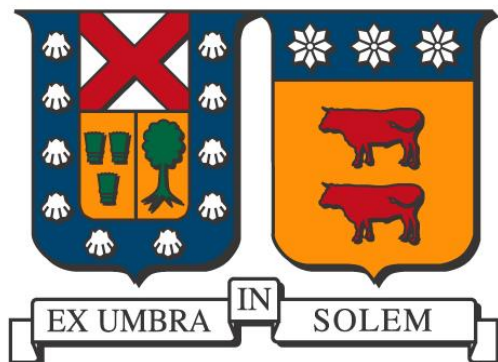


UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y AMBIENTAL
VALPARAÍSO – CHILE



**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE UNA
BACTERIA HIDROCARBONCLÁSTICA DE LA
REGIÓN DE VALPARAÍSO Y SU APLICACIÓN EN
BIORREMEDIACIÓN DE HIDROCARBUROS**

Lisette Estephanie Hernández Guerrero

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE
INGENIERO CIVIL AMBIENTAL

Profesor Guía: MICHAEL SEEGER PFEIFFER

Profesor Co-Guía: HENRIK HANSEN

OCTUBRE 2018

A mi familia, que lo es todo.

Agradecimientos

Sin duda, mis primeros agradecimientos son a mi familia, quienes siempre han sido el gran pilar y el principal apoyo que he tenido durante toda mi vida. A mis padres, por siempre dar lo mejor de sí en esta enorme tarea de ser guías de tres hijos que hoy son nada más que frutos de todo su esfuerzo. Por siempre impulsarme a ser y hacer desde la pasión, desde la vocación y el amor. Por darme todo y más. A mis hermanos, a mi cuñada y mi cuñado, por estar presentes siempre con una palabra de apoyo o alguna broma para subir el ánimo. A mis padrinos, que durante mis años universitarios me abrieron las puertas de su casa. A mis abuelos, tíos y primos, que jamás se han ausentado de hitos importantes y desde siempre me han demostrado el poder del amor y el poder de una familia unida. A Fabián, por darme su apoyo y amor cada vez que lo he necesitado, por sus cariños, por su compañía y contención. Este logro es tan mío como de todos ustedes.

Agradecer también a quienes me integraron en este último proceso universitario, al hermoso grupo que conforma LMMBA. Desde el día uno sentí la colaboración en la que se desenvuelven, el cariño y comprensión con la que se trata este grupo de genios. Estoy realmente agradecida de todo lo que me enseñaron y todo lo que aprendí junto a ustedes. Agradecer principalmente a Barbarita, quien con una gran voluntad me guió, corrigió y apoyó siempre con mucho cariño. Agradecer al equipo INES, Guille y Pauli, por considerarme como parte del equipo, por la amistad, y por enseñarme tanto. Al genio, Roberto D., por la voluntad de enseñarme y ayudarme siempre. Agradecer a Vale por todos sus consejos y ayuda, a NAS por su amistad y apañar siempre al Club, a Pame, Laura, Vane, Cony, Flavia, Ángela, Zule y Gene, que siempre brindaron su apoyo, amistad y ayuda cuando la necesité, alegrando (y endulzando) los días. Al Profesor Michael Seeger y a la Profesora Myriam Gonzalez, por ser los guías y gestores del laboratorio.

Finalmente agradecer a mis S8, ¡Por jamás desaparecer! Por estar siempre con un mensaje de apoyo, con una bien helada cada vez que fue necesaria. A mis Espumitas, a los SuperPasivos, mi Muelita, Felipe, apoyando y tirando para arriba, por permanecer en mi vida, gracias. A Rocío, Iván, Georgette, Camila O., Caro, Gaby, Pau, Tatiana, Camila U. y a todos los ambientales de corazón ¡Por hacer de los años universitarios inolvidables!

¡Gracias!

Resumen

La biorremediación es una estrategia para remover contaminantes desde suelos o aguas. Este proceso se lleva a cabo generalmente por bacterias degradadoras que fueron aisladas por sus capacidades catabólicas. La biorremediación de hidrocarburos ha sido estudiada como una tecnología efectiva y de bajo costo para la remoción de contaminantes. En el marco de esta memoria se planteó como objetivo aislar y caracterizar una nueva cepa degradadora y estudiar su posible aplicación en biorremediación de suelos contaminados con diésel. Se planteó como hipótesis: Desde un suelo proveniente de la Región de Valparaíso contaminado con diésel y sometido a un proceso de biorremediación se podrá aislar una cepa bacteriana degradadora de hidrocarburos. Los objetivos específicos fueron: (1) Aislar e identificar una cepa bacteriana hidrocarbonoclástica proveniente de un suelo contaminado con diésel y sometido a biorremediación; (2) Caracterizar la cepa bacteriana hidrocarbonoclástica aislada mediante técnicas microbiológicas y genéticas; (3) Evaluar las capacidades catabólicas de hidrocarburos del aislado bacteriano. El aislado se obtuvo desde muestras de microcosmos contaminados con diésel. La cepa aislada B7 se identificó como *Achromobacter* sp. que posee ~99% de identidad con *Achromobacter spanius* LMG 5911 respecto al gen ARNr 16S. La cepa aislada B7 es capaz de crecer en medio rico en presencia hasta 6% de NaCl. La bacteria creció en hidrocarburos aromáticos como bifenilo y naftaleno. También se observó crecimiento en algunos alcanos como octano, hexano y hexadecano, y en diésel. La caracterización fenotípica y genotípica la cepa bacteriana B7 sugiere que se relaciona con una cepa de *Achromobacter piechaudii*. El estudio de la degradación de los componentes del diésel fue monitoreada mediante cromatografía gaseosa con detector por ionización por llama (GC-FID). El crecimiento se monitoreo midiendo unidades formadoras de colonias y turbidez. La degradación del sistema inoculado con la cepa B7 muestra alrededor de un 95 % de degradación de diésel considerando los hidrocarburos totales de petróleo (TPH), mientras que en el sistema abiótico se alcanzó un 50% de remoción de diésel. Además se observó una alta degradación de hidrocarburos del rango C₁₅ – C₂₁. Por sus propiedades degradadoras de hidrocarburos, la cepa B7 posee potencial para ser utilizada como parte de un consorcio o en forma individual para la biorremediación de hidrocarburos.

Isolation and characterization of a hydrocarbonoclastic bacterium of Valparaíso región and its application in hydrocarbons bioremediation

Abstract

Bioremediation is a technology to remove contaminants from polluted sites. This process is usually carried out by degrading bacteria that were isolated based on their catabolic capabilities. The bioremediation of hydrocarbons has been studied as an effective and low-cost approach for the removal of contaminants. The objective of this thesis was to isolate and characterize a novel hydrocarbon-degrading strain and its application in bioremediation of soils contaminated with diesel. It was proposed as hypothesis: From a soil from the Valparaíso Region contaminated with diesel and subjected to a bioremediation process, a hydrocarbon-degrading bacterial strain can be isolated. The specific objectives were : (1) Isolate and identify a hydrocarbonoclastic bacterial strain from a soil contaminated with diesel and subjected to bioremediation; (2) Characterize the isolated hydrocarbonoclastic bacterial strain by microbiological and genetic techniques; (3) Evaluate the hydrocarbons catabolic capabilities of the bacterial isolate. The isolate was obtained from samples of a soil contaminated with diesel. The isolated strain B7 was identified as *Achromobacter* sp. showing ~ 99% identity with *Achromobacter spanius* LMG 5911 with 16S rRNA gen. Strain B7 is able to grow in presence of up to 6% NaCl. The bacteria grew in aromatic hydrocarbons such as biphenyl and naphthalene. Growth was also observed on specific alkanes such as octane, hexane and hexadecane, and on diesel. The phenotypic and genotypic characterization of the bacterial strain B7 suggests that it belong to *Achromobacter piechaudii*. The degradation of diesel components was monitored by gas chromatography with flame ionization detector (GC-FID). Growth was monitored by measuring colony forming units and turbidity. The degradation of the system inoculated with the B7 strain shows ~ 95% diesel degradation based on the total petroleum hydrocarbons (TPH), whereas in the abiotic system 50% diesel removal was achieved. High degradation of hydrocarbons of the C15 - C21 range was observed. Due to its hydrocarbon degrading capabilities, strain B7 has the potential to be used as part of a consortium or individually for the bioremediation of hydrocarbons.

Índice general

<i>Agradecimientos</i>	3
Resumen	4
Abstract	5
Índice de Figuras	8
Índice de Tablas	9
1. Introducción	10
1.1 Petróleo	11
1.2 Biorremediación.....	13
1.3 Bioaumentación de suelos contaminados con hidrocarburos y su efecto sobre las comunidades microbianas.	15
2. Hipótesis y objetivos	17
2.1 Hipótesis.....	17
2.2 Objetivo general	17
2.3 Objetivos específicos.....	17
3. Materiales y métodos	18
3.1 Reactivos químicos.	18
3.2 Medios de cultivo.....	19
3.3 Cepas bacterianas.	19
3.4 Metodología analítica.....	20
3.4.1 Extracción de ADN.....	20
3.4.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	20
3.4.3 Electroforesis.....	21
3.4.4 Tinción Gram	21
3.4.5 Microscopía óptica	21
3.4.6 Extracción diésel desde matriz líquida.....	21
3.4.7 Cuantificación de hidrocarburos por cromatografía gaseosa con detector de ionización por llama (GC-FID).....	22
3.5 Aislamiento de la bacteria hidrocarbonoclástica.....	22
3.5.1 Diseño de partidores.....	22
3.5.2 Selección de muestras de suelo.....	23
3.5.3 Obtención de cepa bacteriana hidrocarbonoclastica.....	24
3.6 Identificación molecular.....	25

3.7	Determinación de morfología bacteriana.	25
3.8	Crecimiento de bacteria aislada a diferentes temperaturas.....	25
3.9	Caracterización bioquímica de la cepa mediante galería API 20Ne y prueba catalasa.	25
3.10	Resistencia a antibióticos.	26
3.11	Crecimiento de bacteria aislada en diferentes concentraciones de NaCl.	26
3.12	Crecimiento de bacteria aislada en fuentes de carbono convencionales.	26
3.13	Crecimiento de bacteria aislada en hidrocarburos y ácidos orgánicos.	27
3.14	Crecimiento de bacteria aislada en diésel y hexadecano en diferentes concentraciones...	27
3.15	Biorremediación de diésel desde soluciones contaminadas.	28
4.	Resultados	29
4.1	Aislamiento de la bacteria hidrocarbonoclástica.....	29
4.2	Identificación molecular.....	29
4.3	Morfología bacteriana.	30
4.4	Crecimiento de la bacteria aislada a diferentes temperaturas.....	31
4.5	Caracterización bioquímica de cepa mediante galería API 20 Ne y prueba catalasa.	31
4.6	Resistencia a antibióticos.	34
4.7	Crecimiento de la cepa B7 en diferentes concentraciones de NaCl.	34
4.8	Crecimiento en fuentes de carbono convencionales.....	35
4.9	Crecimiento de la cepa B7 en diferentes hidrocarburos y ácidos orgánicos.	36
4.10	Crecimiento de <i>Achromobacter sp.</i> B7 en diésel y hexadecano en diferentes concentraciones.	39
4.11	Biorremediación de diésel desde soluciones contaminadas.	41
5.	Discusión	43
6.	Conclusiones	47
7.	Proyecciones y recomendaciones	48
8.	Bibliografía	49
9.	Anexos	53
9.1	Anexo A	53
9.2	Anexo B	58
9.3	Anexo C	60
10.	Publicaciones y participación en congresos.	61
11.	Financiamiento	61

Índice de Figuras

Figura 1. Clasificación de hidrocarburos presentes en el petróleo.....	11
Figura 2. Rutas aeróbicas de degradación bacteriana de n-alcano.....	14
Figura 3. Sitios de muestreo de los suelos.....	15
Figura 4. Esquema de extracción de ADN.....	20
Figura 5. Esquema de electroforesis de gel de agarosa.....	21
Figura 6. Alineamiento de partidores "Bloom" en secuencia consenso.....	23
Figura 7. Alineamiento de partidores "Alka" en secuencia gen rpoB.....	23
Figura 8. Esquema de metodología de aislamiento.....	24
Figura 9. Esquema antibiograma.....	26
Figura 10. Esquema de metodología de análisis de degradación de diésel de cepa aislada.....	28
Figura 11. Detección de una bacteria amplificada mediante PCR.....	29
Figura 12. Árbol filogenético de la cepa B7.....	30
Figura 13. Morfología de la célula y de colonias de <i>Achromobacter</i> sp. B7.....	31
Figura 14. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento de <i>Achromobacter</i> sp. B7.....	32
Figura 15. Caracterización bioquímica mediante la galería API 20Ne y ensayo de la catalasa.....	33
Figura 16. Crecimiento bacteriano en presencia de diferentes concentraciones de NaCl.....	35
Figura 17. Crecimiento bacteriano en fuentes de carbono convencionales.....	35
Figura 18. Crecimiento bacteriano en medio BHA utilizando naftaleno y bifenilo.....	36
Figura 19. Cinética de crecimiento en hidrocarburos como única fuente de carbono.....	37
Figura 20. Cinética de crecimiento en n-hexadecano y diésel por 23 días.....	37
Figura 21. Cinética de crecimiento de <i>Achromobacter</i> sp. B7 en diésel.....	39
Figura 22. Cinética de crecimiento de <i>Achromobacter</i> sp. B7 en hexadecano.....	40
Figura 23. Degradación de diésel por <i>Achromobacter</i> sp. B7.....	41
Figura 24: Efecto de <i>Achromobacter</i> sp. B7 sobre hidrocarburos C10-C25 de diésel remanente....	42

Índice de Tablas

Tabla 1. Diseño experimental de los microcosmos para los estudios de bioaumentación.....	16
Tabla 2. Partidores utilizados en esta tesis.....	18
Tabla 3. Perfil térmica PCR con partidores "Alka" y "bloom".....	20
Tabla 4. Perfil térmico PCR con partidores 27F y 1492R.....	20
Tabla 6. Partidores diseñados, "Bloom".	23
Tabla 7. Partidores diseñados, "Alka".....	23
Tabla 8. Identificación de la cepa mediante análisis de la secuencia del gen ARNr 16S	30
Tabla 9. Caracterización bioquímica mediante la galería API 20Ne.	33
Tabla 10. Resistencia a antibióticos de <i>Achromobacter</i> sp. B7.	34
Tabla 11. Crecimiento de <i>Achromobacter</i> sp. B7 en presencia de hidrocarburos y ác. orgánicos. ..	38

1. Introducción

El petróleo es una mezcla de compuestos orgánicos, incluyendo compuestos nitrogenados, oxigenados y azufrados, hidrocarburos principalmente. Este combustible fósil y sus derivados son utilizados en diversas industrias, por lo que se ha convertido en un mercado de grandes dimensiones. El problema se presenta cuando su extracción, distribución y almacenaje no se realizan de manera correcta, por lo que se producen derrames y vertimientos al medio ambiente. En Chile estos eventos han estado presentes por años. En la región de Valparaíso se han producido derrames frecuentemente. El año 2002 se derramó en la ribera del río Aconcagua 75 mil litros de petróleo desde la refinería de Concón. En agosto de 2015, se registró un nuevo derrame mientras se reponía combustible en un buque ubicado en el terminal de ENAP, Bahía de Quintero. En abril de 2018 se registró un derrame menor de 50 litros de combustible en Isla de Pascua, en la Bahía Hanga Roa. Este tipo de eventos se hacen presente y forman parte de un grave problema ambiental (La Tercera, 2016; T13, 2018). Se han buscado técnicas para recuperar los lugares afectados por estos eventos. Al comienzo las tecnologías consistían en procesos físicos, en los que se trataba de extraer y contener al contaminante. Esta técnica permite disminuir la cantidad de contaminantes, pero no logra eliminar los compuestos ni elimina sus efectos negativos. Así se comenzó a utilizar la tecnología de biorremediación, que consiste en utilizar microorganismos que por medio de sus rutas catabólicas transforman a los contaminantes en compuestos menos tóxicos, o logran la mineralización. Esta tecnología tiene las ventajas de ser de bajo costo y de no generar nuevos residuos (Moreno *et al.*, 2004). La biorremediación se puede llevar a cabo por distintos microorganismos, pero son las bacterias las más estudiadas. Variadas cepas bacterianas pertenecientes a los géneros *Pseudomonas* y *Acinetobacter* han sido estudiadas para fines de degradación de hidrocarburos (Fuentes, 2014). Existen cepas degradadoras aisladas desde suelo con historial de contaminación, desde suelo sin contaminar o desde agua marina. Considerando que es necesario continuar la búsqueda de nuevos microorganismos que permitan biorremediar sitios dañados por eventos de contaminación, este trabajo busca aislar una cepa bacteriana, proveniente de muestras de suelo contaminado con diésel, para estudiar sus posibles aplicaciones en técnicas de biorremediación. Para esto se plantea una caracterización de la cepa aislada, para luego realizar un estudio de las capacidades catabólicas de hidrocarburos de la cepa.

1.1 Petróleo

El petróleo es una mezcla que se puede encontrar de forma natural en estado líquido o sólido (en forma de roca sedimentaria), que incluye, en su mayoría, hidrocarburos y en menor cantidad compuestos orgánicos de nitrógeno, oxígeno y azufre o metales como níquel, hierro y cobre (Higgins & Burns, 1975). Las fracciones sólidas, líquidas y gaseosas, varían según la región de donde son extraídos, al igual que su color y textura. El petróleo se formó en base a restos animales y vegetales que al ser aprisionados bajo rocas sedimentarias fueron degradados por microorganismos anaerobios, bajo temperaturas y presiones moderadas. En estas condiciones la mayor parte del oxígeno y el nitrógeno se pierden, quedando el carbono y el hidrógeno en forma de hidrocarburos (HC) (Speight, 2015). Los hidrocarburos que conforman el petróleo se clasifican según naturaleza química, como se muestra en la Figura 1, donde los principales grupos son los HC alifáticos y los aromáticos.

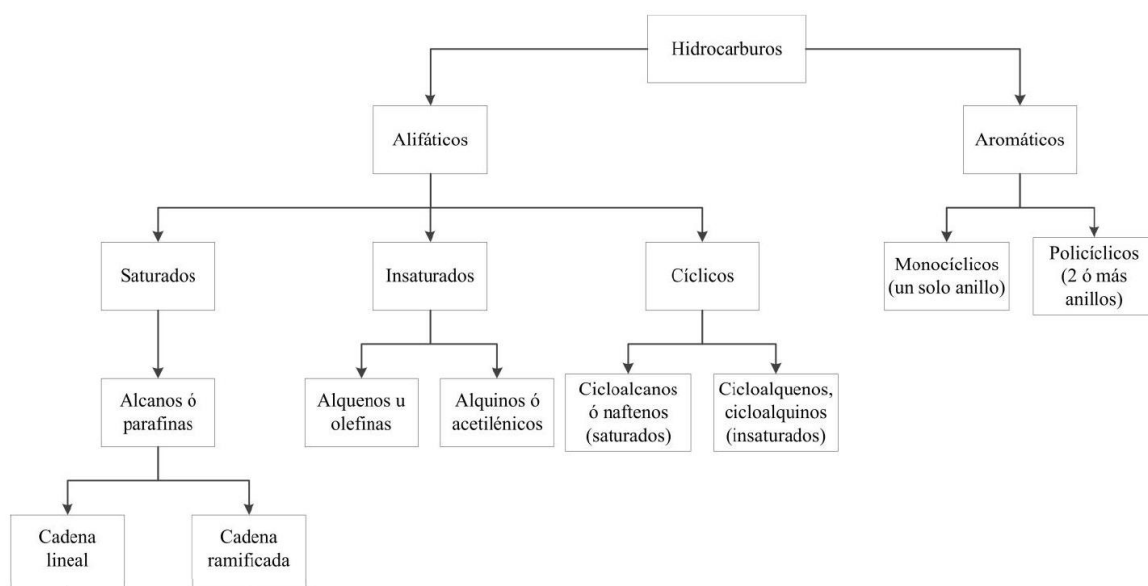


Figura 1. Clasificación de hidrocarburos presentes en el petróleo. (Adaptado de Barra, 2012).

