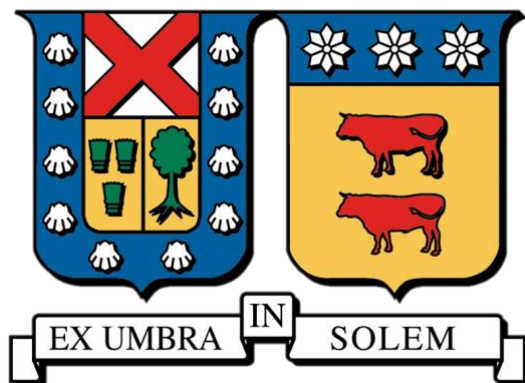


UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y AMBIENTAL



ASLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS

HIDROCARBONOCCLÁSTICAS AISLADAS DESDE SUELOS COSTEROS Y EVALUACIÓN DE
SU POTENCIAL BIODEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS

DOMÍNICA XIMENA QUEZADA TOBAR

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO CIVIL AMBIENTAL

PROFESOR GUÍA 1: MICHAEL SEEGER

PROFESOR GUÍA 2: SANTIAGO GARCÍA

PROFESOR CO-REFERENTE: ROBERTO E. DURÁN

Noviembre-2024

Resumen

Los ambientes costeros son afectados por la actividad antropogénica, donde los hidrocarburos (HC) son contaminantes relevantes en estos sistemas. Los procesos de biorremediación utilizan microorganismos para la recuperación de ambientes contaminados, mejorando el crecimiento de bacterias nativas degradadoras. Enriquecimientos microbianos frente a contaminantes recalcitrantes como los hidrocarburos aromáticos (e.g. fluoranteno) nos permiten obtener aislados con capacidades catabólicas específicas. *Alcanivorax*, *Cycloclasticus*, *Marinobacter*, *Rhodococcus*, *Alcaligenes* son géneros con la capacidad de degradar HC frecuentemente aislados en ambientes costeros. El objetivo de este estudio es aislar y caracterizar bacterias degradadoras de hidrocarburos (i.e., hidrocarbonoclasticas) desde ensayos de biorremediación y enriquecimiento de suelo costero contaminado (Viña del Mar). Dos enfoques para el aislamiento fueron realizados; diluciones seriadas desde un experimento de biorremediación de suelo costero en medio rico TSA o en medio mínimo marino (ONR7a) en presencia de diésel o BTEX, respectivamente; ensayos de enriquecimiento con estireno (1% v/v) o fluoranteno (100 mg/L) en medio mínimo ONR7a. Las cepas aisladas desde medios TSA, MA y ONR7a fueron identificadas mediante extracción de DNA, amplificación del gen 16S ARNr (27F, 1492R) y posterior secuenciación parcial (800R). Se aislaron 200 cepas tolerantes a diésel, 60 tolerantes a BTEX, 81 tolerantes a fluoranteno y 27 tolerantes a estireno. De las 368 cepas, se identificaron 243 a nivel de género, distribuidos en 4 filos (*Pseudomonadota*, *Actinomycetota*, *Bacteroidota*; *Bacillota*), 8 clases, 16 órdenes, 27 familias y 50 géneros. Se obtuvieron géneros previamente reportados como hidrocarbonoclasticos, incluyendo *Alloalcanivorax*, *Isoalcanivorax*, *Arthrobacter*, *Dietzia*, *Marinobacter*, *Kocuria*, *Variovorax*, además de cepas que podrían representar nuevos géneros bacterianos. Además, se evaluó el rango de pH y crecimiento utilizando HC en seis cepas, utilizando caldo marino (MB) pH 5,35–9,51 y medio ONR7a con diésel, BTEX, estireno y fluoranteno como única fuente de carbono, respectivamente. Las cepas del género *Alcanivorax* e *Isoalcanivorax* crecieron en caldo marino (MB) entre pH 6,9–9,5 y utilizan diésel como fuente de carbono, lo que resalta su potencial para procesos de biorremediación. La bioprospección y evaluación de cepas hidrocarbonoclasticas desde ambientes

costeros nos permite diversificar las cepas disponibles para procesos de biorremediación adecuados a las condiciones sitio-específicas de cada ecosistema.

Abstract

Isolation and Characterization of Hydrocarbonoclastic Bacterial Strains from Coastal Soils and Evaluation of Their Aromatic Hydrocarbon Biodegradation Potential

Coastal environments are affected by anthropogenic activities, with hydrocarbons (HC) being significant contaminants in these ecosystems. Bioremediation processes use microorganisms to restore contaminated environments, enhancing the growth of native degrading bacteria. Enrichment experiments allow the isolation of strains with specific metabolic capabilities, particularly against recalcitrant compounds such as aromatic hydrocarbons (e.g., fluoranthene). *Alcanivorax*, *Cycloclasticus*, *Marinobacter*, *Rhodococcus*, and *Alcaligenes* are genera frequently isolated from coastal environments with the capacity to degrade HC. The objective of this study is to isolate and characterize hydrocarbon-degrading bacteria (i.e., hydrocarbonoclastic) from bioremediation and enrichment assays in hydrocarbon-contaminated coastal soil (Viña del Mar). Two approaches were carried out: serial dilutions from a coastal soil bioremediation experiment in a rich medium (TSA) or minimal marine medium (ONR7a) in the presence of diesel or BTEX, respectively; and enrichment assays with styrene (1% v/v) or fluoranthene (100 mg/L) in ONR7a. The strains isolated from TSA, MA, and ONR7a media were identified through DNA extraction, 16S gene amplification (27F, 1492R), and subsequent partial sequencing (800R). A total of 200 diesel-tolerant, 100 BTEX-tolerant, 81 fluoranthene-tolerant, and 27 styrene-tolerant strains were isolated. Of the 408 strains, 243 were identified at the genus level, spanning 4 phyla (*Pseudomonadota*, *Actinomycetota*, *Bacteroidota*, *Bacillota*), 8 classes, 16 orders, 27 families, and 48 genera. Hydrocarbonoclastic genera previously reported, including *Alcanivorax*, *Alloalcanivorax*, *Isoalcanivorax*, *Arthrobacter*, *Dietzia*, *Marinobacter*, *Kocuria*, and *Variovorax*, were obtained, in addition to strains that may represent novel bacterial genera. Furthermore, the pH range and growth using HC were evaluated in six strains using marine broth (MB) at pH 5.35–9.51 and ONR7a medium with diesel, BTEX, styrene, and fluoranthene as the sole carbon sources, respectively. Strains from the genera *Alcanivorax* and *Isoalcanivorax* grew in marine

broth (MB) at pH 6.9-9.5 and utilized diesel as a carbon source, highlighting their potential for bioremediation processes. The bioprospecting and evaluation of hydrocarbonoclastic strains from coastal environments enable the diversification of strains available for bioremediation processes for the site-specific conditions of each ecosystem.

Agradecimientos

Agradezco sinceramente a todas las personas que me han acompañado estos años en mi carrera universitaria, tanto a mis amigos, como a mi familia y los miembros del laboratorio LAMMBA. He tenido el lujo de conocer a personas maravillosas que me han guiado y me han dado la mano en cada paso que he dado, por mi parte no haré más que devolver y duplicar la ayuda que se me ha brindado, siempre recordando y honrando mis comienzos y mi crecimiento.

Debo destacar y agradecer en especial a Robert, quien con toda su paciencia y expertiz me recibió con los brazos abiertos para ser un gran tutor y amigo. Quedará en mis mejores recuerdos esa noche que terminamos la extracción orgánica del experimento de los 108 viales y salimos entre medio a celebrar y compartir. Fue un gusto tremendo trabajar y aprender a su lado.

Espero que todas las personas que admiro y aprecio puedan sentir la enorme gratitud que siento hacia ellas. No las mencionaré a cada una, pero las recuerdo constantemente en cada paso que voy dando.

Contenido

Resumen.....	2
Abstract	3
Agradecimientos	5
Lista de Tablas	9
Lista de Figuras.....	10
Nomenclatura	12
Introducción	13
Objetivos y Alcances	16
Objetivo general.....	16
Objetivos específicos	16
Marco Teórico.....	17
Hidrocarburos del petróleo: clasificación y susceptibilidad a la biodegradación	17
Hidrocarburos aromáticos: tipos, características y su impacto en el medio ambiente.....	18
Contaminación por hidrocarburos en Chile: normativa ambiental	21
Bacterias hidrocarbonoclásticas degradadoras de compuestos recalcitrantes	23
Diversidad y aislamiento de cepas hidrocarbonoclásticas	24
Materiales y Métodos.....	26
Reactivos.....	26
Medios de cultivo.....	26

Obtención de enriquecimientos bacterianos hidrocarbonoclásticos	27
Aislamiento de bacterias hidrocarbonoclásticas tolerantes a estireno y fluoranteno	27
Identificación taxonómica de aislados bacterianos mediante secuenciación parcial del gen 16S ARNr.....	29
Análisis filogenético del gen 16S ARNr de aislados identificados	31
Crecimiento de cepas de interés a diferentes pH y fuentes de carbono	31
Evaluación de capacidad hidrocarbonoclástica de cepas de interés	32
Construcción de consorcios degradadores simplificados para estireno y fluoranteno.....	33
Extracción y cuantificación de estireno y fluoranteno mediante HPLC-DAD.....	33
Resultados	34
Aislamiento e identificación de bacterias hidrocarbonoclásticas	34
Enriquecimiento bacteriano con fluoranteno o estireno	37
Construcción de un Consorcio Degradador Simplificado	41
Caracterización y evaluación de capacidad hidrocarbonoclástica de cepas de interés	42
Discusión.....	48
Aislamiento e identificación de bacterias hidrocarbonoclásticas	48
Construcción de Consorcio Degradador Simplificado	53
Caracterización y evaluación de capacidad hidrocarbonoclástica de cepas de interés	54
Conclusiones	57
Referencias.....	59

Anexo.....	71
------------	----

Lista de Tablas

Tabla 1: Susceptibilidad a biodegradación. Adaptado de (Tikka et al., 2023)	18
Tabla 2: Ejemplos de especies degradadoras de fluoranteno (Reddy et al., 2018) y de estireno (Mooney et al., 2006).....	24
Tabla 3: Partidores utilizados para la secuenciación parcial del gen 16S y la identificación de bacterias aisladas (Macrogen, 2022).....	30
Tabla 4: Perfil térmico usado en el PCR.....	30
Tabla 5: Hidrocarburos seleccionados para probar capacidad hidrocarbonoclástica de las cepas seleccionadas.....	32
Tabla 6: Cepas identificadas a partir de aislamiento de bacterias enriquecidas con fluoranteno .	39
Tabla 7: Géneros identificados a partir del enriquecimiento con estireno.....	40
Tabla 8: Valores máximos de turbidez para las cepas enriquecidas en diésel y BTEX a distintos pH en medio MB.....	45
Tabla 9: Valores máximos de turbidez para las cepas enriquecidas con fluoranteno y estireno en distintos pH en medio MB	46
Tabla 10: Géneros aislados con poca o nula evidencia de degradación de hidrocarburos y/o escasamente documentados hasta la fecha.....	52

Lista de Figuras

Figura 1: Clasificación química de los hidrocarburos. Adaptado de (Daher Hazaimah & Ahmed, 2021)	17
Figura 2: Estructuras químicas de hidrocarburos aromáticos	19
Figura 3: Estructura química de estireno y poliestireno	20
Figura 4: Estructura química del fluoranteno	21
Figura 5: Esquema del procedimiento de enriquecimiento y aislación de bacterias con hidrocarburos aromáticos como fuente de carbono. Elaboración propia.....	29
Figura 6: Esquema de procedimiento experimental para obtener curvas de crecimiento en medio MB con diferentes pH.....	32
Figura 7: Géneros identificados a partir de aislamiento de bacterias enriquecidas con diésel y BTEX	36
Figura 8: Árbol filogenético de cepas con porcentaje de identidad entre 94.8% y 98.7% aisladas a partir de columnas de biorremediación.....	37
Figura 9: Crecimiento de cepas seleccionadas provenientes del enriquecimiento bacteriano utilizando fluoranteno en medios TSA, MA y ONR7a.....	38
Figura 10: Árbol filogenético de las cepas identificadas a partir del enriquecimiento con Fluoranteno	39
Figura 11: Árbol filogenético de las cepas identificadas a partir del enriquecimiento con Estireno	40
Figura 12: Concentración relativa de Fluoranteno en los viales, en base al área bajo la curva de los	

cromatogramas obtenidos	42
Figura 13: Concentración relativa de Estireno en los viales, en base al área bajo la curva de los cromatogramas obtenidos	42
Figura 14: Medición de turbidez a lo largo del tiempo de las cepas marinas seleccionadas en medio MB	43
Figura 15: Medición de turbidez a lo largo del tiempo de las cepas seleccionadas en medio ONR7a	44
Figura 16: Medición de turbidez a lo largo del tiempo de las cepas seleccionadas en medio MB44	
Figura 17: Crecimiento de cepas seleccionadas utilizando Acetato, BTEX, Diésel, Estireno y Fluoranteno	47

Nomenclatura

Sigla	Significado
BTEX	Benceno, tolueno, etilbenceno, xileno
CN	Control negativo
EPA	Agencia de Protección Ambiental
HC	Hidrocarburos
MA	Agar marino
MAH	Hidrocarburos aromáticos monocíclicos
MB	Caldo marino
PAH	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
TPH	Hidrocarburos totales del petróleo
TSA	Agar de soja tróptica
TSB	Caldo de soja tróptica

Introducción

El petróleo es un recurso natural que consiste en una mezcla compleja de hidrocarburos (HC) y se encuentra de forma natural en reservorios submarinos, producto de la descomposición de material orgánica tras miles de años. Los hidrocarburos se componen en su mayoría de carbono e hidrógeno, composición que, junto con su estructura química, determinan su tamaño y propiedades fisicoquímicas. Entre los hidrocarburos del petróleo se encuentran *n*-alcanos, hidrocarburos aromáticos policíclicos, otros compuestos como sulfuros, nitruros, ácidos alcanoicos y metales orgánicos como vanadio y níquel. De acuerdo con la estructura química de estos compuestos, estos hidrocarburos se pueden clasificar en alifáticos, aromáticos, resinas y asfaltenos.(Li et al., 2022; Rodríguez Castro et al., 2022)

El petróleo como materia prima es utilizado para producir múltiples productos industriales como plástico, solventes, fertilizantes, pesticidas, tintes, textiles, combustible, gas, diésel, entre otros (Rodríguez Castro et al., 2022). La producción de petróleo, a pesar de los esfuerzos por alcanzar una descarbonización global, sigue jugando un papel clave dentro de la economía a escala mundial. Actualmente se producen alrededor de 100 millones de barriles diarios, un 22% de ellos producidos por Estados Unidos, 11% por Arabia Saudita y 11% por Rusia (U.S. EIA, 2024).

La extracción de petróleo y su posterior transporte son causantes importantes de derrames de estos compuestos al medioambiente. Se estima que cada año se vierten entre 10 y 70 millones de barriles de HC al mar (Daher Hazaimah & Ahmed, 2021). Si bien la cantidad vertida es solo una pequeña fracción del total producido y distribuido a nivel mundial, el alto impacto que este tiene sobre los ecosistemas lo hace un problema grave que requiere atención. Una vez que los

hidrocarburos (HC) del petróleo entran en contacto con el suelo producen cambios en sus propiedades fisicoquímicas y alteran su microbioma (Stepanova et al., 2022). Los HC generan intoxicaciones neurológicas, cáncer, acumulación en tejidos y son compuestos difíciles de degradar (Borowik et al., 2019). Además, la estabilidad de estas moléculas debido a sus cadenas de carbono e hidrógeno permiten su acumulación dentro de seres vivos, como también su persistencia en el agua, aire y suelo por largos periodos de tiempo. (Ladino-Orjuela et al., 2016; Daher Hazaimah & Ahmed, 2021). Debido este alto impacto, los derrames y filtraciones de HC en ambientes naturales son un problema que requieren atención y acción.

Las técnicas tradicionalmente utilizadas para limpiar las áreas afectadas por derrames de petróleo incluyen métodos fisicoquímicos, como el uso de dispersantes o solidificantes, adsorbentes, desnatadores, incineración, entre otras. Sin bien estas técnicas son de rápida acción y logran un alto porcentaje de remoción de contaminantes, son costosas y muchas veces destructivas, impidiendo o ralentizando la recuperación biológica de la zona (Koshlaf & Ball, 2017). Una alternativa que ha comenzado a recibir más atención y desarrollo es la biorremediación. La biorremediación es una tecnología que se basa en la metabolización natural de compuestos tóxicos por microorganismos, proceso que es manipulado mediante biotecnología para acelerar la descontaminación. En comparación con las técnicas tradicionales, la biorremediación es más lenta, pero también menos costosa, menos invasiva con la zona a tratar y en muchos casos logra llegar a la mineralización completa del contaminante (Koshlaf & Ball, 2017; Daher Hazaimah & Ahmed, 2021). Esta técnica utiliza organismos vivos como plantas, hongos y/o bacterias para lograr la descontaminación, siendo las bacterias la opción más ampliamente estudiada para estos propósitos (Macaya et al., 2019).

