°C, se aislaron los microorganismos capaces de crecer en medio sólido M9 suplementado con glucosa como única fuente de carbono. El número de aislados obtenidos en cada muestra se determinó utilizando como criterio la morfología de colonias (Tabla 3).

Tabla 3. Microorganismos aislados a partir de los cultivos enriquecidos.

Muestra	Condición	Número de aislados	
		28°C	4°C
R1A	Diésel	2	2
	Fenantreno	2	3
	Fenantreno -Pb	2	3
	Fenantreno - Cd	2	3
R2A	Diésel	2	1
	Fenantreno	3	3
	Fenantreno -Pb	1	2
	Fenantreno - Cd	2	3
P2A	Diésel	2	4
	Fenantreno	4	3
	Fenantreno -Pb	3	3
	Fenantreno - Cd	3	4
P3B	Diésel	2	2
	Fenantreno	2	2
	Fenantreno -Pb	2	2
	Fenantreno - Cd	2	2

En ninguna muestra se obtuvo más de 4 aislados morfológicamente distintos. Considerando que en muestras de suelo de características similares a las del presente trabajo se pueden encontrar cientos de colonias diferentes (Gran-Scheuch y col., 2017), los resultados sugieren que efectivamente en el proceso hubo una presión de selección sobre las comunidades, lo cual se dilucidará con mayor detalle a través del análisis de diversidad por secuenciación masiva del gen ARNr 16S en el siguiente objetivo.

3.3 Análisis de diversidad bacteriana de las muestras de suelo

Con el propósito de estudiar las comunidades bacterianas presentes en las muestras de suelo antártico antes de ser sometidas al proceso de selección anteriormente descrito, y con ello poder comprender el efecto de la contaminación con diésel y metales pesados sobre estas comunidades, se realizó una secuenciación masiva del gen ARNr 16S. Se estudió la estructura de la comunidad bacteriana de las muestras de suelo (diversidad

Alpha) y la composición (abundancia relativa de géneros). A través de este análisis se detectaron 310 secuencias con un total de 150 OTUs diferentes.

En cuanto a la diversidad Alpha, en la muestra de suelo R2A (Base Escudero) no contaminado con diésel y que además posee concentraciones mínimas de metales pesados ($< 0,025$ ppm de Cd y 4,18 ppm de Pb), se encontró una riqueza de 87 géneros bacterianos con un índice de Shannon de 3,6, equitatividad alta (0,8) y baja dominancia (Simpson cercano a 0) (Figura 6A, B, C y D). Al comparar con el sitio R1A de características similares pero expuesto a contaminación por diésel (752,6 ppm de fenantreno y 105 ppm de Pb), se observó una menor riqueza, dado que se encontraron solo 59 géneros (Figura 6A). Además, presenta una disminución en la diversidad de Shannon y la equitatividad, aumentando la dominancia (Simpson) (Figura 6B, C y D), lo que significa que en estas muestras la presencia del contaminante disminuye tanto la riqueza como la diversidad bacteriana.

En la muestra P3B (Base Prat) no expuesta al contaminante, se encontró un total de 62 géneros distintos (Figura 6A), una diversidad de Shannon de 2 y una alta dominancia y baja equitatividad (Figura 6B, C y D). En cambio, en la muestra P2A se encontraron 102 géneros diferentes con un alto índice de diversidad de Shannon, un índice alto de equitatividad cercano a 1 y dominancia cercana a 0 (Figura 6B, C y D). Es decir, se observa un aumento tanto en la riqueza como en la diversidad de la muestra a pesar de haber sido expuesta a contaminación por diésel, que le confirió una alta concentración de fenantreno (318 ppm) y de Pb (390 ppm).

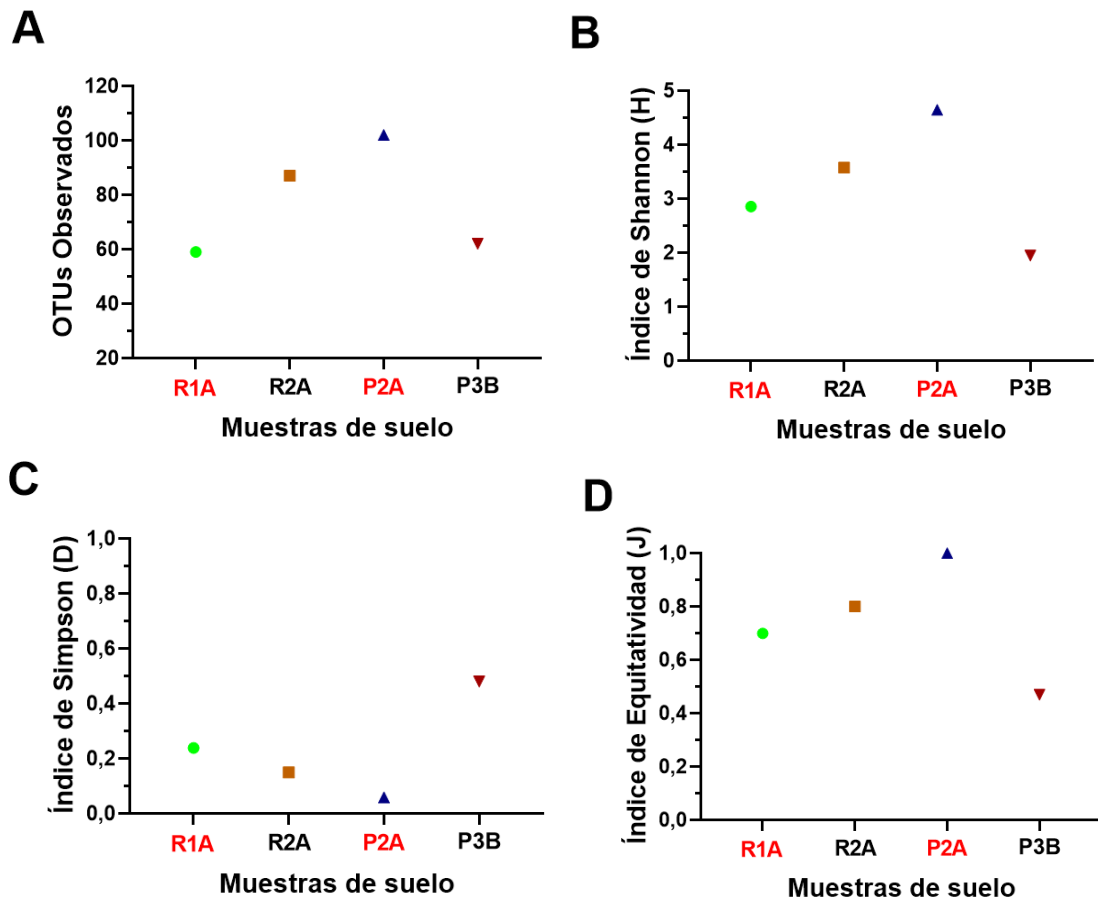


Figura 6. Índices de diversidad Alpha para muestras de suelo. A) OTUS observados (riqueza). B) Índice de Shannon-Wiener (diversidad), C) Índice de Simpson (dominancia), D) índice de Equitatividad. Muestras R1A (contaminada) y R2A (no contaminada) Base Escudero, muestras P2A (contaminada) y P3B (no contaminada) Base Prat.

Al analizar la composición de los suelos a nivel de género bacteriano, se observa que en la muestra de suelo no contaminada R2A (Base Escudero) de los 87 géneros encontrados (Figura 6A), solo 20 constituyen el 95% de los organismos. Se encontraron principalmente representantes de los géneros *Pedobacter* (25,8%), *Pseudomonas* (23,7%), *Chryseobacterium* (11,2%), *Massilia* (7,8%), *Pseudarthrobacter* (7,5%) y *Flavobacterium* (3-8%). Los demás géneros se encontraron en menos del 1% (Figura 7). En presencia del contaminante (muestra R1A) hay un aumento de *Pseudomonas*

(42,5%), *Chryseobacterium* (20%), y *Sphingomonas* (3,6%), mientras que *Pedobacter* y *Massilia* disminuyen (9,7% y 0,4%, respectivamente). Además, aparecen otros géneros menos representados que no se encontraron en la muestra control R2A, como *Rhizorhapis*, *Dyadobacter* y *Burkholderia* (5-6% abundancia), *Sphingomonas*, *Actinimicrobium* y *Sphingobium* (1-4% abundancia). Los demás géneros representan menos del 1% de la comunidad (Figura 7).

En la muestra no contaminada P3B (Base Arturo Prat), se encontraron 62 géneros distintos de los cuales solo 20 constituyen el 95% de esta muestra, con una gran predominancia de *Pseudomonas* (68%), junto con algunos géneros menos representados como *Pseudarthrobacter* (8%), *Chryseobacterium* (7,8%), *Sphingopyxis* (5,6%), *Pedobacter* (2%), *Polaromonas* (1,8%), *Brevundimonas* (1%) y *Flavobacterium* (1%) (Figura 7), lo cual se relacionaría con la baja diversidad encontrada en ella. En contraste, la muestra contaminada P2A presenta una mayor riqueza con 102 géneros distintos, donde el 95% de ella lo constituyen 30 géneros, con varios en proporciones similares (equitatividad alta). Se encontró *Alkanindiges*, *Chryseobacterium*, *Pseudomonas* y *Sulfuritalea* en porcentajes de abundancia entre 7-10%, *Arcticibacter*, *Fermentimonas*, *Pedobacter*, *Pseudoxanthomonas* y *Williamsia* entre 4-6%, *Paenibacillus*, *Taibaiella*, *Luteolibacter*, *Mucilaginibacter*, *Immundisolibacter* y *Proteiniphilum* entre 2-4%. El resto de los géneros se encuentran en porcentajes inferiores al 2%. Al comparar ambas muestras, se observa que dentro de las más representadas comparten los géneros *Pseudomonas*, *Pedobacter* y *Chryseobacterium*, encontrándose el primero en mayor proporción en P3B, mientras que el segundo y tercero se encuentran en proporciones menores en el control (Figura 7).

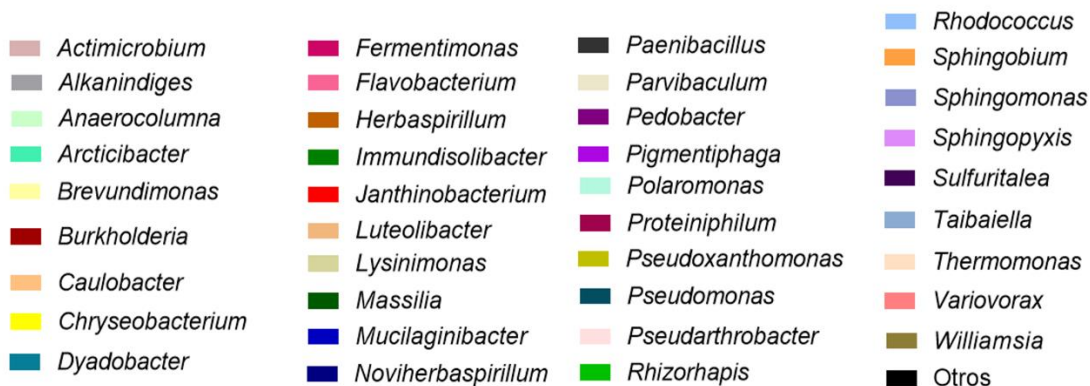
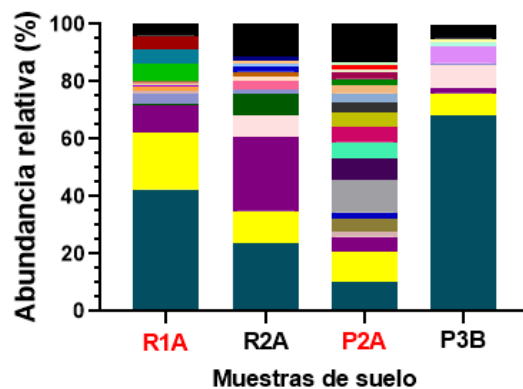


Figura 7. Secuenciación masiva del gen ARNr 16S de muestras de suelo antártico. Gráfico de la abundancia relativa (%) de los géneros bacterianos representados sobre el 1% en cada muestra de suelo: muestras R1A (contaminada) y R2A (no contaminada) Base Escudero, muestras P2A (contaminada) y P3B (no contaminada) Base Prat.

3.4 Análisis de diversidad bacteriana después del proceso de selección

Con el propósito de evaluar el efecto de los procesos de selección realizados a 28 y 4°C sobre las comunidades microbianas encontradas en los suelos, se caracterizaron las comunidades microbianas mediante secuenciación masiva del gen ARNr 16S. Se estudió tanto la composición (abundancia relativa) como la estructura microbiana (diversidad Alpha). A través de este análisis se detectaron 684 secuencias con un total de 106 OTUs diferentes.

Selección con glucosa como única fuente de carbono:

Las muestras provenientes de sitios contaminados (R1A y P2A) y no contaminados (R2A y P3B) incubados en glucosa a 2°C, se enriquecieron principalmente en *Pseudomonas* con más del 88% de éstas en todos los cultivos. En la muestra P2A se encontró además *Janthinobacterium* y *Stenotrophomonas* (10% y 1,5%, respectivamente) (Figura 8A). Todas las muestras presentaron crecimiento bacteriano al final del proceso (Figura 3C). Al incubar a 4°C, las bacterias encontradas en glucosa son similares a las encontradas a 28°C, con representantes de los géneros *Pseudomonas* constituyendo más del 96% de las muestras, *Janthinobacterium* (3%, menor que a 28°C) en P2A y *Arsenicitalea* en R2A (1,23%) (Figura 8A). Al igual que a 28°C, hubo crecimiento del cultivo en todas las muestras (Figura 5C). Por lo tanto, al final del proceso incubando con glucosa como única fuente de carbono, a 28 y 4°C se favorecen principalmente representantes del género *Pseudomonas*.