Los compuestos alifáticos son los que se encuentran en mayor porcentaje y en este grupo se encuentran hidrocarburos saturados (parafinas o alcanos) y no saturados (alquenos y alquinos), ambos grupos pueden ser cíclicos o no (Baldrich, 1998). Los alcanos o parafinas corresponden a estructuras compuestas por enlaces simples carbono-hidrogeno, las cuales pueden ser lineales, ramificadas o cíclicas y pueden presentarse en estado gaseoso, como el caso de los alcanos de cadena corta (metano, etano, propano y butano), en estado líquido (C_5 al C_{17}) y en estado sólido (C_{18} o más), que son solubles en disolventes no polares (Botello *et al.* 2005). Por otra parte los HC aromáticos son aquellos que dentro de su estructura contienen un anillo de 6 carbonos con doble enlaces conjugados. Según la

cantidad de anillos se clasifican en monocíclicos, que pueden ser sustituidos con cadenas laterales o no, y policíclicos (conocidos como PAH; por el inglés *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*). Los HC aromáticos se encuentran en menor abundancia que los compuestos alifáticos.

Del petróleo refinado se obtienen productos como: gasolinas, lubricantes, ceras, parafinas, siendo uno de los principales el diésel. El proceso de refinación consiste en la destilación fraccionada del crudo, donde cada destilado se define por la mezcla de compuestos que lo forman y por el rango de ebullición. Es importante destacar que cada destilado del petróleo tiene una composición característica pero que no es estándar. El diésel es definido como una mezcla de hidrocarburos (C_9 al C_{20} principalmente) y con un rango de ebullición entre 163° a 357°C (Speight, 2015). Los hidrocarburos que componen el diésel son HC saturados (parafinas o alcanos), los cuales se encuentran en mayor abundancia (% v), y en menor abundancia compuestos aromáticos y algunos compuestos sulfurados (Baldich, 1998). Entre los alcanos presentes en el diésel, los alcanos C_{15} al C_{18} son los más representativos, siendo el C_{16} el que alcanza el mayor porcentaje de volumen (Baldrich, 1998).

Producto de la globalización y de la demanda permanente de recursos, el petróleo y sus derivados contribuyen como fuente de energía y de precursores químicos industriales. Sin embargo, estos compuestos han sido protagonistas de grandes desastres ambientales, debido a que cantidades no despreciables se liberan al ambiente en los procesos de extracción, refinado, transporte y almacenamiento, lo cual representa un riesgo potencial para los ecosistemas (Eom *et al.*, 2007). El petróleo, al igual que sus derivados, se consideran contaminantes, debido a que varios de los componentes son altamente recalcitrantes y se mantienen persistentes en la matriz donde son liberados (Siva *et al.*, 2004). En el caso de derrames en suelo el efecto negativo del petróleo se debe en parte a que los hidrocarburos impiden el intercambio gaseoso con la atmósfera, desencadenando algunas reacciones y procesos físico-químicos que finalmente se vuelven letales para la biota que habita en éstos (Restrepo, 2002). En el agua el contaminante flota, por diferencia de densidades, lo que impide la entrada de luz y el intercambio gaseoso provocando la solubilización de algunos compuestos y afectando inicialmente a plancton, llegando a afectar a la macrofauna (Bento *et al.*, 2003). Según el Informe Anual de Medio Ambiente del año 2017, las principales fuentes de contaminación de diésel o petróleo son por mal manejo y de producen en descargas petroquímicas y refinerías y derrames por tuberías corroídas.

1.2 Biorremediación

Uno de los tratamientos aplicados ante episodios de contaminación con petróleo, es la extracción de la matriz contaminada y su disposición en sectores aislados para evitar mayor expansión de la contaminación al medio ambiente. La extracción no es completa y en algunos casos puede generar problemas a largo plazo (Dermont *et al.*, 2008). Para tratar compuestos orgánicos se utiliza: lavados con agentes químicos, flotación, reacción de oxidación, filtración, osmosis, entre otros (Fuentes *et al.*, 2014). La desventaja de estos tratamientos es que pueden ser poco selectivos y costosos, además pueden generar otros tipos de residuo contaminantes (Malik, 2004). Por esto se presentó la necesidad de buscar tecnologías que cumplieran la función de descontaminar a bajo costo. De esta búsqueda surgió la utilización de procesos de degradación biológica que pueden ser aplicados a diferentes contaminantes orgánicos (Moreno *et al.*, 2004). Existen dos grandes tratamientos de bio-descontaminación, la biorremediación por medio de microorganismos, y la fitorremediación por medio de plantas, que es apropiada para remoción de metales pesados (Benavides López *et al.*, 2006).

La biorremediación es un proceso que puede ser natural o dirigido, que por procedimientos biológicos se degradan o neutralizan los contaminantes transformándolos en sustancias inocuas. En este proceso se suelen utilizar hongos o bacterias, en algunos casos se utilizan bacterias con modificaciones genéticas (Morgante *et al.*, 2010). Las principales ventajas de este tipo de procesos son que requieren bajo consumo de energía y no generan residuos (Moreno *et al.*, 2004). Los tipos de biorremediación se pueden clasificar según el lugar de acción y según lo que se estimule en el sistema. La biorremediación puede ser *in situ* y *ex situ*. La primera corresponde a tratamientos que se realizan en el lugar en que se encuentra el contaminante, comúnmente en suelo, donde sin la necesidad de mover o extraer la matriz contaminada se aplica la técnica. La biorremediación *ex situ* consiste en extraer la matriz contaminada con el fin de tratarla en pilas o bioreactores de volúmenes definidos (Benavides *et al.*, 2006). Dentro de las estrategias asociadas a la biorremediación, se considera la bioestimulación y la bioaumentación, o ambas aplicadas al mismo tiempo. En el proceso de bioestimulación se ajustan parámetros abióticos o se ajustan nutrientes para estimular y mejorar el rendimiento de la biota nativa. Por otro lado la bioaumentación consta de la inoculación de bacterias seleccionadas en formato de consorcio o enriquecimientos, para aumentar el potencial biótico (Fuentes *et al.*, 2014).

La biorremediación se ha mostrado como una estrategia eficiente para el tratamiento de suelos contaminados por agentes orgánicos o inorgánicos, teniendo características de un proceso sustentable. Microorganismos como bacterias, se han utilizado para tratamientos de contaminantes en la

naturaleza de hidrocarburos aromáticos, pesticidas, policlorobifenilos, dioxinas, entre otros (Robles-González *et al.*, 2008; Hernández *et al.*, 2008; Seeger *et al.*, 2010; Fuentes *et al.*, 2016).

La biorremediación de hidrocarburos se produce por microorganismos que poseen enzimas capaces de adicionar grupos funcionales al esqueleto de carbono, polarizando las moléculas de hidrocarburos (Rojo, 2009). Al generar el momento dipolar la molécula se vuelve susceptible a ser transformada en intermediarios capaces de entrar a alguna de las rutas catabólicas centrales (Fuentes *et al.* 2014). La degradación se puede desarrollar de forma aerobia o anaerobia, siendo esta última menos frecuente (Wentzel *et al.*, 2007). En el caso de la degradación aeróbica, en presencia de oxígeno se agregan grupos hidroxilo al esqueleto gracias a la acción de oxigenasas, que después de sucesivas oxidaciones transforman el hidrocarburo en intermediarios metabólicos inocuos (Fuentes *et al.*, 2014). La biodegradación de alcanos se realiza por oxidación en secuencia del alcano a alcohol, luego aldehído y finalmente a ácido graso, para entrar a la ruta β -oxidación, como se muestra en la Figura 2. En la degradación anaerobia, se logra la activación acoplando una molécula de CO_2 y se utilizan sulfato y nitrato como aceptores terminales de electrones (Callaghan, *et al.*, 2012). Existen rutas alternativas para la degradación de un mismo compuesto.

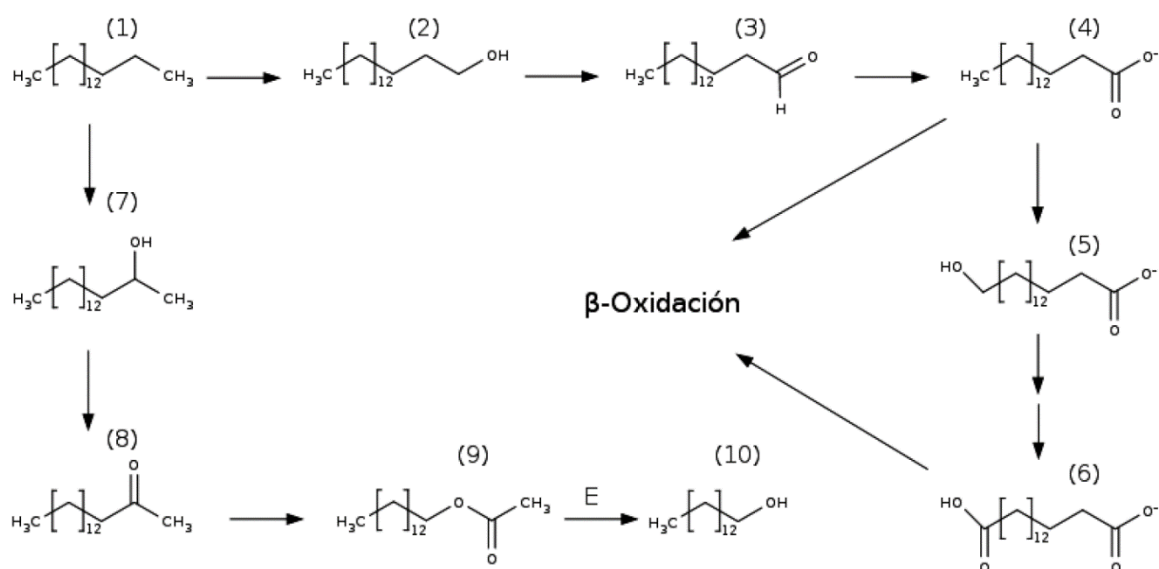


Figura 2. Rutas aeróbicas de degradación bacteriana de n-alcano. n-Hexadecano se muestra como molécula modelo. La ruta catabólica de este tipo está descrita en Proteobacteria. (Adaptado de Fuentes, 2014).

1.3 Bioaumentación de suelos contaminados con hidrocarburos y su efecto sobre las comunidades microbianas.

Fuentes (2014) exploró la bioaumentación de suelos contaminados con hidrocarburos y estudió su efecto sobre las comunidades microbianas. Durante esta investigación Fuentes (2014) realizó el aislamiento de bacterias degradadoras de hidrocarburos desde suelos con historial de contaminación. Se estudió la respuesta de las comunidades microbianas de suelos con historial de contaminación ante un nuevo evento de contaminación con hidrocarburos, y evaluó el desempeño de los aislados bacterianos en suelos contaminados con hidrocarburos. Para el aislamiento se tomaron muestras de suelos que tenían historial de contaminación, en la desembocadura del río Aconcagua (Figura 3A), desde donde se obtuvieron 86 aislados bacterianos, de los cuales se seleccionaron cuatro aislados por su capacidad de utilizar diferentes hidrocarburos como fuente de carbono. Estos cuatro aislados correspondieron a *Pseudomonas* sp. cepas DN34 y DN36, y *Acinetobacter* sp. cepas AF53 y AA64. En paralelo se obtuvieron enriquecimientos bacterianos desde la zona II de muestreo mediante sucesivos subcultivos en diésel. El ensayo de microcosmos consistió en sistemas con 300 g de suelo sin historial de contaminación obtenido del sector de Laguna verde (33°11'S, 71°71'O), Región de Valparaíso (Figura 3B). Los diseños experimentales se presentan en la Tabla 1.

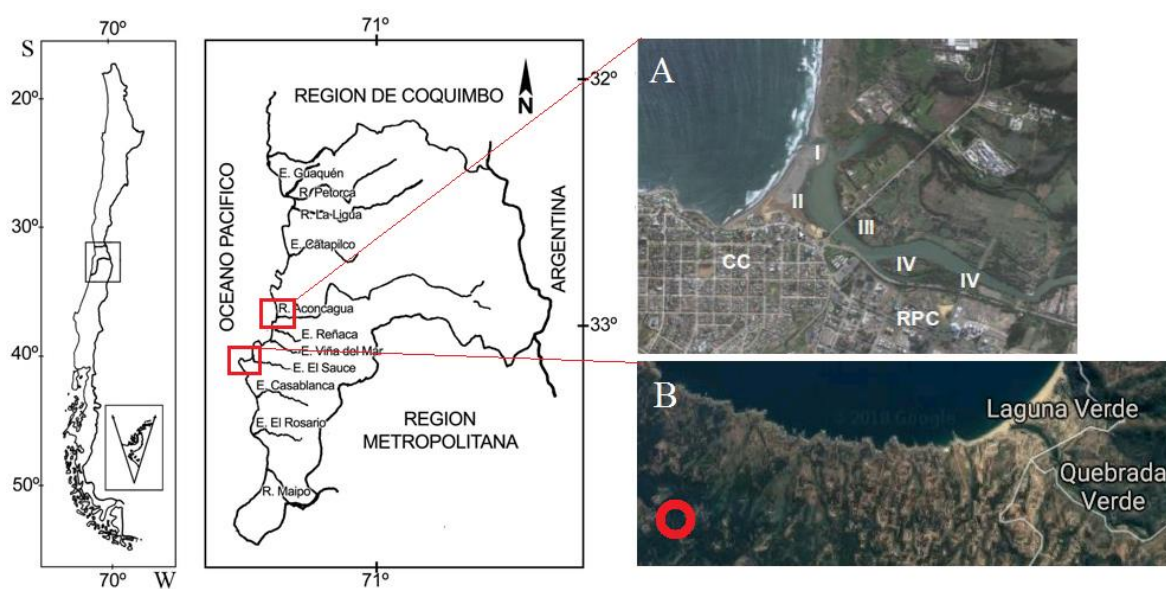


Figura 3. Sitios de muestreo de los suelos de la ribera del estuario del río Aconcagua y de suelos de Laguna Verde. A, Sitios muestreados para este estudio se muestran en números romanos comenzando desde la costa. Cinco réplicas se tomaron desde cada sitio. CC, Concón, región de Valparaíso. RPC, Refinería de Petróleo de Concón. Adaptado de Fuentes, 2014. B, Sitio muestreado de suelo sin historial de contaminación de Laguna Verde, sector ubicado al sur de Valparaíso.

Tabla 1. Diseño experimental de los microcosmos para los estudios de bioaumentación.
(Fuentes, 2014).

Microcosmos	Condición	Diésel	Inoculación	Objetivo
CA	Abiótico	+	-	Control pérdida de diésel por factores abióticos
C0	Sin tratamiento	-	-	Control comunidades sin tratamiento
C1	Contaminado	+	-	Control degradación
E1	Bioaumentado 1	+	+	Evaluar desempeño de consorcio
E2	Bioaumentado 2	+	+	Evaluar desempeño del enriquecimiento

Por medio de secuenciación masiva mediante la tecnología Illumina y análisis metagenómico del gen ARNr 16S se estudió la dinámica de las comunidades de estos sitios frente a contaminación con hidrocarburos. Se estableció que los mayores cambios se observaron por efecto de la contaminación por diésel. La bioaumentación alteró en menor medida la estructura de la comunidad. Con respecto a la degradación de los componentes de diésel se observó que los sistemas bioaumentados con consorcio bacteriano y enriquecimientos, la degradación alcanzada fue mayor que en los sistemas sin inocular. El efecto de la primera contaminación con diésel (3% p/p) fue suficientemente drástico como para no permitir observar cambios significativos en las comunidades en respuesta a la segunda contaminación.

En los sistemas de microcosmos contaminados con diésel por primera vez se observó un aumento de géneros bacterianos que no pertenecían a los géneros inoculados. El análisis de secuenciación masiva y análisis metagenómico permitió observar un florecimiento que representaba cerca del 60% de la comunidad bacteriana, dejando en menor proporción a las cepas pertenecientes al consorcio inoculado. Es interesante que bacterias que se encuentran en bajos niveles inicialmente, logren sobrepasar a cepas bacterianas degradadoras seleccionadas.

Durante esta tesis se busca aislar de estos sistemas una nueva cepa bacteriana que posea capacidades catabólicas de hidrocarburos. Se busca de preferencia una cepa de un género diferente a *Pseudomonas* y *Acinetobacter*, que corresponden a los géneros de las cepas inoculadas.

2. Hipótesis y objetivos

2.1 Hipótesis

Desde un suelo proveniente de la Región de Valparaíso contaminado con diésel y sometido a un proceso de biorremediación se aislará una cepa degradadora de hidrocarburos.

2.2 Objetivo general

El objetivo general es aislar y caracterizar una bacteria degradadora de hidrocarburos de un suelo de la Región de Valparaíso contaminado con diésel y sometido a biorremediación.

2.3 Objetivos específicos

Los objetivos específicos fueron los siguientes:

- Aislar e identificar una cepa bacteriana hidrocbonoclastica proveniente de un suelo contaminado con diésel y sometido a biorremediación.
- Caracterizar la cepa bacteriana hidrocbonoclastica aislada mediante técnicas microbiológicas y genéticas.
- Evaluar las capacidades catabólicas de hidrocarburos del aislado bacteriano.

3. Materiales y métodos

3.1 Reactivos químicos.

Las fuentes de carbono utilizadas fueron fructosa, succinato, piruvato, catecol, protocatecuato, fluoreno, ácido salicílico, ácido gentísico, ácido ftálico, bencenotriol, ácido toluico, antranilato, ácido cinámico, muconato, 3,5 diclorobenzoato, 3-clorobenzoato, 4-clorobenzoato, los cuales fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EE.UU). Las fuentes de carbono obtenidas de Merk, USA, fueron glucosa, glicerol, naftaleno, bifenilo, tolueno, benceno, n-hexano, n-hexadecano, n-octano, ciclohexano, benzoato, fenantreno y antraceno. Sacarosa fue obtenido de Difco™ BD, Francia. El diésel utilizado fue adquirido en una estación de servicio bencinero y esterilizado por medio de filtrado con poro de 0,22 µm.

Los antibióticos utilizados para esta tesis fueron bacitracina, gentamicina, eritromicina, trimetoprima, estreptomina, kanamicina, penicilina, rifampicina, ampicilina y tetraciclina, estos fueron adquiridos de Arlab, Santiago, Chile.

Reactivos de biología molecular:

Los reactivos utilizados en biología molecular fueron Green Master Mix 2× Gotaq® y Nuclease-Free Water obtenidos de Promega, Madison, USA. Además se utilizó GelRed Nucleic Acid Stain obtenidos de Biotium INC. El marcador de peso molecular O'GeneRuler™ 1kb DNA Ladder fue obtenido de Thermo Scientific. Por último se utilizaron tres pares de partidores, los cuales se detallan en la Tabla 2. Los partidores Blooming y Alkarpob fueron sintetizados por Integrated DNA Technologies (IDT).

Tabla 2. Partidores utilizados en esta tesis.

Partidor	Secuencia* (5'->3')	Gen	Largo del producto (bp)	Referencia
Blooming F	GGCCTTTTGGTTGTAAAGCAC	ARNr 16S	219	Esta tesis
Blooming R	GCAATGCCCAAGTTAAGCTC			
Alka F	TCCAGGACTTCTTGCGTGAG	<i>rpoB</i>	494	Esta tesis
Alka R	TACACCGCCCTTGAGGTTTT			
27 F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	ARNr 16S	1500	Lane, 1991
1492 R	TACGGCTACCTTGTTACGACTT	(universal)		

*Bases de nucleótidos de la secuencia. A: Adenina, C: Citocina, G: Guanina, T: Timina.