Las bacterias degradadoras de hidrocarburos (i.e. hidrocarbonoclasticas) son capaces de

utilizar hidrocarburos del petróleo como fuente de carbono y energía, y son especialmente útiles para su uso en biorremediación. Estas se encuentran de forma natural en una proporción mínima en el medio ambiente y aumentan cuando aumenta la presencia de hidrocarburos a su alrededor (Rodríguez Castro et al., 2022). Con la presencia de hidrocarburos comienza el proceso de degradación en varias etapas. Los compuestos más propensos a ser metabolizados en orden descendiente son los *n*-alcanos, seguidos por alcanos alquilados, compuestos aromáticos de bajo peso molecular, cicloalcanos y por último compuestos aromáticos policíclicos (Stepanova et al., 2022). Algunas bacterias que han demostrado degradación de hidrocarburos del petróleo incluyen especies de los géneros *Cycloclasticus*, *Marinobacteri*, *Alcanivorax*, *Atermonadales*, *Colwellia*, *Oceanospirillum*, *Rhodococcus*, *Alcaligenes*, entre otras (Dombrowski et al., 2016; Kleindienst et al., 2016; Gutierrez et al., 2018; Yalaoui-Guellal et al., 2020; Daher Hazaimah & Ahmed, 2021). En Chile se han aislado bacterias hidrocarbonoclásticas desde diversas matrices ambientales, más su estudio y bioprospección son un tema relativamente nuevo en los últimos 10 años. Aumentar el conocimiento de este tipo de bacterias es relevante para contribuir con el desarrollo de técnicas de biorremediación sitio-específicas con bacterias nativas.

En esta memoria se plantea el aislamiento y caracterización de bacterias hidrocarbonoclásticas provenientes de suelo del terreno de Salinas, un sector crónicamente contaminado con hidrocarburos del petróleo. Su estudio será abordado mediante técnicas microbiológicas de aislamiento, enriquecimiento con hidrocarburos, extracción de ADN con técnicas de biología molecular e identificación a nivel de género con secuenciación parcial del gen 16S ARNr. Como hidrocarburos se utilizará benceno, tolueno, etilbenceno, xileno (BTEX), diésel, estireno y fluoranteno. Esto últimos son de especial interés debido a la falta de conocimiento de su biodegradación, su alta toxicidad y larga permanencia en el medio ambiente.

Objetivos y Alcances

Objetivo general

Aislar y caracterizar cepas bacterianas hidrocarbonoclásticas desde suelos costeros y sedimentos marinos contaminados con hidrocarburos en la región de Valparaíso.

Objetivos específicos

- Aislar e identificar cepas bacterianas hidrocarbonoclásticas provenientes de suelos contaminados por hidrocarburos
- Seleccionar y caracterizar cepas bacterianas capaces de biodegradar hidrocarburos aromáticos (e.g estireno, fluoranteno)
- Evaluar la capacidad de biodegradación de cepas hidrocarbonoclásticas seleccionadas

Marco Teórico

Hidrocarburos del petróleo: clasificación y susceptibilidad a la biodegradación

El petróleo se compone en su mayor parte de hidrocarburos; compuestos químicos formados exclusivamente por enlaces covalentes entre carbono e hidrógeno. Los hidrocarburos del petróleo son un grupo químicamente diverso, con más de 250 compuestos diferentes, por lo que existen distintos criterios para su clasificación (ATSDR, 1999). Según su composición química, se pueden dividir en cuatro clases, como se muestra en la Figura 1.

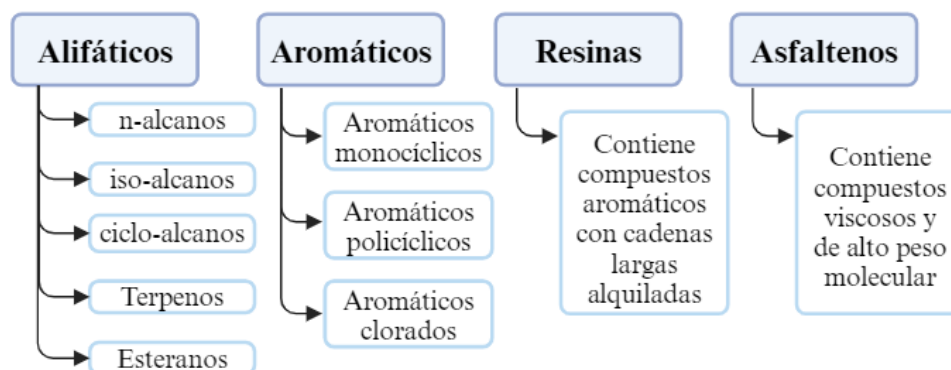


Figura 1: Clasificación química de los hidrocarburos. Adaptado de (Daher Hazaimah & Ahmed, 2021)

La estructura química de los HC juega un rol en la forma en que los organismos interactúan con ellos en el medio ambiente y puede facilitar o dificultar que sean degradados (Tikka et al., 2023). La biodegradación es un concepto que aborda todos los procesos químicos llevados a cabo por enzimas producidas por organismos vivos y que llevan a la metabolización de compuestos susceptibles. Los *n*-alcanos son los HC más estables y abundantes en el petróleo y en general también los más propensos a ser biodegradados. Los alcanos ramificados son menos biodegradables y los cicloalcanos son altamente resistentes a la biodegradación (Tikka et al., 2023; Timmis, 2010). En la Tabla 1 se muestra un resumen de la susceptibilidad a la

biodegradación según la clasificación química de los hidrocarburos. Además de la estructura química, también juegan un rol en su degradación las condiciones ambientales, la composición química de la mezcla, sus propiedades fisicoquímicas, la biodisponibilidad de los compuestos, así como la diversidad de la comunidad microbiana.

Tabla 1: Susceptibilidad a biodegradación. Adaptado de (Tikka et al., 2023)

Susceptibilidad general	Clase	Susceptibilidad relativa a biodegradación dentro de la clase
Mayor  Menor	n-alcanos	C ₃ -C ₈ -C ₁₂ >~C ₁₂ -C ₁₅ >C ₁₅ +
	iso-alcanos	Menor > mayor sustitución alquílica
	Terpenos	Menor PM > pristano, fitano > mayor PM > acíclicos > policíclicos
	Aromáticos	Monocíclico > policíclico ; 1 anillo > 2 anillos > 3 anillos > 4-5 anillos
	Aromáticos sustituidos con alquilos	Sin substituir > Substuidos con alquilos; metil y dimetil > trimetil o más
	Alcanos cíclicos y esteroides	Ciclo-alcanos simples > ciclo-alcanos complejos > esteroides aromáticos
	Resinas	Simplees > complejos
	Asfaltenos	Biodegradación poco probable

La biodegradación de HC ha permitido el desarrollo de estrategias de descontaminación ambiental, como la biorremediación de suelos. Este enfoque se basa en el uso de la capacidad metabólica de organismos vivos, como plantas, hongos y bacterias, para degradar compuestos contaminantes como los HC (de Lorenzo, 2008). Para que la biorremediación sea efectiva se deben conocer y emplear organismos que tengan afinidad específica con los contaminantes presentes en el sitio afectado. Como se ve en la Tabla 1, los hidrocarburos aromáticos son menos susceptibles a la biodegradación en comparación con los alcanos, lo que subraya la importancia de estudiar y seleccionar organismos capaces de tolerar su toxicidad y llevar a cabo su metabolización.

Hidrocarburos aromáticos: tipos, características y su impacto en el medio ambiente

Los hidrocarburos aromáticos son compuestos que contienen un anillo de benceno en su

estructura, se caracterizan por ser químicamente estables y pueden ser separados en hidrocarburos aromáticos monocíclicos (MAH) y policíclicos (PAH) según la cantidad de anillos de benceno que poseen. Los MAH son biodegradables, relativamente solubles en agua y tóxicos en altas concentraciones (Tikka et al., 2023). En esta clasificación se encuentran compuestos ampliamente estudiados como el grupo BTEX (Benceno, Tolueno, Etilbenceno y Xilenos) que son los hidrocarburos aromáticos con mayor distribución en el medio ambiente por ser los más volátiles y solubles en agua (Rodríguez Castro et al., 2022). Los PAHs son menos susceptibles a ser biodegradados en parte debido a su menor solubilidad en agua y su menor biodisponibilidad (Tikka et al., 2023). En esta clasificación se tienen compuestos más complejos, como el antraceno, fenantreno, benzo(a)pireno o criseno.

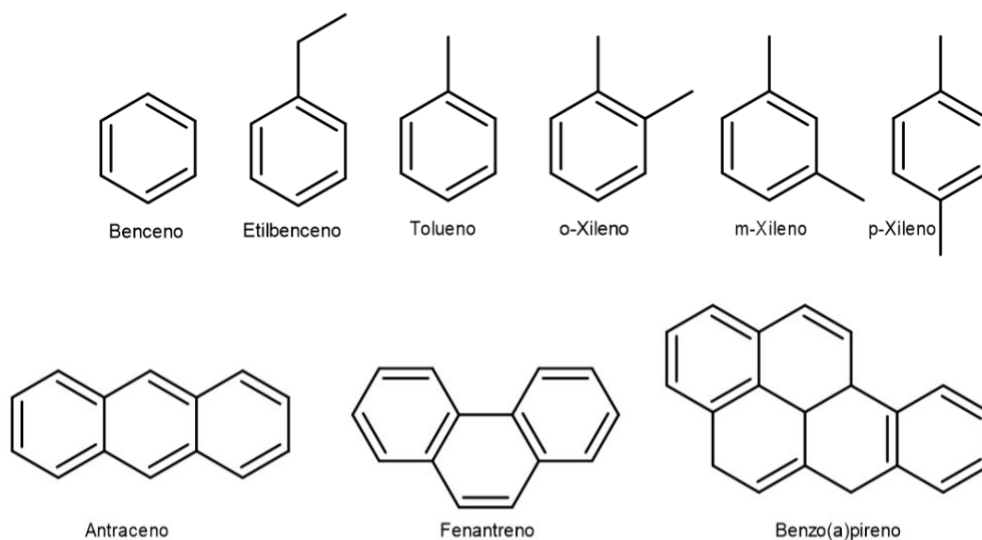


Figura 2: Estructuras químicas de hidrocarburos aromáticos

Un ejemplo interesante de MAH es el estireno, monómero del poliestireno, plástico ampliamente utilizado a nivel mundial. Un ejemplo de PAHs es el fluoranteno, que es considerado un buen representante de esta clasificación debido a su gran abundancia en el medio ambiente. El estudio de ambos compuestos, estireno y fluoranteno, es relevante debido a la

limitada evidencia acerca de su degradación por bacterias y su alta toxicidad y serán por ende utilizados dentro de este trabajo. Es importante ampliar el conocimiento respecto a la biodegradación de HC aromáticos para sentar bases para poder gestionar estos contaminantes y desarrollar estrategias para su remoción.

El estireno es uno de los monómeros aromáticos más simples e importantes debido a su amplia aplicación industrial. Es producido a partir de petróleo para su polimerización industrial, siendo utilizado para manufacturar plásticos, goma, aislantes, fibra de vidrio, tuberías, partes de automóviles, recipientes de alimentos y respaldos de alfombras, entre otros productos. El 65% de su demanda es para producción de poliestireno, uno de los termoplásticos menos costosos y más ampliamente utilizado (Kirk-Othmer, 2006; National Center for Biotechnology Information, 2023b). El estireno está dentro de la lista del Código Marítimo Internacional De Mercancías Peligrosas (OMI, 2011) y del Inventario de Sustancias Químicas del Acta de Control de Sustancias Tóxicas (TSCA) de Estados Unidos, además se estar clasificado como carcinogénico dentro del grupo 2A (probablemente carcinogénico para humanos)(Kogevinas et al., 2018). Este MAH es medianamente tóxico e inflamable (National Center for Biotechnology Information, 2023b).

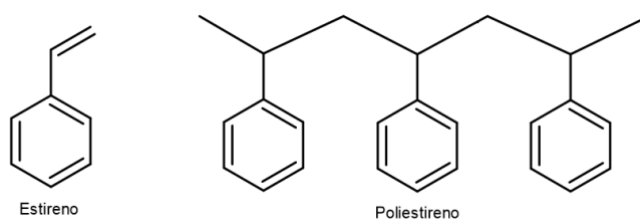


Figura 3: Estructura química de estireno y poliestireno

El fluoranteno tiene una estructura química más compleja en comparación con el estireno. Está formado por un anillo de naftaleno unido a un anillo de benceno conectado por un anillo de 5 carbonos. (National Center for Biotechnology Information, 2023a). El fluoranteno es un buen

representante de los PAHs, ya que es de los PAHs más presentes en ambientes acuáticos y presenta la toxicidad característica de este grupo; es genotóxico, mutagénico, carcinogénico y se ha visto que es capaz de inducir toxicidad neuroconductual, afectar el sistema inmune y la salud de los pulmones humanos. Está dentro del grupo 3 de carcinógenos por la Agencia Internacional de Investigación de Cáncer y está incluido dentro de la lista de contaminantes prioritarios de la Agencia de Protección Ambiental (EPA) de USA. (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 1995; Reddy et al., 2018; Narayanan et al., 2024)

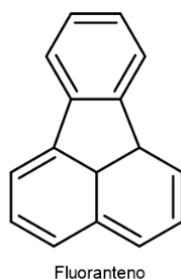


Figura 4: Estructura química del fluoranteno

Contaminación por hidrocarburos en Chile: normativa ambiental

La contaminación por hidrocarburos ha sido un problema en distintas localidades de Chile. Se han registrado varios derrames de petróleo en el país, siendo de los más significativos el ocurrido en 2014 en la bahía de Quintero, provocado por la ruptura de un oleoducto submarino y en que se vertieron aproximadamente 22.000 litros de petróleo (El Mercurio, 2014). Otro gran derrame ocurrió en la Isla Guarello en Puerto Natales resultado de una operación de trasvasije de petróleo en tierra con un vertimiento de 40.000 litros en 2019 (El Mercurio, 2019). En la Región de Valparaíso, además de ocurrir derrames de petróleo, también existe contaminación por fugas de hidrocarburos debido a la actividad de industrias que refinan y/o almacenan esta materia prima. En Viña del Mar el sector “Las Salinas” sirvió como sede de actividades relacionadas con el

almacenamiento de combustibles y petroquímicos, desde aproximadamente 1919 hasta el año 2003. Actualmente aún posee residuos de contaminación de hidrocarburos debido a la actividad realizada en la zona. La línea base del proyecto de “Saneamiento del Terreno Las Salinas” reportó que en muestras superficiales del suelo del sitio había presencia de hidrocarburos totales del petróleo, bifenilos policlorados y PAHs como benzo(ghi)perileno con valores que excedían valores referenciales como aceptables para uso residencial/área verde según Decreto Legislativo N° 152/2006 de Italia (Golder Associates S.A., 2018).

A pesar de la existencia y gravedad de la contaminación por hidrocarburos, actualmente la ley chilena solo regula esta contaminación por hidrocarburos en cuerpos de agua. La resolución exenta 309 del año 2023 da comienzo a la elaboración del anteproyecto de la norma primaria de calidad ambiental para suelos de Chile. En ella se establecerán las concentraciones y períodos máximos permisibles de compuestos que sean un riesgo para la vida o salud de la población (Ministerio del Medio Ambiente, 2023). A nivel mundial no existe consenso respecto a regulación específica para hidrocarburos del petróleo y solo unos pocos países cuentan con ella. Se puede tomar el ejemplo de países desarrollados como Estados Unidos, Reino Unido, Canadá, Nueva Zelanda, Los Países Bajos y Australia, en que está regulada la concentración máxima de hidrocarburos totales del petróleo (TPH) y BTEX en suelo, Ciertos países además incluyen PAHs, siendo Canadá el país con mayor cantidad de PAHs regulados, con 12, incluyendo el fluoranteno (Kuppusamy et al., 2019). De todas formas, aunque la normativa chilena actual no especifique valores máximos de estos contaminantes, la búsqueda de nuevas estrategias de descontaminación...Una legislación que regule los límites permisibles de estos contaminantes ayuda a justificar y planificar la remoción de HC.