Selección en diésel como única fuente de carbono:

Al crecer las muestras de suelos contaminados en medio suplementado con diésel a 28°C, ambas se enriquecieron principalmente en representantes de los géneros *Pseudomonas* (>94%), *Burkholderia* en R1A (5,8 %), y *Janthinobacterium* (3%) y *Variovorax* (1,6%) en P2A (Figura 8B). En las muestras de sitios no contaminados (R2A y P3B), también se encontró que las muestras se encontraban representadas por más de un 98% por representantes del género *Pseudomonas*. Sin embargo, aunque estas fueron las bacterias seleccionadas en el proceso, se encontrarían en una menor cantidad, dado que no se observó crecimiento en el medio de cultivo al final del proceso (ver discusión), lo cual sí se observa en R1A y P2A (Figura 3C). Al incubar a 4°C, se obtuvo algo muy similar a lo encontrado a 28°C: los 4 cultivos se enriquecieron principalmente en representantes de los géneros *Pseudomonas* (>97%), *Janthinobacterium* (1,7%) en P2A (Figura 8B), muestra en la cual se observó el mayor crecimiento al final de proceso junto con R1A (Figura 5C). En los cultivos no contaminados se encontraron principalmente representantes del género *Pseudomonas*, y al igual que a 28°C no se observó crecimiento en el medio de cultivo (Figura 5C).

Por lo tanto, al inocular en medio de cultivo con diésel como única fuente de carbono, se favorecieron principalmente representantes del género *Pseudomonas* tanto en los cultivos inoculados con las muestras contaminadas como con las inoculadas con los controles. Sin embargo, el crecimiento se observa en los cultivos inoculados con R1A y P2A, por lo cual las cepas seleccionadas en las muestras control (R2A y P3B) pertenecen al género *Pseudomonas*, pero se encuentran en menor cantidad, evidenciado por la falta de crecimiento.

Selección con fenantreno como única fuente de carbono:

La muestra proveniente del sitio R1A incubada a 28°C en fenantreno, se enriqueció principalmente en 6 géneros: *Pseudomonas* (24,92%), *Variovorax* (26,19%), *Burkholderia* (21,22 %), *Sphingobium* (20,22%), *Pigmentiphaga* (1,81%), y *Rhizorhaphis* (4 %). En P2A se encontraron 7 géneros principales constituyendo más del 99% de la muestra: *Pigmentiphaga* (30%), *Pseudomonas* (21,93%), *Sphingobium* (16,8%), *Mucilaginibacter* (13,55%), *Variovorax* (8,13%), *Pedobacter* (6,47%), y *Allorhizobium* (2,36%) (Figura 8C). En ambos casos se observó un crecimiento mayor al control sin fuente de carbono acompañado de un cambio de coloración del medio cultivo (Figura 3 C). En contraste, en muestras provenientes de los sitios no contaminados se encontraron predominantemente representantes de los géneros *Pseudomonas* (>93%), *Pseudarthrobacter* (4,25%) en R2A y, *Allorhizobium* (2,31%) y *Pseudarthrobacter* (3,25%) en P3B (Figura 8C). En este caso solo se observó un bajo crecimiento en P3B con leve cambio de coloración del medio de cultivo al final del proceso (Figura 3C). Al incubar a 4°C, en R1A se encontraron nuevamente representantes de los géneros *Pseudomonas* (43%) y *Pigmentiphaga* (8,8%) ambos en un menor porcentaje que a 28°C. Los demás géneros dejan de ser detectables favoreciendo a *Pedobacter* (11%), acompañado de crecimiento y cambio de coloración del cultivo en la última semana, aunque menor que a 28°C (Figura 5C). En el caso de la muestra P2A, al incubar a 4°C se encuentran nuevamente representantes de los géneros *Pseudomonas* (12%), *Mucilaginibacter* (2,8%), *Pedobacter* (4,5%) y *Pigmentiphaga* (2,1%) aunque todos en proporciones menores por el favorecimiento de *Polaromonas* (77,9%) que es el género predominante (Figura 8C). Respecto a las muestras control, en R2A al incubar a 4°C, *Pseudomonas* disminuyó a un 60% con el favorecimiento de *Massilia* (36%) y *Pedobacter* (3,4%). En P3B al incubar a 4°C se encuentra algo similar a lo observado a

28°C: *Pseudomonas* (95%), *Pseudarthrobacter* (2%) y *Polaromonas* (1,5%) en lugar de *Allorhizobium*.

Por lo tanto, al incubar los microorganismos en fenantreno como única fuente de carbono, tanto a 28 como a 4°C, se observa que en los cultivos que fueron inoculados con las muestras contaminadas (R1A y P2A), se encuentra un mayor número de géneros diferentes y crecimiento del medio de cultivo, en comparación a los controles (R2A y P3B) donde predominan principalmente *Pseudomonas* y no se observó crecimiento ni cambio de coloración del medio (Figura 3 y 5C).

Selección con fenantreno como única fuente de C en presencia de Pb:

Si se analiza el efecto de incubar con fenantreno en presencia de Pb, se puede ver que en el cultivo inoculado con la muestra contaminada R1A (Base Escudero) incubado a 28°C, se obtiene algo similar a lo observado sin metales (Figura 8D). En cambio, al inocular con la otra muestra contaminada P2A (Base Prat) la presencia del Pb favorece *Sphingobium* (de 16,8% a 40%) desfavoreciendo *Pigmentiphaga* (de 30% a 11,24%) (Figura 8D). Al incubar a 4°C en R1A se observa una disminución de *Variovorax* en relación con el cultivo sin metal, mientras que en P2A la presencia de Pb no genera mayor efecto (Figura 8E). En R2A la presencia del plomo disminuye el género *Massilia*. En P3B, tanto a 28 como a 4°C, la presencia de Pb favorece a *Pseudarthrobacter* (Figura 8D y E) aumentando el crecimiento a 28°C (Figura 3C).

Selección con fenantreno como única fuente de C en presencia de Cd:

Al incubar con fenantreno a 28°C en presencia de Cd, en R1A (contaminada) no se encuentra *Sphingobium*, pero en cambio se favorece *Rhizorhaphis* (de 4% a 23,6%) al

comparar con la muestra sin metal (Figura 8D). Al incubar esta misma muestra a 4°C, *Pedobacter* desaparece respecto al cultivo sin metal (Figura 8E). En P2A a 28°C la presencia de Cd favorece al género *Variovorax* aumentando de 8,13 a 18,24%, y desfavorece a *Pedobacter* (desde 6,5% hasta menos del 1%) (Figura 8D). Al incubar P2A a 4°C, en presencia de Cd aumenta *Variovorax* (desde menos del 1% a 37,15%), desfavoreciendo a *Polaromonas* (de 77,9 a 32,7%) (Figura 8E). En P3B al incubar a 4°C la presencia de Cd favorece a *Polaromonas* (de 1,56 a 31,7%) (Figura 8E). En R2A a 28°C disminuye *Massilia* similar a lo observado con plomo, mientras que a 4°C se ve una disminución de *Pseudarthrobacter*, (Figura 8D y E).

Por lo tanto, en los cultivos suplementados con metales pesados inoculados con muestras provenientes de sitios contaminados, se observa algo similar a los cultivos sin metales. Sin embargo, la presencia de Pb parece afectar al género *Pigmentiphaga* y *Variovorax*. En cambio, el Cd parece tener un efecto negativo sobre *Sphingobium*, y favorecer a *Variovorax*.

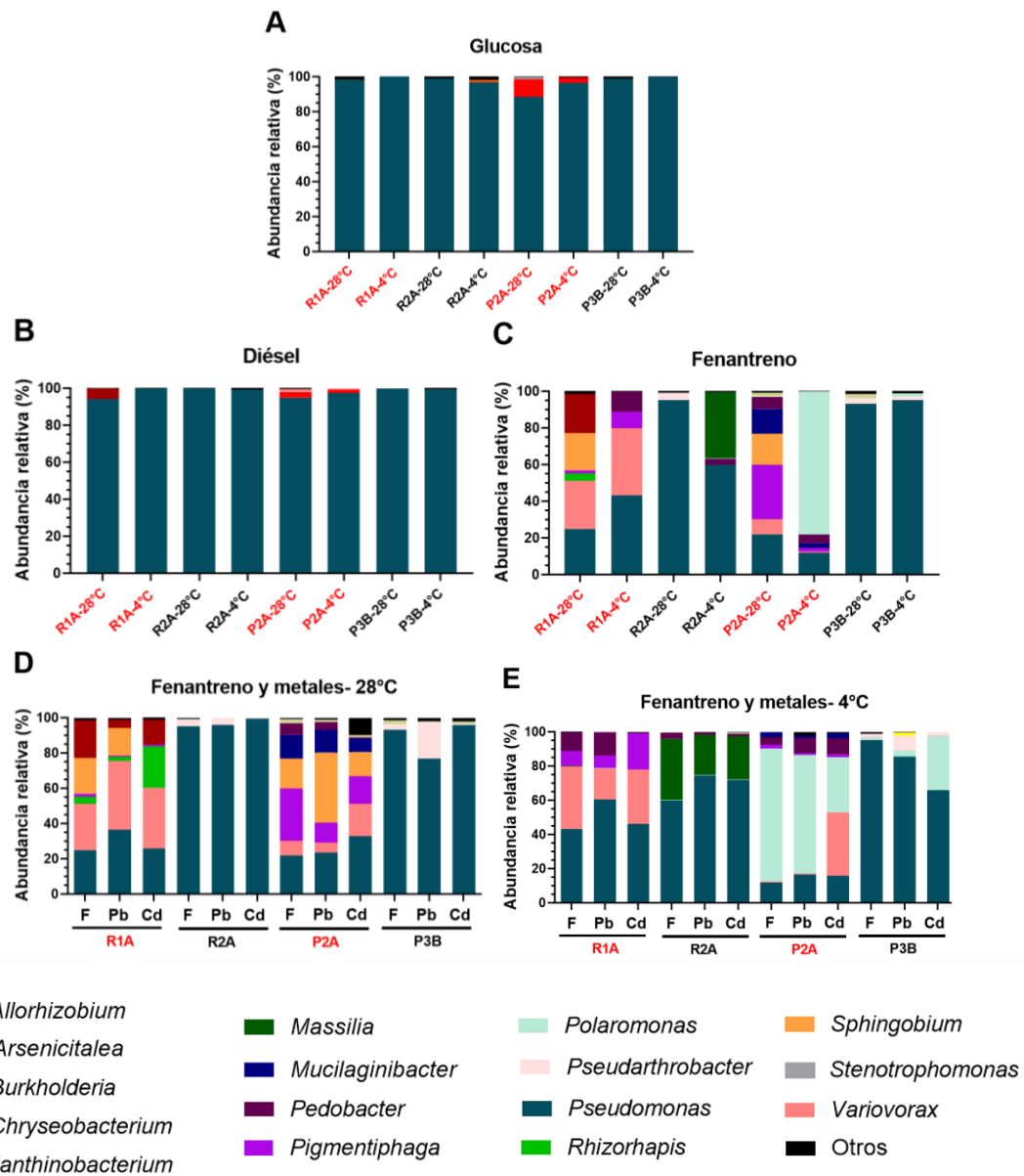


Figura 8. Secuenciación masiva del gen ARNr 16S después de los procesos de selección microbiana.

Gráficos de abundancia relativa (%) de bacterias encontradas en las 4 muestras estudiadas tanto a 28 como a 4°C, en las 3 fuentes de carbono utilizadas: Glucosa (A), Diésel (B) y Fenantreno (C). D) y E) comparación entre consorcios obtenidos al incubar con fenantreno y fenantreno con metales a 28 y 4°C respectivamente, donde: fenantreno sin metales (F), fenantreno con plomo (Pb), fenantreno con cadmio (Pb). Muestras R1A (contaminada) y R2A (no contaminada) Base Escudero, muestras P2A (contaminada) y P3B (no contaminada) Base Prat.

Comparación de las comunidades bacterianas antes y después de la selección:

Los cultivos incubados con diésel tanto a 28 como a 4°C se enriquecieron principalmente de *Pseudomonas*, género que se encontraba en altos porcentajes en todas las muestras de suelo antes de la selección (42,5 en R1A, 23,7% en R2A, 10% en P2A, 68% en P3B) (Figura 9A y B). Además, en R1A se encontró *Burkholderia* a 28°C en un porcentaje similar a lo encontrado en el suelo (Figura 9A), y *Janthinobacterium* y *Variovorax* en P2A en porcentajes menores al 3%, géneros que ya se encontraban en bajas proporciones en las muestras de suelo (1,2% y 1% respectivamente) (Figura 9A).

En el caso de los cultivos incubados con fenantreno inoculados con las muestras contaminadas, en R1A incubado a 28°C la muestra se enriqueció en representantes del género *Pseudomonas* que se encontraba en un alto porcentaje en el suelo, pero también de los géneros *Variovorax*, *Burkholderia* y *Sphingomonas* que se encontraban en muy bajas proporciones antes de la selección. Al incubar esta misma muestra a 4°C la muestra se enriqueció en representantes de los géneros *Pseudomonas* y *Pedobacter* que se encontraban en proporciones similares respecto al suelo antes de la selección y también de *Variovorax* y *Pigmentiphaga* que se encontraban muy subrepresentados (Figura 9A). En P2A incubado a 28°C el medio se enriqueció de *Pseudomonas* y *Pedobacter* que se encontraban en proporciones similares antes del tratamiento, mientras que *Variovorax*, *Sphingobium*, *Mucilaginibacter*, *Pigmentiphaga* y *Allorhizobium* se encontraban muy subrepresentados (Figura 9A). Al incubar esta la muestra P2A se favorece principalmente *Polaromonas* que se encontraba muy subrepresentado antes del proceso de selección, mientras que *Pedobacter*, *Mucilaginibacter*, *Pigmentiphaga* y *Pseudomonas* se encontraban en proporciones similares.