3.2 Medios de cultivo.

Los siguientes medios de cultivo fueron utilizados para el desarrollo de este trabajo:

Medio mineral Caldo Bushnell-Haas (BHB) (Bushnell & Haas, 1941) compuesto por KH_2PO_4 1 g L⁻¹, K_2HPO_4 1 g L⁻¹, NH_4NO_3 1 g L⁻¹, MgSO_4 0,2 g L⁻¹, FeCl_3 0,05 g L⁻¹ y CaCl_2 0,02 g L⁻¹. Se ajustó pH a 7 y para la preparación de placas de cultivo se agregó al medio 15 g L⁻¹ de agar.

Medio rico Luria Bertani (LB) (Sambrook *et al.*, 1989) compuesto por triptona 10 g L⁻¹, extracto de levadura 5 g L⁻¹ y cloruro de sodio 5 g L⁻¹. Para la preparación de placas de cultivo de LB se agregó 15 g L⁻¹ de agar.

Medio mínimo M9 (Sambrook *et al.*, 1989) compuesto por Na_2HPO_4 7,1 g L⁻¹, KH_2PO_4 3 g L⁻¹, NaCl 5 g L⁻¹ y NH_4Cl 0,4 g L⁻¹. El medio M9 además contiene tres trazas A:B:C en relación 2:1:1. Solución A contiene 10,75 g L⁻¹ $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2 g L⁻¹ CaCO_3 , 1,44 g L⁻¹ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,12 g L⁻¹ $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,25 g L⁻¹ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,28 g L⁻¹ $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,06 g L⁻¹ H_3BO_3 y 51,30 mL HCl concentrado. Solución B contiene 246 g L⁻¹ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Solución C contiene 10,01 g L⁻¹ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Todas las soluciones se prepararon con agua MilliQ.

Medio caldo de Soja Trípica (Tryptic Soy Broth, TSB) 30 g L⁻¹ y medio agar de Soja Trípica (Tryptic Soy Agar, TSA) 40 g L⁻¹ según condiciones del fabricante BD Difco™ (Sparks, Maryland, USA).

Medio Mueller Hinton (Difco, New Jersey, USA), se preparó el medio de cultivo según especificaciones del fabricante BD Difco™.

3.3 Cepas bacterianas.

Para este trabajo se utilizaron los siguientes microorganismos:

Achromobacter sp. B7, cepa aislada en esta tesis, desde muestras de microcosmos enriquecidos y contaminados con diésel (Fuentes, 2014).

Acinetobacter sp. cepa AF53, cepa aislada a partir de suelos con historial de contaminación por hidrocarburos desde la desembocadura del río Aconcagua (Fuentes, 2014) perteneciente a la colección del cepario de Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología Ambiental, LMMBA.

3.4 Metodología analítica.

3.4.1 Extracción de ADN

Se realizó la extracción de ADN mediante shock térmico, con hervido de las células durante 15 minutos a 96°C, luego se mantuvo por 15 minutos en hielo y finalmente se centrifugó a 13.000 rpm por 15 minutos y el sobrenadante fue recuperado (Figura 4).

Se realizó extracción de ADN metagenómico con el kit comercial PowerSoil DNA Isolation, MoBio, según instrucciones de fabricante.

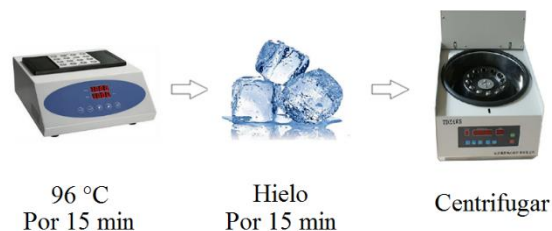


Figura 4. Esquema de extracción de ADN.

3.4.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El perfil térmico de PCR que se aplicó para los partidores diseñados, *Alka* y *Bloom*, se muestra en la Tabla 3. Se utilizó el equipo *Mastercycler gradient*, Eppendorf, para la reacción de PCR.

Tabla 3. Perfil térmica PCR con partidores "Alka" y "bloom".

Etapas	Temperatura [°C]	Tiempo	
Desnaturalización inicial	95	5 [min]	
Desnaturalización	95	1 [min]	
Hibridación	50	1 [min]	30 ciclos
Elongación	72	30 [s]	
Elongación final	72	7 [min]	

El perfil térmico de PCR que se aplicó para los partidores universales 27F y 1492R (Lane., 1991) se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Perfil térmico PCR con partidores 27F y 1492R.

Etapas	Temperatura [°C]	Tiempo	
Desnaturalización inicial	95	5 [min]	
Desnaturalización	95	1 [min]	
Hibridación	59	1 [min]	30 ciclos
Elongación	72	45 [s]	
Elongación final	72	7 [min]	

Las reacciones de PCR fueron realizadas con 22 μL de agua libre de nucleasas, 25 μL de GoTaq Green Master Mix, 1 μL de cada partidor y 1 μL de ADN.

3.4.3 Electroforesis

Productos de PCR fueron examinados en gel de agarosa 1,5 % p/v en buffer TAE 1 \times teñido con GelRed al 1% v/v. La electroforesis se realizó a 70 V y a 2 A durante 1 hora. Para verificar las bandas de los productos de reacción se utilizó el marcador de peso GeneRuler 1 kb DNA Ladder. Se cargó 1,5 μL de marcador de peso y con 2 μL de producto de PCR en los pocillos correspondientes. (Figura 5).

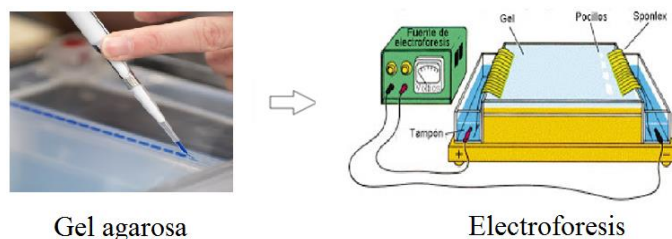


Figura 5. Esquema de electroforesis de gel de agarosa.

3.4.4 Tinción Gram

Para la tinción Gram se utilizó el protocolo descrito por López-Jácome, 2014, el cual consistió en un portaobjeto donde se puso una gota de agua, para luego tomar biomasa y agregar a la gota de agua, extendiendo en el portaobjeto. Se secó a temperatura ambiente y se fijó flameando. Luego se agregó cristal violeta y se lavó, no directamente, después de 2 minutos. Después se agregó lugol durante 1 minuto. Luego se agregó alcohol acetona durante 1 a 2 segundos y se lavó con agua. Finalmente se agregó safranina durante 30 segundos y se lavó con agua, delicadamente. Se observó el portaobjeto por medio de microscopía óptica.

3.4.5 Microscopía óptica

Se realizó microscopía óptica de las muestras obtenidas a partir de la tinción gram. Se utilizó un microscopio óptico modelo Zeiss Aixo Lab.A1. La muestra se observó con el lente 100 \times utilizando aceite de inmersión.

3.4.6 Extracción diésel desde matriz líquida

Para la extracción de diésel se agregó 5 mL de n-hexano y se agitó manualmente durante 1 minuto. Se separaron fases y se reservó fase orgánica. Luego se volvió a agregar 5 mL de n-hexano y se agitó manualmente durante 1 minuto y se separaron fases, reservando fase orgánica. Finalmente se mezclaron ambas fases orgánicas reservadas y se llevaron 2 mL como muestra de extracción a viales para su procesamiento.

3.4.7 Cuantificación de hidrocarburos por cromatografía gaseosa con detector de ionización por llama (GC-FID)

Las muestras provenientes de la extracción de hidrocarburos fueron procesadas con Cromatógrafo de gases acoplado a un detector de ionizador de llama, Gas Chromatograph-Flame Ionization Detector, GC-FID Clarus 680, Perkin Elmer. Para esto se utilizó la curva de calibración compuesta por n-alcános del rango C10-C25 (Fuentes, 2014). Se inyectó 1 μL de muestra en el equipo con una columna DB5 (Perkin-Elmer) de 30 m y 0,25 mm de diámetro. El gas portador fue helio, el inyector se fijó a 320°C y el detector FID se trabajó a 295°C con un flujo de 450 mL min^{-1} de aire y 45 mL min^{-1} de hidrógeno. El método utilizado para cada corrida fue el probado en 2014 por Fuentes S. (Fuentes, 2014). El valor de intensidad de cada pico se interpoló en la curva de calibración mediante el análisis “diésel_all_acm” para obtener el reporte. De los reportes se utilizó el dato “raw amount” de cada componente (C10 – C25) expresado en $\text{ng}/\mu\text{L}$, los cuales se sumaron para obtener el TPH (total petroleum hydrocarbons) de cada muestra. El porcentaje de diésel remanente para ambos casos, se calculó considerando el tiempo cero como el 100%.

3.5 Aislamiento de la bacteria hidrocarbonoclástica.

3.5.1 Diseño de partidores.

Para el aislamiento de una bacteria degradadora se diseñaron 2 pares de partidores específicos para bacterias diferentes a *Pseudomonas* y *Acinetobacter* en base a dos genes (ARNr 16S y *rpoB*) pertenecientes a una bacteria representativa del florecimiento, *Alkanindiges*. El primer par de partidores, denominado “Blooming”, se diseñó a partir del gen ARNr 16S utilizando una secuencia consenso construida con las secuencias disponibles del género en GENBANK, agregando también las secuencias parciales del gen ARNr 16S de la secuenciación metagenómica obtenida por Fuentes, 2014, (Ver secuencia consenso en Anexo A.1). En esta secuencia consenso se identificaron las regiones conservadas y variables diseñando un partidador en la región conservada y el otro en la región variable (V3-V4) del gen. El segundo par de partidores, denominado “Alka”, se diseñó a partir del gen *rpoB*, con mayor especificidad para *Alkanindiges illinoisensis*. Se utilizó la secuencia del genoma *Alkanindiges illinoisensis* DSM 15370 identificando el gen *rpoB* mediante las herramientas tblastn y blastn del programa BLAST+ utilizando secuencias nucleotídicas de *rpoB* disponibles en la base de datos UniProtKB-Swissprot. (Ver secuencia gen *rpoB* en Anexo A.2). Una vez encontrado se realizó un alineamiento múltiple de secuencias con bacterias filogenéticamente cercanas para buscar partes conservadas y variables y finalmente diseñar el partidador en la región variable.

Partidor “Blooming” diseñado en base a gen ARNr 16S expuesto en Tabla 6 y en la Figura 6 se muestra la ubicación del partidador en la secuencia.

Tabla 5. Partidores diseñados, "Bloom".

Partidor	Secuencia (5'->3')	% GC	Tm (°C)	Largo producto (bp)	Referencia
Blooming F	GGCCTTTTGGTTGTAAAGCAC	48	58,52	219	Esta tesis
Blooming R	GCAATGCCCAAGTTAAGCTC	50	57,72		

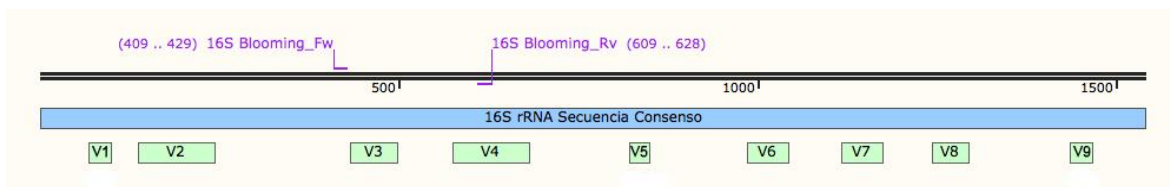


Figura 6. Alineamiento de partidores "Bloom" en secuencia consenso. En color celeste la secuencia consenso, en color verde regiones variables.

Partidor "Alka" diseñado en base a gen *rpoB* expuesto en Tabla 7 y en la Figura 7 se muestra la ubicación del partidor en la secuencia.

Tabla 6. Partidores diseñados, "Alka".

Partidor	Secuencia (5'->3')	% GC	Tm (°C)	Largo producto (bp)	Referencia
Alka F	TCCAGGACTTCTTGCGTGAG	55	59,68	494	Esta tesis
Alka R	TACACCGCCCTTGAGGTTTT	50	59,52		

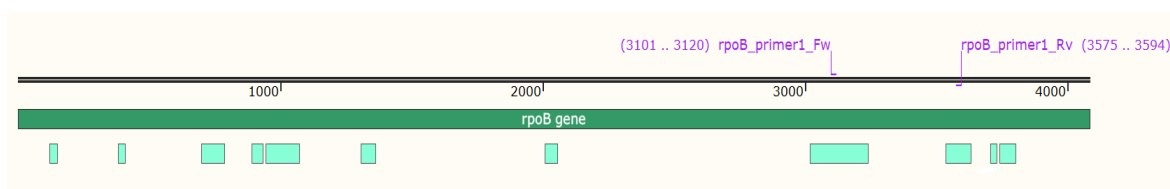


Figura 7. Alineamiento de partidores "Alka" en secuencia gen *rpoB*. En color verde oscuro la secuencia del gen *rpoB* y regiones variables en color verde claro.

Para el partidor "Blooming" se utilizó como control positivo la cepa *Acinetobacter* sp AF53, en el caso del partidor "Alka", no se utilizó control positivo debido a su alta especificidad.

3.5.2 Selección de muestras de suelo.

Se seleccionaron muestras de suelo contaminado con diésel provenientes del experimento a escala de microcosmos realizados por Fuentes, 2014. Para determinar las muestras a analizar se consideró como criterio de selección el tiempo de cada muestra en el microcosmo y la abundancia de bacterias pertenecientes al florecimiento. Se extrajo ADN metagenómico a partir de las muestras seleccionadas,

muestra de semana 9 y semana 10. Posteriormente con el ADN obtenido se realizó un PCR (perfil térmico indicado en Tabla 3), utilizando los partidores diseñados anteriormente, “*Blooming*” y “*AlkarpoB*”, para finalmente verificar el amplicón mediante electroforesis en el gel de agarosa 1,5 % p/v. Con esto se busca asegurar la presencia de bacterias degradadoras que pertenecieran al florecimiento.

3.5.3 Obtención de cepa bacteriana hidrocarbonoclastica.

A partir de las muestras seleccionadas se tomaron 0,67 g de suelo de la semana 9 y 0,95 g de suelo de la semana 10, ambas muestras fueron resuspendidas en NaCl 0,85% p/v. Se agitó de forma rotatoria a 1980 rpm, en equipo Heidolph MultiReax, a temperatura ambiente por 2 horas, luego se dejó decantar por 1 hora. El sobrenadante se utilizó para inocular tubos de ensayo con diferentes medios de cultivos expuestos a hidrocarburos, diésel y n-hexadecano, utilizando estos compuestos como método de selección. Se inocularon seis sistemas, tres de ellos contaminados con diésel en medio LB, BHB y TSB. Por otro lado se contaminaron tres sistemas con n-hexadecano, en medio LB, BHB y TSB.

Una vez crecidos los cultivos en cada medio, se realizó una extracción de ADN el cual fue utilizado como templado para verificar la presencia de la bacteria en alguna condición con los partidores “*AlkarpoB*” y “*Blooming*”.

A partir de los sistemas donde se verificó la presencia de la bacteria, se comenzó a aislar colonias en placas con medio LBA, BHA o TSA, y diésel o n-hexadecano como fuente de carbono, bajo las mismas condiciones en que se encontraba cada sistema. Los cultivos en placas se incubaron a 29 °C por 24 a 48 horas, finalmente se realizó un PCR de colonias utilizando los partidores “*AlkarpoB*” y “*Blooming*” y así obtener un aislado de la bacteria de interés (Figura 8).

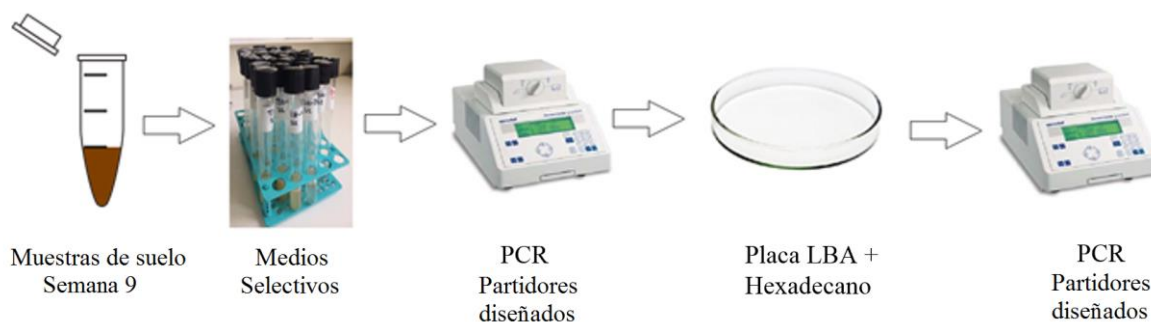


Figura 8. Esquema de metodología de aislamiento.

3.6 Identificación molecular.

Secuenciación completa del gen ARNr 16S.

Se realizó una extracción de ADN desde las colonias aisladas de la bacteria seleccionada. Se amplificó el gen ARNr 16S utilizando los partidores universales 27F y 1492R. Los productos de PCR fueron purificados y secuenciados por MacroGen Inc, Corea del Sur utilizando los partidores 27F, 518F y 1492R. Desde las secuencias entregadas por MacroGen Inc. se ensamblaron las lecturas forward y reverse, se eliminaron los fragmentos laterales utilizando MEGA7, las secuencias curadas se identificaron mediante *blastn*.

3.7 Determinación de morfología bacteriana.

La morfología celular se corroboró mediante tinción Gram según la metodología descrita (López-Jácome *et al.*, 2014) en base a un cultivo en medio LB de 48 horas a 30°C, para luego observar las células utilizando microscopio óptico.

La morfología de colonias se observó por medio de un cultivo en placa Petri, donde se sembró usando la técnica de siembra en estrías para obtener colonias aisladas. El cultivo fue realizado con medio LB, a 30°C durante 48 horas.

3.8 Crecimiento de bacteria aislada a diferentes temperaturas.

Se realizó un estudio cualitativo de crecimiento a diferentes temperaturas. Se cultivó en placa bajo dos condiciones, una de ellas fue cultivo en medio rico LBA y el otro fue cultivo en medio mínimo BHA con diésel como única fuente de carbono, donde se depositó papel filtro embebido de diésel en la contratapa. Las temperaturas probadas fueron 4, 18, 25, 30 y 37 °C para ambas condiciones. Los cultivos fueron incubados por 5 días, donde se monitoreó el crecimiento de la cepa B7 a las 24 y 48 horas, y finalmente a los 5 días. Los cultivos se realizaron en duplicado.

3.9 Caracterización bioquímica de la cepa mediante galería API 20Ne y prueba catalasa.

Para obtener una caracterización general en base a diferentes pruebas bioquímicas se utilizó la galería API 20Ne, específica para bacterias gram negativas, siguiendo las instrucciones del fabricante, donde se requería un cultivo joven de 18 a 24 horas y una turbidez equivalente a 0,5 McFarland.

Para complementar la galería se realizó la prueba de catalasa, donde se suspendieron colonias en NaCl 0,9 % p/v en un portaobjeto, donde se añadió peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 30 % v/v. Se considera positiva la prueba si se observan burbujas en el portaobjeto y negativo si no se observan burbujas.

3.10 Resistencia a antibióticos.

El perfil de resistencia a antibióticos se realizó en placas con medio agar Mueller Hinton donde se depositaron discos que contenían bacitracina 0,04 U, gentamicina 10 µg, eritromicina 15 µg, trimetoprima 5 µg, estreptomicina 10 µg, kanamicina 30 µg, penicilina 10 U, rifampicina 30 µg, ampicilina 10 µg y tetraciclina 30 µg. El perfil de resistencia a antibióticos se determinó después de 20 horas de incubación a 30 °C y se considera resistente si no presenta halo circundante al disco, en caso de presentar halo se consideró sensible (Figura 9) y se midió el halo.

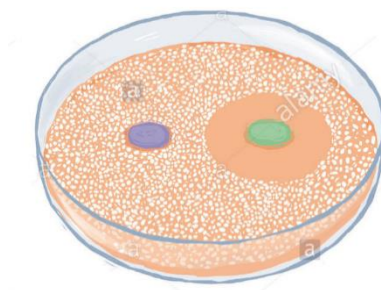


Figura 9. Esquema antibiograma. Disco verde muestra sensibilidad de la cepa al antibiótico. Disco azul muestra resistencia de la cepa al antibiótico.