Bacterias hidrocarbonoclásticas degradadoras de compuestos recalcitrantes

La biodegradación de HC involucra diferentes actores, siendo las bacterias el grupo más activo y consideradas las degradadoras primarias (Koshlaf & Ball, 2017). Las bacterias con capacidad de degradar HC se denominan bacterias hidrocarbonoclásticas. Dado que el ecosistema microbiano está en un estado de constante cambio, la abundancia de estas bacterias varía en función de la presencia de HC en su entorno. Estas bacterias dan paso a la biodegradación y recuperación de los ecosistemas tras derrames de petróleo. En ambientes no contaminados con HC, las bacterias hidrocarbonoclásticas representan entre el 0,1 y el 1% de la comunidad bacteriana (Varjani & Upasani, 2017). Sin embargo, al haber un incremento de HC su abundancia puede aumentar hasta alcanzar un 90% de la comunidad bacteriana (Yakimov et al., 2007; Tikka et al., 2023). Las bacterias hidrocarbonoclásticas aerobias son capaces de degradar PAHs gracias a la expresión de enzimas que incorporan oxígeno molecular al anillo aromático, desestabilizando la molécula y permitiendo reacciones de oxidación que llevan a su apertura (Durán, 2019).

Respecto a los compuestos aromáticos estireno y fluoranteno, si bien se ha demostrado que son biodegradables, los mecanismos específicos de su degradación y las especies bacterianas capaces de llevarlos a cabo han sido relativamente poco estudiados. Aunque se ha identificado a varias especies capaces de metabolizar el estireno y el fluoranteno (Tabla 2) es fundamental aislar bacterias hidrocarbonoclásticas que puedan llevar a cabo este metabolismo de manera eficiente. Esto no solo permitiría una mejor comprensión de la capacidad de degradación de bacterias hidrocarbonoclásticas, sino que también contribuiría al desarrollo de estrategias efectivas para la biorremediación de entornos contaminados con estos compuestos recalcitrantes.

Tabla 2: Ejemplos de especies degradadoras de fluoranteno (Reddy et al., 2018) y de estireno (Mooney et al., 2006)

Bacterias degradadoras	
Fluoranteno	Estireno
<i>Pseudomonas alcaligenes</i> PA-10	<i>Pseudomonas putida</i> CA-3
<i>Mycobacterium</i> sp.	<i>Xanthobacter</i> 124X
<i>Sphingomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas fluorescens</i> ST
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DQ8	<i>Pseudomonas</i> sp. Y2
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Rhodococcus rhodochrous</i> NCIMB 13259
<i>Paenibacillus</i> sp. PRNK-6	

Diversidad y aislamiento de cepas hidrocarbonoclásticas

Las bacterias adaptadas a la degradación y consumo de hidrocarburos del petróleo existen alrededor de todo el mundo, sin embargo, solo en las últimas décadas ha aumentado el conocimiento e importancia global respecto a ellas. Actualmente se tiene conocimiento de al menos 332 géneros bacterianos que utilizan hidrocarburos del petróleo como principal o única fuente de carbono (Prince et al., 2010; W. Wang et al., 2014; L. Jiang et al., 2015; Umar et al., 2017; Abo-State et al., 2018; Rizzo et al., 2018; Ganesh Kumar et al., 2019; Mei et al., 2019; Lyu et al., 2022; Al-Marri et al., 2023; J. Liu et al., 2023; Marasco et al., 2023; Tikka et al., 2023). De ellos, un 66,8% corresponden al filo *Pseudomonadota*, 13,7% a *Actinomycetota*, 7,9% a *Bacillota*, 7,6% a *Bacteroidota*, 3,7% a *Cyanobacteriota* y la menor porción con solo un género hidrocarbonoclástico a *Deinococcota*. Debido a que estos géneros se han aislado gracias a técnicas cultivo-dependientes se ha de tener en cuenta la enorme diversidad bacteriana que aún permanece no cultivable y que podría tener propiedades hidrocarbonoclásticas. Se estima que las bacterias no cultivables representan a más de un 99% de las especies (Bodor et al., 2020). Por lo tanto, aún existen muchas especies hidrocarbonoclásticas que no han sido aisladas y descritas. Estas especies nuevas pueden aportar información taxonómica y también ofrecer nuevas aplicaciones para la biotecnología en especial en el diseño de nuevas estrategias de

biorremediación.

Otra estrategia utilizada en la degradación de hidrocarburos recalcitrantes es la obtención de consorcios bacterianos, incluyendo la diversidad no cultivable de estas comunidades microbianas. Su uso además permite complementar la actividad degradadora de distintas cepas. En algunos estudios se ha obtenido mayor degradación al utilizar un consorcio degradador en comparación con bacterias aisladas (Sugiura et al., 1996). En el mismo contexto, la simplificación de la comunidad microbiana realizando diluciones seriadas, puede llevar a la creación de consorcios menos complejos permitiendo seleccionar solo aquellas bacterias que se mantienen activas en el proceso de degradación, optimizando así su eficacia en aplicaciones de biorremediación (Kang et al., 2020; Díaz-García et al., 2021).

En Chile se han aislado cepas hidrocarbonoclásticas desde distintas matrices ambientales, tales como *Stutzerimonas degradans*, *Pseudomonas chloritidismutans*, *Kocuria rosea*, *Acinetobacter radioresistens*, *Acinetobacter calcoaceticus* (Méndez et al., 2017) desde un río con presencia de contaminación por hidrocarburos, *Alcanivorax* sp. desde una zona intermareal de una playa en Antofagasta (Zadjelovic et al., 2020) o *Pseudarthrobacter equi*, *Micrococcus aloeverae*, *Dietzia kunjamensis* y *Alcaligenes aquatilis* a partir de sedimentos marinos obtenidos de la zona central posterior a derrames de petróleo en el mar (Barra, 2019). Dada la gran diversidad de suelos y climas en Chile, así como la presencia generalizada de contaminación por hidrocarburos en distintas regiones del país, Chile representa un lugar con un alto potencial para el aislamiento de bacterias hidrocarbonoclásticas. Estas condiciones variadas ofrecen la oportunidad para identificar nuevas cepas con capacidades específicas de biodegradación, como de estireno o fluoranteno, que podrían ser aplicadas en la biorremediación de sitios contaminados.

Materiales y Métodos

Este trabajo de investigación se desarrolló en el Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología Ambiental de la Universidad Técnica Federico Santa María ubicada en la ciudad de Valparaíso.

Reactivos

Hidrocarburos: Estireno ($\geq 99\%$), fluoranteno (98%), etilbenceno (99,8%), *o*-xileno ($\geq 99,0\%$), *m*-xileno ($\geq 99,0\%$), *p*-xileno ($\geq 99,0\%$), fueron obtenidos desde SigmaAldrich (MO, United States). La solución de benceno, tolueno, etilbenceno, y xilenos (BTEx_{o,m,p}) fue preparada mezclando volúmenes iguales de cada hidrocarburo (1:1:1:1:1 v/v). El diésel comercial fue filtrado con filtro un filtro de PTFE de 0,22 μm , para luego ser almacenado a 4°C.

Medios de cultivo

El enriquecimiento de cepas tolerantes a hidrocarburos se realizó en ONR7a, medio de sales minerales que imita al agua de mar sin fuente de carbono. Por cada litro de agua destilada contiene 22,79 g de NaCl, 11,18 g de $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 3,98 g de Na_2SO_4 , 1,46 g de $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 1.3 g de TAPSO {3-[N-tris(hydroxymethyl)methylamino]-2-hydroxypropane-sulfonic acid}, 0.72 g de KCl, 0.27 g de NH_4Cl , 89 mg de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 83 mg de NaBr, 31 mg de NaHCO_3 , 27 mg de H_3BO_3 , 24 mg de $\text{SrCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 2.6 mg de NaF, y 2,0 mg de $\text{FeCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ (Shao, 2010). Se suplementó este medio con vitaminas B2, B7 y B12. Este medio se preparó según las indicaciones propuestas por (Mcgenity et al., 2017).

También se trabajó con caldo marino (Marine Broth, MB) 37,4 g/L y medio agar de soya trípica 40 g/L (Tryptic Soy Agar, TSA) ambos preparados según las conficiones indicadas por el

fabricante BD Difco (NJ, Estados Unidos). Posterior a la preparación de MB se suplementó con acetato de sodio 0,005g/L, fuente de carbono presente en ambientes marinos y que es fácilmente degradable por amplio espectro de bacterias (Sala et al., 2020). Para la preparación de placas de cultivo con agar marino se agregó 15 g/L de agar a MB.

Todos los medios de cultivos utilizados fueron esterilizados mediante autoclave durante 15 min a 121°C, 1 atm.

Obtención de enriquecimientos bacterianos hidrocarbonoclasticos

Para el aislamiento de cepas bacterianas hidrocarbonoclasticas se realizaron dos enriquecimientos en fuentes de carbono distintas. Ambos utilizaron muestras de suelo obtenidas del terreno Las Salinas, ubicado en Viña del Mar, sitio contaminado con hidrocarburos del petróleo. El muestreo fue realizado el 2021 por investigadores del laboratorio asociado al proyecto de biorremediación “Estudio de Núcleos y Microcosmos de Suelo” y las muestras fueron almacenadas a 4°C durante 2 años hasta su utilización el año 2023.

Los ensayos de enriquecimiento se realizaron agregando 1g de suelo (peso húmedo) en suspensión en 50 ml de medio ONR7a suplementado con 1% v/v de estireno o 100 mg/L de fluoranteno como única fuente de carbono, ambos en matraces de vidrio con deflectores. Los matraces se homogenizaron y se incubaron a 180 RPM a 25°C durante 3 meses.

Aislamiento de bacterias hidrocarbonoclasticas tolerantes a estireno y fluoranteno

Se realizaron diluciones seriadas en solución salina 3,5 % p/v a partir de 100 µl de inóculo obtenido del enriquecimiento de estireno y fluoranteno, respectivamente (Figura 5). Se trabajó hasta la dilución 10^{-8} . Se sembró un inóculo de 100 µl de cada dilución en placas de cultivo de medio ONR7a y MA suplementadas con cicloheximida 200 mg/L para inhibir crecimiento de

hongos. Se agregó estireno y fluoranteno respectivamente. El estireno se suministró en cada placa mediante el posicionamiento de un papel filtro estéril con 15 µl de estireno puro en la tapa de la placa. Se sellaron las placas con Parafilm y fueron almacenadas dentro de bolsas de polipropileno para reducir las fugas por volatilización del estireno. Para el caso del fluoranteno, se trabajó con placas suplementadas con 100 mg/L de fluoranteno directamente en el agar. Durante su preparación se homogenizó el fluoranteno en el medio de cultivo derretido mediante sonicación. Las placas inoculadas fueron incubadas a 20°C durante 7-21 días hasta la aparición de colonias visibles. Se tomaron inóculos de las colonias seleccionadas en tres medios de cultivo (MA, TSA y ONR7a) con estireno y fluoranteno, respectivamente, para comparar su crecimiento. Luego se volvieron a sembrar seleccionando el medio de cultivo óptimo para cada cepa y se repitió el sembrado hasta obtener aislados bacterianos puros.

Además, se trabajó con un cepario de 240 aislados previamente obtenidos a partir de diluciones seriadas de muestras de experimentos biorremediación en columnas de suelo. Estas cepas se aislaron en placas de TSA u ONR7a con presencia de Diésel (0,1% v/v) o BTEX (0,033%v/v) el año 2022. Se retomó su procesamiento el año 2023 para asegurar su pureza y terminar el proceso de su identificación.

Las cepas puras fueron criopreservadas a -20°C. Para ello se realizaron crecimientos de cada cepa pura en medio líquido (MB, TSB y ONR7a según corresponda) para luego mezclar 700 µl de inóculo bacteriano con 500 µl de glicerol 50% v/v obteniendo una concentración final de glicerol al 20,8% v/v.

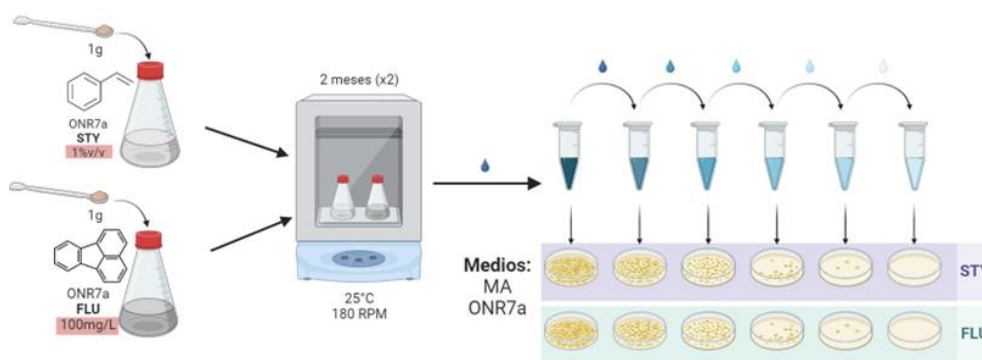


Figura 5: Esquema del procedimiento de enriquecimiento y aislamiento de bacterias con hidrocarburos aromáticos como fuente de carbono. Elaboración propia

Identificación taxonómica de aislados bacterianos mediante secuenciación parcial del gen 16S ARNr

Para la identificación taxonómica de los aislados bacterianos, se realizó una extracción de ADN genómico, para luego amplificar el gen 16S ARNr y finalmente una secuenciación parcial mediante el partidor 800R. Para la extracción se utilizó una solución de enzimas líticas de mutanolisina y lisozima en buffer Tris-EDTA pH 8.0. Un inóculo de una colonia pura fue suspendido en 80 µl de solución enzimática. Se llevó a 37°C por 1 hora y luego se agregaron 5 µl de proteinasa K para digerir proteínas presentes, liberando ácidos nucleicos de interior de la célula. Se dejaron las muestras a 56°C durante toda la noche para luego subir la temperatura a 95°C por 10 min y centrifugar por 10 min a 13.000 RPM. Se descartó el pellet y el sobrenadante fue almacenado a -20°C. Se realizó una reacción de PCR para la amplificación parcial del gen 16S ARNr utilizando los partidores universales 27F y 1492R (Tabla 3), con una mezcla de 25 µl de GoTaq Green Master Mix 2x Gotaq® (Promega, Madison, USA), 21 µl de agua libre de nucleasas, 1,5 µl de cada partidor 10uM y 1µl de ADN genómico

Tabla 3. La reacción fue llevada a cabo con el perfil térmico mostrado en la Tabla 4 en un

termociclador. Una vez obtenidos los productos de PCR se comprobó su integridad cargando 5 µl de amplicon en una electroforesis en gel de agarosa al 1% p/v teñido con GelRed Nucleic Acid Stain (Biotium, CA, Estados Unidos) 0,01% v/v en buffer TAE a 70V durante 45 minutos. Se utilizó de referencia 2 µl del marcador de peso molecular O'GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (Thermo Scientific, Massachusetts, USA). Luego de comprobar la amplificación del gen 16S ARNr se enviaron las muestras de PCR para secuenciación parcial del gen ARNr 16S en la empresa Macrogen (Santiago, Chile) (Tabla 3). Las secuencias fueron procesadas filtrando las secuencias de baja calidad utilizando el software UGENE v.49.0, recortando los extremos con calidad menor a un valor de Phred Score de 50, además de corroborar manualmente el cromatograma de cada secuencia. Las secuencias filtradas fueron utilizadas en la identificación de las cepas con la herramienta de alineamiento local BLAST, utilizando blastn y la base de datos “*rRNA/ITS databases|16S ribosomal RNA sequences*”.

Tabla 3: Partidores utilizados para la secuenciación parcial del gen 16S y la identificación de bacterias aisladas (Macrogen, 2022)

Partidor	Secuencia
800R	CTACCAGGGTATCTAAT
27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG
1492R	TACGGYTACCTTGTTACGACTT

Tabla 4: Perfil térmico usado en el PCR

Etapas	Temperatura	Duración	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	5 min	1
Desnaturalización	95°C	1 min	30
Hibridación	59°C	1 min	
Elongación	72°C	45 s	
Elongación final	72°C	7 min	1

Análisis filogenético del gen 16S ARNr de aislados identificados

Una vez obtenidos los datos de secuenciación se construyeron árboles filogenéticos. Se consideró como referencia la secuencia de *Escherichia coli* NBRC-102203^T y las cepas tipo más cercanas en la identificación por BLAST de cada aislado. Los números de acceso de GenBank se muestran entre paréntesis en cada secuencia. Se realizó un alineamiento nucleotídico en el programa MEGA v.11 utilizando el algoritmo MUSCLE (Edgar, 2004). El árbol se generó con el software IQ-Tree utilizando la herramienta Model Finder Plus para la selección del modelo evolutivo adecuado para cada set de datos y al generar el árbol se utilizó un Bootstrap de 1000 repeticiones. Para la visualización de datos se utilizó la aplicación web tvBOT (Xie et al., 2023).