Respecto a las muestras control incubadas con fenantreno como única fuente de carbono, en R2A tanto a 28 como a 4°C se encontraron principalmente representantes del género *Pseudomonas* que se encontraban en alto porcentaje en la muestra de suelo, pero además se favorece *Massilia* que se encontraba en un menor porcentaje (7%) y *Pedobacter* que se encontraba en menor proporción antes de la selección. En P3B al incubar a 28 o 4°C se encontraron principalmente bacterias del género *Pseudomonas* que se encontraban altamente representadas antes de la selección, y también *Pseudarthrobacter* y *Polaromonas* que se encontraban en proporciones similares (Figura 9B).

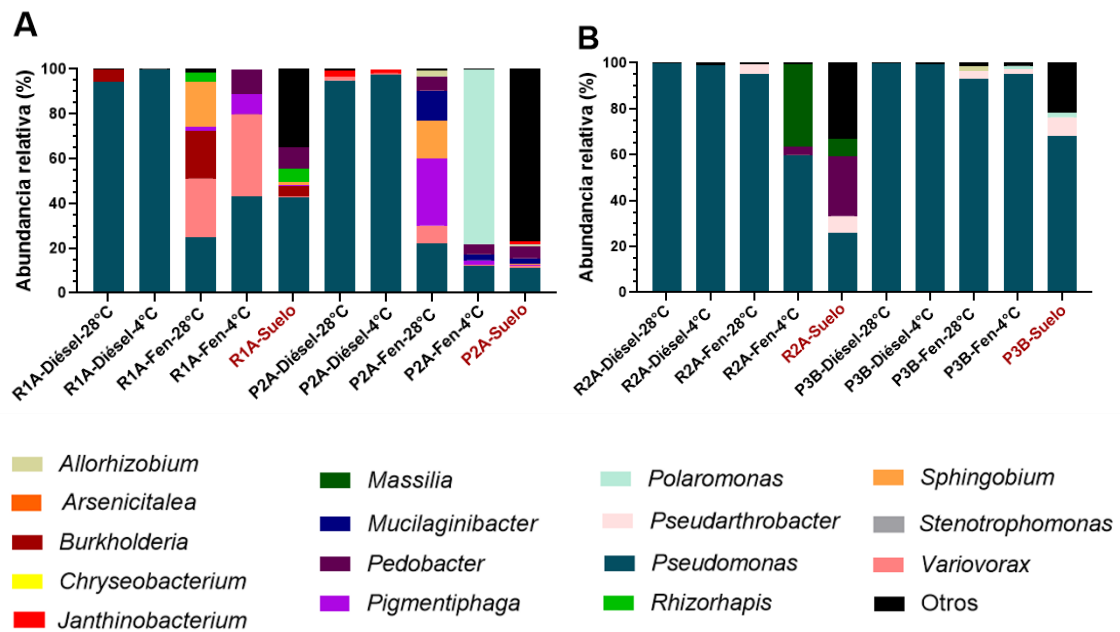


Figura 9. Comparación entre las comunidades microbianas antes y después del proceso de selección. Géneros encontrados al seleccionar microorganismos en diésel o fenantreno, a 28 y 4°C en A) las muestras contaminadas (R1A y P2A) y B) las muestras no contaminadas (R2A y P3B). Los nombres señalados en color rojo presentan las muestras de suelo y en negro las muestras de los cultivos obtenidos luego de la selección bacteriana.

Al analizar la diversidad Alpha se puede ver que, en los cultivos con glucosa, todas las muestras cuentan con un número reducido de OTUs (no más de 12) (Figura 10A y B) acompañado además de una diversidad de Shannon baja (menor a 1) (Figura 10C y D), una dominancia cercana a 1 (Figura 10E y F) y equitatividad cercana a 0 (Figura 10G y H), lo cual se condice con que todas las muestras se favorecieron en casi un 90% de *Pseudomonas* (Figura 8A). En P2A a 28 y 4°C, y en R2A a 4°C, donde se encontraron otros géneros sobre el 1% cada uno, se nota un leve aumento en el índice de diversidad de Shannon (Figura 10C y D). Por lo tanto, en relación con lo encontrado en las muestras de suelo antes de ser sometidas al proceso, hay una pérdida de la riqueza y también de la diversidad.

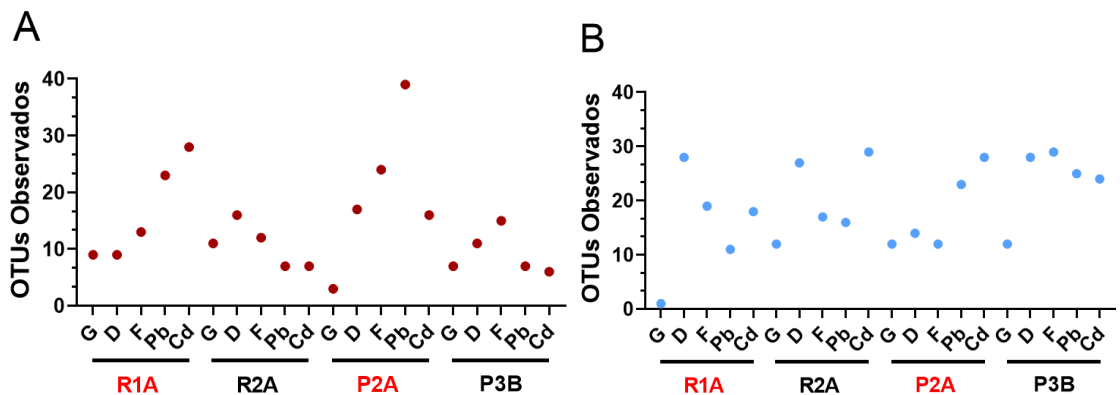
En las muestras incubadas en diésel a 28°C, la riqueza de géneros no supera los 20 mientras que a 4°C no superan los 30 (Figura 10A y B). Pese a que se encuentran más OTUs en comparación a glucosa, la diversidad, dominancia y equitatividad es similar puesto que todas las muestras constan de más de un 94% de *Pseudomonas* (Figura 8B). Además, en P2A a 28 y 4°C, y R1A a 28°C se ve un leve aumento de la diversidad en relación con las muestras control, lo que se acompaña de un crecimiento al final del proceso, no observado en las muestras control (R2A y P3B) (Figura 3 y 5C). Por ende, al igual que en glucosa, el tratamiento produjo en todas las muestras una disminución de la riqueza y diversidad bacteriana, con valores mayores de estos parámetros en los consorcios inoculados a partir de las muestras de los sitios contaminados donde hubo crecimiento.

En los cultivos incubados con fenantreno a 28 o 4°C e inoculados con las muestras provenientes de los sitios contaminados R1A y P2A a 28°C, se ve una diversidad mayor (Shannon) con menor dominancia y equitatividad que en los controles (Figura 10C, D,

E, F, G y H), donde se encontró principalmente *Pseudomonas*, mientras que en las muestras P2A y R1A se pueden ver más géneros representados (Figura 8C). Similar a lo observado en diésel, un mayor favorecimiento de géneros diferentes (aumento de diversidad) en los cultivos inoculados con R1A y P2A (contaminados), favorece el crecimiento y un cambio de coloración en el medio de cultivo al final del proceso en relación con los controles, donde hay menor diversidad y no hay crecimiento (Figura 3 y 5C).

La presencia de los metales en los cultivos con fenantreno inoculados con R1A (contaminada), disminuyó la diversidad, al incubar tanto a 28 como a 4°C. En cambio, al inocular con P2A (contaminada) a 28°C la diversidad disminuyó solo con Pb en cambio al incubar a 4°C, la diversidad aumenta en presencia de los metales.

Cabe destacar que en todas las muestras el número de OTUs observados no supera los 40 géneros mientras que en los suelos se encontraron al menos 62 (Figura 6A y Figura 10A y B), lo cual indica una pérdida en la riqueza de las muestras, es decir, que hubo una selección de géneros favorecidos bajo las condiciones estudiadas.



(Figura continúa en página siguiente)

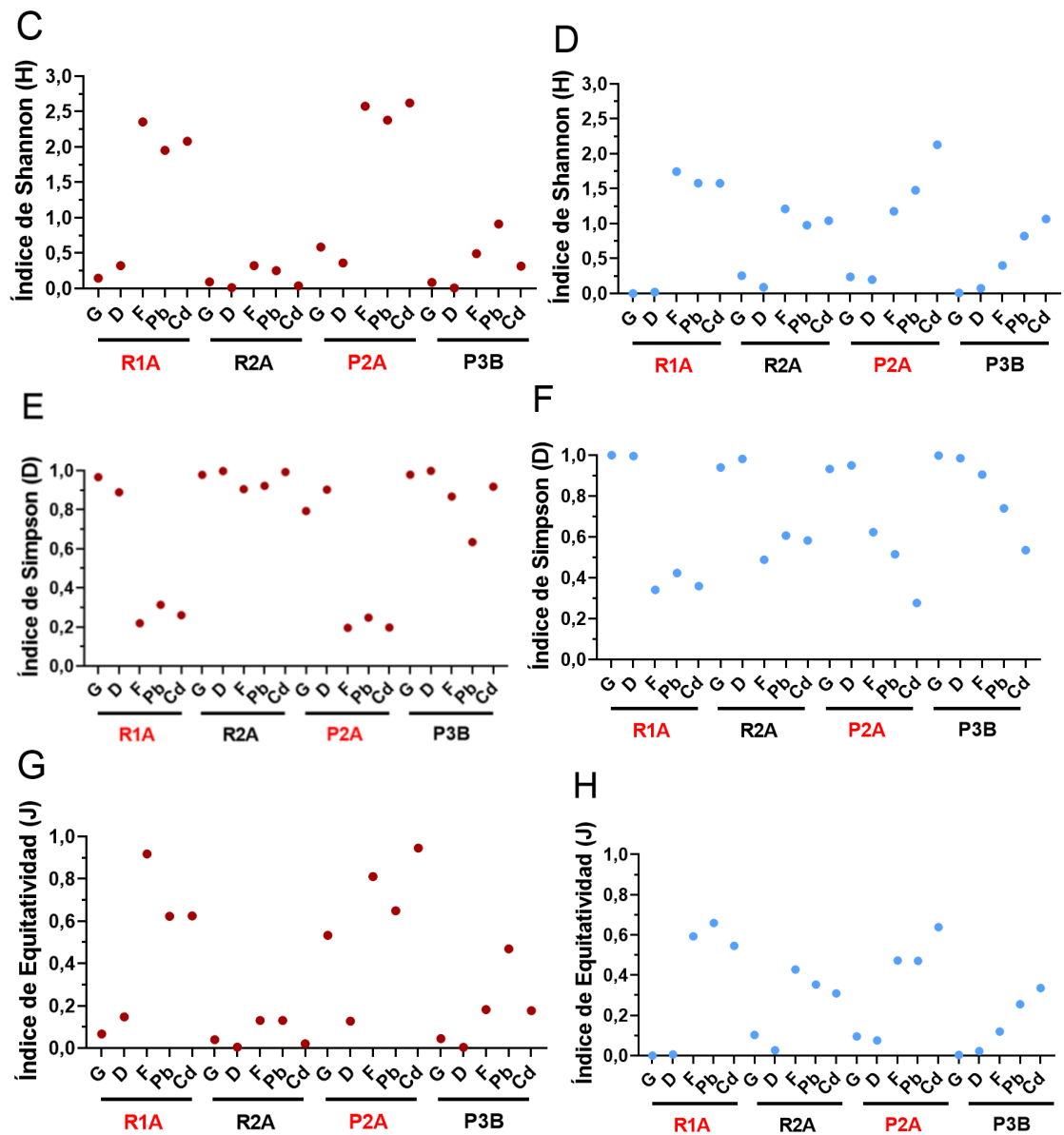


Figura 10. Índices de diversidad Alpha obtenidos a partir de la secuenciación masiva del gen ARNr 16S luego de los procesos de selección bacteriana. A) y B) OTUS observados (riqueza) a 28 y 4°C respectivamente. C) y D) Índice de Shannon-Wiener (diversidad), E) y F) Índice de Simpson (dominancia) G) y H) índice de Equitatividad. En los gráficos se muestran los índices de los experimentos realizados en: glucosa (G), diésel (D), fenantreno sin metales (F), fenantreno con cadmio (Cd), fenantreno con plomo (Pb). En rojo (A, C, E, G) se señalan los experimentos realizados a 28°C y en celeste (B, D, F, H) los realizados a 4°C.

4. DISCUSIÓN Y PROYECCIONES

4.1 Relevancia de la investigación

Descontaminar los suelos antárticos contaminados con diésel producto de constantes derrames en zonas costeras donde se encuentran bases científicas, es de suma relevancia debido a la nocividad de sus componentes (hidrocarburos y metales pesados). Además del daño que implican los derrames por diésel sobre las comunidades microbianas, la flora y fauna, éstos cambian las propiedades físicas y químicas del suelo (Aislabe y col., 2004; Saul y col., 2005; Adams y col., 2015). La biorremediación es una forma de descontaminación de bajo impacto ambiental, y esta investigación contribuye en los primeros pasos requeridos para evaluar la factibilidad de esta estrategia, a través de la búsqueda de bacterias antárticas que puedan biodegradar hidrocarburos contenidos en el diésel. Adicionalmente, se estudió la co-contaminación de diésel con metales pesados y el efecto que éstos producen al disminuir la eficiencia de metabolización de HPAs, problemática que ha sido escasamente abordada en el territorio hasta la fecha (Gran-Scheuch y col., 2017; Abdulrasheed y col., 2020; Gran-Scheuch y col., 2020; Zakaria y col., 2020).