3.11 Crecimiento de bacteria aislada en diferentes concentraciones de NaCl.

Para observar la tolerancia de la bacteria a diferentes niveles de NaCl se realizó un cultivo en microplaca de 96 pocillos (Costar) con un volumen de cultivo de 200 µL, utilizando medio LB al 0, 2, 4, 6, 8 y 10 % p/v de NaCl. Para este experimento se utilizó el equipo Tecan infinite 200 pro, el cultivo se incubó por 7 días a 29,8°C, durante los cuales se midió turbidez 600 nm y se agitó cada 15 minutos. Los cultivos se realizaron en duplicado y con control negativo sin inóculo.

3.12 Crecimiento de bacteria aislada en fuentes de carbono convencionales.

Se realizó un cultivo de 200 µL en microplaca con medio mínimo M9, utilizando diferentes fuentes de carbono estandarizando la cantidad de carbonos disponibles en el medio de cultivo. Para esto se utilizó glucosa 5 mM, fructosa 5 mM, succinato 8 mM, piruvato 10 mM, glicerol 10 mM y sacarosa 2,5 mM. El cultivo fue incubado por 7 días a 29,8°C en equipo Tecan infinite 200 pro con agitación en modo orbital con amplitud 6 mm, con frecuencia 141,9 rpm, y medición de turbidez 600 nm cada 15 minutos. Los cultivos se realizaron en triplicado y con control negativo sin inóculo.

3.13 Crecimiento de bacteria aislada en hidrocarburos y ácidos orgánicos.

Se evaluó el crecimiento de la cepa bajo tres condiciones experimentales con diferentes hidrocarburos.

Para el crecimiento en naftaleno y bifenilo, se sembró la bacteria en placa Petri utilizando medio BHA, dejando en la contratapa cristales de naftaleno. De la misma forma se sembró la bacteria con bifenilo. Se incubaron ambas placas a 30°C por 3 días donde se observó el crecimiento.

Para el crecimiento de compuestos volátiles, se realizaron cultivos líquidos de 3 mL en medio mínimo M9 en tubos con tapa para evitar pérdida de los compuestos volátiles durante el crecimiento de la cepa. Los compuestos utilizados como única fuente de carbono fueron tolueno, benceno, n-hexano, diésel, n-hexadecano, n-octano y ciclohexano a 1% v/v. Los cultivos fueron incubados por 16 días a 30 °C con agitación constante de 180 rpm, durante este periodo se midió turbidez 600 nm cada 4 días. Cada condición fue realizada en duplicado y con control negativo sin inóculo.

Para el crecimiento en hidrocarburos aromáticos y ácidos orgánicos, se utilizó una placa de 96 pocillos de 2 mL con medio mínimo M9 y benzoato 4 mM, catecol 5 mM, protocatecuato 4 mM, fluoreno 2 mM, fenantreno 2 mM, antraceno 2 mM, ácido salicílico 4 mM, ácido gentísico 4 mM, ácido ftálico 5 mM, 1,2,4 bencenotriol 5 mM, ácido toluico 4 mM, antranilato 4 mM, ácido cinámico 2 mM, muconato 5 mM, 3,5-diclorobenzoato 4 mM, 3-clorobenzoato 4 mM, 4-clorobenzoato 4 mM como única fuente de carbono. La placa fue incubada a 30 °C con agitación de 180 rpm durante 10 días, en los cuales se midió turbidez 600 nm cada dos días. Cada condición fue realizada en triplicado y con control negativo sin inóculo.

Por otra parte se realizó una curva de crecimiento con diésel y otra curva de crecimiento con n-hexadecano, compuestos en los cuales presentó crecimiento la bacteria previamente. Para este experimento se utilizaron cultivos de 5 mL con medio mínimo M9 y el hidrocarburo respectivo se agregó al 1% v/v. Los cultivos se incubaron por 21 días a 30 °C con agitación 180 rpm, midiendo turbidez 600 nm cada 4 días. Los cultivos se realizaron en duplicado y con control negativo sin inóculo.

3.14 Crecimiento de bacteria aislada en diésel y hexadecano en diferentes concentraciones.

La viabilidad de las células en diferentes concentraciones de diésel y n-hexadecano se evaluó en cultivos utilizando 0, 1, 3 y 5% v/v de cada compuesto respectivamente. Se trabajó con un volumen de cultivo de 5 mL en medio mínimo M9, los cultivos fueron incubados durante 16 días a 30 °C con

agitación de 180 rpm. Cada 4 días se midió la turbidez 600 nm y se realizó recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) en placas con medio LBA, para ello se tomaron alícuotas de 100 µL de cultivo y se realizaron diluciones seriadas en 900 µL de solución de NaCl 0,85 % estéril. En placas de medio LBA se sembraron 6 diluciones consecutivas, cada una en triplicado. Las placas se incubaron a 30 °C. Se realizó el recuento en las placas y se calculó las UFC mL⁻¹ (Madigan *et al.*, 2003), como se muestra en la ecuación 1, donde \bar{X} corresponde al promedio de los recuentos en placas.

$$\frac{UFC}{mL} = \bar{X} \cdot \text{Factor dilución} \cdot \text{Factor inóculo} \quad (\text{Ecuación 1})$$

3.15 Biorremediación de diésel desde soluciones contaminadas.

Se seleccionó la concentración de 1 % v/v para estudiar la degradación de hidrocarburos atribuidos al consumo bacteriano. El ensayo se realizó en cultivos de 5 mL con medio mínimo M9 incubados a 30 °C con agitación de 180 rpm, el ensayo fue de tipo sacrificial y se realizó con un control negativo sin inóculo con el objetivo de considerar las pérdidas abióticas. Cada 7 días se realizó el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) y se realizó la extracción de hidrocarburos de las muestras utilizando como solvente orgánico hexano (Figura 10).



Figura 10. Esquema de metodología de análisis de degradación de diésel de cepa aislada.

4. Resultados

4.1 Aislamiento de la bacteria hidrocarbonoclástica.

Las muestras de suelo seleccionadas corresponden a las tomadas en las semanas 9 y 10 del tratamiento E2 que corresponde a suelo contaminado con diésel que fue bioaumentado con un enriquecimiento bacteriano (Fuentes, 2014). Ambas tomas de muestra fueron realizadas en triplicado lo que permitió tener la cantidad de suelo necesario para los experimentos, y en estas semanas se observó el florecimiento de una población de las bacterias.

La Figura 11 muestra el gel de agarosa donde se observa que de los seis sistemas inoculados, tres presentaron una banda como resultado de la amplificación mediante PCR de ADN metagenómico. Se observó banda en las condiciones LB contaminado con n-hexadecano, BH contaminado con n-hexadecano y BH contaminado con diésel. La bacteria aislada amplificó sólo con los partidores “*Blooming*” y fue aislada en una placa de LB contaminado con n-hexadecano. Se denominó B7 a la cepa aislada.

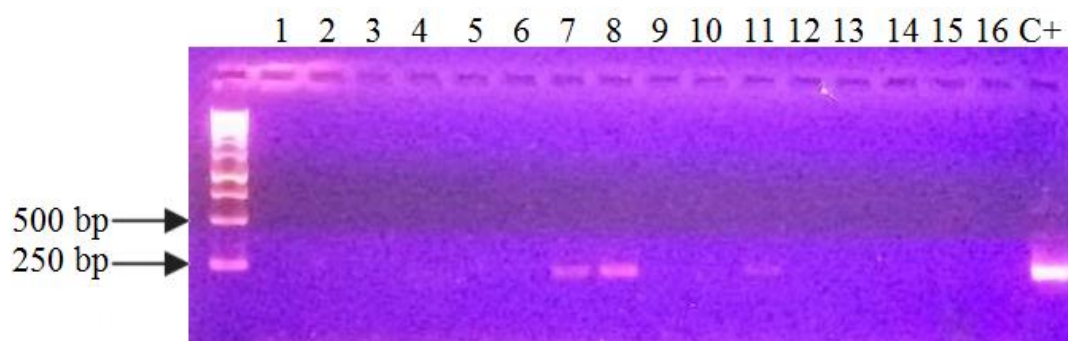


Figura 11. Detección de una bacteria amplificada mediante PCR con partidores “*Blooming*”. Gel agarosa de productos de PCR. Condiciones: Muestras suelo S9 1: Medio LB con hexadecano, 2: Medio BH con hexadecano, 3: Medio TSB con hexadecano, 4: Medio LB con diésel, 5: Medio BH con diésel, 6: Medio TSB con diésel, Muestras suelo S10 7: Medio LB con hexadecano, 8: Medio BH con hexadecano, 9: Medio TSB con hexadecano, 10: Medio LB con diésel, 11: Medio BH con diésel, 12: Medio TSB con diésel y C+: Control positivo *Acinetobacter sp.* AF53. 13, 14, 15 y 16 pocillos vacíos.

4.2 Identificación molecular.

La Tabla 8 ilustra las cuatro cepas con las que la cepa B7 presenta una mayor identidad. Se observó que la cepa aislada está estrechamente relacionada al género *Achromobacter*. Para estudiar las relaciones filogenéticas con el género *Achromobacter* se realizó un árbol filogenético que se muestra en la Figura 12.

Tabla 7. Identificación de la cepa mediante análisis de la secuencia del gen ARNr 16S con la herramienta blastn.

	Identidad (%)
<i>Achromobacter spanius</i> LMG 5911	99,86
<i>Achromobacter deleyi</i> LMG 3458	99,79
<i>Achromobacter kerstersii</i> LMG 3441	99,79
<i>Achromobacter piechaudii</i> NBRC 102461	99,66

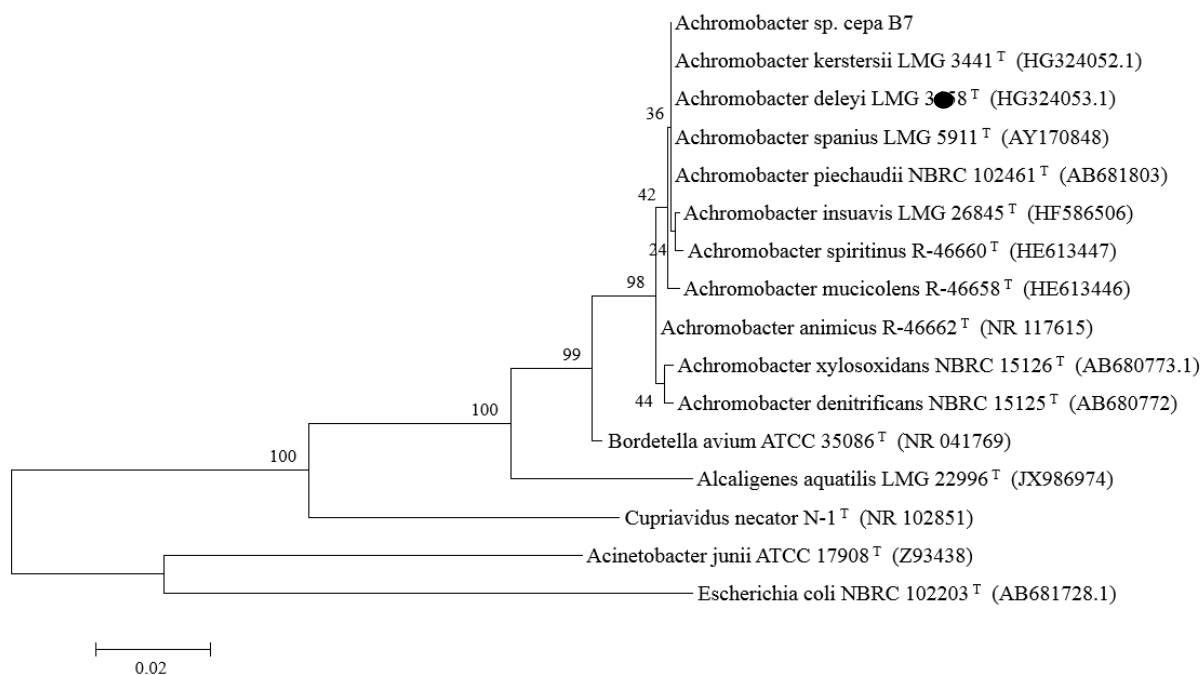


Figura 12. Árbol filogenético de la cepa B7. Árbol representando aislado del género *Achromobacter*. El árbol fue construido utilizando el método Neighbour-joining al cual se le aplicó un bootstrap de 1000 repeticiones. Los valores bajo 50% no se muestran en los nodos. La distancia evolutiva fue calculada con el método Jukes-Cantor. Se consideró de la posición 21 hasta 1392 de la secuencia, de acuerdo con la secuencia ARNr 16S de *Escherichia coli* NBRC 102203. Los números de acceso de GenBank se muestran entre paréntesis. La escala de distancia corresponde a 0,1 sustituciones entre secuencias.

4.3 Morfología bacteriana.

Se observó la morfología celular de *Achromobacter sp.* B7 mediante microscopía óptica. Se determinó que la cepa B7 es Gram negativa y presenta una morfología bacilar. La caracterización de la morfología de las colonias de la cepa B7 en medio rico LBA muestra colonias con bordes lisos, levemente convexas y de un color amarillo translúcido (Figura 13).

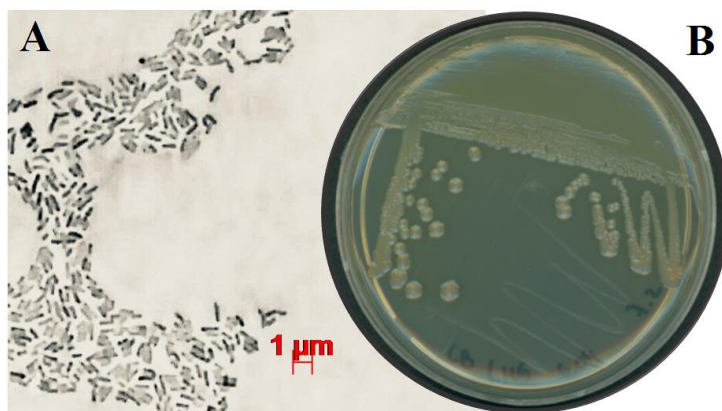


Figura 13. Morfología de la célula y de colonias de *Achromobacter* sp. B7. A, Microscopía óptica de *Achromobacter* sp. B7. Células teñidas mediante tinción Gram. Imagen obtenida desde microscopía óptica, 100^x. B, Morfología de colonias de *Achromobacter* sp. B7 en medio LBA a 48 h. Colonias bordes lisos, levemente convexas y de un color amarillo translúcido.

4.4 Crecimiento de la bacteria aislada a diferentes temperaturas.

La cepa aislada presenta crecimiento desde 4°C a 37°C en medio LBA, por lo que se clasifica como mesófila, tolerante al frío. La cepa B7 presenta mayor comportamiento a 30 °C, mostrando colonias de mayor tamaño a las 48 h, en comparación a las demás temperaturas (Figura 14). En medio BHA se observa un comportamiento diferente, ya que no crece en todas las temperaturas estudiadas, la cepa B7 crece a 25, 30 y 37 °C, y se observa mayor crecimiento a 30 °C alcanzando una mayor biomasa (Anexo A.3).

4.5 Caracterización bioquímica de cepa mediante galería API 20 Ne y prueba catalasa.

La caracterización bioquímica de la cepa B7 determinó que según el código entregado por API 20Ne (Anexo A.4) a las 48 h correspondería a una cepa de *Burkholderia gladioli*. En la Figura 15 se observa la galería API 20Ne a las 48 h inoculada con cepa B7. La prueba catalasa resultó positiva, lo que significa que la bacteria posee la enzima catalasa por lo que es capaz de descomponer el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. El resultado de cada prueba de la galería se presenta en la Tabla 9.

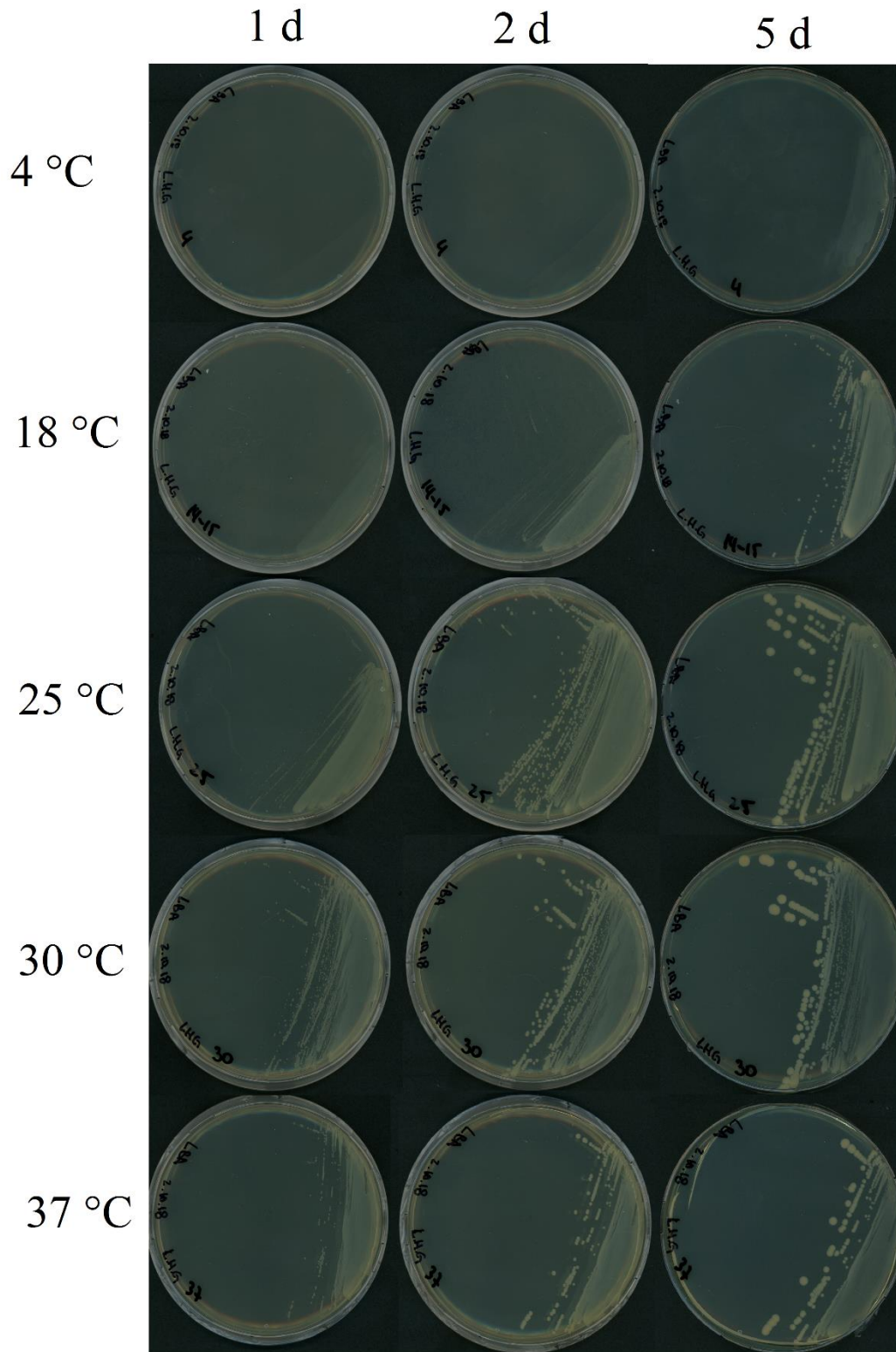


Figura 14. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento de *Achromobacter sp. B7* en medio LB. Se observó mayor crecimiento a 30 °C, al presentar colonias definidas y de mayor tamaño en menor tiempo que las demás condiciones. La evaluación se realizó de forma cualitativa. Cada condición se realizó en duplicado.

Tabla 8. Caracterización bioquímica de *Achromobacter sp. B7* mediante la galería API 20Ne. Galería 20Ne a las 48 h de ser inoculada.