Crecimiento de cepas de interés a diferentes pH y fuentes de carbono

Para la caracterización de cepas de interés se eligieron 10 cepas, 5 aisladas utilizando BTEX o diésel y 5 aisladas utilizando fluoranteno. En una primera etapa se realizaron curvas de crecimiento en dos medios, MB y ONR7a. Se inoculó al 1%v/v una suspensión celular a OD_{600nm} 0,6 en tubos de 15 ml con 3 ml de medio de cultivo (MB o ONR7a) y se suplementó con acetato como fuente de carbono. Se dejaron los tubos cultivando a 25°C a 250 RPM. Se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a 600 nm cada 2 días durante 8 días. Con esto se obtuvieron las curvas de crecimiento para ambos medios de cultivo. Además, se evaluó el pH óptimo de crecimiento de las cepas seleccionadas. Para ello se crecieron las cepas en duplicado técnico en MB con seis pH diferentes (5,35 - 9,51) en una microplaca de 96 pocillos. Se inoculó al 1% v/v con una suspensión celular a OD_{600nm} 0,6. Se midió la absorbancia a 600nm cada 15 minutos en un equipo lector multimodal de microplacas Infinite 200 PRO (Tecan Group Ltda., Männedorf, Suiza) durante 5 días a temperatura ambiente (~25°C) con agitación orbital durante 15 segundos

con una amplitud de 6 mm (Figura 6). Un control negativo sin inocular (control abiótico) fue agregado para cada pH evaluado. Con esto se obtuvieron curvas de crecimiento de cada cepa seccionada para cada pH.

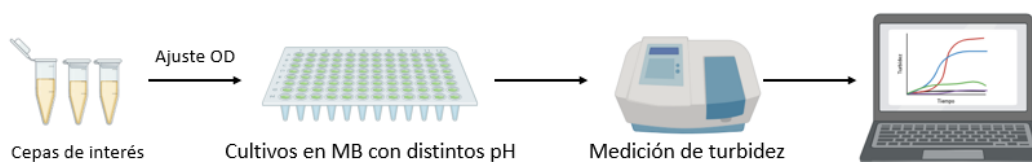


Figura 6: Esquema de procedimiento experimental para obtener curvas de crecimiento en medio MB con diferentes pH

Evaluación de capacidad hidrocarbonoclástica de cepas de interés

En una segunda etapa, se estudió la capacidad de las cepas seleccionadas para crecer en medio mínimo ONR7a líquido con estireno, diésel, BTEX o fluoranteno como única fuente de carbono (Tabla 5). Para ello se inocularon 30 μ l de una suspensión celular a OD_{600nm} en tubos de vidrio de 15ml, agregando cada uno de los HC. Se trabajó en duplicado técnico para cada condición. Se utilizaron tapas de PTFE/Silicona para evitar la evaporación de los hidrocarburos volátiles. Se incubaron por 15 días a 25°C y 250 RPM, midiendo la turbidez cada 5 días y obteniendo curvas de crecimiento. Se utilizó acetato como control positivo y ninguna fuente de carbono como control negativo.

Tabla 5: Hidrocarburos seleccionados para probar capacidad hidrocarbonoclástica de las cepas seleccionadas

Estireno	1,5	mM
Diésel	0,70	mM
BTEX	1,5	mM
Fluoranteno	0,5	mM
Acetato	20,0	mM

Construcción de consorcios degradadores simplificados para estireno y fluoranteno

Se trabajó en la construcción de un consorcio degradador simplificado para la degradación de estireno o fluoranteno, de forma separada. Se tomó un inóculo de $_\text{ml}$ del enriquecimiento de estireno y de fluoranteno y se hicieron diluciones seriadas en medio ONR7a, con la finalidad de disminuir la carga microbiana y exponer cada dilución al contaminante para evaluar su capacidad degradadora. Para ello se prepararon viales con 495 μl de ONR7a y estireno 1% v/v o 20 μl de fluoranteno como única fuente de carbono. Se inocularon 5 μl de cada dilución en cinco viales por dilución, obteniendo dos viales para criopreservación, y 3 viales para cuantificación de estireno o fluoranteno utilizando cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD). Los viales se incubaron por 1 mes a 25°C a 180 RPM. A los 30 días, dos viales por dilución fueron criopreservados en glicerol y almacenados a -80°C.

Extracción y cuantificación de estireno y fluoranteno mediante HPLC-DAD

Para evaluar la degradación de estireno y fluoranteno, a los 30 días del experimento tres viales por dilución (triplicado técnico) fueron utilizados para extraer y cuantificar estireno y el fluoranteno. Para la extracción se utilizó acetato de etilo en una relación 2:1 a los viales, agitando por 5 minutos, para luego extraer la fracción orgánica (superior). El sobrenadante fue filtrado con un filtro de PTFE 0,22 μm para eliminar cualquier debris celular y luego cuantificar estas muestras en HPLC-DAD. Para la separación, se utilizó una columna C18-RP de 100 mm de largo, una fase móvil de acetonitrilo con un flujo de 1 ml/min y una temperatura de 30°C. Los tiempos de retención correspondieron a 3,98 min para estireno y 8,54 min para fluoranteno. Se midió la absorbancia a 234 nm para estireno y fluoranteno.

Resultados

En esta memoria se realizó la identificación y caracterización de nuevas cepas bacterianas hidrocarbonoclásticas degradadoras desde suelos costeros obtenidas desde dos estrategias de aislamiento: 1) Identificación de cepas bacterianas aisladas previamente desde un experimento de biorremediación utilizando suelo costero contaminado; 2) Aislamiento e identificación desde un experimento de enriquecimiento bacteriano de suelo costero contaminado en presencia de hidrocarburos recalcitrantes (e.g. estireno, fluoranteno).

Aislamiento e identificación de bacterias hidrocarbonoclásticas

Previamente, un aislamiento de cepas hidrocarbonoclásticas en presencia de diésel o BTEX de un proceso de biorremediación con suelo costero contaminado concluyó con un cepario de 240 aislados capaces de tolerar la presencia de estos compuestos. En esta memoria, 240 cepas criopreservadas fueron reactivadas en el medio de cultivo sólido respectivo donde fueron aisladas en presencia de diésel o una mezcla de BTEX dependiendo de la cepa. Los medios utilizados fueron: medio rico convencional TSA; medio rico marino MB; y medio mínimo marino ONR7A. De las 240 cepas, 190 cepas fueron reactivadas con éxito en su medio sólido respectivo. Mediante observación de los fenotipos que crecieron en las placas se determinó que 50 de las cepas reactivadas tenían posible contaminación y requerían purificación. Del proceso de purificación se obtuvieron 60 nuevos aislados, teniendo un total de 250 cepas puras. La extracción de ADN se realizó a las 250 cepas puras, obteniendo la amplificación del gen 16S ARNr en 243 muestras. 210 pudieron ser identificadas mediante la amplificación del gen 16S ARNr y posterior secuenciación parcial. Finalmente 205 cepas tuvieron la suficiente cercanía taxonómica (>94.8%) (Yarza et al., 2014), para ser identificadas a nivel de género. En general los crecimientos en placa

fueron entre 2 y 10 días.

La mayor cantidad de cepas identificadas mediante la primera estrategia de aislamiento pertenecen a la clase *Gammaproteobacteria* (105), con mayor cantidad de aislados en los géneros *Pseudomonas* (44), *Acinetobacter* (40), *Alloalcanivorax* (6), *Stenotrophomonas* (3), *Stutzerimonas* (3) y *Alcanivorax* (2). La segunda clase con mayor abundancia de aislados fue *Actinomycetes* (36), con géneros como *Rhodococcus* (10), *Myceligenans* (6), *Isoptericola* (5), *Streptomyces* (4) o *Krasilnikoviella* (3). Se obtuvieron también aislados detectados dentro de la clase *Betaproteobacteria* (21), con algunos géneros como *Delftia* (6), *Achromobacter* (5) o *Paraburkholderia* (4). Por último, también mencionar las clases las clases *Alphaproteobacteria* (18), *Flavobacteriia* (13), *Sphingobacteriia* (6) y *Bacilli* (6) con aislados identificados dentro de los géneros *Brucella* (10), *Galbibacter* (10), *Sphingobacterium* (6) y *Niallia* (5) respectivamente. En la Figura 7 se muestran la cantidad de cepas identificadas por género, se aprecia que predominaron *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Galbibacter*, *Brucella* y *Rhodococcus* con 10 o más cepas aisladas de cada género.

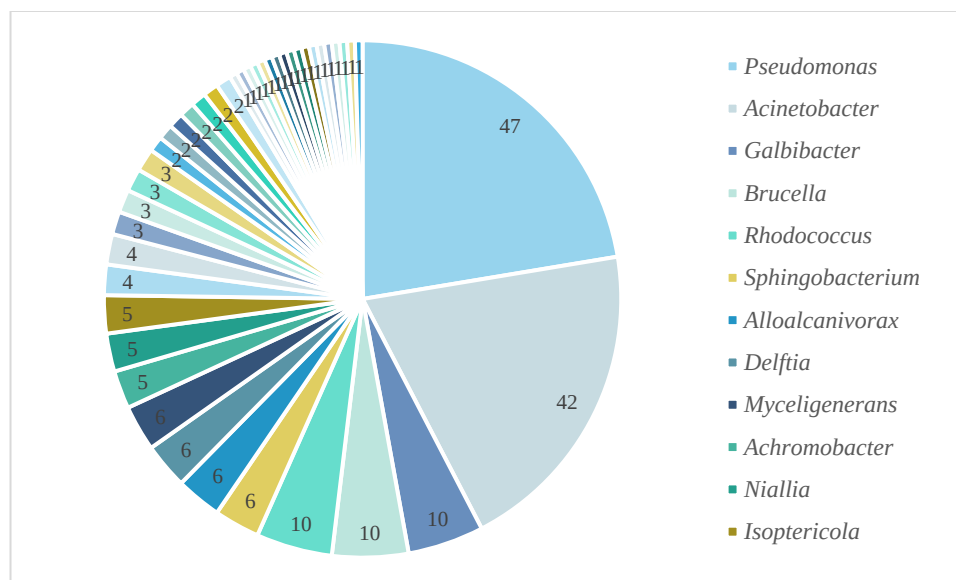


Figura 7: Géneros identificados a partir de aislamiento de bacterias enriquecidas con diésel y BTEX

Para evaluar la relación evolutiva entre los aislados con menor porcentaje de identificación y las especies más cercanas, se construyó un árbol filogenético a partir las secuencias con menor porcentaje de identificación y las secuencias de cepas tipo de cada especie cercana, como se muestra en la Figura 8. Como criterio para seleccionar las cepas para construir el árbol se utilizó el porcentaje de identidad obtenido con especies de cepas tipo cercanas. Se utilizaron los rangos propuestos por (Yarza et al., 2014), que definen un 94,8% de identidad como el límite inferior para la clasificación por género y un límite superior de 98,7% que vendría a limitar con la identificación a nivel de especie. Las cepas seleccionadas dentro de este rango pueden clasificarse en el género propuesto, más existe la posibilidad de que representen una nueva especie dentro de este género. En este grupo se identificó una cepa monoespecífica dentro del género *Allopusillimonas*. Otros géneros identificados dentro del aislamiento y que tienen pocas especies descritas incluyen *Krasilnikoviella* (2), *Galbibacter* (3), *Myceligenerans* (5) y *Niallia* (5).

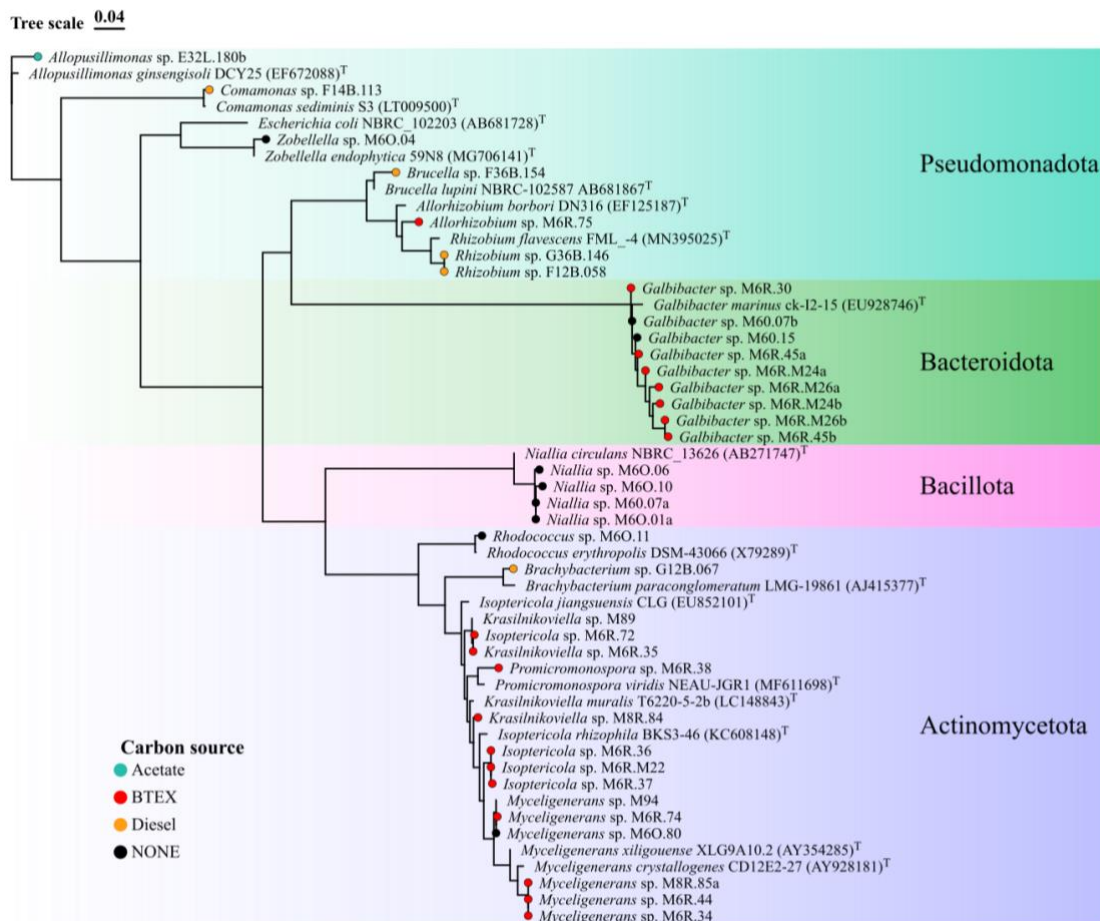


Figura 8: Árbol filogenético de cepas con porcentaje de identidad entre 94.8% y 98.7% aisladas a partir de columnas de biorremediación.

Enriquecimiento bacteriano con fluoranteno o estireno

Como segunda estrategia para obtener cepas degradadoras de hidrocarburos desde zonas costeras, se aislaron cepas a partir de experimentos de enriquecimiento bacteriano de suelo costero contaminado en medio mínimo marino ONR7a, agregando fluoranteno como única fuente de carbono con el fin de aislar e identificar cepas hidrocarbonoclasticas capaces de degradar PAHs. El aislamiento a partir del enriquecimiento bacteriano utilizando fluoranteno se hizo a partir de crecimiento en placas de diluciones seriadas, las colonias seleccionadas fueron sembradas en tres medios de cultivo, TSA, MA y ONR7a suplementadas con fluoranteno (200

mg/L) y cicloheximida para inhibir el crecimiento de hongos, como se puede apreciar en la Figura 9.