4.2 Selección microbiana a diferentes temperaturas

Dado que se encontraron hidrocarburos (fenantreno y benzo[a]pireno) y metales en las muestras de suelo antártico, se quiso obtener consorcios y aislados microbianos, seleccionando los microorganismos que pudieran crecer en presencia de estos contaminantes. En este caso la selección se basó en la fuente de carbono adicionada al medio. Por ello, tanto diésel como fenantreno fueron agregados al 0,2%, concentración que permite a los microorganismos sobrevivir en el medio de cultivo por

varios días pero que además no es letal (Stallwood y col., 2005; Ma y col., 2006; Shukor y col., 2009; Gran-Scheuch y col., 2017). Esto último es especialmente relevante cuando se trabaja con diésel, puesto que si este es agregado en concentraciones sobre el 1,5% los solventes orgánicos contenidos en el combustible pueden ser tóxicos para los microorganismos (Shukor y col., 2009). Además, debido al efecto que tiene la presencia de metales como Pb y Cd sobre la biodegradación de fenantreno (Sandrin y col., 2003; Thavamani y col., 2012; Muthusamy y col., 2016), se hicieron dos procesos de selección en presencia de éstos. Se utilizaron concentraciones de los metales que se ha reportado que disminuyen la eficiencia de la biodegradación de fenantreno (Sandrin y col., 2003; Gran-Scheuch y col., 2017; Liu y col., 2019).

En el proceso de selección realizado a 28°C, después de la primera, tercera y quinta semana, el crecimiento tanto en diésel como en fenantreno o fenantreno con metales, se observó en los cultivos inoculados con suelos provenientes de los sitios contaminados R1A y P2A (Figura 5. A, B y C). En el caso del fenantreno, el crecimiento se asoció a un cambio de coloración desde traslúcido a amarillo. A 4°C, se observa un fenómeno similar luego de la tercera, sexta y octava semana del proceso. Estos fenómenos no fueron observados en los cultivos inoculados con las muestras de los sitios no contaminados (R2A y P3B).

Se ha descrito que, en condiciones aeróbicas en presencia de diésel o fenantreno como única fuente de carbono, bacterias heterótrofas aumentan su crecimiento con el aumento de la tasa de biodegradación de estos compuestos (Liu y col., 2019; Zakaria y col., 2020). Por lo tanto, los resultados sugieren que efectivamente hubo biodegradación de los hidrocarburos y en este caso, el proceso de selección favorece a los microorganismos de las muestras contaminadas, seleccionando a las poblaciones

capaces de hacerlo en presencia de los metales pesados Cd y Pb. Este fenómeno se explicaría por las diferencias observadas entre las poblaciones microbianas de los suelos contaminados y los controles, lo cual se discutirá más adelante.

A 4°C al final de la octava semana (2 semanas después de la segunda renovación del medio de cultivo), se observó un mayor cambio de coloración en el medio de cultivo con fenantreno, pero con un crecimiento similar respecto a las muestras incubadas a 28°C. En ese sentido, es posible que a 4°C las bacterias que se vieron favorecidas por el proceso de selección en comparación a las encontradas a 28°C sean más eficientes en la biodegradación del compuesto, o bien requieran más de este compuesto para producir la misma cantidad de biomasa.

Por otra parte, a partir de los consorcios obtenidos al final de los procesos de selección, se aislaron microorganismos que podrían potencialmente tener capacidad para biodegradar los hidrocarburos por sí mismos. También podrían estar creciendo en el medio de cultivo por interacciones con otros miembros del consorcio que sí incorporen los hidrocarburos en su metabolismo. Esto se podría dilucidar en estudios futuros estudiando la capacidad de biodegradación de los aislados obtenidos, cuantificando la concentración de los hidrocarburos luego de incubar estos microorganismos en presencia de diésel o fenantreno como únicas fuentes de carbono (Gran-Scheuch y col., 2017).

4.3 Análisis de diversidad bacteriana de las muestras de suelo

Para comprender el efecto de la presencia de los contaminantes (hidrocarburos y metales), producto de los derrames de diésel en los suelos de la Base Escudero y la Base Arturo Prat, sobre las comunidades microbianas presentes en ellas, se estudió la

estructura y composición bacteriana de las muestras a partir de la secuenciación masiva del gen ARNr 16S.

Respecto a las muestras provenientes de la Base Escudero, se encontró que la muestra R2A proveniente del sitio no contaminado en relación con R1A que fue expuesto al combustible, presentó un índice de Shannon y de equitatividad mayor, una menor dominancia de especies (índice de Simpson) y mayor riqueza (Figura 5A, B, C y D). Por lo tanto, estos resultados indican que hubo una disminución de la diversidad de las bacterias producto de los derrames por diésel. Este fenómeno de perturbación de la estructura microbiana del suelo con una pérdida de la diversidad es comúnmente observado como consecuencia de derrames de diésel y otros combustibles derivados del petróleo (Delille, 2000; Aislabie y col., 2001; Saul y col., 2005).

Para comprender con mayor profundidad estos resultados, se analizó la composición bacteriana de los suelos, estudiando las abundancias relativas de las bacterias encontradas a nivel de género. Con relación a esto, se encontraron en común entre la muestra del sitio no contaminado y del contaminado (R2A y R1A) representantes de los géneros *Pseudomonas*, *Pedobacter*, *Sphingomonas* y *Chryseobacterium* (Figura 7). Los primeros 3 se han reportado tanto en suelos antárticos contaminados con petróleo (Baraniecki y col., 2002; Vázquez y col., 2013; Van Dorst y col., 2014) como en suelos no contaminados (Huang y col., 2017; Da y col., 2015; See-Too y col., 2017; He y col., 2019). Representantes del género *Chryseobacterium* no han sido reportado antes en suelos antárticos contaminados con petróleo, pero sí desde no contaminados (Kämpfer y col., 2009). En presencia del contaminante (muestra R1A), aumenta la abundancia de bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Chryseobacterium* y *Sphingomonas*, y además aparecen los géneros *Sphingobium*, *Dyadobacter*, *Burkholderia*, *Rhizorhapis*, y

Actinimicrobium, de los cuales solo los dos últimos no poseen reportes relacionados con biodegradación de hidrocarburos del petróleo. Bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas* aisladas desde suelos antárticos han sido ampliamente asociadas a biodegradación de hidrocarburos alcanos C16, C17, C18, C19, C20 y aromáticos como fenantreno, naftaleno y otros (Aislabe y col., 2000; Stallwood y col., 2005; Ma y col., 2006; Shukor y col., 2009; Gran-Scheuch y col., 2017). Incluso, se ha reportado que la pérdida de riqueza y diversidad con dominancia de *Pseudomonas* podría ser un bioindicador de contaminación y daño del ecosistema microbiano (Van Dorst y col., 2014). Bacterias de género *Pedobacter* han mostrado capacidad para crecer en diésel como única fuente de carbono y se han asociado a la biodegradación de alcanos como C8 y C10 y también de aromáticos como pireno, naftaleno y fenantreno (Margesin y col., 2003; Vázquez y col., 2013; Li y col., 2019). Bacterias de los géneros *Sphingomonas*, *Sphingobium*, y *Burkholderia* se han relacionado principalmente a biodegradación de hidrocarburos poliaromáticos que incluyen fenantreno, naftaleno, antraceno, pireno, fluoreno entre otros, en la Antártica y otros ambientes (Aislabe y col., 2000; Kim y col., 2003; Saul y col., 2005; Huang y col., 2008; Puntus y col., 2008; Izmalkova y col., 2013; Waigi y col., 2015; Huang y col., 2008; Van Dorst y col., 2016; Gran-Scheuch y col., 2017). Bacterias del género *Dyadodobacter* no se han descrito antes en la Antártica, pero sí en otras zonas polares (Chen y col., 2013; Chaudhary y col., 2020), y se ha reportado una cepa con gran capacidad para biodegradar hidrocarburos alifáticos (Olowomofe y col., 2019).

En el caso de las muestras de suelo pertenecientes a la Base Prat, se observa que en este caso la presencia del contaminante (muestra P2A) provocó un aumento en la riqueza de los suelos, un mayor índice de Shannon y equitatividad y por ende una menor

dominancia de especies (índice de Simpson) (Figura 6A, B, C y D). La diferencia observada en cuanto a la diversidad entre las muestras de suelo de la Base Escudero con las de la Base Arturo Prat, podría deberse a las diferencias en cuanto a la concentración de hidrocarburos presente. En P2A había casi la mitad de contaminación con fenantreno, lo que podría implicar que el efecto del contaminante haya sido menor, permitiendo el desarrollo de más biotipos.

A pesar de que no se ha descrito que la presencia del contaminante pueda producir un aumento en la diversidad microbiana, se ha visto que producto de los derrames de petróleo u otros combustibles derivados de éste, hay un enriquecimiento de bacterias que pueden biodegradar estos compuestos (Saul y col., 2005). En ese sentido, en la muestra no contaminada (P3B) se encontraron en común con P2A bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Chryseobacterium* y *Pedobacter*, similar a lo observado en la base Escudero, aunque en este caso en P3B se encuentra una proporción mayor de *Pseudomonas*. Pero, además en la muestra P2A (contaminada), se encontraron los géneros *Alkanindiges*, *Sulfuritalea*, *Pseudoxanthomonas*, *Williamsia*, *Paenibacillus*, *Mucilagibacter*, *Immundisolibacter*, *Taibaiella*, *Luteolibacter*, *Arcticibacter*, *Fermentimonas* y *Proteiniphilum*. De éstos, los primeros 8 géneros mencionados poseen especies asociadas a biodegradación de hidrocarburos (Obuekwe y col., 2009; Ron & Rosenberg, 2010; Nopcharoenkul y col., 2013; Benedek y col., 2016; Corteselli y col., 2017; Nwinyi, & Amund, 2017; Jiang y col., 2019; Dong y col., 2020; Feng y col., 2020), al igual que *Pseudomonas*, *Chryseobacterium* y *Pedobacter* como se dijo anteriormente. Entre ellos destaca *Alkanindiges* que además de ser el más abundante, posee especies biodegradadoras obligadas de hidrocarburos (alcanos y aromáticos), lo

cual significa que no pueden crecer sin este tipo de fuente de carbono (Bogan y col., 2003; Klein y col., 2007).

Por lo tanto, estos antecedentes sugieren que la presencia de diésel en ambos sitios muestreados, estarían alterando la diversidad y la composición microbiana de los suelos, con un enriquecimiento de bacterias con capacidad para biodegradar hidrocarburos de este combustible.

Las muestras R1A y P2A se encontraban además co-contaminadas con Cd y Pb producto de los derrames por diésel (Tabla 2, anexo). En relación a esto, estudios anteriores han reportado bacterias pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Pedobacter*, *Sphingomonas*, *Burkholderia* y *Sphingobium*, en suelos co-contaminados con cadmio, plomo, entre otros metales e hidrocarburos, mostrando resistencia a estos metales (Colombo y col., 2011; Thavamani y col., 2013; Kuppusamy y col., 2016; Gran-Scheuch y col., 2017; Hemmat-Jou, y col., 2018). A su vez, los géneros encontrados en la muestra P2A, *Pseudoxanthomonas*, *Paenibacillus*, e *Immundisolibacter* también han sido reportados en suelos co-contaminados con metales e hidrocarburos (Patel, V., Cheturvedula, S., & Madamwar, D. 2012; Thavamani y col., 2013; Li y col., 2020). Los géneros *Mucilaginibacter* y *Sulfuritalea* también encontrados en esta muestra de suelo, han sido reportados en suelos contaminados con altas concentraciones de metales pesados como Pb y Cd (Tang y col., 2016; Li y col., 2018; Zhai y col., 2020). *Alkanindiges*, que mostró ser el género más abundante en P2A, no ha se ha asociado con resistencia a metales pesados. Sin embargo, el género *Acinetobacter*, el cual se encuentra filogenéticamente relacionado a este género, se ha reportado como resistente a Cd, Pb y otros metales. En ese sentido, se ha descrito ampliamente el efecto de estos

metales sobre la biodegradación de hidrocarburos en *Acinetobacter* (Sandrin y col., 2003; Czarny y col., 2020).

Por lo tanto, estos antecedentes sugieren que las muestras provenientes de los sitios contaminados, se enriquecieron en bacterias biodegradadoras de hidrocarburos y además resistentes a los metales ahí presentes. Estos hallazgos, refuerzan la importancia de considerar la co-contaminación con metales pesados cuando se analizan las comunidades microbianas de estas zonas.

4.4 3.4 Análisis de diversidad bacteriana después del proceso de selección

La secuenciación masiva del gen ARNr 16S de las muestras de suelo, permitió conocer la composición microbiana. Estos resultados mostraron que las muestras provenientes de los sitios contaminados con diésel se encontraban enriquecidas de bacterias que biodegradan hidrocarburos del petróleo. En este contexto, se quiso estudiar cómo estas bacterias se ven afectadas y cuales se enriquecen bajo las presiones de selección a las cuáles estas fueron sometidas en el laboratorio (Figura 2, anexo).

Selección con glucosa como única fuente de C:

En los cultivos suplementados con glucosa como única fuente de carbono, se encontró principalmente bacterias del género *Pseudomonas* en todas las muestras, tanto a 28 como a 4°C (Figura 8. A), género que es comúnmente encontrado en la Antártica y que ha sido aislado previamente bajo condiciones de cultivo similares (Bozal y col., 2007; Carrion y col., 2011). Además de ello, se encontraron *Janthinobacterium* y *Stenotrophomonas* a 28 y 4°C en P2A, géneros con cepas reportadas como psicrotolerantes (Mojib y col., 2013; Vázquez y col., 2005).

La glucosa es una fuente de carbono de fácil y rápida metabolización utilizable por gran parte de los microorganismos. Por lo tanto, la mayoría de los microorganismos encontrados en el suelo antes de ser sometidos al proceso de selección deberían haber crecido en este medio de cultivo. Sin embargo, se seleccionaron principalmente bacterias del género *Pseudomonas* (Figura 10 A y B) probablemente porque encontraba en un alto porcentaje en las 4 muestras de suelo. Dado que el cultivo fue incubado por varios días, es posible que estas bacterias hayan metabolizado más eficientemente el compuesto desplazando a las demás.