Pruebas bioquímicas	24 h	48 h
Formación de indol (TRP)	-	n.a*
Fermentación de glucosa (GLU)	-	n.a
Desnitrificación		
Reducción de nitrato a nitrito (NO ₂)	+	n.a
Reducción de nitrato a nitrógeno (N ₂)	+	n.a
Actividad enzimática		
Ureasa (URE)	-	-
Arginina dihidrolasa (ADH)	-	-
β-glucosidasa (ESC)	-	-
β-galactosidasa (PNG)	-	-
Gelatinasa (GEL)	-	-
Asimilación		
Ácidos orgánicos		
Malato (MLT)	+	+
Citrato (CIT)	+	+
Carbohidratos y derivados		
Maltosa (MAL)	-	-
Glucosa (GLU)	-	-
Manosa (MNE)	-	-
Gluconato (GNT)	+	+
Arabinosa (ARA)	-	-
Manitol (MAN)	-	-
N-acetilglucosamina (NAG)	-	-
Ácidos grasos		
Caprato (CAP)	-	-
Adipato (ADI)	+	+
Otros		
Fenilacetato (PAC)	+	+

*No aplica a 48 horas.



Figura 15. Caracterización bioquímica de *Achromobacter sp. B7* mediante la galería API 20Ne y ensayo de la catalasa. A, Galería 20Ne a las 48 h de ser inoculada. B, Prueba catalasa positiva.

4.6 Resistencia a antibióticos.

Se evaluó la resistencia a antibióticos de la cepa B7 (Tabla 10). Se determinó que la cepa es resistente a bacitracina, trimetoprima y penicilina.

Tabla 9. Resistencia a antibióticos de *Achromobacter* sp. B7.

Familia	Antibiótico	Resistente/Sensible	Halo [cm]
	Estreptomicina	S	1,4
Aminoglucósidos	Gentamicina	S	1,4
	Kanamicina	S	2,0
	Ampicilina	S	1,3
β -Lactámicos	Penicilina	R	
Diaminopirimidinas	Trimetoprima	R	
Macrolidos	Eritromicina	S	1,8
Polipeptídico	Bacitracina	R	
Rifampicinas	Rifampicina	S	1,80
Tetraciclinas	Tetraciclina	S	2,5

4.7 Crecimiento de la cepa B7 en diferentes concentraciones de NaCl.

La evaluación del crecimiento en diferentes concentraciones de NaCl muestra que el crecimiento de la cepa B7 es afectado en función de la concentración del contenido de NaCl en el medio (Figura 16). Se observó que desde la concentración de 6% p/v NaCl la bacteria es inhibida, llegando a no presentar crecimiento en 8 y 10% p/v de NaCl. La cepa alcanzó mayor biomasa en la condición de 0% p/v de NaCl, las condiciones de 2 y 4 % presentan un nivel de biomasa similar, pero difieren en el tiempo en que alcanzan el estado estacionario, debido a que la condición de 4% p/v tiene una pendiente menor. Con respecto a la fase de latencia se observa que aumenta medida que aumenta la concentración de NaCl.

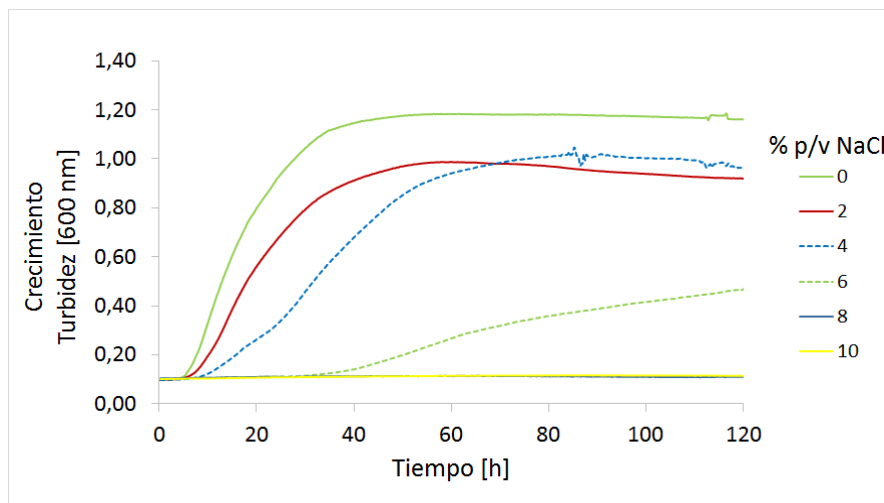


Figura 16. Crecimiento de *Achromobacter* sp. B7 en presencia de diferentes concentraciones de NaCl. Se observó que concentraciones mayores a 6% p/v no hay crecimiento. La evaluación se realizó en lector de microplacas Tecan Infinite 200 PRO. Cada ensayo se realizó en triplicado.

4.8 Crecimiento en fuentes de carbono convencionales.

Se evaluó el crecimiento de la cepa B7 en diversas fuentes de carbono y energía. Se observó que la cepa fue capaz de crecer en presencia de succinato 8 mM y en fructosa 5 mM (Figura 17). No se observó crecimiento en glucosa [5 mM], piruvato [10 mM], glicerol [10 mM] y sacarosa [2,5 mM].

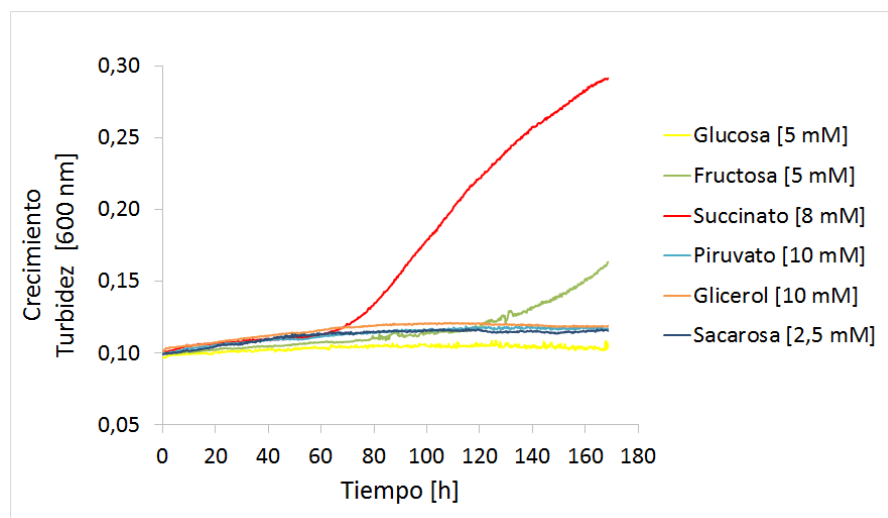


Figura 17. Crecimiento de *Achromobacter* sp. B7 en fuentes de carbono convencionales. Se observó crecimiento en succinato [8 mM] y fructosa [5 mM]. La evaluación se realizó en lector de microplacas Tecan Infinite 200 PRO. Cada ensayo se realizó en triplicado.

4.9 Crecimiento de la cepa B7 en diferentes hidrocarburos y ácidos orgánicos.

Se evaluó el crecimiento de la cepa B7 en presencia de hidrocarburos y ácidos orgánicos. Se determinó que la cepa B7 muestra crecimiento en placas de BHA suplementado con naftaleno y bifenilo respectivamente, como única fuente de carbono (Figura 18).

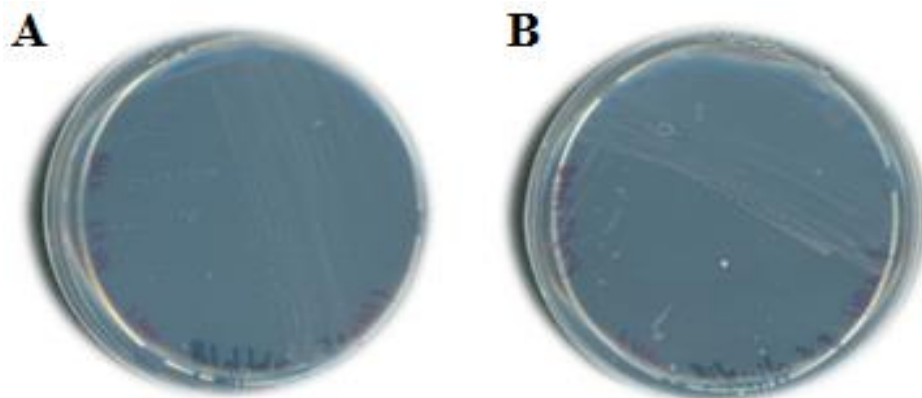


Figura 18. Crecimiento de *Achromobacter sp.* B7 en medio BHA utilizando naftaleno y bifenilo como fuentes de carbono. A, Crecimiento en naftaleno. B, Crecimiento en bifenilo. Crecimiento evaluado a los tres días.

En medio líquido se evaluó el crecimiento de la cepa B7 en hidrocarburos y ácidos orgánicos como única fuente de carbono. Se observó que la cepa B7 presenta crecimiento en alcanos como en hexano, n-hexadecano y octano, y en diésel (Figura 19). Con la finalidad de determinar mejor el comportamiento en los compuestos con mayor crecimiento de la cepa B7 se evaluó la cinética de crecimiento en diésel y n-hexadecano, en un mayor tiempo de cultivo, las gráficas se muestran en la Figura 20. En presencia de n-hexadecano se alcanzó una mayor turbidez que la condición con diésel al tiempo de 12 días. En la condición con diésel se observó una fase de adaptación menor que en la condición con n-hexadecano.

Por lo que, en resumen, se observó que *Achromobacter sp.* B7 crece en hidrocarburos alifáticos, como n-hexano, n-octano y n-hexadecano. Además crece en compuestos aromáticos, bifenilo y naftaleno. Finalmente la cepa B7 crece en mezcla de hidrocarburos, diésel. La Tabla 11 muestra un resumen de los compuestos utilizados por la cepa B7 como única fuente de carbono para el crecimiento y los compuestos probados en donde no se observó crecimiento.

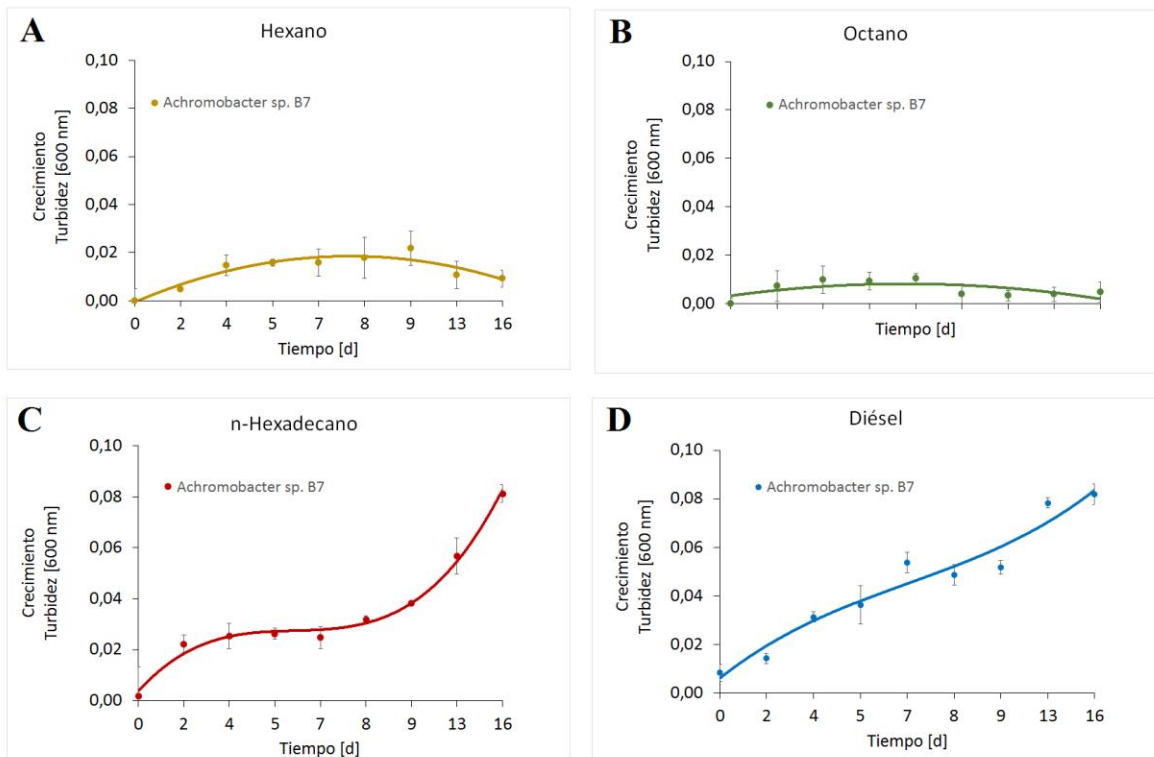


Figura 19. Cinética de crecimiento de *Achromobacter sp. B7* en hidrocarburos como única fuente de carbono. A, Crecimiento en hexano 1 % v/v. B, Crecimiento en octano 1 % v/v. C, Crecimiento en hexadecano 1 % v/v. D, Crecimiento en diésel 1 % v/v. Líneas continuas corresponden a líneas de tendencia. Los valores representan el promedio de ensayos realizados en triplicado. Las barras verticales representan la desviación estándar.

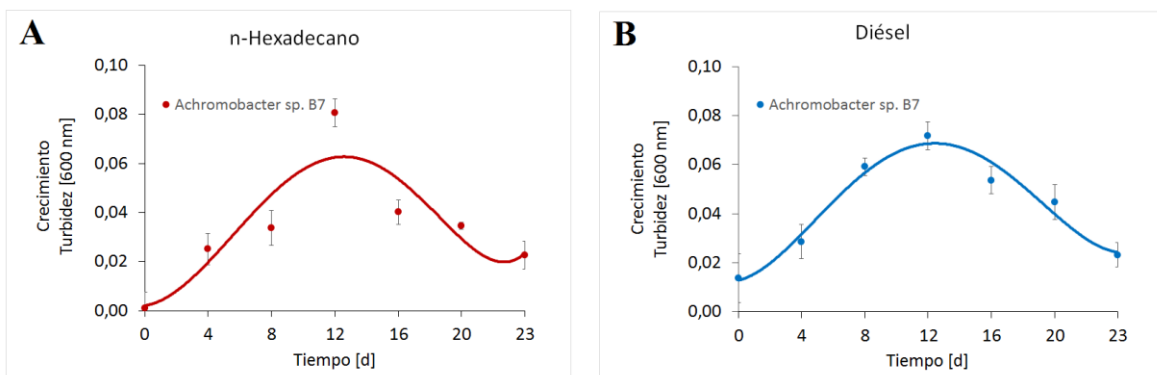


Figura 20. Cinética de crecimiento de *Achromobacter sp. B7* en n-hexadecano y diésel por 23 días. A, Crecimiento en hexadecano 1 % v/v. B, Crecimiento en diésel 1 % v/v. Líneas continuas corresponden a líneas de tendencia. Los valores representan el promedio de ensayos realizados en triplicado. Las barras verticales representan la desviación estándar.

Tabla 10. Crecimiento de *Achromobacter* sp. B7 en presencia de hidrocarburos y ácidos orgánicos.

Compuestos	Crecimiento
Hidrocarburos alifáticos lineales	
n-hexano	+
n-octano	+
n-hexadecano	++
Hidrocarburos alifáticos cíclicos	
Ciclohexano	-
Hidrocarburos Aromáticos	
Monocíclicos	
Benceno	-
Tolueno	-
Policíclicos	
Antraceno	-
Bifenilo	+
Fenantreno	-
Fluoreno	-
Naftaleno	+
Sustratos de rutas centrales	
Ácido gentísico	-
Ácido ftálico	-
Catecol	-
Protocatecuato	-
Sustratos de rutas periféricas	
Ácido benzoico	-
Ácido cinámico	-
Ácido salicílico	-
Ácido toluico	-
Antranilato	-
Bencenotriol	-
Sustratos de rutas periféricas clorados	
3,5-diclorobenzoato	-
3-clorobenzoato	-
4-clorobenzoato	-
Otros	
Muconato	-
Diésel	++

* Niveles de crecimiento: (-): sin crecimiento, (+): leve crecimiento, (+ +): buen crecimiento.

4.10 Crecimiento de *Achromobacter sp.* B7 en diésel y hexadecano en diferentes concentraciones.

Se evaluó el crecimiento mediante viabilidad celular de la cepa B7 en cuatro concentraciones de diésel y n-hexadecano. Figura 21 muestra el crecimiento en diferentes concentraciones de diésel, donde se observó que la cepa mantiene las unidades formadoras de colonias en el mismo orden de magnitud en las tres concentraciones estudiadas, lo cual demuestra la tolerancia a altas concentraciones del compuesto. A medida que aumenta la concentración de diésel, como única fuente de carbono, aumenta la biomasa de la cepa B7 llegando a $6,33 \times 10^7$ UFC mL⁻¹ al cabo de 12 días.

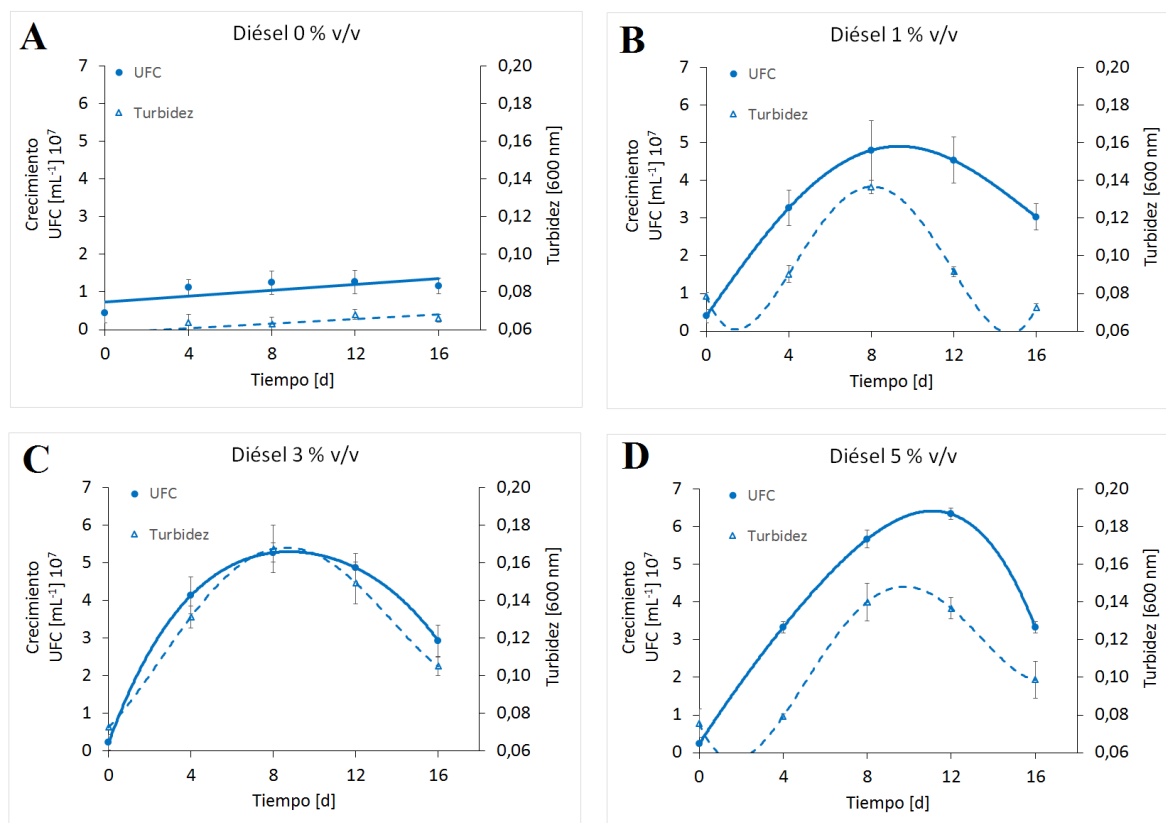


Figura 21. Cinética de crecimiento de *Achromobacter sp.* B7 en diésel. A, Crecimiento en diésel 0% v/v. B, Crecimiento en diésel 1% v/v. C, Crecimiento en diésel 3% v/v. D, Crecimiento en diésel 5% v/v. Líneas continuas corresponden a líneas de tendencia UFC. Líneas segmentadas corresponden a líneas de tendencia turbidez. Los valores representan el promedio de ensayos realizados en triplicado. Las barras verticales representan la desviación estándar.