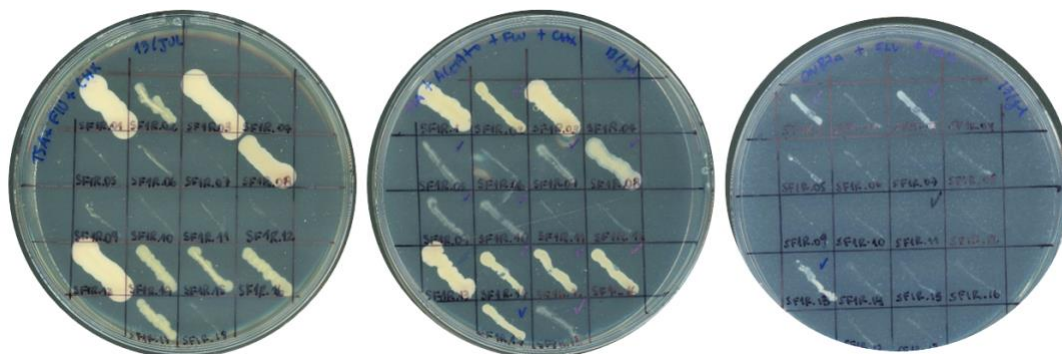


Figura 9: Crecimiento de cepas seleccionadas provenientes del enriquecimiento bacteriano utilizando fluoranteno en medios TSA, MA y ONR7a

A partir de la evaluación en los tres medios de cultivo se siguieron aislando las cepas en el medio de cultivo óptimo para cada una de ellas. Se aislaron un total de 81 cepas que crecieron en presencia de fluoranteno, de las que 55 se aislaron desde MA y 26 desde ONR7a donde el contaminante correspondía a la única fuente de carbono. De estos aislados, 28 cepas fueron identificadas mediante secuenciación parcial del gen 16S ARNr. Tres géneros frecuentemente aislados en esta condición fueron *Arthrobacter*, *Mesobacillus* y *Georgenia*, con 6, 4 y 5 cepas respectivamente. El resto de las cepas identificadas y su cantidad puede observarse en la Tabla 6. Se construyó un árbol filogenético con todas las cepas identificadas, como puede verse en la Figura 10. Se identificaron cepas de los filos *Actinomycetota* (77%) y *Bacillota* (23%) dentro de los que encontramos 6 géneros. *Paenarthrobacter* es el género con menos especies descritas (7), seguido por *Georgenia*, *Mesobacillus* y *Pseudoarthrobacter*, cada uno con 14 especies (Parte et al., 2020). *Kocuria* y *Arthrobacter* tienen 26 y 74 especies descritas, respectivamente (Parte et al., 2020).

Tabla 6: Cepas identificadas a partir de aislamiento de bacterias enriquecidas con fluoranteno

Género	Cantidad de cepas
<i>Arthrobacter</i>	8
<i>Mesobacillus</i>	7
<i>Georgenia</i>	5
<i>Pseudarthrobacter</i>	5
<i>Paenarthrobacter</i>	2
<i>Kocuria</i>	1
Total	28

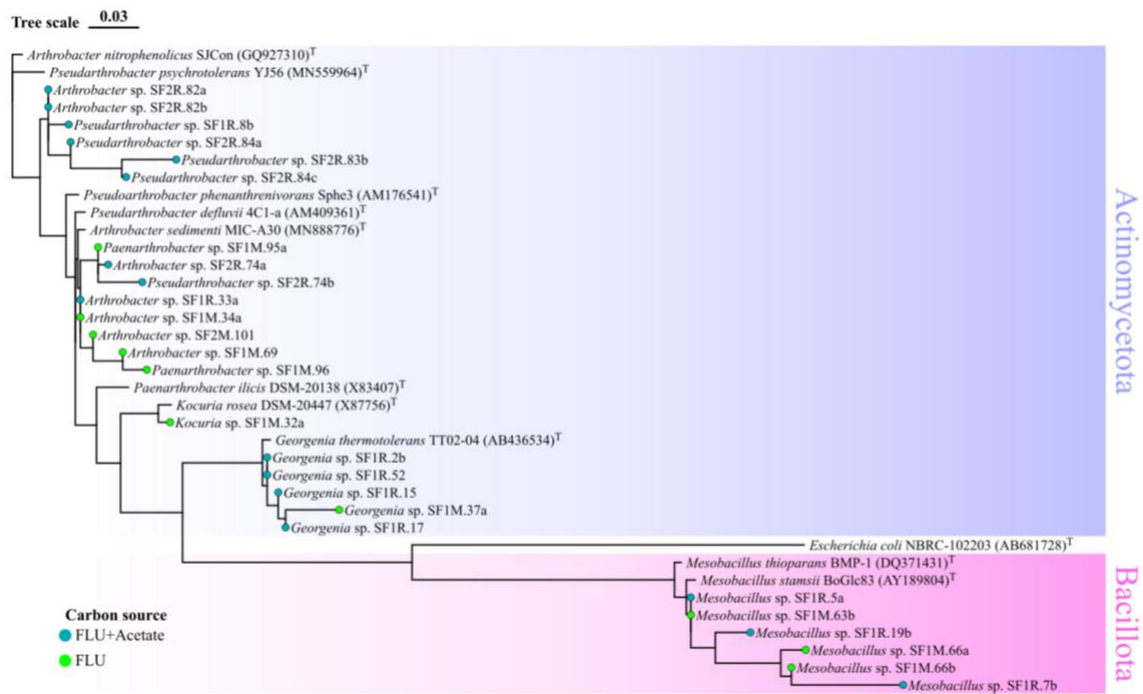


Figura 10: Árbol filogenético de las cepas identificadas a partir del enriquecimiento con Fluoranteno

Si siguiendo el mismo procedimiento anterior, se aislaron cepas a partir de enriquecimientos bacterianos utilizando ahora estireno (1% v/v) en medio mínimo marino ONR7a buscando ampliar la cantidad de aislados con propiedades hidrocarbonoclasticas capaces de degradar MAHs. En esta condición se observó un efecto inhibitorio del estireno en la fracción cultivable, solo obteniendo algunas cepas luego de 2 a 4 semanas a T° ambiente. Finalmente, se obtuvieron 27 aislados de lento crecimiento. De estas cepas, 26 cepas fueron aisladas desde MA y una desde ONR7a. De este grupo, seis cepas fueron identificadas mediante secuenciación parcial del gen

16S ARNr, de las que cinco tuvieron mayor similitud con el género *Chungangia* y una con *Nocardia* (Tabla 7). Se construyó un árbol filogenético con estas cepas, corroborando la cercanía evolutiva de las cepas de *Chungangia* con la cepa tipo más cercana (Figura 11). Se identificaron las cepas dentro de los filos *Actinomycetota* (17%) y *Bacillota* (83%). *Chungangia* es un género monoespecífico (Parte et al., 2020), mientras que *Nocardia* cuenta con 131 especies descritas (Parte et al., 2020). Para identificar si las cepas identificadas como *Chungangia* correspondían a la misma especie, se realizó un alineamiento nucleotídico de sus secuencias del gen 16S ARNr. Al realizar este análisis se obtuvo una similitud de 100% entre las cuatro cepas, sugiriendo que las cepas corresponden a la misma especie.

Tabla 7: Géneros identificados a partir del enriquecimiento con estireno

Género	Cantidad de cepas
<i>Chungangia</i>	5
<i>Nocardia</i>	1
Total	6

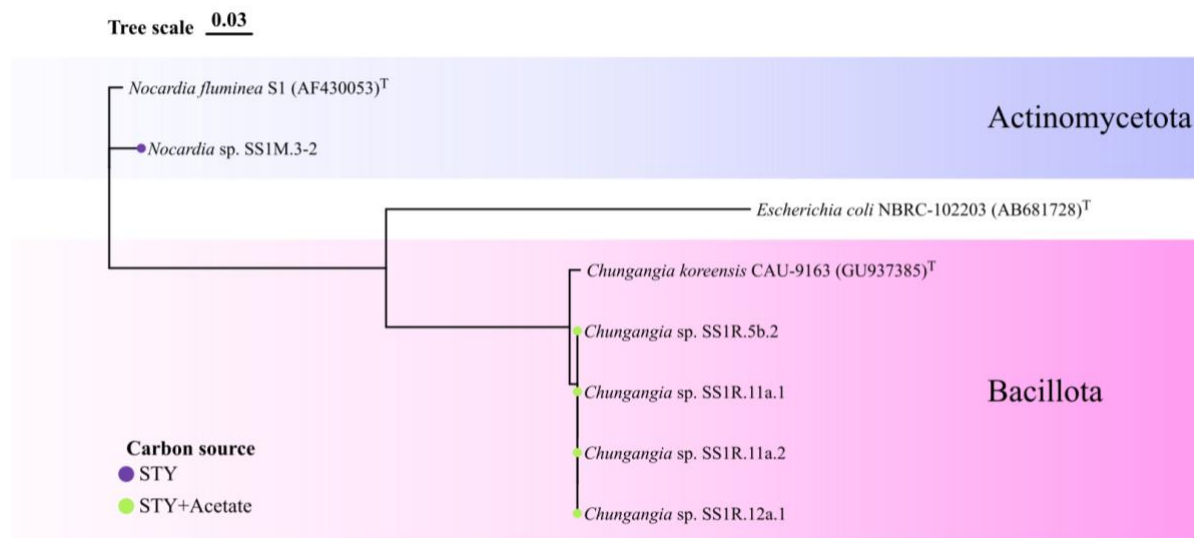


Figura 11: Árbol filogenético de las cepas identificadas a partir del enriquecimiento con Estireno

Construcción de un Consorcio Degradador Simplificado

Además de aislar e identificar cepas bacterianas hidrocarbonoclásticas, se evaluó si al simplificar la comunidad microbiana asociadas al enriquecimiento bacteriano, podríamos obtener comunidades que degraden de igual o mejor forma el contaminante. Se utilizó el cultivo de los ensayos de enriquecimiento utilizando fluoranteno o estireno, realizando diluciones seriadas del consorcio microbiano en ONR7a con el fin de analizar cómo la reducción de carga microbiana afectaba la degradación de los HC aromáticos. Las diluciones del consorcio microbiano fueron expuestas a cada contaminante (fluoranteno o estireno), para luego dejarlas en agitación a 25°C por 30 días y evaluar la degradación en comparación a un control abiótico (CN). Al comparar el área bajo la curva (mAU.s) de cada condición, podemos observar rápidamente **Figura 12** **Error! Reference source not found.** elevada variabilidad de los datos que no permite observar correlaciones entre el grado de dilución de la muestra y la degradación de HC. Sin embargo, en el experimento de degradación de fluoranteno (Figura 12) se observa que las diluciones “d0” y “d6” muestra una menor concentración (area) , ambas con un error estándar considerablemente más bajo que el resto de las diluciones, lo que podría sugerir degradación de fluoranteno en ambas diluciones. Asi mismo, en el experimento de degradación de estireno (Figura 13) se observa que la dilución “d2” muestra una menor concentración del compuesto con bajo error estándar.

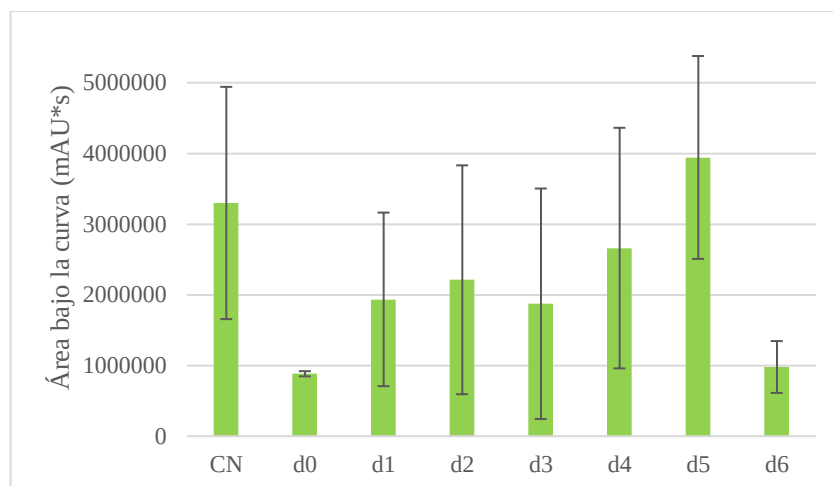


Figura 12: Área bajo la curva para viales con Fluoranteno en cromatogramas. Barras de error representan el error estándar ($n=3$, réplicas técnicas).

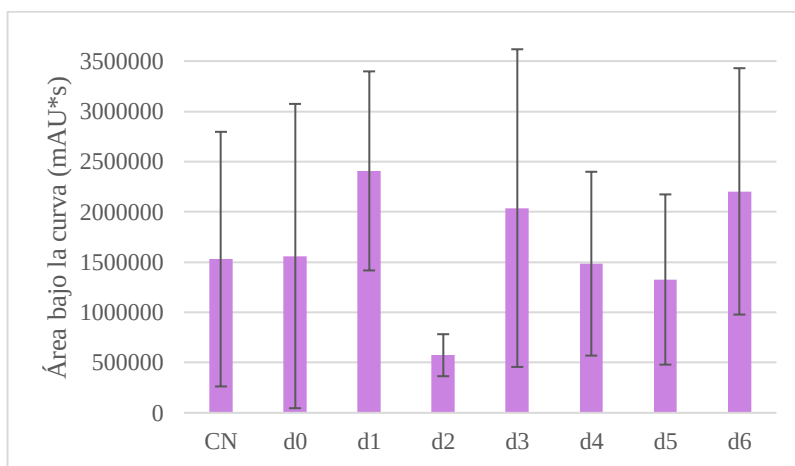


Figura 13: Área bajo la curva para viales con Estireno en cromatogramas. Barras de error representan el error estándar ($n=3$, réplicas técnicas).

Caracterización y evaluación de capacidad hidrocarbonoclástica de cepas de interés

Se seleccionaron dos grupos de aislados bacterianos para para caracterizar y evaluar su capacidad de degradación de hidrocarburos. El primer grupo corresponde a cepas marinas aisladas del enriquecimiento con BTEX y constaron de: *Galbibacter* sp. M30, *Galbibacter* sp.

M26a, *Marinobacter* sp. M81a, *Dietzia* sp. M76, *Alloalcanivorax* sp. M64a, *Isoalcanivorax* sp. M55 y *Alloalcanivorax* sp. M2. El segundo grupo corresponde a dos cepas aisladas del enriquecimiento con estireno; *Kocuria* sp. SS1-c y *Chungangia* sp. SS5b, y a cuatro cepas aisladas del enriquecimiento con fluoranteno; *Arthrobacter* sp. SF82b, *Arthrobacter* sp. SF101, *Paenarthrobacter* sp. SF95a, *Mesobacillus* sp. SF7b.

Se obtuvieron las curvas de crecimiento de las cepas en medio MB con acetato a 25°C (Figura 14), observando que todas las cepas se encuentran en la mitad de su fase de crecimiento exponencial alrededor de las 30 horas y alcanzan la fase estacionaria aproximadamente a las 60 horas.

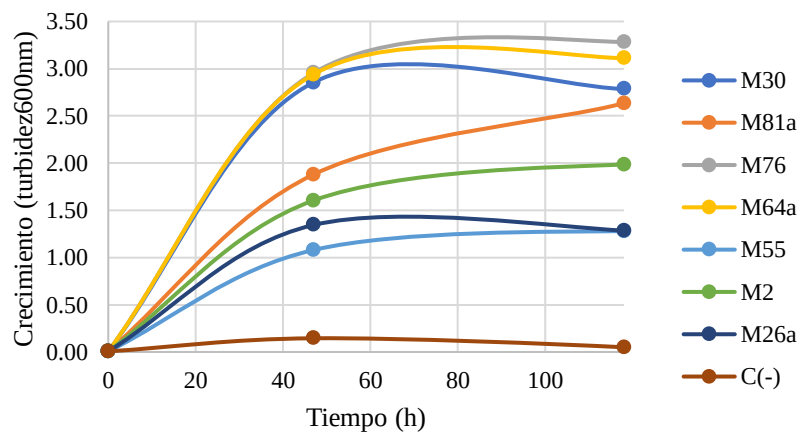


Figura 14: Medición de turbidez a lo largo del tiempo de las cepas marinas seleccionadas en medio MB

Se realizó también la inoculación de las cepas marinas en medio ONR7a con acetato para obtener su curva de crecimiento, como se muestra en la Figura 15, obteniendo resultados menos claros que en MB. No todas las cepas crecieron óptimamente en este medio, por ejemplo las cepas M76, M26a, M30, M64a mostraron una turbidez cercana a la del control negativo. Por otro lado, M55, M2 y M81a alcanzaron niveles más altos de turbidez y por ende de crecimiento. Se puede ver que alrededor de las 100 horas se encuentran en crecimiento exponencial. No se ve con claridad cuándo alcanzan la fase estacionaria.