Selección con diésel como única fuente de C:

En el caso de los cultivos suplementados con diésel como única fuente de carbono, incubados a 28 o 4°C que fueron inoculados con las muestras de suelo contaminadas (R1A y P2A), al igual que en glucosa se encontró predominantemente *Pseudomonas* (Figura 8B). Como se dijo anteriormente (4.3), *Pseudomonas* es de los géneros con más cepas descritas y aisladas en la Antártica que han mostrado capacidad para biodegradar hidrocarburos del petróleo. Posee varias cepas psicotolerantes capaces de biodegradar variados hidrocarburos presentes en el diésel como fenantreno, naftaleno y otros aromáticos, además de alcanos como C16, C17, C18, C19, C20, en ensayos realizados entre 4 y 30°C (Aislabie y col., 2000; Stallwood y col., 2005; Ma y col., 2006; Shukor y col., 2009; Gran-Scheuch y col., 2017). Además de esto, se encontró *Burkholderia* en la muestra R1A incubada a 28°C, género que ha sido reportado en suelos subantárticos contaminados con diésel, mostrándose como uno de los géneros predominantes en ensayos de biodegradación de hidrocarburos de petróleo (Van Dorst y col., 2016). Además de ello, este género se ha encontrado en otros ambientes, con cepas reportadas capaces de biodegradar hidrocarburos como fenantreno y naftaleno entre 24

y 30°C (Balashova y col., 1999; Kang y col., 2003; Huang y col., 2008; Puntus y col., 2008; Izmalkova y col., 2013). En la muestra contaminada P2A (Base Prat) incubada con diésel, al igual que con glucosa se vio favorecido el género *Janthinobacterium* tanto a 28 como a 4°C (Figura 8B). Este género como se dijo anteriormente ha sido reportado en distintas zonas de la Antártica y además Kuc y col. (2019) reportaron una cepa psicrotolerante capaz de biodegradar n-alcanos del diésel a 15°C. Este género también se ha reportado en otros ambientes obtenidos desde sitios contaminados con diésel, con cepas capaces de biodegradar hidrocarburos de petróleo entre 15 y 25°C (Ciric y col., 2010; Stickney y col., 2010; Pham y col., 2014; Borowik & Wyszowska, 2018). En la muestra P2A incubada a ambas temperaturas también se favoreció *Variovorax* (Figura 8B), el cual ha sido reportado como género predominante en suelos antárticos contaminados con diésel (Saul y col., 2005). Además, se ha descrito una cepa perteneciente a este género, capaz de biodegradar antraceno a temperatura ambiente (Jones b y col., 2011) y otra aislada desde suelo ártico, capaz de crecer en fenantreno o pireno a baja temperatura (7°C) (Eriksson y col., 2003).

Cabe mencionar que los cultivos que fueron inoculados con las muestras de suelo contaminados (R1A y P2A) en donde se observó crecimiento al incubar a 28 y 4°C, ya se encontraba el género *Pseudomonas* con una alta predominancia, especialmente en la muestra de la Base Escudero (Figura 9). Además, en ambas muestras se encontraban también otros microorganismos que potencialmente podrían biodegradar hidrocarburos del petróleo (4.3, discusión). Sin embargo, ninguno de éstos se vio favorecido bajo las condiciones estudiadas en el laboratorio (salvo *Burkholderia*, *Janthinobacterium* y *Variovorax*). En este contexto, se ha descrito que una de las limitaciones en la captación y biodegradación de los hidrocarburos por parte de los microorganismos es la

insolubilidad que éstos tienen en agua. Por este motivo, muchos de ellos han desarrollado un mecanismo para aumentar la solubilidad y el acceso a estos compuestos mediante la producción de moléculas como bioemulsificadores o biosurfactantes. Estas moléculas de carácter anfipático ayudan a producir micro emulsiones o micelas donde se genera una interfase entre los hidrocarburos y la parte polar (medio líquido acuoso). Con ello se incrementa la biodisponibilidad y por ende el flujo de los compuestos donde crecerán estos microorganismos (Peng y col., 2008). En relación a esto, se han reportado varias cepas pertenecientes al género *Pseudomonas* capaces de producir este tipo de compuestos ayudando a la metabolización de hidrocarburos poliaromáticos y alifáticos (Déziel y col., 1996; Scheibenbogen y col., 1994; Nie y col., 2010; Meliani & Bensoltane 2014). Es por estos antecedentes que se especula que bacterias del género *Pseudomonas* se podrían haber seleccionado preferentemente bajo las condiciones trabajadas, aunque sería necesario realizar estudios para demostrar que estas moléculas podrían estar favoreciendo el proceso y la selección.

Por lo tanto, estos antecedentes sugieren que en medio líquido con diésel como única fuente de carbono, bacterias pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Variovorax*, *Burkholderia* y *Janthinobacterium*, se favorecieron por a su capacidad para biodegradar alcanos y/o hidrocarburos poliaromáticos de este combustible.

Por otro lado, a pesar que en los consorcios obtenidos de los cultivos inoculados con las muestras de suelo no contaminadas (R2A y P3B) se encontró un alto porcentaje de *Pseudomonas* al igual que en R1A y P2A, en estas muestras no se observó crecimiento microbiano. Por lo tanto, es posible que en estos cultivos se haya seleccionado principalmente *Pseudomonas* considerando que este género ya se encontraba

altamente representado en las muestras de suelo antes de ser sometidas al tratamiento en el laboratorio (Figura 9). Es probable que debido a la ausencia del contaminante en el ambiente natural, la muestra se encontrase enriquecida principalmente en cepas que no tenían capacidad para biodegradar los hidrocarburos.

Selección con fenantreno como única fuente de C:

En el cultivo obtenido de la incubación a 28°C con fenantreno como única fuente de carbono inoculado con la muestra contaminada R1A (Base Escudero), se encontraron predominantemente representantes de los géneros *Pseudomonas*, *Pigmentiphaga*, *Variovorax*, *Rhizorhapis*, *Sphingobium* y *Burkholderia*. Como se dijo anteriormente, los géneros *Pseudomonas*, *Variovorax* y *Burkholderia* tienen cepas reportadas que biodegradan fenantreno y otros aromáticos a 28°C o temperaturas similares. El género *Pigmentiphaga* ha sido reportado escasamente en zonas polares, con una cepa aislada desde nieve antártica (Antony y col., 2016) y un lago ártico (Veillette y col., 2011), pero no desde muestras de suelo antártico y que además crezcan en fenantreno. Sin embargo, se han reportado cepas provenientes de otros ambientes capaces de biodegradar antraceno y fenantreno a temperatura ambiente (Jones a y col., 2011; Jones.b y col., 2011). Bacterias pertenecientes al género *Sphingobium* reportadas desde muestras antárticas, se han asociado a la biodegradación de fenantreno y otros compuestos aromáticos (Aislabie y col., 2000; Gran-Scheuch y col., 2017). Respecto a *Rhizorhapis* no existen reportes en la literatura sobre su presencia en la Antártica y tampoco se ha asociado a la biodegradación de fenantreno u otro compuesto aromático. Al incubar esta misma muestra a 4°C, se favorece nuevamente *Pseudomonas*, *Variovorax* y *Pigmentiphaga*, los primeros dos con cepas psicrotolerantes que biodegradan fenantreno a bajas temperaturas (Eriksson y col., 2003; Ma y col., 2006),

mientras que los otros géneros encontrados a 28°C son reemplazados por *Pedobacter*. Este es un género que se ha reportado en la Antártica con cepas capaces de crecer en compuestos aromáticos a 15°C (Vázquez y col., 2013) y también se ha obtenido desde otros ambientes donde cepas mostraron capacidad para biodegradar fenantreno y otros hidrocarburos a bajas temperaturas (Li y col., 2019; Margesin y col., 2003).

Respecto a la muestra contaminada de la Base Arturo Prat (P2A), cuando se incubó con fenantreno a 28°C, al igual que en la muestra R1A, se favorecieron predominantemente representantes de los géneros *Pseudomonas*, *Variovorax*, *Pigmentiphaga* y *Sphingobium*, pero también *Mucilaginibacter*, *Pedobacter* y *Allorhizobium*, que como se dijo anteriormente se ha reportado que hay cepas de estos géneros capaces de biodegradar hidrocarburos aromáticos (a excepción de *Allorhizobium*). En contraste, al incubar P2A con fenantreno a 4°C, se encuentran nuevamente *Pseudomonas*, *Variovorax*, *Mucilaginibacter*, *Pedobacter* y *Pigmentiphaga*. Sin embargo, su abundancia es notablemente menor puesto que en este caso se encuentra casi un 80% de *Polaromonas*. Este género bacteriano es comúnmente encontrado en zonas frías o polares, ya sea en agua, hielo o suelos (Ciok y col., 2018). Además de ello, se han reportado cepas capaces de biodegradar compuestos aromáticos como fenantreno, antraceno y pireno a bajas temperaturas (7-10°C) Eriksson y col., 2002; Jeon y col., 2004). En muestras de suelo antártico se ha reportado *Polaromonas naphthalenivorans* (Vázquez y col., 2017; Jurelevicius y col., 2012), especie que biodegrada naftaleno (Jeon y col., 2004).

Por lo tanto, estos antecedentes sugieren que bacterias pertenecientes a los géneros antes mencionados que se enriquecieron en los cultivos inoculados con las muestras de suelo contaminadas, estarían biodegradando el fenantreno y generando la energía y

biomasa necesarias para el crecimiento y el cambio de coloración observado en el medio de cultivo a 28 y 4°C.

En relación con las muestras R2A y P3B provenientes de los sitios no contaminados, al incubarse a 28 o 4°C se seleccionaron principalmente bacterias del género *Pseudomonas*. En R2A incubado a 4°C, donde se observó un leve crecimiento al final de la sexta y octava semana, también aumentó la abundancia de bacterias pertenecientes al género *Massilia* (35%). Aunque bacterias de este género poseen capacidad para biodegradar fenantreno y otros hidrocarburos aromáticos (Liu y col., 2014), considerando que el crecimiento y cambio de coloración fue mínimo, los resultados sugieren que las bacterias favorecidas tendrían una baja eficiencia para biodegradar los compuestos. Por lo tanto, ocurriría algo similar a lo observado en las muestras control incubadas con diésel. A pesar de que el medio se enriqueció principalmente en *Pseudomonas*, es posible que las cepas que se encontraban en el suelo no tenían capacidad para biodegradar hidrocarburos, considerando que los sitios no estaban contaminados.

Selección con fenantreno en presencia de metales:

Al incubarse a 28°C con fenantreno como única fuente de carbono suplementado con cadmio e inocular con la muestra contaminada R1A (Base Escudero), el género *Sphingobium* no es detectable (Figura 8D). En estudios previos se reportó que *Sphingobium xenophagum* aislado también desde muestras de suelo antártico de la Isla Rey Jorge contaminado con diésel, disminuye su crecimiento y capacidad de biodegradación de fenantreno en presencia de cadmio a la concentración aplicada en este estudio (Gran-Scheuch y col., 2017).

En la muestra contaminada P2A (Base Arturo Prat), la presencia de cadmio favoreció a representantes del género *Variovorax* tanto a 28 como a 4°C (Figura 8D y E). En relación con lo anterior, se ha demostrado que bajas concentraciones de cadmio favorecen la biodegradación de fenol (compuesto aromático derivado del petróleo) y por ende el crecimiento de bacterias pertenecientes a este género (Hupert-Kocurek y col., 2013), lo cual podría explicar el fenómeno observado. Al incubar esta misma muestra con fenantreno en presencia de Pb, se observa el favorecimiento del género *Sphingobium*. Al respecto, se han reportado previamente que representantes de este género poseen una alta resistencia a este metal (Song y col., 2019; Jalilvand y col, 2020).

4.5 Proyecciones

A partir de esta investigación, se obtuvieron consorcios y aislados bacterianos que mostraron capacidad para biodegradar hidrocarburos encontrados en el diésel, particularmente fenantreno en presencia de los metales pesados cadmio y plomo.

Gracias a estos resultados, en estudios posteriores se podrían utilizar los microorganismos encontrados para realizar pruebas de laboratorio *ex situ* de descontaminación de suelos contaminados con diésel. Con ello, se podrían optimizar las condiciones necesarias para poder realizar una biorremediación *in situ* que permita mitigar la problemática ambiental abordada en esta investigación.

5. CONCLUSIONES

Los derrames de diésel en las muestras de suelo de la Base Escudero y Arturo Prat que fueron estudiadas, tuvieron como consecuencia una alta concentración de fenantreno y metales pesados como plomo y cadmio. Esto provocó un cambio en la estructura (diversidad Alpha) y en la composición de las comunidades bacterianas, observándose un enriquecimiento de bacterias que pueden biodegradar hidrocarburos que componen el diésel y que resisten a metales pesados.

Los procesos de selección microbiana realizados permitieron enriquecer las muestras en bacterias que pueden biodegradar diésel o fenantreno. Se seleccionaron bacterias que ya se encontraban enriquecidas en las muestras de suelo y también otras que se favorecieron durante el proceso, capaces de biodegradar el fenantreno en presencia de Cd o Pb. También se observó que incubar a bajas temperatura favorece la presencia de bacterias típicas de zonas polares que biodegradan hidrocarburos.