El crecimiento en diferentes concentraciones de n-hexadecano se ilustra en la Figura 22. Con respecto a la biomasa alcanzada se observa que en la condición de 3% v/v se tiene la mayor cantidad de biomasa alcanzando $5,13 \times 10^7$ UFC mL⁻¹ al día 8, seguido de la condición de 1% v/v con $4,8 \times 10^7$ UFC mL⁻¹ al día 12 y finalmente $4,33 \times 10^7$ UFC mL⁻¹ a 5% v/v al día 12. Se observa que la cepa mantiene constante el orden de magnitud de UFC, lo cual demuestra la tolerancia a altas concentraciones del compuesto.

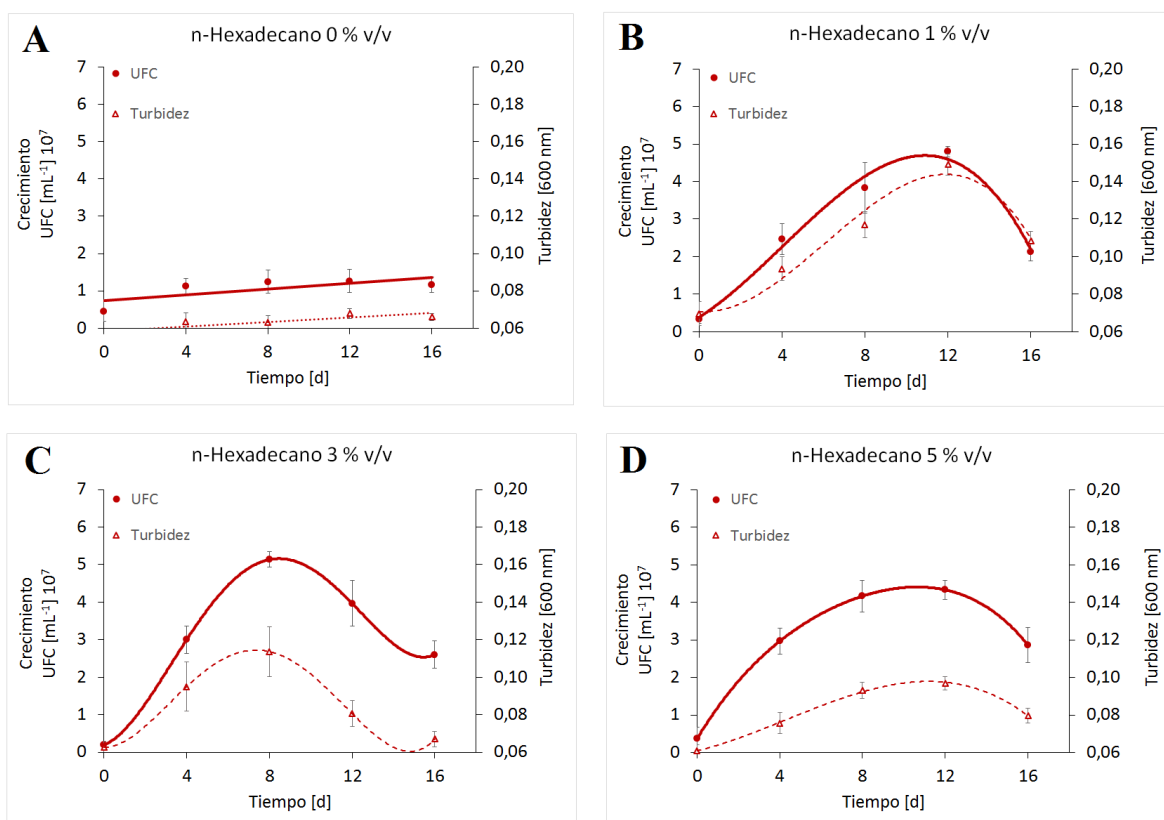


Figura 22. Cinética de crecimiento de *Achromobacter* sp. B7 en hexadecano. A, Crecimiento en hexadecano 0% v/v. B, Crecimiento en hexadecano 1% v/v. C, Crecimiento en hexadecano 3% v/v. D, Crecimiento en hexadecano 5% v/v. Líneas continuas corresponden a líneas de tendencia UFC. Líneas segmentadas corresponden a líneas de tendencia turbidez. Los valores representan el promedio de ensayos realizados en triplicado. Las barras verticales representan la desviación estándar.

4.11 Biorremediación de diésel desde soluciones contaminadas.

Se analizó la cinética de degradación de diésel a partir del crecimiento de la cepa B7. Se comparó entre el control abiótico y el cultivo inoculado con *Achromobacter* sp. B7. La Figura 23A muestra el diésel remanente en el sistema para ambos casos estudiados. En el sistema abiótico se obtuvo un ~50% de diésel remanente a los 21 días, mientras que en el sistema inoculado con la cepa B7 se obtuvo un ~5% de diésel remanente a los 21 días, por lo que la cepa degrada ~92% con respecto al control abiótico. Se observó que al día 7 se tiene un crecimiento de $3,8 \times 10^7$ UFC mL⁻¹ de la cepa B7. La Figura 23B presenta el porcentaje de degradación de diésel atribuible a la cepa B7 con respecto al control abiótico.

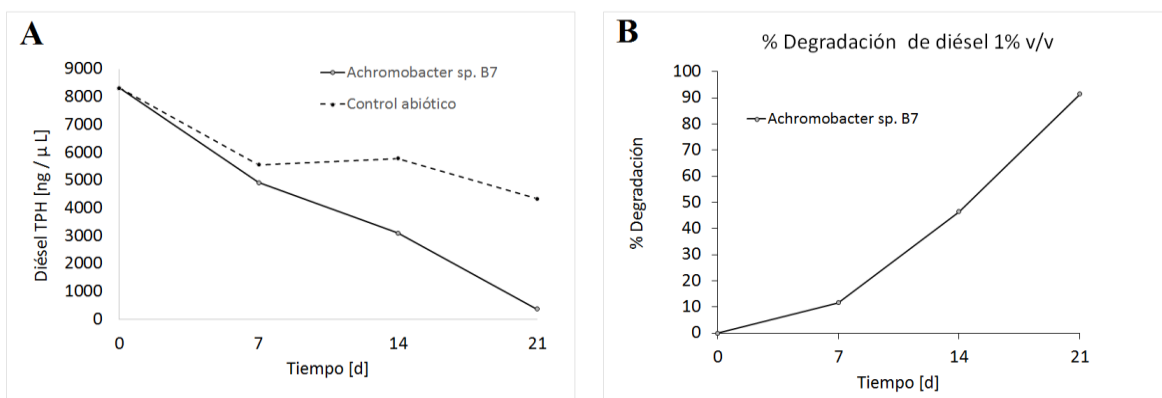


Figura 23. Degradación de diésel por *Achromobacter* sp. B7. A, Diésel remanente en el sistema abiótico y el sistema inoculado con *Achromobacter* sp. B7. B, Porcentaje de degradación de diésel de *Achromobacter* sp. B7. Barras verticales corresponden a desviación estándar. Ensayo sacrificial y en triplicado.

La disminución de la concentración de diésel en las muestras se puede observar en el tiempo en los cromatogramas entregados por GC-FID (Anexo B.1), de los cuales se analizaron las concentraciones de cada hidrocarburo (C₁₀ – C₂₅) en el tiempo. En la comparación de ambos tratamientos, se observa que existe una disminución en la concentración de hidrocarburos en ambas condiciones. En la Figura 24 se puede apreciar que el cultivo biótico presenta mayor disminución, lo que se puede atribuir a la presencia de la bacteria. Se observa que en el tiempo 0 (color verde) las diferencias de concentración son pocas entre los sistemas, esto se acentúa en el tiempo 21 (color amarillo). Se presume que el consumo de la cepa comienza con hidrocarburos C₁₄ y C₁₅, donde al tiempo 7 (color naranja) ya se observan diferencias entre los tratamientos, para continuar con los hidrocarburos (C₁₂ – C₁₉). Finalmente se observó la degradación de los hidrocarburos de cadena más larga (C₂₀ – C₂₅).

Los componentes con mayor degradación son C₁₅, C₁₆, C₁₇ y C₂₁, los cuales presentan degradación mayor al 50% y se presentan en el gráfico expuesto en Anexo B.2 y B.3.

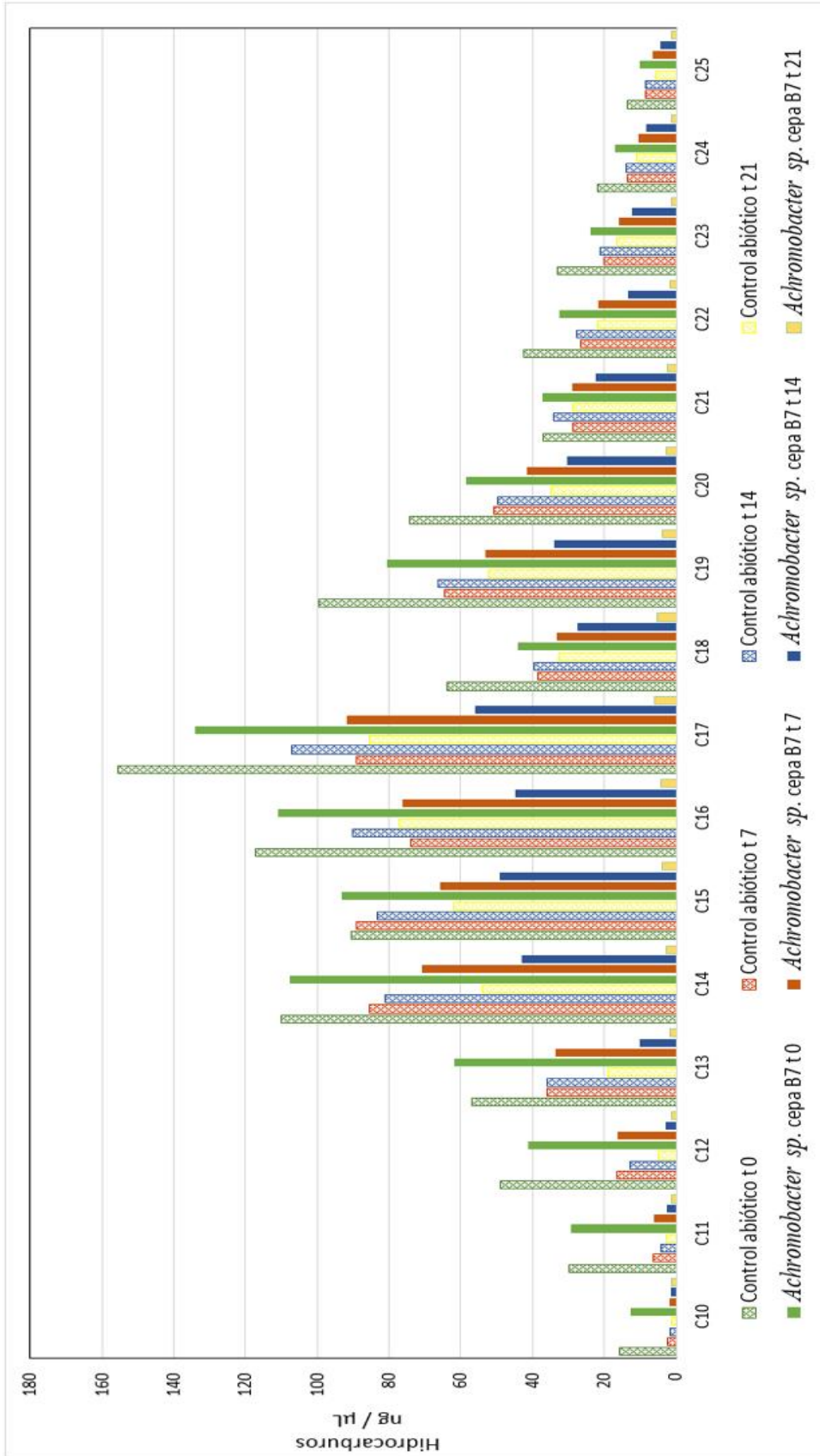


Figura 24: Efecto de *Achromobacter sp. B7* sobre hidrocarburos C10-C25 de diésel remanente. Colores sólidos corresponden a sistema inoculado. Colores achurados corresponden a control abiótico.

5. Discusión

Para el aislamiento de la bacteria hidrocarbonoclástica realizado se utilizó diésel y *n*-hexadecano como fuentes de carbono. Se seleccionó diésel por ser una mezcla de hidrocarburos y *n*-hexadecano por ser uno de los alcanos más representativos de este refinado de petróleo (Baldrichf, 1998). Las muestras utilizadas en el aislamiento, correspondían a suelo de ensayos a escala de microcosmos, donde se utilizó suelo sin historial de contaminación, el cual fue contaminado artificialmente con diésel para finalmente ser tratados por biorremediación, específicamente bioaumentación (Fuentes *et al.*, 2016). En estos ensayos se evaluaron dos enriquecimientos, ENR.1 y ENR.2, en los cuales el género *Achromobacter* representó el 0,2 y 0,9 % respectivamente de la población bacteriana, según análisis de secuenciación del gen ARNr 16S metagenómico de suelos. Esto concuerda con los resultados obtenidos mediante secuenciación total del gen ARNr 16S del aislado bacteriano, que indicó que pertenece al género *Achromobacter*. El análisis de la secuencia del gen ARNr 16S permite determinar el género, no se pudo determinar la especie de la cepa B7, dado que muestra alta identidad con 15 especies del género *Achromobacter*. En algunos casos se tiene una identidad de 100% pero un puntaje (score) bajo por la cantidad de pares de base comparados y la cantidad de GAP en la secuencia (espacio introducido en un alineamiento para compensar inserciones o deleciones en una secuencia relativa a otra, con el fin de mejorar el alineamiento), dado que algunas de las secuencias comparables correspondían a secuencias parciales de alrededor de 200 pb.

De forma complementaria a esta tesis se realizó la secuenciación del genoma de la cepa *Achromobacter* sp. B7 mediante Illumina HiSeq (Méndez, Hernández *et al.*, Aceptado). La metodología utilizada se describe en Anexo C.1. El genoma de *Achromobacter* sp. B7 posee un tamaño total de 6,24 Mb y un contenido de G + C de 64,8%. El contenido de G+C se correlaciona con el contenido de G + C determinado previamente para *A. piechaudii* NBRC 102461T (64,8%). El análisis por identidad de nucleótidos promedio basada en BLAST (ANIb), usando el servidor web JSpeciesWS, con *Achromobacter piechaudii* NBRC 102461T y *Achromobacter marplatensis* sp. B2T, indicó una identidad de 88% y 85.4%, respectivamente. Para complementar este análisis se realizó una comparación genómica utilizando Tetra Correlation Search (TCS), utilizando el servidor web JSpeciesWS, la cual indicó que *Achromobacter* sp. B7 está muy relacionado con *Achromobacter* sp. LC458 (puntaje $z > 0,999$) y *Achromobacter piechaudii* NBRC 102461T (puntaje $z > 0,9906$). Este análisis no permite definir la especie, dado que el parámetro es $>0,999$ (Roselló-Mora & Amann, 2015).

La cepa *Achromobacter* sp. B7 tiene similitud en las características fenotípicas con cuatro especies analizadas (Vandamme *et al.*, 2016), que corresponden a *Achromobacter kerstersii* sp. nov. LMG 3441, *Achromobacter kerstersii* sp. nov. LMG 3442, *Achromobacter animicus* LMG 26690 y *Achromobacter piechaudii* LMG 1873. Con las bacterias comparte la característica de crecer en un medio con 3 y 4.5 % de NaCl. Además la cepa B7 asimiló las fuentes de carbono *L*-arabinosa, *D*-manosa, *N*-acetil-glucosamina, maltosa, citrato, ácido fenilacético, *D*-glucosa, gluconato, ácido cáprico y ácido adípico. Finalmente *Achromobacter* sp. B7 comparte la característica de reducción de nitritos a nitratos y reducción de nitritos como la cepa *Achromobacter animicus* LMG 26690.

El género *Achromobacter* pertenece a la familia *Alcanigenaceae*, del orden *Burkholderiales* de clase β -*proteobacteria*. Se ha aislado desde muestras de agua y suelo, y algunas especies se han aislado desde muestras clínicas humanas (Kiredjian *et al.*, 1986). Desde que el género fue descrito en el año 1981 se han transferido algunas especies del género *Alcaligenes* (Coenye *et al.*, 2003). Entre algunas de las especies descritas se encuentra *Achromobacter xylosoxidans*, que es capaz de causar daños respiratorios en seres humanos diagnosticados con fibrosis (Liu *et al.*, 2002), *Achromobacter piechaudii* que puede ser aislada desde muestras de suelo y de muestras clínicas humanas (Kiredjian *et al.*, 1986). Se han descubierto algunas capacidades degradadoras del género *Achromobacter* y se ha logrado aislar especies pertenecientes a este género desde suelos contaminados con petróleo (Deng *et al.*, 2014), o desde aguas residuales contaminadas con petróleo (Hassanshahian *et al.*, 2013). Se logró aislar una cepa del género *Achromobacter* desde suelo contaminado con petróleo, enriquecido con naftaleno (Al-Thani *et al.*, 2009). Además se ha estudiado el desempeño de cepas bacterianas del género *Achromobacter* en ensayos de biorremediación donde se utiliza como parte de un consorcio (Circic *et al.*, 2010).

En el pasado, como método de identificación y clasificación, se realizaban pruebas bioquímicas y ensayos fenotípicos. Alrededor del año 1960, se comenzó a utilizar la técnica de hibridación ADN-ADN con el fin de estudiar la similitud entre cepas, indicando que pertenecían a la misma especie con una similitud > 70% (Roselló-Morá, Amann, 2011). En los años 1970 se utilizó el gen rARN 16S para reconstrucción genealógica, convirtiéndose en el estándar utilizado para identificación de especies (Woese, 1987). Actualmente se consideran tres importantes ejes para tener una clasificación precisa: (i) monofilo, (ii) coherencia genómica, (iii) coherencia fenotípica. De esta forma se asegura la similitud en genes y similitud en la expresión de éstos mostrando la coherencia entre estos ejes (Roselló-Morá, Amann, 2015). Por esta razón es necesario integrar ambos resultados para poder acercarse de mejor forma a la identificación de especie. Por lo que se sugiere que la cepa B7 se parece a la especie *piechaudii*, por el análisis realizado genotípica y fenotípicamente.

Se observó que la cepa B7 mostró resistencia a los antibióticos bacitracina, penicilina y trimetoprima. Estos resultados coinciden con bacterias ambientales degradadoras de hidrocarburos, las cuales presentan resistencia a antibióticos (Méndez *et al.*, 2017). Cepas del género *Pseudomonas* y *Acinetobacter* aisladas desde suelos del valle de Aconcagua, presentan resistencia a bacitracina y penicilina, debido al amplio empleo de antibióticos en la medicina y agricultura. (Méndez *et al.*, 2017).