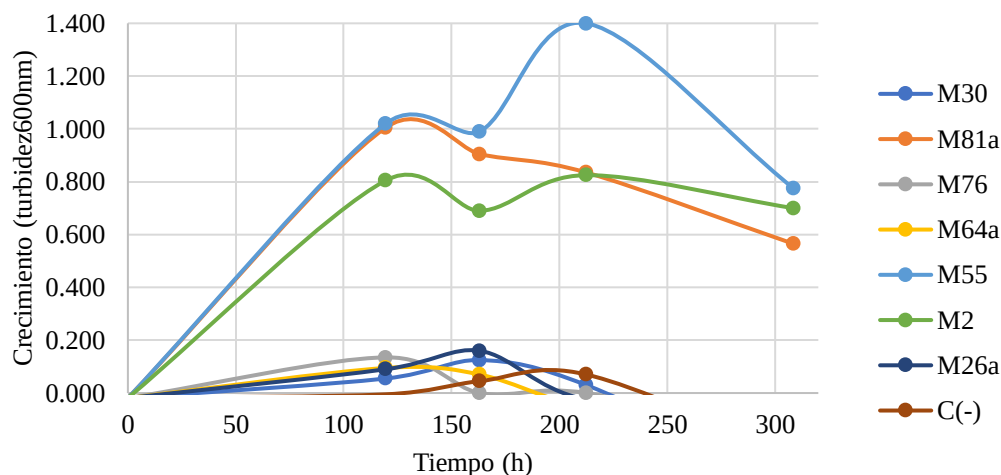


Figura 15: Medición de turbidez a lo largo del tiempo de las cepas seleccionadas en medio ONR7a

Se obtuvieron las curvas de crecimiento del segundo grupo en medio MB con acetato a 25°C como se muestra en la Figura 16. Casi todas las cepas se encuentran en la mitad de su fase exponencial alrededor de las 40 horas y se estabilizan pasadas las 80 horas, mientras que la cepa SF7b aún continúa en su fase exponencial a las 60 horas.

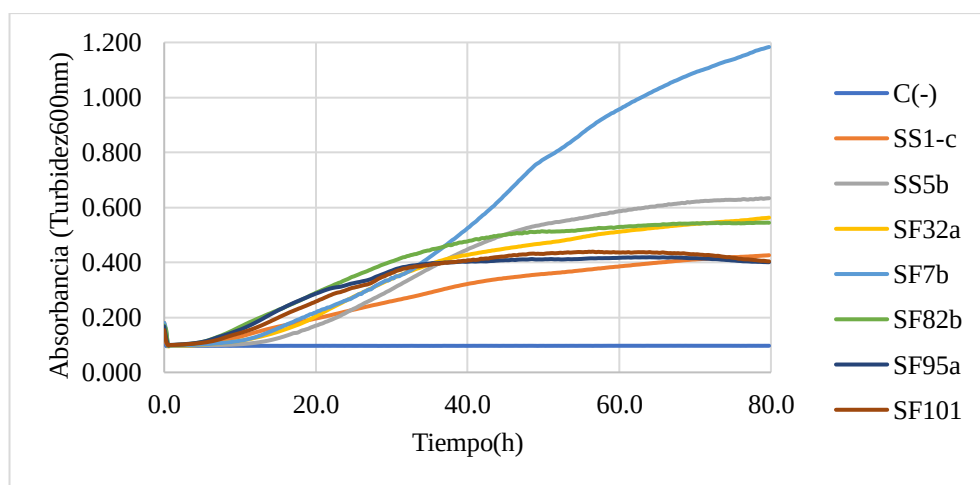


Figura 16: Medición de turbidez a lo largo del tiempo de las cepas seleccionadas en medio MB

Se evaluó el crecimiento de las cepas seleccionadas en medio MB en distintos pH. En la Tabla 8 se muestra un resumen de los valores máximos de turbidez alcanzados por cada cepa

marina del primer grupo en los distintos pH. Se agregó una escala de colores para resaltar los valores. Los mayores valores se observaron en *Marinobacter* sp. M81a, que junto con *Allocanivorax* sp. M2, *Alloalcanivorax* sp. M64 e *Isoalcanivorax* sp. M55 crecieron óptimamente en un rango de pH 6,9 a 9,5. Por otro lado, ambas cepas de *Galbibacter* crecieron óptimamente entre pH 7,8 y 8,6, mientras que *Dietzia* sp. M76 mostró una clara preferencia por el pH 8,6.

Tabla 8: Valores máximos de turbidez para las cepas enriquecidas en diésel y BTEX a distintos pH en medio MB

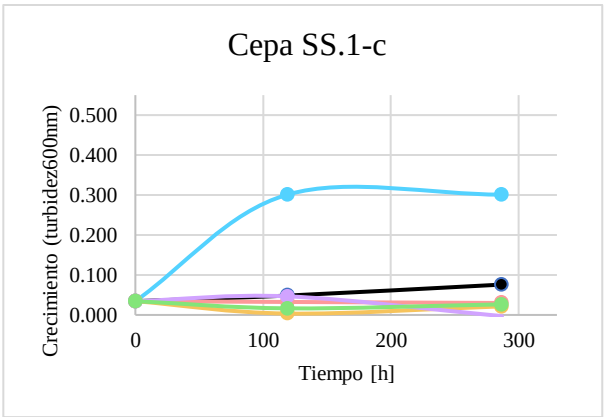
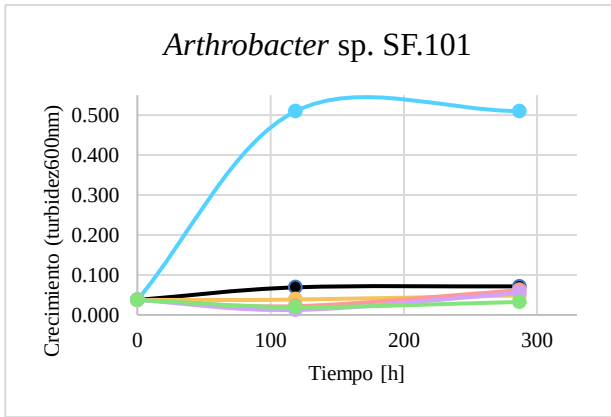
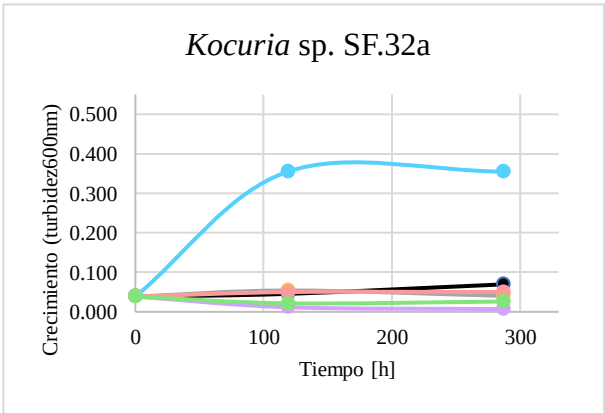
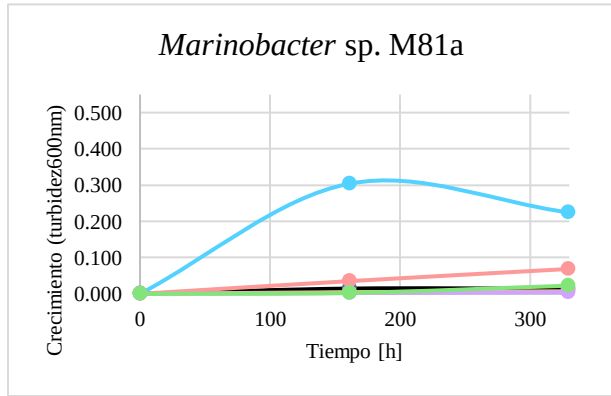
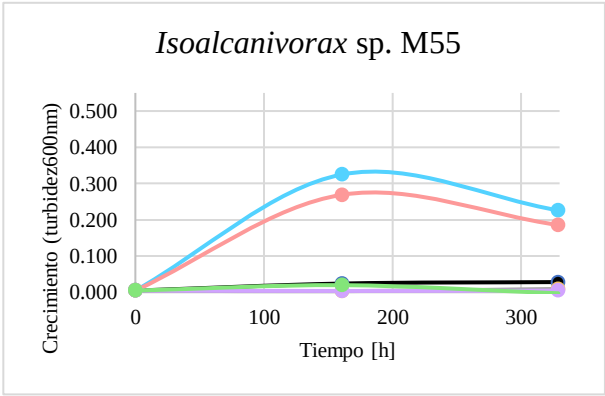
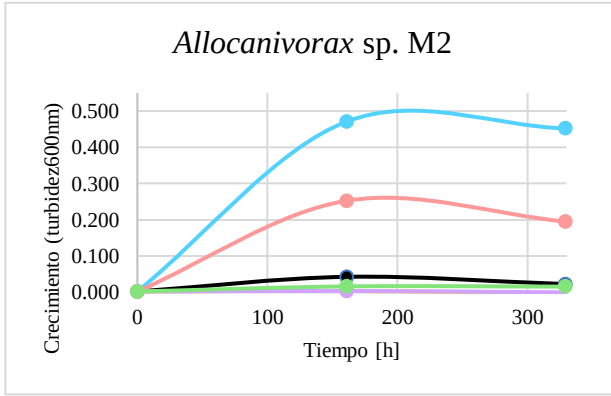
	5,35	6,03	6,90	7,80	8,63	9,51
Control negativo	0.171	0.176	0.171	0.184	0.183	0.187
<i>Allocanivorax</i> sp. M2	0.183	0.179	0.888	0.922	0.945	0.891
<i>Alloalcanivorax</i> sp. M64	0.169	0.167	0.555	0.555	0.548	0.500
<i>Isoalcanivorax</i> sp. M55	0.168	0.182	0.699	0.682	0.694	0.689
<i>Marinobacter</i> sp. M81a	0.162	0.156	1.163	1.194	1.181	1.037
<i>Dietzia</i> sp. M76	0.168	0.170	0.162	0.286	0.606	0.161
<i>Galbibacter</i> sp. M30	0.178	0.170	0.168	0.239	0.276	0.166
<i>Galbibacter</i> sp. M26	0.172	0.172	0.165	0.271	0.229	0.167

También se evaluó el crecimiento de las cepas del segundo grupo a distintos pH, obteniendo los resultados expuestos en la Tabla 9. Se puede observar que *Mesobacillus* sp. SF7b muestra los mayores valores de turbidez, por ende mejor capacidad de crecimiento en medio líquido MB, y su rango óptimo de crecimiento es en el rango de pH 6,9 a 9,5. Las cepas SS1-c, *Kocuria* sp. SF32a y *Arthrobacter* sp. SF101 crece en el rango 6,9 a 8,6. *Chungangia* sp. SS5b tolera un rango más básico, de 7,8 a 9,5. *Arthrobacter* sp. SF82b y *Paenarthrobacter* sp. SF95a tiene un pH específico de crecimiento óptimo de 6,9.

Tabla 9: Valores máximos de turbidez para las cepas enriquecidas con fluoranteno y estireno en distintos pH en medio MB

	5,35	6,03	6,90	7,80	8,63	9,51
Control negativo	0.157	0.161	0.152	0.156	0.154	0.148
Cepa SS1-c	0.160	0.167	0.464	0.440	0.473	0.396
<i>Kocuria</i> sp. SF32a	0.153	0.166	0.546	0.568	0.552	0.526
<i>Arthrobacter</i> sp. SF82b	0.146	0.465	0.623	0.550	0.522	0.416
<i>Arthrobacter</i> sp. SF101	0.149	0.309	0.472	0.449	0.410	0.305
<i>Paenarthrobacter</i> sp. SF95a	0.145	0.397	0.520	0.421	0.412	0.366
<i>Mesobacillus</i> sp. SF7b	0.150	0.322	1.241	1.187	1.240	1.236
<i>Chungangia</i> sp. SS5b	0.153	0.163	0.576	0.635	0.635	0.623

Se seleccionaron 6 cepas para probar su crecimiento en medio líquido con hidrocarburos como fuente de carbono con el fin de probar sus propiedades hidrocarbonoclásticas (Figura 17). Se observa que todas las cepas crecieron en el control positivo con acetato 20 mM como única fuente de carbono y que ninguna creció sin fuente de carbono. La cepa identificada como *Alloalcanivorax* sp. M2 creció hasta una turbidez_{600nm} de 0,25 luego de 160 hrs con diésel 0,70 mM. La cepa *Isoalcanivorax* sp. M55 también creció en esta fuente de carbono, alcanzando aproximadamente una turbidez_{600nm} de 0,27 tras 160hrs. Por otro lado, *Marinobacter* sp. M81a comenzó a aumentar su turbidez al final del experimento, alcanzando 0,07 a las 330hrs. El resto de las cepas no mostró turbidez en presencia de los hidrocarburos seleccionados.



— Sin fuente de carbono — Acetato — BTEX — Diesel — STY — FLU

Figura 17: Crecimiento de cepas seleccionadas utilizando Acetato, BTEX, Diésel, Estireno y Fluoranteno

Discusión

Aislamiento e identificación de bacterias hidrocarbonoclásticas

El aislamiento y el estudio de cepas hidrocarbonoclásticas desde ambientes costeros nos permite diversificar las cepas disponibles para desarrollar estrategias sitio-específicas para cada ecosistema impactado por hidrocarburos. En esta memoria se aislaron cepas hidrocarbonoclásticas desde sedimentos expuestos a hidrocarburos de las costas de Viña Mar. Para ello se utilizaron dos enfoques (i) diluciones seriadas desde un experimento de biorremediación de suelo costero en medio rico TSA o medio mínimo marino ONR7a en presencia de diésel o BTEX, respectivamente; y (ii) ensayos de enriquecimiento con estireno (1% v/v) o fluoranteno (100 mg/L) en ONR7a. Se aislaron 368 cepas en total, de las que 74% son provenientes de los aislamientos con diésel o BTEX y 26% son aislados provenientes de los enriquecimientos con estireno o fluoranteno. Se observaron diferentes géneros bacterianos cultivados a partir de los dos enfoques, lo que resalta el factor selectivo de los ensayos de enriquecimiento.

De las 408 cepas aisladas totales, se identificaron genéticamente 243, de las que 81% corresponde a géneros que han sido previamente descritos como hidrocarbonoclásticos en la literatura disponible a la fecha. En el caso particular de los géneros identificados a partir del enriquecimiento con Fluoranteno (*Arthrobacter*, *Georgenia*, *Kocuria*, *Mesobacillus*, *Paenarthrobacter* y *Pseudarthrobacter*) todos han sido previamente descritos como hidrocarbonoclásticos (Prince et al., 2010; Asimakoula et al., 2023; Liu et al., 2023; Rojas-Vargas et al., 2024). El alto porcentaje de géneros hidrocarbonoclásticos identificados tanto en la aislación a partir de columnas de biorremediación como de ensayos de enriquecimiento con HC

aromáticos es coherente con las condiciones del suelo del que provinieron las muestras utilizadas, ya que el suelo utilizado proviene de un terreno con historial de contaminación por hidrocarburos. Se evidenció que presenta hidrocarburos como BTEX, antraceno, benzo(a)pireno, fenantreno, fluoranteno, naftaleno, entre otros (Golder Associates S.A., 2018). La presencia de hidrocarburos en el medio ambiente afecta a las comunidades microbianas, favoreciendo la proliferación de géneros hidrocarbonoclásticos (LaMontagne et al., 2004).

A partir de la identificación de cepas de columnas de biorremediación se aislaron 37 cepas identificadas dentro del género *Acinetobacter* que tuvieron mayor cercanía a la especie *A. tandoii*, en promedio con $99.45\% \pm 0.53\%$ de identidad. De la misma forma, se aislaron 10 cepas del género *Rhodococcus* que tuvieron mayor cercanía a la especie *R. erythropolis*, en promedio con $99.82\% \pm 0.41\%$ de identidad. Estos fueron el primer y tercer género más aislado de los enriquecimientos. Ambos géneros fueron agregados a los ensayos de biorremediación, por lo que su aislamiento sugiere su supervivencia en el suelo post tratamiento.

Resulta especialmente interesante prestar atención a las cepas aisladas del enriquecimiento con estireno, ya que la concentración utilizada (1% v/v) resultó ser altamente tóxica, lo que limitó notablemente el número de cepas que se pudo aislar (28 aislados). En comparación, el fluoranteno demostró ser menos tóxico, permitiendo una mayor proliferación bacteriana y por ende, una mayor cantidad de cepas aisladas (101 aislados). Este contraste resalta la mayor toxicidad del estireno y subraya la resiliencia de las pocas cepas capaces de sobrevivir en dichas condiciones.

Se identificaron dos géneros tolerantes a estireno: *Chungangia* y *Nocardia*. Por un lado, *Chungangia* es un género muy escasamente estudiado, aislado por primera vez desde sedimentos marinos de una granja de camaronicultura en Corea (Kim et al., 2012). Según la literatura disponible hasta la fecha, ha sido identificado en seis ocasiones en los siguientes lugares: laguna

con residuos industriales en India (Krishna et al., 2014), lodo activado de una planta de tratamiento de agua en China (Yan et al., 2020a), suelo en China (Y. Liu et al., 2020a; X. Wang et al., 2024; Zang et al., 2024a), muestras de microbioma fecal humano en Nigeria (Doumatey et al., 2021) y suelos de ambientes naturales, que van desde praderas hasta bosques en Dinamarca (Xu et al., 2024). Sin embargo, aunque las publicaciones citadas brindan información sobre los lugares donde se puede encontrar el género *Chungangia*, ninguno de ellos ha profundizado en el estudio de la especie en sí. Las cepas aisladas identificadas dentro del género *Chungangia* coincidieron en promedio $98.95\% \pm 0.13\%$ con la única especie descrita del género (Parte et al., 2020); *C. koreensis*, por lo que podrían representar nuevas especies de este género monoespecífico.