Por lo tanto, los experimentos realizados en esta investigación permiten aceptar lo planteado en la hipótesis: “microorganismos provenientes de suelos antárticos contaminados con diésel, son capaces de crecer con hidrocarburos del petróleo como única fuente de carbono en presencia de metales pesados a diferentes temperaturas”. Estos resultados destacan la importancia de estudiar las comunidades microbianas de suelos antárticos cuando ocurren derrames de diésel, zonas que son altamente sensibles por el rol fundamental que tiene este continente sobre el mantenimiento del equilibrio del ecosistema Terrestre. Estos resultados también recalcan la relevancia de considerar los metales pesados y el efecto de la temperatura, al seleccionar los microorganismos óptimos para una biorremediación eficiente.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Abdulrasheed, M., Roslee, A. F., Zakaria, N. N., Zulkharnain, A., Lee, G. L. Y., Convey, P., ... & Ahmad, S. A. 2020. Effects of heavy metals on diesel metabolism of psychrotolerant strains of *Arthrobacter sp.* from Antarctica. *Journal of Environmental Biology*, 41: 966-972.
- Adams, G. O., Fufeyin, P. T., Okoro, S. E., & Ehinomen, I. 2015. Bioremediation, biostimulation and bioaugmentation: a review. *International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation*, 3: 28-39.
- Ahn, I. Y., Lee, S. H., Kim, K. T., Shim, J. H., & Kim, D. Y. 1996. Baseline heavy metal concentrations in the antarctic clam, *Laternula elliptica* in Maxwell Bay, King George Island, Antarctica. *Marine Pollution Bulletin*, 32: 592-598.
- Aislabie, J., Foght, J., & Saul, D. 2000. Aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from soil near Scott Base, Antarctica. *Polar Biology*, 23: 183-188.
- Aislabie, J., Fraser, R., Duncan, S., & Farrell, R. L. 2001. Effects of oil spills on microbial heterotrophs in Antarctic soils. *Polar Biology*, 24: 308-313.
- Aislabie, J. M., Balks, M. R., Foght, J. M., & Waterhouse, E. J. 2004. Hydrocarbon spills on Antarctic soils: effects and management. *Environmental Science & Technology*, 38:, 1265-1274.
- Antony, R., Sanyal, A., Kapse, N., Dhakephalkar, P. K., Thamban, M., & Nair, S. 2016. Microbial communities associated with Antarctic snow pack and their biogeochemical implications. *Microbiological research*, 192: 192-202.
- Balashova, N. V., Kosheleva, I. A., Golovchenko, N. P., & Boronin, A. M. 1999. Phenanthrene metabolism by *Pseudomonas* and *Burkholderia* strains. *Process Biochemistry*, 35: 291-296.
- Baraniecki, C. A., Aislabie, J., & Foght, J. M. 2002. Characterization of *Sphingomonas sp.* Ant 17, an aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from Antarctic soil. *Microbial Ecology*, 43: 44-54.
- Bargagli, R. 2005. Antarctica: geomorphology and climate trends. *Antarctic Ecosystems: Environmental Contamination, Climate Change, and Human Impact*, 175: 1-41.
- Bargagli, R. 2008. Environmental contamination in Antarctic ecosystems. *Science of the total environment*, 400: 212-226.
- Bej, A. K., Saul, D., & Aislabie, J. 2000. Cold-tolerant alkane-degrading *Rhodococcus* species from Antarctica. *Polar Biology*, 23: 100-105.
- Benedek, T., Táncsics, A., Szabó, I., Farkas, M., Szoboszlay, S., Fábrián, K., ... & Kriszt, B. 2016. Polyphasic analysis of an *Azoarcus-Leptothrix*-dominated bacterial biofilm

developed on stainless steel surface in a gasoline-contaminated hypoxic groundwater. *Environmental Science and Pollution Research*, 23: 9019-9035

Bento, F. M., Camargo, F. A., 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.

Bogan, B. W., Sullivan, W. R., Kayser, K. J., Derr, K. D., Aldrich, H. C., & Paterek, J. R. 2003. *Alkanindiges illinoisensis* gen. nov., sp. nov., an obligately hydrocarbonoclastic, aerobic squalane-degrading bacterium isolated from oilfield soils. *Journal of Medical Microbiology*, 53:1389-1395.

Borowik, A., & Wyszowska, J. 2018. Remediation of soil contaminated with diesel oil. *Journal of Elementology*, 23: 767-788.

Boutron, C. F., & Wolff, E. W. 1989. Heavy metal and sulphur emissions to the atmosphere from human activities in Antarctica. *Atmospheric Environment*. 23: 1669-1675.

Bozal, N., Montes, M. J., & Mercade, E. 2007. *Pseudomonas guineae* sp. nov., a novel psychrotolerant bacterium from an Antarctic environment. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 57: 2609-2612.

Bruins, M. R., Kapil, S., & Oehme, F. W. 2000. Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicology and environmental safety*, 45:198-207.

Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. 2016. DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature methods*. 13: 581–583.

Carrion, O., Minana-Galbis, D., Montes, M. J., & Mercade, E. 2011. *Pseudomonas deceptionensis* sp. nov., a psychrotolerant bacterium from the Antarctic. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 61: 2401-2405.

Chang, S. E., Stone, J., Demes, K., & Piscitelli, M. 2014. Consequences of oil spills: a review and framework for informing planning. *Ecology and Society*, 19: 26.

Chaudhary, D. K., Dahal, R. H., & Kim, J. 2020. *Dyadobacter psychrotolerans* sp. nov. and *Dyadobacter frigoris* sp. nov., two novel psychrotolerant members of the family Cytophagaceae isolated from Arctic soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70: 569-575.

Chen, L., Jiang, F., Xiao, M., Dai, J., Kan, W., Fang, C., & Peng, F. 2013. *Dyadobacter arcticus* sp. nov., isolated from Arctic soil. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63: 1616-1620.

Chown, S. L., Clarke, A., Fraser, C. I., Cary, S. C., Moon, K. L., & McGeoch, M. A. 2015. The changing form of Antarctic biodiversity. *Nature*, 522: 431-438.

Ciok, A., Budzik, K., Zdanowski, M. K., Gawor, J., Grzesiak, J., Decewicz, P., ... & Dziewit, L. 2018. Plasmids of psychrotolerant *Polaromonas spp.* isolated from arctic and antarctic glaciers—diversity and role in adaptation to polar environments. *Frontiers in Microbiology*, 9: 1285.

Ciric, L., Griffiths, R. I., Philp, J. C., & Whiteley, A. S. 2010. Field scale molecular analysis for the monitoring of bacterial community structures during on-site diesel bioremediation. *Bioresource technology*, 101: 5235-5241.

Clarkson, M. A., & Abubakar, A. I. 2015. Bioremediation and biodegradation of hydrocarbon contaminated soils: a review. *IOSR Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology*, 9: 38-45.

Colombo, M., Cavalca, L., Bernasconi, S., & Andreoni, V. 2011. Bioremediation of polyaromatic hydrocarbon contaminated soils by native microflora and bioaugmentation with *Sphingobium chlorophenolicum* strain C3R: a feasibility study in solid-and slurry-phase microcosms. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65: 191-197.

Convey, P., & Stevens, M. I. 2007. Antarctic biodiversity. *Science*, 317: 1877-1878.

Convey, P., Chown, S. L., Clarke, A., Barnes, D. K., Bokhorst, S., Cummings, V., ... & Griffiths, H. J. 2014. The spatial structure of Antarctic biodiversity. *Ecological monographs*, 84: 203-244.

Corteselli, E. M., Aitken, M. D., & Singleton, D. R. 2017. Description of *Immundisolibacter cernigliae* gen. nov., sp. nov., a high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium within the class Gammaproteobacteria, and proposal of *Immundisolibacterales* ord. nov. and *Immundisolibacteraceae* fam. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 67: 925–931.

Coulon, F., Pelletier, E., Gourhant, L., & Delille, D. 2005. Effects of nutrient and temperature on degradation of petroleum hydrocarbons in contaminated sub-Antarctic soil. *Chemosphere*, 58: 1439-1448.

Cowan, D. A., Makhalanyane, T. P., Dennis, P. G., & Hopkins, D. W. 2014. Microbial ecology and biogeochemistry of continental Antarctic soils. *Frontiers in microbiology*, 5:154.

Czarny, J., Staninska-Pięta, J., Piotrowska-Cyplik, A., Juzwa, W., Wolniewicz, A., & Marecik, R. 2020. *Acinetobacter* sp. as the key player in diesel oil degrading community exposed to PAHs and heavy metals. *Journal of hazardous materials*, 383: 121168.

Da, X., Jiang, F., Chang, X., Ren, L., Qiu, X., Kan, W., ... & Peng, F. 2015. *Pedobacter ardleyensis* sp. nov., isolated from soil in Antarctica. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 65: 3841-3846.

Delille, D. 2000. Response of Antarctic soil bacterial assemblages to contamination by diesel fuel and crude oil. *Microbial Ecology*, 40: 159-168

Déziel, É., Paquette, G., Villemur, R., Lépine, F., & Bisailon, J. 1996. Biosurfactant production by a soil *Pseudomonas* strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbons. *Applied and environmental microbiology*, 62: 1908-1912.

Di Toro, D. M., McGrath, J. A., & Stubblefield, W. A. 2007. Predicting the toxicity of neat and weathered crude oil: toxic potential and the toxicity of saturated mixtures. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 26: 24-36.

Dong, Z. L., Wang, B. S., & Li, J. 2020. Effects of petroleum hydrocarbon contamination on soil bacterial diversity in the permafrost region of the Qinghai-Tibetan Plateau. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*, 29(3), 322-339.

Eriksson, M., Sodersten, E., Yu, Z., Dalhammar, G., & Mohn, W. W. 2003. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons at low temperature under aerobic and nitrate-reducing conditions in enrichment cultures from northern soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69: 275-284.

Eriksson, M., Dalhammar, G., & Mohn, W. W. 2002. Bacterial growth and biofilm production on pyrene. *FEMS microbiology ecology*, 40: 21-27.

Feng, X., Liu, Z., Jia, X., & Lu, W. 2020. Distribution of Bacterial Communities in Petroleum-Contaminated Soils from the Dagang Oilfield, China. *Transactions of Tianjin University*, 26: 22-32.

Fernández-Luqueño, F., Valenzuela-Encinas, C., Marsch, R., Martínez-Suárez, C., Vázquez-Núñez, E., & Dendooven, L. 2011. Microbial communities to mitigate contamination of PAHs in soil—possibilities and challenges: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 18: 12-30.

Gadd, G. M., & Griffiths, A. J. 1977. Microorganisms and heavy metal toxicity. *Microbial ecology*, 4: 303-317.

Gran-Scheuch, A., Fuentes, E., Bravo, D. M., Jiménez, J. C., & Pérez-Donoso, J. M. 2017. Isolation and characterization of phenanthrene degrading bacteria from diesel fuel-contaminated Antarctic soils. *Frontiers in microbiology*, 8: 1634.

Gran-Scheuch, A., Ramos-Zuñiga, J., Fuentes, E., Bravo, D., & Pérez-Donoso, J. M. 2020. Effect of co-contamination by pahs and heavy metals on bacterial communities of diesel contaminated soils of south shetland islands, Antarctica. *Microorganisms*, 8: 1749.

Harju, S., Fedosyuk, H., & Peterson, K. R. 2004. Rapid isolation of yeast genomic DNA: Bust n'Grab. *BMC biotechnology*. 4: 8-14.

Hemmat-Jou, M. H., Safari-Sinegani, A. A., Mirzaie-Asl, A., & Tahmourespour, A. 2018. Analysis of microbial communities in heavy metals-contaminated soils using the metagenomic approach. *Ecotoxicology*, 27: 1281-1291.

He, R. H., Liu, Z. W., Yu, Y., Li, H. R., & Du, Z. J. 2019. *Pedobacter changchengzhani* sp. nov., isolated from soil of Antarctica. *Antonie van Leeuwenhoek*, 112: 1747-1754.

Huang, X., Tian, Y., Luo, Y. R., Liu, H. J., Zheng, W., & Zheng, T. L. 2008. Modified sublimation to isolate phenanthrene-degrading bacteria of the genera *Sphingomonas* and *Burkholderia* from Xiamen oil port. *Marine pollution bulletin*, 57: 538-543.

Huang, Y., Wei, Z., Danzeng, W., Kim, M. C., Zhu, G., Zhang, Y., ... & Peng, F. 2017. *Sphingomonas antarctica* sp. nov., isolated from Antarctic tundra soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67: 4064-4068.

Hupert-Kocurek, K., Saczyńska, A., & Piotrowska-Seget, Z. 2013. Cadmium increases catechol 2, 3-dioxygenase activity in *Variovorax* sp. 12S, a metal-tolerant and phenol-degrading strain. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 104: 845-853.

Hussein, K. A., & Joo, J. H. 2013. Heavy metal resistance of bacteria and its impact on the production of antioxidant enzymes. *African Journal of Microbiology Research*, 7: 2288-2296.

Izmalkova, T. Y., Sazonova, O. I., Kosheleva, I. A., & Boronin, A. M. 2013. Phylogenetic analysis of the genes for naphthalene and phenanthrene degradation in *Burkholderia* sp. strains. *Russian journal of genetics*, 49: 609-616

Jalilvand, N., Akhgar, A., Alikhani, H. A., Rahmani, H. A., & Rejali, F. 2020. Removal of heavy metals Zinc, Lead, and Cadmium by biomineralization of urease-producing bacteria isolated from Iranian Mine Calcareous soils. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 20: 206-219.

Jensen, V. 1977. Effects of lead on biodegradation of hydrocarbons in soil. *Oikos*. 28: 220-224.

Jeon, C. O., Park, W., Ghiorse, W. C., & Madsen, E. L. 2004. *Polaromonas naphthalenivorans* sp. nov., a naphthalene-degrading bacterium from naphthalene-contaminated sediment. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 54: 93-97.

Jesus, H. E., Peixoto, R. S., & Rosado, A. S. 2015. Bioremediation in Antarctic soils. *J Pet Environ Biotechnol*, 6: 2.