La cepa B7 presentó crecimiento en hidrocarburos alcanzando niveles de UFC moderados del orden de 10^7 UFC/mL. Se observó que a pesar de mantener esta concentración celular la cepa B7 degradó diésel y *n*-hexadecano. Esto podría atribuirse a diferencias en la forma de medición del crecimiento bacteriano (unidades formadoras de colonias), la cual subestima la biomasa metabólicamente activa presente en el ensayo. Se ha observado que algunas cepas bacterianas entran en una fase llamada “VBNC” (del inglés *Viable But Non Culturable*), en la cual se observa una baja en la actividad metabólica, debido a entornos que provocan estrés en la célula (James, 2005). Ensayos de recuento de viabilidad muestran que en ambientes de estrés, las unidades formadoras de colonias disminuyen, pero no así el número total de células (James, 2005). Las bacterias que entran en esta fase incluyen a bacterias del género *Alcaligenes*. El género *Achromobacter* muestra relaciones filogenéticas con el género *Alcaligenes*. Esto podría respaldar el comportamiento observado bajo condiciones donde la única fuente de carbono es diésel o *n*-hexadecano. Otro factor que podría explicar el comportamiento es que la condición de crecimiento estudiada induciría a que la bacteria tenga un coeficiente de mantención mayor. El coeficiente de mantención se define como la energía utilizada en actividades distintas al crecimiento. Se ha observado que microorganismos en condiciones de crecimiento bajo fuentes de carbono complejas o en condiciones de estrés, incrementan el consumo de energía para permanecer viables, disminuyendo la duplicación celular (Van Bodegom, 2007). Durante el crecimiento con hidrocarburos como única fuente de carbono, se observó que la cepa B7 no alcanzó una turbidez a $600\text{ nm} > 0,12$. Este comportamiento se puede explicar por el fenómeno de aglomeración celular, esto ocurre como respuesta a situaciones de estrés en la célula (Trunk *et al.*, 2018).

La cepa bacteriana estudiada presentó crecimiento en diésel y hexadecano 5 % v/v. Se observó que se mantiene estable en el tiempo a esta concentración, lo que hace referencia a su tolerancia a estos niveles de contaminación. Esto se podría explicar por el origen de la cepa, dado que al ser aislada de un suelo donde existía alta contaminación con diésel. En los ensayos de degradación se observó que el sistema contaminado artificialmente e inoculado con la cepa B7 presenta una degradación de ~ 92%, mientras que el sistema contaminado artificialmente sin inocular alcanza una remoción del 50%.

Por lo que se estima que la bacteria logra degradar cerca del 92% de diésel en el sistema a los 21 días, con respecto al control abiótico. En comparación con la degradación descrita por otras cepas del género *Achromobacter* se observó que la cepa B7 presenta mayor degradación de hidrocarburos. Un caso estudiado en India el año 2015 mostró que una cepa bacteriana fue aislada desde suelo contaminado con diésel, la cual presenta un 99% de identidad con el género *Achromobacter*, y logra un 32% de degradación de diésel en medio líquido (Sibi *et al.*, 2015). Existen estudios donde se incluye una cepa del género *Achromobacter* como parte de un consorcio para la degradación de algún contaminante. Un ejemplo de esto es el consorcio utilizado en un sistema contaminado con hexadecano en un biorreactor, donde se observó una degradación del 90% luego de 10 días (Zanaroli *et al.*, 2010). En comparación a ensayos de este tipo se observó que la degradación es mayor a la degradación por la cepa B7 durante los ensayos de esta tesis.

La cepa B7 muestra mayor degradación de diésel en aguas (~92%) en los ensayos de esta tesis, en comparación con la degradación de diésel (37%) por un consorcio bacteriano durante el proceso de biorremediación en suelos contaminados (Fuentes, 2014). Esto puede deberse a una mayor disponibilidad de hidrocarburos en el sistema acuoso, en comparación a la matriz de suelo. Por otro lado, la distribución de hidrocarburos en suelo es heterogénea y la aireación puede ser insuficiente para las bacterias inoculadas. En el sistema acuoso, la mayor homogeneidad y aireación pueden favorecer la degradación de hidrocarburos.

6. Conclusiones

El desarrollo de esta tesis se basó en tres objetivos específicos: (1) Aislar e identificar una cepa bacteriana hidrocarbonoclástica proveniente de un suelo contaminado con diésel y sometido a biorremediación; (2) Caracterizar la cepa bacteriana hidrocarbonoclástica aislada mediante técnicas microbiológicas y genéticas; (3) Evaluar las capacidades catabólicas de hidrocarburos del aislado bacteriano. Con respecto al primer objetivo, se logró aislar una cepa bacteriana hidrocarbonoclástica utilizando técnicas de microbiología molecular. Para su identificación se analizó la secuencia del gen ARNr 16S y se complementó con pruebas bioquímicas de la galería API20 Ne. La cepa aislada pertenece al género *Achromobacter*, y presenta alta similitud con *Achromobacter piechaudii* según análisis realizados. Mediante la caracterización realizada en el objetivo dos, se determinó la morfología de la cepa. Además se evaluó el efecto de la temperatura en el crecimiento del aislado, donde se obtuvo un mejor crecimiento a 30 °C y se clasificó la cepa como mesófila tolerante al frío. Por otro lado se estudió la halotolerancia, donde la cepa resultó halotolerante creciendo hasta en un 6 % p/v NaCl en el medio. Finalmente se observó el crecimiento de la cepa B7 en compuestos aromáticos, compuestos alifáticos y mezcla de hidrocarburos (diésel), siendo resistente a altas concentraciones de n-hexadecano y diésel (5 % v/v). La cepa B7 degradó ~92 % de diésel en medio acuoso.

Por lo tanto, luego de cumplir con los objetivos planteados se concluye que la cepa aislada presenta características de interés para su aplicación en biorremediación, el desempeño de la cepa en un medio acuoso contaminado con diésel muestra un alto porcentaje de degradación. Además se observa un potencial para ser utilizada incluso en ambientes marinos, debido a su halotolerancia, y en ambientes de temperatura del rango 18-37 °C donde la cepa presenta buen crecimiento.

7. Proyecciones y recomendaciones

En base al genoma secuenciado de la cepa B7 se podría realizar una búsqueda de genes de rutas metabólicas de compuestos degradados por la bacteria. El genoma completo podría ser útil para determinar de la especie de la cepa B7.

Considerando el buen desempeño de la cepa degradadora, se podría establecer un consorcio bacteriano, compuesto por bacterias degradadoras de diferentes compuestos. Además se podría aplicar este consorcio en diferentes matrices para un eficiente proceso de biorremediación. Para esto se recomienda evaluar antagonismo entre cepas candidatas a ser parte del consorcio, con el fin de asegurar un comportamiento favorable en el proceso.

Considerando la halotolerancia, y las capacidades catabólicas de la cepa B7, se podría buscar una aplicación en biorremediación en condiciones salinas, como agua de mar, y en sectores mineros. En ambos casos, se podría escalar ensayos y explorar el desempeño de la cepa en agua o suelo contaminado.

Con el fin de complementar aún más la caracterización realizada, se recomienda estudiar la resistencia de la cepa B7 a metales pesados, debido a que en los lugares donde existe contaminación por hidrocarburos, generalmente también existe contaminación de metales pesados. Por lo que para un eficiente proceso de biorremediación se necesita información sobre la resistencia de las cepas a estos compuestos y si son capaces de crecer en presencia de ellos.

8. Bibliografía

- Al-Thani, R. F., Abd-El-Haleem, D. A., & Al-Shammri, M.** 2009. Isolation and characterization of polyaromatic hydrocarbons-degrading bacteria from different Qatari soils. *African Journal of Microbiology Research*, 3, 761-766.
- Atlas, R. & Philp, J.** 2005. *Bioremediation: Applied microbial solutions for real-world environmental cleanup*. ASM Press. Washington, DC. IX-XI p.
- Baldrichf, C.** 1998. Diesel characterization by high resolution mass spectrometry-gas chromatography. *CT&F-Ciencia, Tecnología y Futuro*, 1, 65-73.
- Benavides J., Roldan F., Ocampo A., Londoño M., Pardo A., Perdomo C.** 2004. Efecto de la adición de nutrientes e identificación de microorganismos degradadores de hidrocarburos de suelos contaminados con petróleo. Universidad de la Salle. Facultad de Ingeniería Ambiental. Bogotá, Colombia.
- Bento F., de Oliveira Camargo F., Okeke B., Frankenberger-Junior W. T.** 2003. Bioremediation of soil contaminated by diésel oil. *Brazilian Journal Microbiology*. 34, 65-68.
- Botello, A.V., Rendón Von Osten, G. Gold-Bouchot y C. Agraz-Hernández,** 2005. Golfo de México, Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias. 2da Edición. Univ. Autón. De Campeche, Univ. Nal Autón de México, Instituto Nacional de Ecología. (261).
- Bushnell, L. & Haas, H.** 1941. The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. *Journal of Bacteriology*. 41, 653-73.
- Callaghan, A., Morris, B., Pereira, I., McInerney, M., Austin, R., Groves, J., Kukor, J., Suflita, J., Young, L., Zylstra, G., Wawrik, B.** 2012. The genome sequence of *Desulfatibacillum alkenivorans* AK-01: a blueprint for anaerobic alkane oxidation. *Environmental Microbiology*. 14, 101-113.
- Ciric, L., Philp, J. C., & Whiteley, A. S.** 2010. Hydrocarbon utilization within a diesel-degrading bacterial consortium. *FEMS Microbiology Letters*, 303, 116-122.
- Coenye, T., Vancanneyt, M., Falsen, E., Swings, J., & Vandamme, P.** 2003. *Achromobacter insolitus* sp. nov. and *Achromobacter spanius* sp. nov., from human clinical samples. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, 1819-1824.

- Daane L.**, Harjono I., Zylstra G., Häggblom M. 2001. Isolation and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria associated with the rhizosphere of salt Marsh plants. *Applied and Environmental Microbiology*. 67, 2683 – 2691.
- Deng, M. C.**, Li, J., Liang, F. R., Yi, M., Xu, X. M., Yuan, J. P., Wang, J. H., *et al.* 2014. Isolation and characterization of a novel hydrocarbon-degrading bacterium *Achromobacter* sp. HZ01 from the crude oil-contaminated seawater at the Daya Bay, southern China. *Marine pollution bulletin*, 83, 79-86.
- Dermont, G.**, Bergeron, M., Mercier, G., Richer-Lafleche, M. 2008. Soil washing for metal removal: A review of physical/chemical technologies and field applications. *Journal of Hazardous Materials*. 152, 1-31.
- Eom, I.C.**, Rast, C., Veber, A. M. & Vasseur, P. 2007. Ecotoxicity of a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-contaminated soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 67, 190-205.
- Fuentes S.**, Méndez V., Aguila P. 2014. Bioremediation of petroleum hydrocarbons: catabolic genes, microbial communities, and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 98, 4781-4789.
- Hassanshahian, M.**, Ahmadinejad, M., Tebyanian, H., & Kariminik, A. 2013. Isolation and characterization of alkane degrading bacteria from petroleum reservoir waste water in Iran (Kerman and Tehran provenances). *Marine pollution bulletin*, 73, 300-305.
- Higgins, I. & Burns, R.** 1975. *The chemistry and microbiology of pollution*. 8ed. Academic Press. London. 248 p.
- James, D.** 2005. The viable but nonculturable state in bacteria. *The Journal of Microbiology*, 43, 93-100.
- Kiredjian, M.**, Holmes, B., Kersters, K., Guilvout, I., & De Ley, J. 1986. *Alcaligenes piechaudii*, a new species from human clinical specimens and the environment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 36, 282-287.
- La Tercera**, 2016. <http://www2.latercera.com/noticia/los-derrames-de-petroleo-que-han-marcado-la-costa-de-quintero/> (Revisado el 04 de septiembre de 2018)
- Lane, D.**, 1991. *Nucleic Acid Techniques in bacterial systematics*. New York, 125-175 p.

Liu, L., Coenye, T., Burns, J.L., Whitby, P.W., Stull, T.L. & LiPuma, J.J. 2002. Ribosomal DNA-directed PCR for identification of *Achromobacter (Alcaligenes) xylosoxidans* recovered from sputum samples from cystic fibrosis patients. *Journal of Clinical Microbiology*. 40, 1210-1213.

López-Jácome, L. E., Hernández-Durán, M., Colín-Castro, C. A., Ortega-Peña, S., Cerón-González, G., & Franco-Cendejas, R. 2014. Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Investigación en Discapacidad*, 3, 10-18.

Madigan, M., Martinko, J. & Parker, J. 2003. *Brock Biología de los Microorganismos*. Pearson Educación, Madrid. 137-161 p.

Malik, A. 2004. Metal bioremediation through growing cells. *Environment International*. 30, 261-278.

Méndez, V., Fuentes, S., Morgante, V., Hernández, M., González, M., Moore, E., & Seeger, M. 2017. Novel hydrocarbonoclastic metal-tolerant *Acinetobacter* and *Pseudomonas* strains from Aconcagua river oil-polluted soil. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 17, 1074-1087.

Méndez, V., Hernández L., Salvà-Serra F., Jaén-Luchoro D., Durán R. E., Barra B., Piñeiro-Iglesias B., Moore E. R. B. & Seeger M. 2018. Complete Genome Sequence of the Hydrocarbonoclastic Strain *Achromobacter* sp. B7, Isolated during petroleum hydrocarbon bioremediation in Valparaíso Region, Chile. *Microbial Resource Announcements*. (Accepted).

Moreno, C. M., Becerra, A. G., & Santos, M. J. B. 2004. Tratamientos biológicos de suelos contaminados: contaminación por hidrocarburos. Aplicaciones de hongos en tratamientos de biorrecuperación. *Rev Iberoam Micol*, 21, 103-120.

Morgante, V., López-López, A., Flores, C., González, M., González, B., Vásquez, M., Rosselló-Mora, R. & Seeger, M. 2009. Bioaugmentation with *Pseudomonas* sp. strain MHP41 promotes simazine attenuation and bacterial community changes in agricultural soils. *FEMS Microbiology Ecology*. 71, 114-126.

Reid BJ, Jones KC, Semple KT. 2000. Bioavailability of persistent organic pollutants in soils and sediments. A perspective on mechanisms, consequences and assessment. *Environmental Pollution*. 108, 103 – 112.

Restrepo R. 2002. Derrame de hidrocarburos. Impacto en los ecosistemas tropicales. *ECOPETROL Instituto Colombiano de Petróleo*.

Rojo, F. 2009. Degradation of alkane by bacteria. *Environmental Microbiology*. 11, 2477-2490.

Rosselló-Móra, R., & Amann, R. 2011. Towards a taxonomy of *Bacteria* and *Archaea* based on interactive and cumulative data repositories. *Environmental of Microbiology*. 14, 318-334.

Rosselló-Móra, R., & Amann, R. 2015. Past and future species definitions for *Bacteria* and *Archaea*. *Systematic and Applied Microbiology*, 38, 209-216.

Sambrook J & Russell D W. 1989. *Molecular cloning*, 3th edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press (Eds.). Cold Spring Harbor, New York.

Sibi G, Simaria C, Pant G. 2015. Characterization and Evaluation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Degrading Bacteria Isolated from Oil Contaminated Soil. *Appli Micro Open Access* 1:104.

Sivakumaran S., Robinson B., Mills T., Vogeler I., Clothier B., Northcott G. L. and McNaughton. 2004. *Bioremediation of soils contaminated with organic compounds*. HortResearch, PB 3123, Hamilton, New Zealand.

Speight, J.G. 2015. *Handbook of petroleum product analysis*. USA, 1-25 p.

T13. Noticias, 2018. <http://www.t13.cl/noticia/nacional/derrame-petroleo-costas-isla-pascua> (Revisado el 04 de septiembre de 2018).

Trunk T., Khalil H. S. & Leo J. C. 2018. Bacterial autoaggregation. *AIMS Microbiology*. 4, 140-164.

Van Bodegom, P. 2007. Microbial maintenance: a critical review on its quantification. *Microbial Ecology*, 53, 513-523.

Vandamme, P. A., Peeters, C., Inganäs, E., Cnockaert, M., Houf, K., Spilker, T., & LiPuma, J. J. 2016. Taxonomic dissection of *Achromobacter denitrificans* Coenye et al. 2003 and proposal of *Achromobacter agilis* sp. nov., nom. rev., *Achromobacter pestifer* sp. nov., nom. rev., *Achromobacter kerstersii* sp. nov. and *Achromobacter deleyi* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66, 3708-3717.

Wentzel, A., Ellingsen, TE., Koltar, H-K., Zorchev, SB. Throne-Holst, M. 2007. Bacterial metabolism of long-chain n-alkane. *Applied Microbiology Biotechnology*, 76, 1209-1221.

Woese, C.R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*. 51, 221-271.

Zanaroli, G., Di Toro, S., Todaro, D., Varese, G. C., Bertolotto, A., & Fava, F. 2010. Characterization of two diesel fuel degrading microbial consortia enriched from a non acclimated, complex source of microorganisms. *Microbial cell factories*, 16; 9:10.

9. Anexos

9.1 Anexo A

A.1 Secuencia consenso para diseño partidior “Blooming”.

TGGAGAGTTTGATCCTGGTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAACGG
ATTGGTGGTGCTTGCAACATTNATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCCAT
AGCGGGGGACAACGTTTGGAAACGCACGCTAATACCGCATAACGCCCTACGGGGGAAAGCAGGGGA
CTCTCTTAGGGCCTTGCACTAATGGATGAGCCTAGGTCAGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGC
CTACCAAGGCGACGATCTGTAGCGGGTCTGAGAGGATGATCCGCCACACTGGAAGTGAACACGG
TCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCA
TGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTTTGGTTGTAAAGCACTTTAAGCGAGGAGGAGGCTACTNNTG
TTAATACCAAGAAGTAGTGGACGTTACTCGCAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCC
GCGGTAATACAGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGCGGCTT
GTTAAGTCAAATGTGAAATCCCCGAGCTTAACTGGGCATTGCATTGATACTGGCAAGCTAGAG
TATGGGAGAGGAAGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCG
ATGGCGAAGGCAGCCTTCTGGCCTAATACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCATGGGGAGCAAACAGG
ATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGGGGATTTGATCCTTT
AGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGNACTAAAACTCAA
TGAATTGACGGGGGCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACC
TTACCTGGTCTTGACATAGTGAGAATCNTGCAGAGATGCGNGAGTGCCNTTCGGGAATTCACATA
CAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGC
AACCTTTTCTTATTTGCCAGCACTTNCGGGTGGGAACTCTAAGGATACTGCCAGTGACAACT
GGAGGAAGGCGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTGCTACA
ATGGTCGGTACAAAGGGTTGCTACACNGCGANGTNATGCTAATCTCAAAAAGCCGATCGTAGTCC
GGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGAATGCCG
CGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTTGTGACACCAGA
AGTAGGTAGTCTAACCTTAGGGGGGACGCTTACCACGGTGTGGCCGATGACTGGGGTGAAGTCGT
ACAAGGTANCCGTAGGGGAACCTGCGGYTGATCACCTCCTT

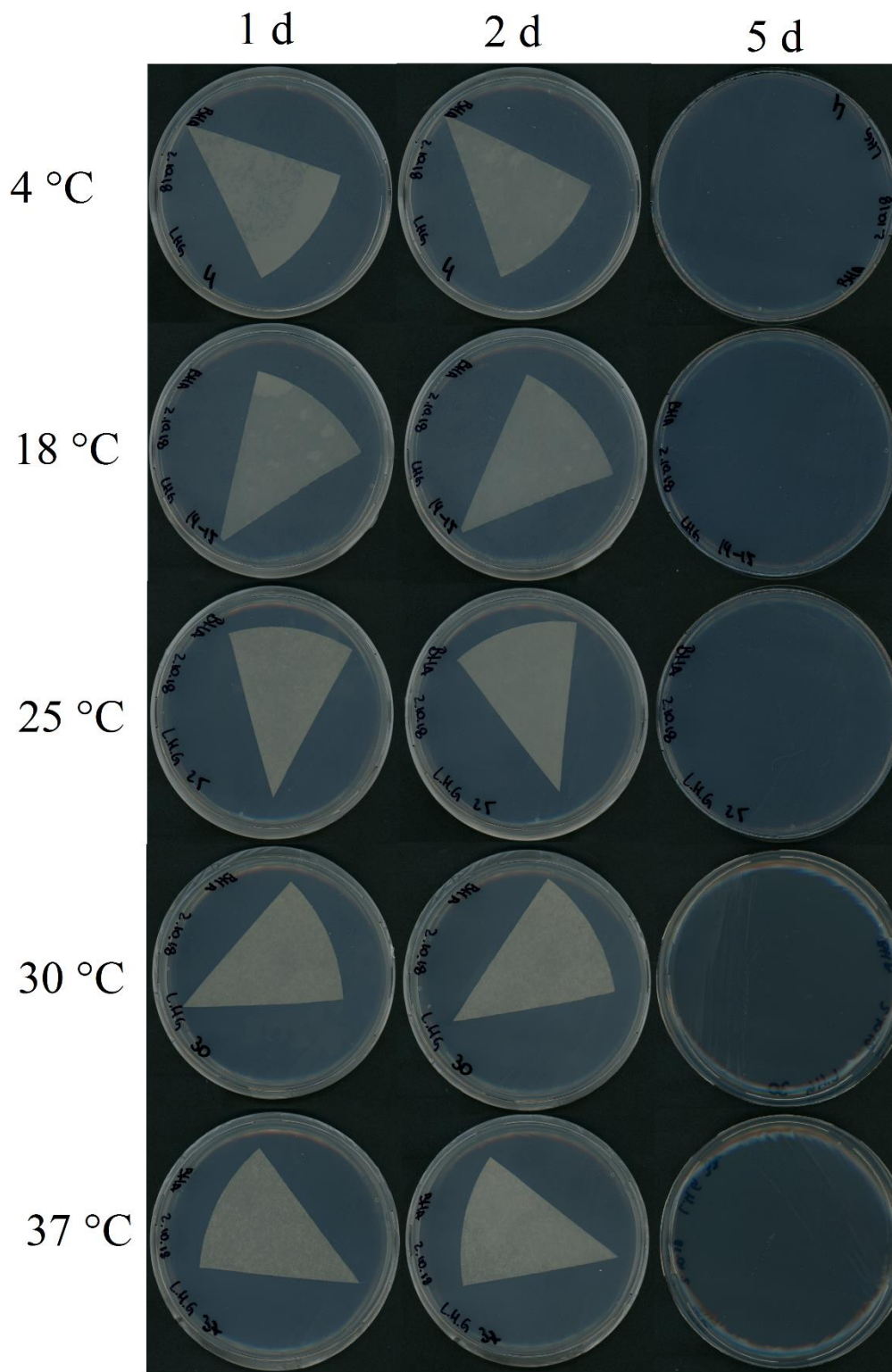
A.2 Secuencia gen *rpoB* para diseño partidior “AlkarpoB”.