La cepa SS1M.3-1 identificada dentro del género *Nocardia*, tuvo mayor cercanía a la especie *N. fluminea* con un 97,27% de identidad. Este género tiene especies hidrocarbonoclásticas sin embargo y, a pesar de su abundancia en el medio ambiente, ha sido menos estudiado que otros géneros. Presenta un crecimiento más lento que otros géneros utilizados en biorremediación, sin embargo tiene especies capaces de tolerar condiciones desfavorables en ambientes contaminados, lo que lo hace un candidato atractivo para aplicación. En 2020 se publicó el primer y único estudio hasta la fecha en que se demuestra la capacidad de *N. fluminea* como especie hidrocarbonoclástica degradadora de fenol y PAHs (Azadi & Shojaei, 2020). Sería interesante continuar investigando esta cepa aislada para comprobar si se trata de una especie nueva dentro del género *Nocardia*, o comprobar y ampliar el conocimiento respecto a las capacidades degradadoras de *N. fluminea*.

Por otro lado, se tuvo dificultades para identificar la cepa la cepa SS1R.1-C. Resulta una candidata interesante ya que fue de las pocas aisladas a partir del enriquecimiento de estireno, muestra crecimiento rápido (2 días en MA) y alta tolerancia a estireno en crecimiento en placa

(15 ul). Además, creció en placa con fluoranteno (100 mg/L) y medio ONR7a, lo que indica que es una cepa tolerante a hidrocarburos aromáticos, justificando su potencial para ser degradadora y muy resistente a ambientes inhóspitos.

Como se mencionó anteriormente, el 81% de los géneros aislados ha sido descrito previamente como hidrocarbonoclástico. Es relevante prestar atención al 19% que no ha sido clasificado de esta manera. En la Tabla 10 se hizo un resumen de estos géneros, incluyendo el año en que fueron número de especies y un breve resumen de la información relacionada con degradación de HC que se ha publicado hasta la fecha. Se tienen géneros con muy pocas especies, como es el caso de *Allopusillimonas* (1), *Chungangia* (1), *Krasilnikoviella* (2) o *Alloalcanivorax* (2). El estudio de géneros bacterianos que tienen pocas especies descritas es interesante por varias razones. Dentro del contexto de degradación de hidrocarburos, estos microorganismos poco estudiados podrían tener capacidades metabólicas novedosas, ofreciendo nuevas perspectivas de tratamiento. Específicamente podrían llevar al descubrimiento de nuevas enzimas o rutas metabólicas más eficientes o complementarias a las existentes y aplicadas a la fecha, o podrían también tener propiedades de adaptación a condiciones adversas. Su estudio es interesante e importante para continuar con el desarrollo de técnicas de biorremediación, además de ampliar el conocimiento respecto a su ecología, evolución y rol en el ecosistema. A pesar de no haber mucha información acerca de los géneros descritos en la Tabla 10, el hecho de haberlos aislado desde columnas de biorremediación o enriquecimiento con hidrocarburos nos señala que son capaces de sobrevivir en ambientes con HC, lo que sugiere que podrían tener propiedades hidrocarbonoclásticas no descritas.

Tabla 10: Géneros aislados con poca o nula evidencia de degradación de hidrocarburos y/o escasamente documentados hasta la fecha. Información de número de especies obtenido el 2024 de repositorio online LPSN (Parte et al., 2020)

Género	Especies	Literatura	Fuente
<i>Allopusillimonas</i>	1	En 2020 se descubrió la primera <i>Pusillimonas</i> que degrada PAHs	(W. Wang et al., 2020)
<i>Chungangia</i>	1	Identificada en contextos de degradación de HC (fenol y tolueno)	(Y. Liu et al., 2020b; Yan et al., 2020b; Zang et al., 2024b)
<i>Isoalcanivorax</i>	2	Presencia de genes degradadores de HC	(Lai & Shao, 2012)
<i>Krasilnikoviella</i>	2	No hay información	-
<i>Myceligenerans</i>	5	Degrada benzo(a)pireno, resistente a condiciones extremas y promotor del crecimiento vegetal	(Kaleri et al., 2024; Zhao et al., 2022)
<i>Sinomicrobium</i>	5	Recientemente aislada en contextos de degradación de HC, actividad alguicida, antibacteriana y antifúngica	(Al-Marri et al., 2023b; Marasco et al., 2023b; Perdigão et al., 2024; Pringgenies et al., 2023)
<i>Allorhizobium</i>	10	Identificada en contextos de degradación de HC	(Abdul Raheem et al., 2022; Pandolfo et al., 2024)
<i>Cellvibrio</i>	11	Identificada en contextos de degradación de HC	(He et al., 2024a; Ridley & Voordouw, 2018; Vivas et al., 2008; Yang et al., 2024)
<i>Mesobacillus</i>	14	Degrada poliestireno	(R. Liu et al., 2023)
<i>Promicromonospora</i>	14	Aislada en contextos de degradación de HC, genes de degradación de HC, aislada en residuos de agricultura, es promotor del crecimiento vegetal y tiene potencial como fertilizante	(Koshlaf et al., 2020; H. Liu et al., 2020; Sekkour et al., 2019; Wu et al., 2017)

Por último, es relevante recordar que se trabajó con métodos microbiológicos cultivo-dependientes, lo que significa que se está dejando de lado todas las bacterias que son hasta el momento no cultivables y que se estima que representan el 99% de las especies. Una forma de abordar este sesgo sería realizar un estudio metagenómico de las bacterias hidrocarbonoclásticas presentes en el suelo y en los ensayos de enriquecimiento. De esta manera se podría contrastar el cambio de la comunidad bacteriana al ser expuesta a hidrocarburos de forma más directa, además de estudiar la presencia de genes asociados a la degradación específica de hidrocarburos aromáticos.

Construcción de Consorcio Degradador Simplificado

Los ensayos de enriquecimiento realizados en viales de 5 ml permitieron exponer a consorcios con distintos niveles de carga bacteriana a estireno y fluoranteno, con el fin de comprobar la degradación de estos compuestos por consorcios. Para la degradación de fluoranteno, se obtuvo que el consorcio sin diluir (10^0) y el consorcio con factor de dilución 10^{-6} tuvieron las menores concentraciones de fluoranteno, posiblemente debido a la degradación del compuesto. Para el caso de la degradación de estireno, se obtuvo que la dilución 10^{-2} tuvo la menor concentración del compuesto. Se obtienen entonces tres consorcios con potencial de degradación de HC aromáticos, dos para fluoranteno y uno para estireno. Se sugiere la continuación del estudio de estos consorcios mediante extracción de ADN para comprobar las

especies presentes y los genes asociados a la degradación de ambos compuestos. Sería interesante comprobar la presencia de los géneros aislados en ensayos de enriquecimiento, dentro de estos consorcios. Sin embargo, los resultados para las demás diluciones presentaron alta variabilidad, sin mostrar una tendencia clara en la disminución de estireno o fluoranteno en los viales. Esta variabilidad podría deberse a una combinación de errores experimentales. El uso de un volumen de trabajo de 500 µl podría haber magnificado tanto el error instrumental de las pipetas como el error en la extracción orgánica. Al usar volúmenes tan pequeños, estas imprecisiones adquieren mayor relevancia en los resultados finales. Además, la volatilidad del estireno puede haber generado pérdidas por evaporación, afectando los datos obtenidos. Para minimizar estos problemas, se recomienda realizar futuros experimentos con mayores volúmenes de muestra. Los inóculos de cada dilución se conservaron en glicerol a -80°C, lo que permite realizar pruebas adicionales para determinar si los consorcios formados en cada dilución pueden biodegradar hidrocarburos. Asimismo, sería útil realizar una identificación genómica de las bacterias presentes en estos consorcios y analizar cómo esta composición cambia a medida que el consorcio se simplifica con diluciones sucesivas.

Caracterización y evaluación de capacidad hidrocarbonoclástica de cepas de interés

Se evaluó el rango de pH y crecimiento utilizando HC en seis cepas seleccionadas, utilizando caldo marino (MB) pH 5,35–9,51 y medio ONR7a con diésel, BTEX, estireno y fluoranteno como única fuente de carbono. Se comprobó que la mayoría de las cepas crecieron entre pH 6,90 y 9,51 esto es coherente con el lugar del que fueron aisladas, considerando que el pH del océano pacífico es 8,06 (L. Q. Jiang et al., 2019) y las muestras provinieron de suelos costeros. Ciertas cepas presentaron un valor óptimo de pH, como lo fue *Dietzia* sp. M76 que

creció más en pH 8,63. Es importante tener esto en consideración para que el pH no sea un factor estresor y contribuya con un óptimo crecimiento para poder evaluar otros factores que afecten a las bacterias a estudiar.

Las cepas *Allocanivorax* sp. M55 e *Isoalcanivorax* sp. M81a mostraron crecimiento en medio MB con un rango de pH de 6,9 a 9,5 y lograron crecer en medio ONR7a líquido con diésel como única fuente de carbono. Según estudios previos, la especie *Alloalcanivorax dieselolei* degrada un amplio rango de HC, como alcanos (C_6 - C_{36}) (Wang & Shao, 2014) y diésel (Qiao & Shao, 2010). Sin embargo, hasta la fecha, no se ha reportado la capacidad de especies del género *Isoalcanivorax* para utilizar hidrocarburos como fuente de carbono, lo que hace especialmente relevante este hallazgo y resalta su potencial para procesos de biorremediación.

La cepa del género *Marinobacter* comenzó a tener crecimiento al final del ensayo con diésel, esto podría indicar que es una cepa que requiere más tiempo de adaptación al contaminante o también puede ser que para entonces el HC se haya volatilizado lo suficiente como para permitir el crecimiento de la cepa.

Por otro lado, ninguna de las cepas estudiadas creció sin fuente de carbono o en presencia de BTEX, estireno o fluoranteno. Si se tiene en cuenta que naturalmente las bacterias viven en comunidad y en continua interacción entre sí, el hecho de que aislados puros no hayan utilizado HC como fuente de carbono puede explicarse debido a la falta de enzimas para completar la ruta metabólica necesaria para transformar el HC en energía/carbono. Se ha visto que los consorcios bacterianos degradan HC de forma más eficiente que aislados puros, posiblemente debido al catabolismo complementario de los metabolitos que se van generando cuando una especie no degrada completamente el HC. Se forma así una dinámica cooperativa entre especies que permite el aprovechamiento de las distintas capacidades metabólicas de las especies (McGenity et al.,

2012; Nieto et al., 2024). Por lo tanto se sugiere trabajar con consorcios bacterianos para aumentar las probabilidades de degradación de HC.

Además se evidenció dificultad para obtener crecimiento en medio líquido ONR7a a pesar de tener acetato como fuente de carbono. Esto podría deberse a la necesidad de las bacterias en cuestión en crecer sobre una matriz sólida, por lo que ensayos de inmovilización podrían ser interesantes para obtener mejores resultados de crecimiento en medio mínimo líquido y posterior degradación de HC.

Conclusiones

El desarrollo de esta tesis se basó en tres objetivos específicos: (1) Aislar e identificar cepas bacterianas hidrocarbonoclásticas provenientes de suelos costeros y sedimentos marinos contaminados con hidrocarburos en la región de Valparaíso; (2) Seleccionar y caracterizar aquellas cepas con capacidad de biodegradar hidrocarburos aromáticos; y (3) Evaluar la capacidad de biodegradación de las cepas seleccionadas. Con respecto al primer objetivo, se lograron aislar 408 cepas bacterianas tolerantes a hidrocarburos mediante enriquecimientos con BTEX, diésel, estireno y fluoranteno. De estos aislados se identificaron 243 a nivel de género mediante secuenciación parcial del gen 16S ARNr. Las cepas identificadas están distribuidas en 4 filos, 8 clases, 16 órdenes, 27 familias y 50 géneros. Se aislaron géneros previamente descritos como hidrocarbonoclásticos como *Acinetobacter*, *Pseudomonas* y *Kocuria*, géneros asociados a degradación de HC como *Alloalcanivorax* e *Isoalcanivorax* así como también géneros poco descritos y monoespecíficos, como *Allopusillimonas* y *Chungangia*. En cuanto al segundo objetivo, se seleccionaron 14 cepas y se evaluó su capacidad de crecimiento en diferentes pH. Las cepas en su mayoría crecieron óptimamente en un rango de 6,9 a 9,5, habiendo excepciones como *Arthrobacter* sp. SF82b y *Paenarthrobacter* sp. SF95a que crecieron óptimamente en pH 6,9 y *Dietzia* sp. M76 en pH 8,6 respectivamente. En su mayoría las cepas se encontraban en la mitad de su fase exponencial de crecimiento a las 40hrs de cultivo en medio MB, mientras que este tiempo se duplicaba en medio mínimo ONR7a, ambos casos con acetato como fuente de carbono. Finalmente, en relación con el tercer objetivo, se evaluó la capacidad de biodegradación de 6 cepas inoculándolas en medio ONR7a con HC. Se observó que *Alloalcanivorax* sp. M55 e *Isoalcanivorax* sp. M81a crecieron con diésel como única fuente de carbono. El crecimiento de

especies de los géneros *Alloalcanivorax* e *Isoalcanivorax* utilizando hidrocarburos como fuente de carbono no había sido previamente documentado en la literatura.

Por lo tanto, luego de cumplir con los objetivos planteados se concluye que el suelo contaminado de Las Salinas contiene presencia de bacterias capaces de tolerar hidrocarburos aromáticos como BTEX, fluoranteno y estireno. Se comprobó la capacidad de degradación de cepas del género *Alloalcanivorax* e *Isoalcanivorax* y se propone la continuación del estudio de las cepas identificadas como *Chungangia* y *Nocardia* debido a su inusual capacidad para resistir altas concentraciones de estireno, a la falta de conocimiento de estos géneros y a su potencial como bacteria hidrocarbonoclástica con aplicaciones biotecnológicas.