Jiang, M. Z., Qiu, Z. J., Zhang, G. W., Gao, S. Y., You, X. Y., & Ma, Y. F. 2019. *Mucilaginibacter xinganensis* sp. nov., a phenanthrene-degrading bacterium isolated from wetland soil. *Antonie van Leeuwenhoek*, 112: 641-649.

Jones a, M. D., Crandell, D. W., Singleton, D. R., & Aitken, M. D. 2011. Stable-isotope probing of the polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterial guild in a contaminated soil. *Environmental microbiology*, 13: 2623-2632.

Jones b, M. D., Singleton, D. R., Sun, W., & Aitken, M. D. 2011. Multiple DNA extractions coupled with stable-isotope probing of anthracene-degrading bacteria in contaminated soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77: 2984-2991

Jones, P. D., & Lister, D. H. 2015. Antarctic near-surface air temperatures compared with ERA-Interim values since 1979. *International Journal of Climatology*, 35: 1354-1366.

Jurelevicius, D., Alvarez, V. M., Peixoto, R., Rosado, A. S., & Seldin, L. 2012. Bacterial polycyclic aromatic hydrocarbon ring-hydroxylating dioxygenases (PAH-RHD) encoding genes in different soils from King George Bay, Antarctic Peninsula. *Applied Soil Ecology*, 55: 1-9.

Kämpfer, P., Lodders, N., Vanechoutte, M., & Wauters, G. 2009. Transfer of *Sejorgia antarctica*, *Sejorgia jeonii* and *Sejorgia marina* to the genus *Chryseobacterium* as *Chryseobacterium antarcticum* comb. nov., *Chryseobacterium jeonii* comb. nov. and *Chryseobacterium marinum* comb. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 59: 2238-2240.

Kang, H., Hwang, S. Y., Kim, Y. M., Kim, E., Kim, Y. S., Kim, S. K., ... & Zylstra, G. J. 2003. Degradation of phenanthrene and naphthalene by a *Burkholderia* species strain. *Canadian journal of microbiology*, 49: 139-144.

Kelepertzis, E. 2014. Accumulation of heavy metals in agricultural soils of Mediterranean: insights from Argolida basin, Peloponnese, Greece. *Geoderma*, 221: 82-90.

Kim, T. J., Lee, E. Y., Kim, Y. J., Cho, K. S., & Ryu, H. W. 2003. Degradation of polyaromatic hydrocarbons by *Burkholderia cepacia* 2A-12. *World journal of microbiology and biotechnology*, 19: 411-417.

Klein, A. N., Frigon, D., & Raskin, L. 2007. Populations related to *Alkanindiges*, a novel genus containing obligate alkane degraders, are implicated in biological foaming in activated sludge systems. *Environmental microbiology*, 9: 1898-1912.

Košnář, Z., Mercl, F., & Tlustoš, P. 2018. Ability of natural attenuation and phytoremediation using maize (*Zea mays* L.) to decrease soil contents of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) derived from biomass fly ash in comparison with PAHs-spiked soil. *Ecotoxicology and environmental safety*. 153: 16-22.

Kuc, V., Vázquez, S., Hernández, E., Martínez-Alvarez, L., Primitz, J. V., Mac Cormack, W. P., & Ruberto, L. 2019. Hydrocarbon-contaminated Antarctic soil: changes in bacterial community structure during the progress of enrichment cultures with different n-alkanes as substrate. *Polar Biology*, 42: 1157-1166.

Kuppusamy, S., Thavamani, P., Megharaj, M., Venkateswarlu, K., Lee, Y. B., & Naidu, R. 2016. Pyrosequencing analysis of bacterial diversity in soils contaminated long-term with PAHs and heavy metals: implications to bioremediation. *Journal of hazardous materials*. 317: 169-179.

Lee, J. R., Raymond, B., Bracegirdle, T. J., Chades, I., Fuller, R. A., Shaw, J. D., & Terauds, A. 2017. Climate change drives expansion of Antarctic ice-free habitat. *Nature*, 547: 49-54.

Lee, L. S., Hagwall, M., Delfino, J. J., & Rao, P. S. C. 1992. Partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons from diesel fuel into water. *Environmental science & technology*, 26: 2104-2110.

Li, Q., You, P., Hu, Q., Leng, B., Wang, J., Chen, J., ... & Ouyang, K. 2020. Effects of co-contamination of heavy metals and total petroleum hydrocarbons on soil bacterial community and function network reconstitution. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 204: 111083.

Liu J, Liu S, Sun K, Sheng Y, Gu Y, Gao Y. 2014 Colonization on root surface by a phenanthrene-degrading endophytic bacterium and its application for reducing plant phenanthrene contamination. *PLoS ONE* 9: e108249

Liu, X. X., Hu, X., Cao, Y., Pang, W. J., Huang, J. Y., Guo, P., & Huang, L. 2019. Biodegradation of phenanthrene and heavy metal removal by acid-tolerant *Burkholderia fungorum* FM-2. *Frontiers in Microbiology*, 10: 408.

Li, X., Qu, C., Bian, Y., Gu, C., Jiang, X., & Song, Y. 2019. New insights into the responses of soil microorganisms to polycyclic aromatic hydrocarbon stress by combining enzyme activity and sequencing analysis with metabolomics. *Environmental Pollution*, 255: 113312.

Li, Y. P., Carraro, N., Yang, N., Liu, B., Xia, X., Feng, R., ... & Rensing, C. 2018. Genomic islands confer Heavy Metal Resistance in *Mucilaginibacter kameinonensis* and *Mucilaginibacter rubeus* Isolated from a Gold/Copper Mine. *Genes*, 9: 573.

Mac Cormack, W. P., & Fraile, E. R. 1997. Characterization of a hydrocarbon degrading psychrotrophic Antarctic bacterium. *Antarctic Science*, 9: 150-155.

Makhalanyane, T. P., Van Goethem, M. W., & Cowan, D. A. 2016. Microbial diversity and functional capacity in polar soils. *Current opinion in biotechnology*, 38: 159-166.

Ma, Y., Wang, L., & Shao, Z. 2006. *Pseudomonas*, the dominant polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from Antarctic soils and the role of large plasmids in horizontal gene transfer. *Environmental Microbiology*, 8: 455-465.

Meliani, A., & Bensoltane, A. 2014. Enhancement of hydrocarbons degradation by use of *Pseudomonas* biosurfactants and biofilms. *Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology*, 5: 1-7.

Margesin, R., Spröer, C., Schumann, P., & Schinner, F. 2003. *Pedobacter cryoconitis* sp. nov., a facultative psychrophile from alpine glacier cryoconite. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53: 1291-1296.

- Michaud, L., Giudice, A. L., Saitta, M., De Domenico, M., & Bruni, V. 2004. The biodegradation efficiency on diesel oil by two psychrotrophic Antarctic marine bacteria during a two-month-long experiment. *Marine Pollution Bulletin*, 49: 405-409.
- Mojib, N., Farhoomand, A., Andersen, D. T., & Bej, A. K. 2013. UV and cold tolerance of a pigment-producing Antarctic *Janthinobacterium* sp. Ant5-2. *Extremophiles*, 17: 367-378.
- Muthusamy, S., Peng, C., & Ng, J. C. 2016. Effects of multi-component mixtures of polyaromatic hydrocarbons and heavy metal/lloid (s) on Nrf2-antioxidant response element (ARE) pathway in ARE reporter-HepG2 cells. *Toxicology research*, 5: 1160-1171.
- Naik, M. M., & Dubey, S. K. 2013. Lead resistant bacteria: lead resistance mechanisms, their applications in lead bioremediation and biomonitoring. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 98, 1-7.
- Nie, M., Yin, X., Ren, C., Wang, Y., Xu, F., & Shen, Q. 2010. Novel rhamnolipid biosurfactants produced by a polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium *Pseudomonas aeruginosa* strain NY3. *Biotechnology advances*, 28: 635-643.
- Nopcharoenkul, W., Netsakulnee, P., & Pinyakong, O. 2013. Diesel oil removal by immobilized *Pseudoxanthomonas* sp. RN402. *Biodegradation*, 24: 387-397.
- Nwinyi, O. C., & Amund, O. O. 2017. Biodegradation of selected polycyclic aromatic hydrocarbons by axenic bacterial species belonging to the genera *Lysinibacillus* and *Paenibacillus*. *Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science*, 41: 577-587.
- Patel, V., Cheturvedula, S., & Madamwar, D. 2012. Phenanthrene degradation by *Pseudoxanthomonas* sp. DMVP2 isolated from hydrocarbon contaminated sediment of Amlakhadi canal, Gujarat, India. *Journal of hazardous materials*, 201: 43-51.
- Pham, V. H., Kim, J., & Jeong, S. W. 2014. Enhanced isolation and culture of highly efficient psychrophilic oil-degrading bacteria from oil-contaminated soils in South Korea. *Journal of environmental biology*, 35: 1145-1149
- Peixoto, R. S., Vermelho, A. B., & Rosado, A. S. 2011. Petroleum-degrading enzymes: bioremediation and new prospects. *Enzyme research*. 2011; 1-7.
- Peng, R. H., Xiong, A. S., Xue, Y., Fu, X. Y., Gao, F., Zhao, W., ... & Yao, Q. H. 2008. Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. *FEMS microbiology reviews*, 32: 927-955.
- Ron, E., & Rosenberg, E. 2010. *Acinetobacter* and *Alkanindiges*. En Terry J. McGenity (Eds), *Handbook of Hydrocarbon and lipid microbiology*. pp. 1799-1803. Springer, Berlin Heidelberg.

Ruberto, L. A., Vazquez, S. C., Curtosi, A., Mestre, M. C., Pelletier, E., & Mac Cormack, W. P. 2006. Phenanthrene biodegradation in soils using an Antarctic bacterial consortium. *Bioremediation Journal*, 10: 191-201.

Ruberto, L., Vazquez, S. C., & Mac Cormack, W. P. 2003. Effectiveness of the natural bacterial flora, biostimulation and bioaugmentation on the bioremediation of a hydrocarbon contaminated Antarctic soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 52: 115-125.

Ruoppolo, V., Woehler, E. J., Morgan, K., & Clumpner, C. J. 2013. Wildlife and oil in the Antarctic: a recipe for cold disaster. *Polar Record*, 49: 97-109.

See-Too, W. S., Salazar, S., Ee, R., Convey, P., Chan, K. G., & Peix, Á. 2017. *Pseudomonas versuta* sp. nov., isolated from Antarctic soil. *Systematic and applied microbiology*, 40: 191-198.

Obuekwe, C. O., Al-Jadi, Z. K., & Al-Saleh, E. S. 2009. Hydrocarbon degradation in relation to cell-surface hydrophobicity among bacterial hydrocarbon degraders from petroleum-contaminated Kuwait desert environment. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 63: 273-279.

Olaniran, A. O., Balgobind, A., & Pillay, B. 2013. Bioavailability of heavy metals in soil: impact on microbial biodegradation of organic compounds and possible improvement strategies. *International journal of molecular sciences*, 14: 10197-10228.

Olowomofe, T. O., Oluyeye, J. O., Aderiye, J. B. I., & Oluwole, O. A. 2019. Aliphatic hydrocarbon profile of crude-oil degraded by bacteria isolates from bitumen-polluted surface water from Agbabu, Ondo State. *J Pure Appl Microbiol*, 2019, 13: 879-886

Owamah, H. I. 2013. Heavy metals determination and assessment in a petroleum impacted river in the Niger Delta Region of Nigeria. *Albanian Journal of Agricultural Sciences*, 12: 129.

Puntus, I. F., Filonov, A. E., Akhmetov, L. I., Karpov, A. V., & Boronin, A. M. 2008. Phenanthrene degradation by bacteria of the genera *Pseudomonas* and *Burkholderia* in model soil systems. *Microbiology*, 77: 7-15.

Sandrin, T. R., & Maier, R. M. 2003. Impact of metals on the biodegradation of organic pollutants. *Environmental Health Perspectives*, 111: 1093-1101.

Santos, I. R., Silva-Filho, E. V., Schaefer, C. E., Albuquerque-Filho, M. R., & Campos, L. S. 2005. Heavy metal contamination in coastal sediments and soils near the Brazilian Antarctic Station, King George Island. *Marine pollution bulletin*, 50: 185-194.

Saul, D. J., Aislabie, J. M., Brown, C. E., Harris, L., & Foght, J. M. 2005. Hydrocarbon contamination changes the bacterial diversity of soil from around Scott Base, Antarctica. *FEMS Microbiology Ecology*, 53: 141-155.

Scheibenbogen, K., Zytner, R. G., Lee, H., & Trevors, J. T. 1994. Enhanced removal of selected hydrocarbons from soil by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 biosurfactants and some chemical surfactants. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental AND Clean Technology*, 59: 53-59.

Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., ... & Sahl, J. W. 2009. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75: 7537-7541.

See-Too, W. S., Salazar, S., Ee, R., Convey, P., Chan, K. G., & Peix, Á. 2017. *Pseudomonas versuta* sp. nov., isolated from Antarctic soil. *Systematic and applied microbiology*, 40: 191-198.

Shukor, M. Y., Hassan, N. A. A., Jusoh, A. Z., Perumal, N., Shamaan, N. A., MacCormack, W. P., & Syed, M. A. 2009. Isolation and characterization of a *Pseudomonas* diesel-degrading strain from Antarctica. *J. Environ. Biol*, 30: 1-6.

Song, D., Chen, X., Xu, M., Hai, R., Zhou, A., Tian, R., ... & Zhou, J. 2019. Adaptive evolution of *Sphingobium hydrophobicum* C1T in electronic waste contaminated river sediment. *Frontiers in microbiology*, 10: 2263.

Stallwood, B., Shears, J., Williams, P. A., & Hughes, K. A. 2005. Low temperature bioremediation of oil-contaminated soil using biostimulation and bioaugmentation with a *Pseudomonas* sp. from maritime Antarctica. *Journal of Applied Microbiology*, 99: 794-802.