ATGGCATACTCCTATACCGAAAAGAAACGGATCCGCAAGAATTTTGGTAAGTTGCCCAAT
GTAATGGACGTACCGTACTTATTGGCCATTCAGGTTGATTTCGTACCGTGCATTTTTACAG
GACGGTAAAATTTCCAAGCAACGTGAAGATGTTGGCTTGCAAGCCGCCTTCCGTTACAGTT
TTTCCTATTGTTAGCTATTCTGGGAATGCCGCATTAGAGTTTGTGAATACAATCTGGGC
CGCCCTGAGTTTGACGTGCGTGAATGTATTTTGGTGGTTCAACTTATGCTGCCCCCATG
CGTGTCAAGATTCGCCTGATCATTATGATCGTGAAACCAAATCCATTAAAGACGTGCGT
GAGCAGGAAGTTTACATGGGCGAAATTCGCTCATGACTGAAAACGGTACGTTTGTGATT
AATGGTACTGAGCGCGTAATTGTGTCCCAGTTACACCGTTCTCCTGGTGTGTTCTTTGAC
CATGACAAGGGTAAGACCCACTCGTCGGGTAAAGTGCTGTATTCTGCCCGTATTATTCCT
TACCGTGGTTCCTGGCTGGACTTTGAGTTCGATGCCAAGGATCTGGTCTATGTACGTATT
GACCGTCGCCGAAGCTGCTGGCAACCGTAGTGCTGCGTGCCTGACTGGGTATAACCACTGCT
CAGGTACTTGACCTGTTCTTTGAAAAAGTGCCGGTATATGTTGAAGACACTTATCAGATT
GATCTGGTGCCTGAACGCCTGCGCGGTGAGATGTCACAGTTTGATATTACTGATAAAGAT
GGCAAGGTGATTGTTGAGCAGGGCAAGCGGATTAATGCGCGCCATGTTCCGCCAGATGGAA
GCTGCTGGTTTAACCAAACCTGGCTGTTCTGATGAATACCTGTATGAGCGCCTGATTGCT
GAAGACATTAGCCTGAAAAATGGTGATGTGATTGAAGCTAATACTGTTATTAGCCATGAA
GTGCTGGTGAAGCTGGCAGAAGGTGGCATCAAGCAGTTTAATATCCTGTTACCAATGAC
ATTGACCGTGGTTCGTTTATTGCAGATACCCTGCGTGCTGATACCACACGTA CTCTGTA
GATGCACTGGTTGAAATCTACAAAGTCATGCGTCCGGGTGAGCCACCAACCAAGGAAGCT
GCCGAGAACCTGTTTAATAACCTGTTCTTCAGTTCTGAGCGTTATGACCTGTCGCCAGTC
GGCCGCATGAAGTTCAACCGCCGTCTGGGTGCTCCGTATGAAGTCGGCACTGACCAGAAG
TCACGCGCGATTGAAGGTATTCTCAGCAATGAAGATATTGTTGATGTACTGCGCACCCCTG
GTTGACATCCGTAACGGTAAAGGCGAAGTGGACGATATTGACCACTTGGGTAAACCGTCGT
GTGCGTTCTGTGCGTGAATGACCGAAAACAGTTCCGTGTAGGTCTGGTGC GCGTTGAA
CGTGCGGTAAAAGAGCGTTTGAATCAGGCTGAAACTGAAGGCTTATCCCCACAGGATCTG
ATCAATGCCAAGCCAGTAGCTGCTGCAATCAAGGAATCTTTGGTTCCAGCCAGTTGTCA
CAGTTTATGGATCAGAACAATCCGTTGTCTGAAATCACCCATAAGCGCCGTGTTTCTGCA
CTGGGGCCTGGTGGTTTGACCCGTGAACGTGCCGGTTTTGAAGTGCGTGACGTACACCAG
ACCCATTATGGTCGTGTATGTCCGATTGAAACGCCTGAAGGCCCAAACATTGGTCTGATC
AACTCATTATCAGTGTATGCCAAGGCCAACGATTTTGGTTTCCTGGAAACACCATAACCGT
AAAGTGGTTGATGGCCGTGTAACCGATGAAATCGAATATCTGTCAGCCATTGAAGAAAAT
GGGACTGTGATTGCACAGGCGGATTCTCCGGTTGATGCCAATGGCCAACTGCAAGATGAA

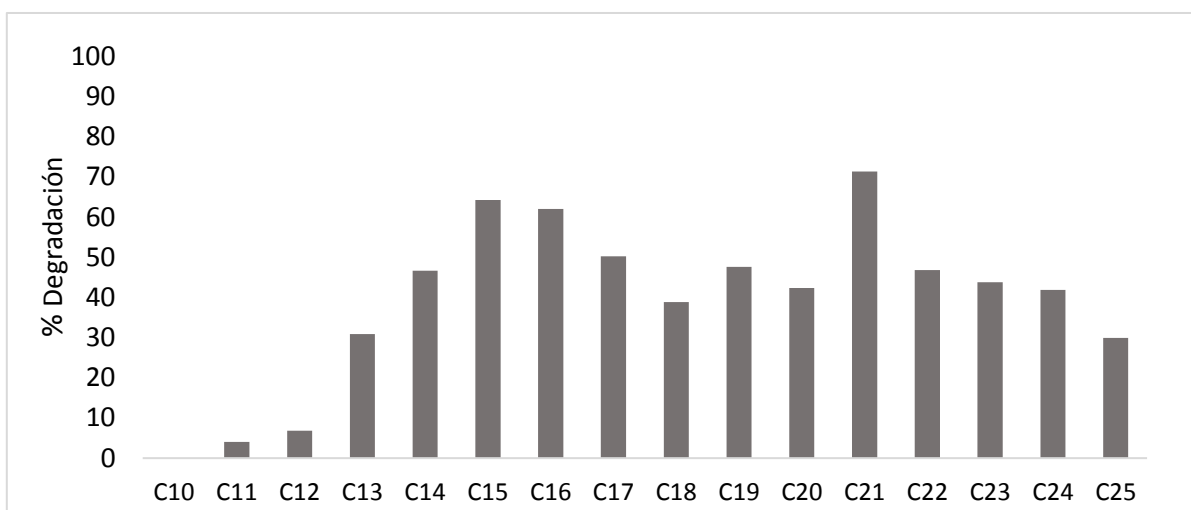
ATGGTTTCTGTGCGTGCACAGGGCGAATTTATCCGTACCAGCCCGGAAAAAGTAACCCAT
ATGGACGTGTCACCACGTCAGGTGGTTTCGGTTGCAGCAAGCTTGATTCCGTTCTGGAA
CATGACGATGCCAACCGTGCATTGATGGGTTTCGAACATGCAGCGTCAGGCAGTACCAACT
TTGCGTGCTGACAAGCCGCTGGTTCGGTACAGGCATGGAGCGCCATGTAGCACGCGATTCA
GGCGTGTGTGTGGTGGCCAAGCGTGGTGGCAAGATTGAGTATGTAGATGCCAGCCGTATC
GTGGTTCGTGTGCATGAAGAAGAAAATGCATGCAGGCGAGGCCGGTGTGACATTTATAAC
CTGATCAAATACACCCGTTCCAACCAGAACACCTGTATTAACCAGAACATTATTGTGAAT
CGCGGTGATGAAATTGCCCGTGGTGTATTTCTGGCCGACGGTCCATCAACCGATCTGGGT
GAACTGGCGCTGGGCCAAAACATGCGCGTGGCATTATGCCGTGGAATGGTTACAACCTC
GAGGATTCGATTTTGTATCCGAGCGTGTGGTTCAGGAAGACCGCTTTACCTCGATCCAC
ATTGAGGAACTGTCCTGTGTGGCGCGTGACACCAAGCTGGGTTCTGAAGAAATCACTGGC
GATATTCAAAACGTGGGTGAAGCAGCACTGTCCAAGCTGGATGAATCCGGTATTGTGTAC
ATTGGTGCAGGAAAGTCAACGCTGGTGCATTCTGGTTGGTAAAGTGACACCTAAGGGTGAA
ACCCAACCTGACGCCAGAAGAAAACTGCTGCGTGCATTTTTGGTGAAAAAGCTGCTGAC
GTGAAGGACTCTTCCTTGCGCGTTCCGTCTGGCACCAAAGGTACAGTAATTGATGTTGAG
GTATTTACCCGCGATGGTCTGGAAAAAGACGAGCGCGCGCTGGCGATTGAAAAAGCCCAG
CTGGATGCTTACCGTAAAGATTTGAAAGAAGAATATCGAATCTTTGAAGAAGCAGCCCGT
GAGCGTGTAATCCGTTTGCTGAATGGCCAGAAAGTCAATGGTGGCGGCACCACCAAGCGT
GGTGTACTGGACGACAGCATGATGTCCAGCCTTGAGCTGAATCAGTTGCTGGACGTG
CAACCCATTGATGAAGGTATTGCCGAGCGCTTGCAGCAAATCCAGGACTTCTTGCGTGAG
AAGGAAAAGGAAATTGATGACAAGTTCACCGAGAAAAAGCGCAAGCTGTCTACCGGTGAT
GAGCTGACCCATGGCGTTCTCAAAGTGGTCAAGTTTTATCTAGCCGTGAAACGTCGTATC
CAGCCGGGTGACAAGATGGCAGGCCGTCATGGTAACAAAGGTGTGGTGTCTGTCATCATG
CCGTTGAAGACATGCCATATGATGAAAACGGTGTACCGGTTGATGTGGTGTAAATCCG
CTGGGTGTACCATCACGGATGAACGTGGTTCAGATTCTGAAACGCATTTGGGTCTGGCT
GCCAAAGGTCTGGGTCAGAAGATCGACAAGATGTTGCAACAGCAGCGTCAGGCTGCCGAG
CTGCGTGAGTTCATGGACAAGATCTACAATCAGGTCGGTGGCGAGCAGGAAACCCTGAAC
GAGCTGACTGATGATGAAGTGATTAGTCTGGCTCAAAACCTCAAGGGCGGTGTACCGATT
GCAACGCCAGTATTTGATGGTGCAGAAGAAACCCAGATCAAGCAATTGCTGAAACTGGCT
GACCTGTCCGAAACTGGCCAGCAGGTACTGTACGATGGCCGTACTGGTGACCGTTTTGAC
CGTCCTGTAACCGTGGGTTATATGTACATGCTCAAACTCAACCACTTGGTGGATGACAAG
ATGCATGCGCGTTCTACCGTTCTTACTCATTGGTTCAGCAACAGCCATTGGGTGGTAAA
GCCAGTTTTGGTGGCCAGCGCTTCGGTGTAGATGGAAGTGTGGGCACTGGAAGCTTATGGT

GCAACCTACACCCTGCAGGAAATGCTGACTGTGAAATCGGATGACGTCGAAGGACGTACC
CGCATTTACAAGAACATTGTCGATGGCAATCACTATATGGATCCGGGCATGCCTGAATCG
TTCAATGTACTGACCAAGGAAATTCGTTCTTTGGGTATTAACATTGAACTTAAAAATGGT
GAC

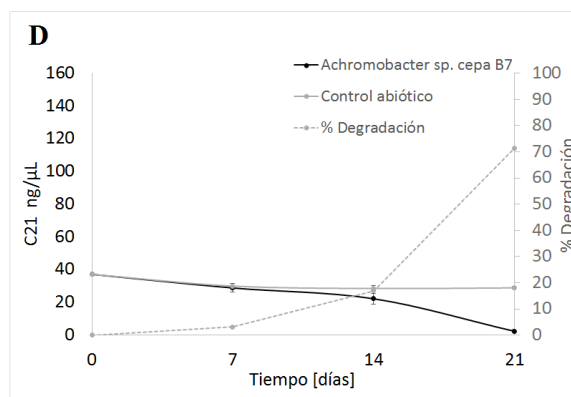
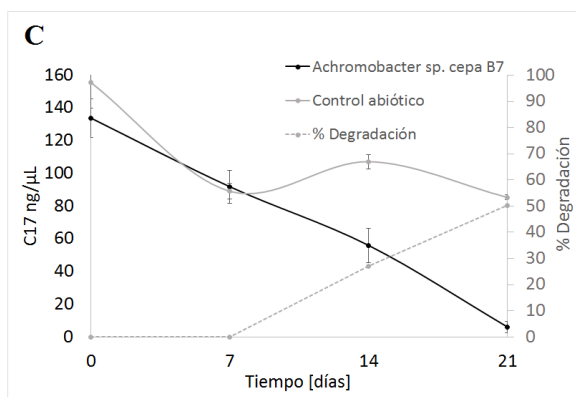
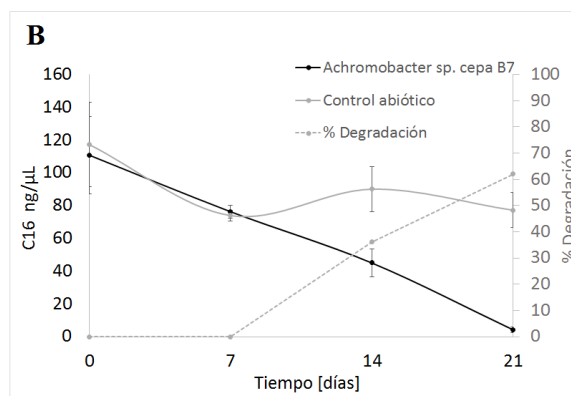
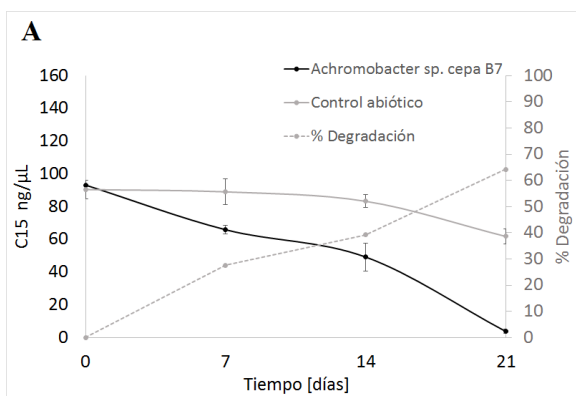
A.3 Efecto de la temperatura sobre el crecimiento de *Achromobacter* sp. B7 en medio BH, con diésel como única fuente de carbono. Papel filtro en contratapa embebido con diésel.



B.2 Degradación de componentes de la fracción C10 – C25 de hidrocarburos.



B.3 Degradación de hidrocarburos específicos. A: Degradación C15. B: Degradación C16. C: Degradación C17. D: Degradación C21.



9.3 Anexo C

C.1 Metodología secuenciación genoma, Valentina Méndez.

Para el aislamiento de ADN genómico, *Achromobacter* sp. B7 se cultivó en agar TSA a 37°C. La lisis de células bacterianas de un cultivo puro se realizó en tampón EDTA-solución salina (NaCl 0,15 M, EDTA 0,01 M, pH 8,0) con lisozima 10 mg / ml durante 2 ha 37°C. El ADN genómico se aisló usando el kit de purificación de ADN genómico Wizard. El ADN se secuenció con un instrumento Illumina HiSeq (GATC Biotech, Alemania), generando 10,102,770 lecturas finales de 151 pb, lo que arroja un total de 1,525.5 Mb. Las lecturas de secuencia se recortaron con la versión 1.33 de Sickle y se ensamblaron de novo utilizando SPAdes versión 3.11.1. El recorte de la secuencia muestra 9,850,646 lecturas del final del par (96.5% de los datos de la secuencia inicial) con un promedio de 151 bp.

10. Publicaciones y participación en congresos.

Méndez, V., Hernández L., Salvà-Serra F., Jaén-Luchoro D., Durán R. E., Barra B., Piñeiro-Iglesias B., Moore E. R. B. & Seeger M. 2018. Complete genome sequence of the hydrocarbonoclastic strain *Achromobacter* sp. B7, isolated during petroleum hydrocarbon bioremediation in Valparaiso Region, Chile. **Microbial Resource Announcements**. Accepted.

Hernández L., Barra-Sanhueza L., Durán R E. & Seeger M. 2018. Aislamiento y caracterización de la bacteria hidrocarbonoclástica *Achromobacter* sp. B7 y su aplicación en biorremediación de hidrocarburos. **XXIV Congreso Latinoamericano de Microbiología ALAM**. 13 al 16 Noviembre 2018. Santiago, Chile. Aceptado.

Barra Sanhueza Bárbara, Hernández Lisette, Durán Roberto, González Myriam, Seeger Michael. 2018. Efecto de la bioestimulación con saponinas de Quillaja saponaria Molina y la bioaumentación con un consorcio bacteriano sobre la degradación de hidrocarburos y las comunidades bacterianas en agua marina contaminada. **XXIV Congreso Latinoamericano de Microbiología ALAM**. 13 al 16 Noviembre 2018. Santiago, Chile. Aceptado.

Seeger, M., Méndez, V., Villegas, P., Orellana, R., Barra, B., Vega-Celedón, P., Durán, R., Hernández, L., Álvarez-Santullano, N., González, A., Macaya, C., González, M., Rojas, M.M., Carballo, M.E. 2018. Extremophiles and their potential for bioremediation and the production of bioplastics. **XXXIII Congreso Latinoamericano de Química y X Congreso de Ciencias, Tecnología e Innovación Química**. 9 al 12 de octubre de 2018, La Habana, Cuba.

11. Financiamiento.

Esta tesis de pregrado fue desarrollada gracias al financiamiento de:

Beca de Gastos Operacionales CONICYT 2013-21130742, Bárbara Barra Sanhueza.

Proyecto FONDECYT 1151174.

Proyecto Anillo GAMBIO ACT172128.

Proyecto INES FSM1402B.