Stickney, J. W., Nikitin, A. G., Nikitin, G. A., & Morgan, R. M. 2010. An efficient enrichment technique for isolation and quantification of indigenous diesel fuel-utilizing bacteria present in freshwater sediments. *Journal of Biotech Research* [ISSN: 1944-3285], 2: 1-11.

Suttie, E. D., & Wolff, E. W. 1993. The local deposition of heavy metal emissions from point sources in Antarctica. *Atmospheric Environment. Part A*. 27: 1833-1841.

Szopińska, M., Namieśnik, J., & Polkowska, Ż. 2016. How important is research on pollution levels in Antarctica? Historical approach, difficulties and current trends. In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. 239: 79-156.

Tang, J., Huang, J., Qiao, Z., Wang, R., & Wang, G. 2016. *Mucilaginibacter pedocola* sp. nov., isolated from a heavy-metal-contaminated paddy field. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66: 4033-4038.

Tchounwou, P. B., Yedjou, C. G., Patlolla, A. K., & Sutton, D. J. 2012. Heavy metal toxicity and the environment. In *Molecular, clinical and environmental toxicology*. 133-164.

Thapa, B., Kc, A. K., & Ghimire, A. 2012. A review on bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in soil. Kathmandu university journal of science, engineering and technology, 8: 164-170.

Thavamani, P., Megharaj, M., & Naidu, R. 2013. Metal-tolerant PAH-degrading bacteria: development of suitable test medium and effect of cadmium and its availability on PAH biodegradation. Environmental Science and Pollution Research, 22: 8957-8968.

Thavamani, P., Malik, S., Beer, M., Megharaj, M., & Naidu, R. 2012. Microbial activity and diversity in long-term mixed contaminated soils with respect to polyaromatic hydrocarbons and heavy metals. Journal of environmental management, 99: 10-17.

Treccani, V. 1965. Microbial degradation of aliphatic and aromatic hydrocarbons. Zeitschrift für allgemeine Mikrobiologie, 5: 332-341.

Turner, J., Barrand, N. E., Bracegirdle, T. J., Convey, P., Hodgson, D. A., Jarvis, M., ... & Shanklin, J. 2013. Antarctic climate change and the environment: an update. Polar Record, 50: 237-259.

Van Dorst, J. M., Hince, G., Snape, I., & Ferrari, B. C. 2016. Novel culturing techniques select for heterotrophs and hydrocarbon degraders in a subantarctic soil. *Scientific reports*, 6: 1-13.

Van Dorst, J., Siciliano, S. D., Winsley, T., Snape, I., & Ferrari, B. C. 2014. Bacterial targets as potential indicators of diesel fuel toxicity in subantarctic soils. Appl. Environ. Microbiol., 80: 4021-4033

Vázquez, S., Nogales, B., Ruberto, L., Mestre, C., Christie-Oleza, J., Ferrero, M., ... & Mac Cormack, W. P. 2013. Characterization of bacterial consortia from diesel-contaminated Antarctic soils: towards the design of tailored formulas for bioaugmentation. International Biodeterioration & Biodegradation, 77: 22-30

Vázquez, S., Monien, P., Minetti, R. P., Jürgens, J., Curtosi, A., Primitz, J. V., ... & Helmke, E. 2017. Bacterial communities and chemical parameters in soils and coastal sediments in response to diesel spills at Carlini Station, Antarctica. Science of the Total Environment, 605: 26-37.

Vázquez, S., Ruberto, L., & Mac Cormack, W. 2005. Properties of extracellular proteases from three psychrotolerant *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from Antarctic soil. Polar Biology, 28: 319-325.

Veillette, J., Lovejoy, C., Potvin, M., Harding, T., Jungblut, A. D., Antoniadis, D., ... & Vincent, W. F. 2011. Milne Fiord epishelf lake: A coastal Arctic ecosystem vulnerable to climate change. *Écoscience*, 18: 304-316.

Vidali, M. 2001. Bioremediation. An overview. Pure and applied chemistry, 73: 1163-1172.

Waigi, M. G., Kang, F., Goikavi, C., Ling, W., & Gao, Y. (2015). Phenanthrene biodegradation by *Sphingomonads* and its application in the contaminated soils and sediments: a review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 104, 333-349.

Walworth, J., Pond, A., Snape, I., Rayner, J., Ferguson, S., & Harvey, P. 2007. Nitrogen requirements for maximizing petroleum bioremediation in a sub-Antarctic soil. *Cold Regions Science and Technology*, 48: 84-91.

Wilson, S. C., & Jones, K. C. 1993. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Environmental pollution*, 81: 229-249.

Zakaria, N. N., Roslee, A. F. A., Gomez-Fuentes, C., Zulkharnain, A., Abdurashed, M., Sabri, S., ... & Ahmad, S. A. 2020. Kinetic studies of marine psychrotolerant microorganisms capable of degrading diesel in the presence of heavy metals. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 19: 1375-1388.

Zhai, W., Dai, Y., Zhao, W., Yuan, H., Qiu, D., Chen, J., ... & Tang, X. 2019. Simultaneous immobilization of the cadmium lead and arsenic in paddy soils amended with titanium gypsum. *Environmental Pollution*, 258: 113790.

ANEXO

Tabla 1 anexo. Descripción de los sitios de muestreo.

Sitio de Muestreo	Coordenadas GPS	Contaminación por diésel	Temperatura (°C)
Base Profesor Julio Escudero, Isla Rey Jorge	62° 12' 03.7" S/ 58° 57' 41.4" W	Si	5,5
Base Profesor Julio Escudero, Isla Rey Jorge	62° 12' 03.7" S/ 58° 57' 41.4" W	Si	4,4
Base Profesor Julio Escudero, Isla Rey Jorge	62° 12' 02.8" S/ 58° 57' 41.6" W	Si	1
Base Profesor Julio Escudero, Isla Rey Jorge	62° 12' 02.8" S/ 58° 57' 41.6" W	Si	0,7
Base Profesor Julio Escudero, Isla Rey Jorge	S62°12' 00.6" /W058°58' 02.1"	Si	5,8
Base Profesor Julio Escudero, Isla Rey Jorge	S62°12' 00.6" /W058°58' 02.1"	Si	5,8
<i>Península Hurd, Isla Livingston</i>	S62°39' 48.6" /W06 0°23' 41.1"	No	5,2
Base española, Isla Livingston.	S62°39' 44.3" /W06 0°23' 13.0"	Si	6,7
Base española, Isla Livingston.	S62°39' 44.3" /W06 0°23' 13.0"	Si	6,3

Sitio de Muestreo	Coordenadas GPS	Contaminación por diésel	Temperatura (°C)	Muestra
Base Naval Capitán Arturo Prat, Isla Greenwich	S62°28' 45.7" /w05 9°39' 46.6"	Si	10,4	E1A
Base Naval Capitán Arturo Prat, Isla Greenwich	S62°28' 45.7" /w05 9°39' 46.6"	Si	6,6	E1B
Base Naval Capitán Arturo Prat, Isla Greenwich	S62°28' 41.8" /w05 9°39' 43.2"	No	8,2	E2A
Base Naval Capitán Arturo Prat, Isla Greenwich	S62°28' 45.8" /w05 9°39' 46.6"	Si	9,6	E2B
Base Escudero, Isla Rey Jorge	62° 11' 37.7" S 58° 56' 15.0" W	Si	3,3	EL5A
Base Escudero, Isla Rey Jorge	62° 11' 37.7" S 58° 56' 15.0" W	Si	3,3	
Base Escudero, Isla Rey Jorge	62° 11' 37.6" S 58° 56' 18.7" W	No	4,1	EL5B
Base O' Higgins, Islote Isabel Riquelme	S63°19' 14.7" /w057°54' 00.4"	Si	7,3	
Base O' Higgins, Islote Isabel Riquelme	S63°19' 16.0" /w057°53' 54.4"	Si	-0,6	H3A
Base O' Higgins, Islote Isabel Riquelme	S63°19' 16.4" /w057°53' 49.6"	No	-0,7	H5A
Base O' Higgins, Islote Isabel Riquelme	S63°19' 16.0" /w057°53' 56.0"	Si	2	H5B

Muestra	P2A	P2B	P3B	P4A	R1B	R1A	R2A	O1A	O2A	O3A	O5A
---------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

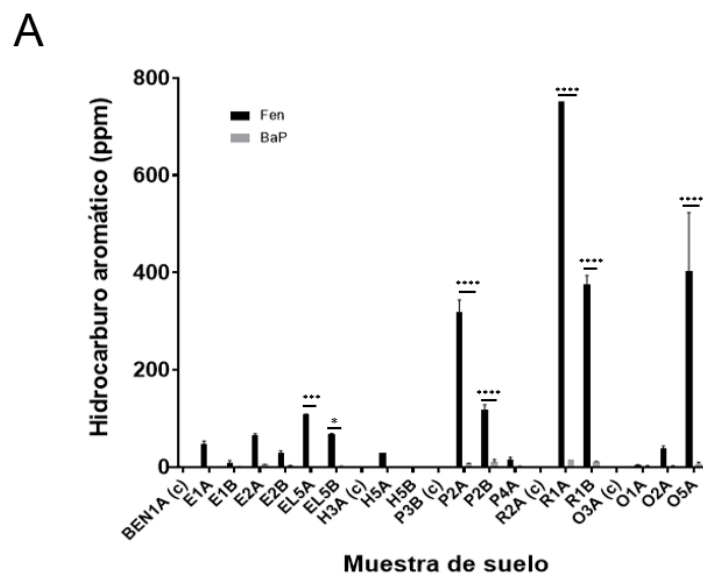


Figura 1 anexo. Caracterización de muestras de suelo antártico. A) Datos correspondientes a la cuantificación mediante espectroscopía de fluorescencia de fenantreno (fen) y benzopireno (BaP). ANOVA de dos vías, p-value < 0,0001. B) y C) Comparación mediante ANOVA de una vía de la concentración de fenantreno y benzo[a]pireno respectivamente, en relación con la muestra control.

Tabla 2 anexo. Cuantificación de plomo y cadmio en muestras de suelo.

Muestra	Concentración Plomo (ppm)	Concentración Cadmio (ppm)
BEN1A (c)	2,65	< 0,025
E2A	168	< 0,025
E1A	36,8	< 0,025
E2B	16	< 0,025
H5A	7,02	0,07
H5B	7,39	0,038
P2A	390	0,208
P2B	69,2	0,036
P4A	17,2	< 0,025

R2A (c)	4,18	< 0,025
R1A	105	< 0,025
O1A	81,6	0,416
O5A	192	0,272

*Las muestras señaladas con una "c" entre paréntesis corresponden a las muestras control provenientes de los sitios no contaminados con diésel.

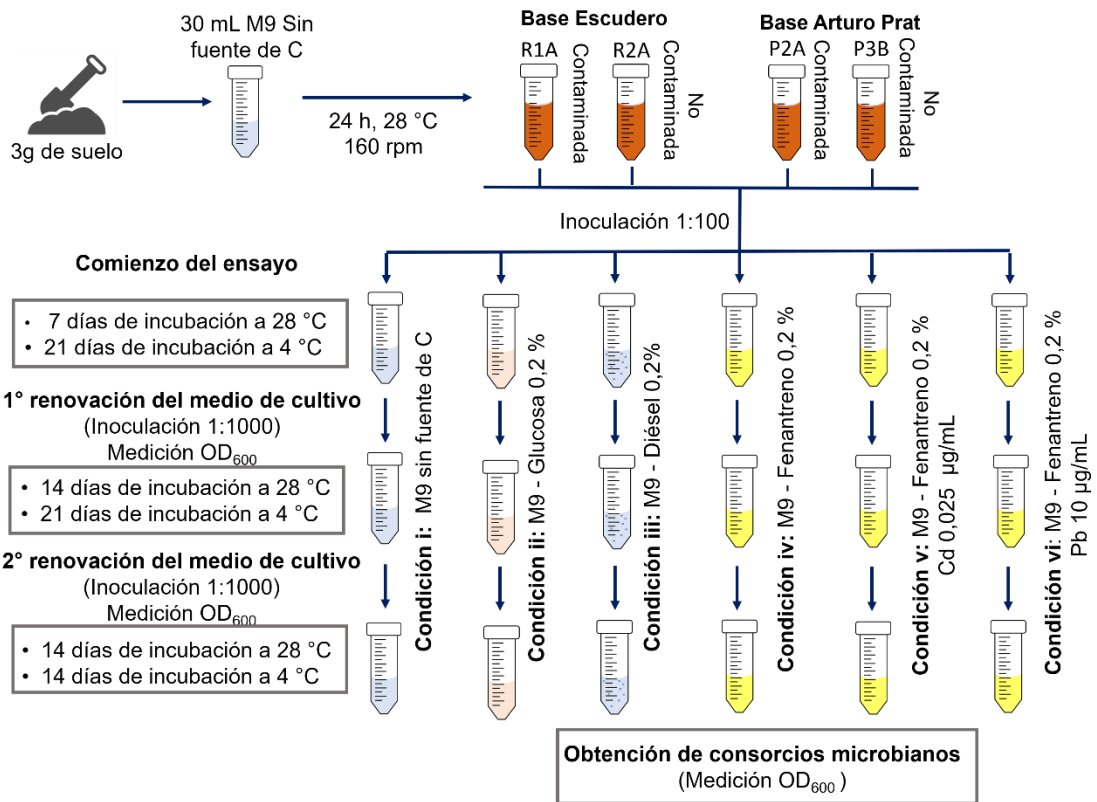


Figura 2 Anexo. Esquema del proceso de selección microbiana. Metodología llevada a cabo para el proceso de selección microbiana tanto a 28 como a 4°C, con sus respectivos tiempos de incubación, las 4 muestras de suelo (R1A, R2A, P2A y P3B) y, las seis condiciones estudiadas.