Referencias

- Abdul Raheem, A. S., Hentati, D., Bahzad, D., Abed, R. M. M., & Ismail, W. (2022). Biocatalytic upgrading of unconventional crude oil using oilfield-inhabiting bacterial consortia. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 174, 105468. <https://doi.org/10.1016/J.IBIOD.2022.105468>
- Abo-State, M. A. M., Riad, B. Y., Bakr, A. A., & Abdel Aziz, M. F. (2018). Biodegradation of naphthalene by *Bordetella avium* isolated from petroleum refinery wastewater in Egypt and its pathway. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 11(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2017.10.001>
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry. (1995). *Toxicological Profile for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*.
- Al-Marri, S., Eldos, H. I., Ashfaq, M. Y., Saeed, S., Skariah, S., Varghese, L., Mohamoud, Y. A., Sultan, A. A., & Raja, M. M. (2023a). Isolation, identification, and screening of biosurfactant-producing and hydrocarbon-degrading bacteria from oil and gas industrial waste. *Biotechnology Reports*, 39. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2023.e00804>
- ATSDR. (1999). *Toxicological Profile for Total Petroleum Hydrocarbons (TPH)* (Agency for Toxic Substances and Disease Registry (US), Ed.). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK595972/>
- Azadi, D., & Shojaei, H. (2020). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons, phenol and sodium sulfate by *Nocardia* species isolated and characterized from Iranian ecosystems. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78821-1>

- Barra, B. (2019). *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 Microbianas En Agua Marina Contaminada*. Utfsm - Pucv.
- Bodor, A., Bounedjoum, N., Vincze, G. E., Erdeiné Kis, Á., Laczi, K., Bende, G., Szilágyi, Á., Kovács, T., Perei, K., & Rákhely, G. (2020). Challenges of unculturable bacteria: environmental perspectives. In *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* (Vol. 19, Issue 1). Springer. <https://doi.org/10.1007/s11157-020-09522-4>
- Borowik, A., Wyszowska, J., Kucharski, M., & Kucharski, J. (2019). Implications of soil pollution with diesel oil and BP petroleum with ACTIVE technology for soil health. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(14). <https://doi.org/10.3390/ijerph16142474>
- Daher Hazaimah, M., & Ahmed, E. S. (2021). Bioremediation perspectives and progress in petroleum pollution in the marine environment: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 28, 54238–54259. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-15598-4>/Published
- Dombrowski, N., Donaho, J. A., Gutierrez, T., Seitz, K. W., Teske, A. P., & Baker, B. J. (2016). Reconstructing metabolic pathways of hydrocarbon-degrading bacteria from the Deepwater Horizon oil spill. *Nature Microbiology*, 1(7). <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.57>
- Doumatey, A., Zhou, J., Adeyemo, A., & Rotimi, C. (2021, December). *Relationships Between Gut Microbiome and Plasma Metabolomics in Obesity in West Africans*. Silver Spring. <https://www.proquest.com/openview/c762d06d95bb923f1bc8286d277cbe88/1?cbl=105348&pq-origsite=gscholar>

- Durán, R. (2019). *Caracterización genómica y funcional del catabolismo de hidrocarburos aromáticos en la bacteria marina Alcaligenes aquatilis QD168 y estudio de la respuesta adaptativa a estrés oxidativo durante la degradación de benceno*. Universidad de Chile.
- El Mercurio. (2014). *Derrame de petróleo en Quintero fue de 22 mil litros y no de 3 mil*. <https://www.emol.com/noticias/nacional/2014/10/03/683244/derrame-de-petroleo-en-quintero-fue-de-22-mil-litros-y-no-de-3-mil.html>
- El Mercurio. (2019). *Greenpeace por derrame de petróleo en Puerto Natales: “Las consecuencias pueden ser devastadoras”*. <https://www.emol.com/noticias/Nacional/2019/07/28/956095/Greenpeace-por-derrame-de-petroleo-en-Puerto-Natales-Las-consecuencias-pueden-ser-devastadoras.html>
- Ganesh Kumar, A., Nivedha Rajan, N., Kirubakaran, R., & Dharani, G. (2019). Biodegradation of crude oil using self-immobilized hydrocarbonoclastic deep sea bacterial consortium. *Marine Pollution Bulletin*, 146, 741–750. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.07.006>
- Giebler, J., Wick, L. Y., Chatzinotas, A., & Harms, H. (2013). Alkane-degrading bacteria at the soil–litter interface: comparing isolates with T-RFLP-based community profiles. *FEMS Microbiology Ecology*, 86(1), 45–58. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12097>
- Golder Associates S.A. (2018). *Línea de Base - Saneamiento del Terreno Las Salinas*.
- Gutierrez, T., Morris, G., Ellis, D., Bowler, B., Jones, M., Salek, K., Mulloy, B., & Teske, A. (2018). Hydrocarbon-degradation and MOS-formation capabilities of the dominant bacteria enriched in sea surface oil slicks during the Deepwater Horizon oil spill. *Marine Pollution Bulletin*, 135, 205–215. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.07.027>
- He, L., Wang, Y., Xi, B., Zhao, X., Cai, D., Sun, Y., Du, Y., & Zhang, C. (2024a). Synergistic removal of total petroleum hydrocarbons and antibiotic resistance genes in Yellow River

- Delta wetlands contaminated soil composting regulated by biogas slurry addition. *Environmental Research*, 252, 118724. <https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2024.118724>
- He, L., Wang, Y., Xi, B., Zhao, X., Cai, D., Sun, Y., Du, Y., & Zhang, C. (2024b). Synergistic removal of total petroleum hydrocarbons and antibiotic resistance genes in Yellow River Delta wetlands contaminated soil composting regulated by biogas slurry addition. *Environmental Research*, 252, 118724. <https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2024.118724>
- Jiang, L. Q., Carter, B. R., Feely, R. A., Lauvset, S. K., & Olsen, A. (2019). Surface ocean pH and buffer capacity: past, present and future. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55039-4>
- Jiang, L., Song, M., Luo, C., Zhang, D., & Zhang, G. (2015). Novel phenanthrene-degrading bacteria identified by DNA-stable isotope probing. *PLoS ONE*, 10(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130846>
- Kaleri, A. R., Ma, J., Jakhar, A. M., Ahmed, A., Faqir, Y., Tan, C., Stanković, S., & Raspor, M. (2024). Composting of Cow-Dung-Amended Soil by the Dung Beetle *Catharsius molossus* L. Improves Bacterial Ecological Functions Related to Nitrogen Mineralization and Human and Plant Pathogenesis. *Agronomy*, 14(9), 2091. <https://doi.org/10.3390/AGRONOMY14092091/S1>
- Kim, W., Traiwan, J., Park, M. H., Jung, M. Y., Oh, S. J., Yoon, J. H., & Sukhoom, A. (2012). *Chungangia koreensis* gen. nov., sp. nov., isolated from marine sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(8), 1914–1920. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.028837-0>
- Kirk-Othmer. (2006). Styrene. In Kirk-Othmer (Ed.), *Encyclopedia of Chemical Technology* (5th ed., Vol. 23). Wiley.

- Kleindienst, S., Grim, S., Sogin, M., Bracco, A., Crespo-Medina, M., & Joye, S. B. (2016). Diverse, rare microbial taxa responded to the Deepwater Horizon deep-sea hydrocarbon plume. *ISME Journal*, 10(2), 400–415. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.121>
- Koshlaf, E., & Ball, A. S. (2017). Soil bioremediation approaches for petroleum hydrocarbon polluted environments. In *AIMS Microbiology* (Vol. 3, Issue 1, pp. 25–49). AIMS Press. <https://doi.org/10.3934/MICROBIOL.2017.1.25>
- Koshlaf, E., Shahsavari, E., Haleyur, N., Osborn, A. M., & Ball, A. S. (2020). Impact of necrophytoremediation on petroleum hydrocarbon degradation, ecotoxicity and soil bacterial community composition in diesel-contaminated soil. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(25), 31171–31183. <https://doi.org/10.1007/S11356-020-09339-2/FIGURES/6>
- Krishna, P., Babu, A. G., & Reddy, M. S. (2014). Bacterial diversity of extremely alkaline bauxite residue site of alumina industrial plant using culturable bacteria and residue 16S rRNA gene clones. *Extremophiles*, 18(4), 665–676. <https://doi.org/10.1007/s00792-014-0647-8>
- Kuppusamy, S., Maddela, N. R., Megharaj, M., & Venkateswarlu, K. (2019). Total Petroleum Hydrocarbons. In *Total Petroleum Hydrocarbons: Environmental Fate, Toxicity, and Remediation*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-24035-6>
- Kweon, O., Kim, S. J., Jones, R. C., Freeman, J. P., Adjei, M. D., Edmondson, R. D., & Cerniglia, C. E. (2007). A polyomic approach to elucidate the fluoranthene-degradative pathway in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *Journal of Bacteriology*, 189(13), 4635–4647. <https://doi.org/10.1128/JB.00128-07>
- Ladino-Orjuela, G., Gomes, E., da Silva, R., Salt, C., & Parsons, J. R. (2016). Metabolic pathways for degradation of aromatic hydrocarbons by bacteria. In *Reviews of Environmental*

- Contamination and Toxicology* (Vol. 237, pp. 105–121). Springer New York LLC.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-23573-8_5
- Lai, Q., & Shao, Z. (2012). Genome Sequence of an Alkane-Degrading Bacterium, *Alcanivorax pacificus* Type Strain W11-5, Isolated from Deep Sea Sediment. *Journal of Bacteriology*, 194(24), 6936–6936. <https://doi.org/10.1128/JB.01845-12>
- LaMontagne, M. G., Leifer, I., Bergmann, S., Van De Werfhorst, L. C., & Holden, P. A. (2004). Bacterial diversity in marine hydrocarbon seep sediments. *Environmental Microbiology*, 6(8), 799–808. <https://doi.org/10.1111/J.1462-2920.2004.00613.X>
- Li, L., Zhao, C., Liu, Q., & Zhang, Y. (2013). Isolation and Genetic Identification of Dibenzothiophene Degrading Bacteria from Contaminated Soil. *Advanced Materials Research*, 610–613, 292–295. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/amr.610-613.292>
- Li, Y., Li, C., Xin, Y., Huang, T., & Liu, J. (2022). Petroleum pollution affects soil chemistry and reshapes the diversity and networks of microbial communities. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 246, 114129. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.114129>
- Liu, H., Gao, H., Wu, M., Ma, C., Wu, J., & Ye, X. (2020). Distribution Characteristics of Bacterial Communities and Hydrocarbon Degradation Dynamics During the Remediation of Petroleum-Contaminated Soil by Enhancing Moisture Content. *Microbial Ecology*, 80(1), 202–211. <https://doi.org/10.1007/S00248-019-01476-7/TABLES/3>
- Liu, J., Cui, Z., Hao, T., Li, Y., Luan, X., Feng, K., & Zheng, L. (2023). Characterization and Hydrocarbon Degradation Potential of *Variovorax* sp. Strain N23 Isolated from the Antarctic Soil. *Microbiology Research*, 14(1), 91–103. <https://doi.org/10.3390/microbiolres14010009>
- Liu, R., Zhao, S., Zhang, B., Li, G., Fu, X., Yan, P., & Shao, Z. (2023). Biodegradation of

- polystyrene (PS) by marine bacteria in mangrove ecosystem. *Journal of Hazardous Materials*, 442, 130056. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2022.130056>
- Liu, Y., Wang, W., Shah, S. B., Zamaroli, G., Xu, P., & Tang, H. (2020a). Phenol biodegradation by *Acinetobacter radioresistens* APH1 and its application in soil bioremediation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(1), 427–437. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10271-w>
- Liu, Y., Wang, W., Shah, S. B., Zamaroli, G., Xu, P., & Tang, H. (2020b). Phenol biodegradation by *Acinetobacter radioresistens* APH1 and its application in soil bioremediation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(1), 427–437. <https://doi.org/10.1007/S00253-019-10271-W/TABLES/2>
- López, Z., Vila, J., Minguillón, C., & Grifoll, M. (2006). Metabolism of fluoranthene by *Mycobacterium* sp. strain AP1. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 70(6), 747–756. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0120-9>
- Lyu, L., Li, J., Chen, Y., Mai, Z., Wang, L., Li, Q., & Zhang, S. (2022). Degradation potential of alkanes by diverse oil-degrading bacteria from deep-sea sediments of Haima cold seep areas, South China Sea. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.920067>
- MacroGen. (2022). *MacroGen Europe Universal Primer list*. <https://www.macrogen-europe.com/support/macrogen-europe-universal-primer-list>
- Marasco, R., Michoud, G., Sefrji, F. O., Fusi, M., Antony, C. P., Seferji, K. A., Barozzi, A., Merlino, G., & Daffonchio, D. (2023a). The identification of the new species *Nitratireductor thuwali* sp. nov. reveals the untapped diversity of hydrocarbon-degrading culturable bacteria from the arid mangrove sediments of the Red Sea. *Frontiers in Microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1155381>

- Marasco, R., Michoud, G., Sefrji, F. O., Fusi, M., Antony, C. P., Seferji, K. A., Barozzi, A., Merlino, G., & Daffonchio, D. (2023b). The identification of the new species *Nitratireductor thuwali* sp. nov. reveals the untapped diversity of hydrocarbon-degrading culturable bacteria from the arid mangrove sediments of the Red Sea. *Frontiers in Microbiology*, *14*, 1155381. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2023.1155381/BIBTEX>
- McGenity, T. J., Folwell, B. D., McKew, B. A., & Sanni, G. O. (2012). Marine crude-oil biodegradation: a central role for interspecies interactions. In *Aquatic Biosystems* (Vol. 8, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/2046-9063-8-10>
- Mei, R., Zhou, M., Xu, L., Zhang, Y., & Su, X. (2019). Characterization of a pH-Tolerant Strain *Cobetia* sp. SASS1 and Its Phenol Degradation Performance Under Salinity Condition. *Frontiers in Microbiology*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02034>
- 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. In *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* (Vol. 17, Issue 4).
- Meng, S., Peng, T., Liu, Y., Zhang, S., Qian, Z., Huang, T., Xie, Q., Gu, J. D., & Hu, Z. (2024). Novel insights into the synergetic degradation of pyrene by microbial communities from mangroves in China. *Journal of Hazardous Materials*, *469*, 133907. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2024.133907>
- Mooney, A., Ward, P. G., & O'Connor, K. E. (2006). Microbial degradation of styrene: Biochemistry, molecular genetics, and perspectives for biotechnological applications. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 72, Issue 1, pp. 1–10). <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0443-1>

- Narayanan, G., Talib, M., Singh, N., & Darbha, G. K. (2024). Toxic effects of polystyrene nanoplastics and polycyclic aromatic hydrocarbons (chrysene and fluoranthene) on the growth and physiological characteristics of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquatic Toxicology*, 268. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2024.106838>
- National Center for Biotechnology Information. (2023a). *Fluoranthene*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Fluoranthene>
- National Center for Biotechnology Information. (2023b). *Styrene*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Styrene>
- Nieto, E. E., Festa, S., Colman, D., Morelli, I. S., & Coppotelli, B. M. (2024). Challenging the impact of consortium diversity on bioaugmentation efficiency and native bacterial community structure in a freshly PAH-contaminated soil. *BioRxiv*, 2024.04.13.589391. <https://doi.org/10.1101/2024.04.13.589391>
- OMI. (2011). *Codigo IMDG*.
- Pandolfo, E., Durán-Wendt, D., Martínez-Cuesta, R., Montoya, M., Carrera-Ruiz, L., Vazquez-Arias, D., Blanco-Romero, E., Garrido-Sanz, D., Redondo-Nieto, M., Martin, M., & Rivilla, R. (2024). Metagenomic analyses of a consortium for the bioremediation of hydrocarbons polluted soils. *AMB Express*, 14(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/S13568-024-01764-7/FIGURES/6>
- Perdigão, R., Tomasino, M. P., Magalhães, C., Carvalho, M. F., Almeida, C. M. R., & Mucha, A. P. (2024). Microbial response to a port fuel spill: Community dynamics and potential for bioremediation. *Marine Pollution Bulletin*, 203, 116434. <https://doi.org/10.1016/J.MARPOLBUL.2024.116434>
- Prince, R. C., Gramain, A., & McGenity, T. J. (2010). Prokaryotic Hydrocarbon Degradation. In

- Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* (pp. 1669–1692). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-77587-4_118
- Pringgenies, D., Wilis, A. S., Feliatra, F., & Ariyanto, D. (2023). The antibacterial and antifungal potential of marine natural ingredients from the symbiont bacteria of mangrove. *Global Journal of Environmental Science and Management*, 9(4), 819–832. <https://doi.org/10.22035/GJESM.2023.04.11>
- Reddy, P. V., Karegoudar, T. B., Monisha, T. R., Mukram, I., & Nayak, A. S. (2018). Biodegradation of fluoranthene by *Paenibacillus* sp. strain PRNK-6: a pathway for complete mineralization. *Archives of Microbiology*, 200(1), 171–182. <https://doi.org/10.1007/s00203-017-1431-9>
- Rehmann, K., Hertkorn, N., & Kettrup, A. A. (2001). Fluoranthene metabolism in *Mycobacterium* sp. strain KR20 : identity of pathway intermediates during degradation and growth. In *Microbiology* (Vol. 147).
- Ridley, C. M., & Voordouw, G. (2018). Aerobic microbial taxa dominate deep subsurface cores from the Alberta oil sands. *FEMS Microbiology Ecology*, 94(6), 73. <https://doi.org/10.1093/FEMSEC/FIY073>
- Rizzo, C., Rappazzo, A. C., Michaud, L., De Domenico, E., Rochera, C., Camacho, A., & Lo Giudice, A. (2018). Efficiency in hydrocarbon degradation and biosurfactant production by *Joostella* sp. A8 when grown in pure culture and consortia. *Journal of Environmental Sciences (China)*, 67, 115–126. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2017.08.007>
- Rodríguez Castro, L., Durán, R., Macaya, C., Dorochesi, F., Hernandez, L., Salazar-Tapia, F., Ayala-Espinoza, V., Santis-Cortés, P., Baez, X., & Seeger, M. (2022). *Novel Insights into Bioremediation of Petroleum-Polluted Environments and Bacterial Catabolic Pathways*

(pp. 65–112). <https://doi.org/10.1201/9781003277354-3>

Sala, M. M., Ruiz-González, C., Borrull, E., Azúa, I., Baña, Z., Ayo, B., Álvarez-Salgado, X. A., Gasol, J. M., & Duarte, C. M. (2020). Prokaryotic Capability to Use Organic Substrates Across the Global Tropical and Subtropical Ocean. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00918>

Sekkour, S., Bekki, A., Bouchiba, Z., Vogel, T. M., & Navarro, E. (2019). The Diversity Of Cultivable Hydrocarbon-Degrading Bacteria Isolated From Crude Oil Contaminated Soil And Sludge From Arzew Refinery In Algeria. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 9(1), 70–77. <https://doi.org/10.15414/JMBFS.2019.9.1.70-77>

Shao, Z. (2010). Enrichment and Isolation of Hydrocarbon Degraders. In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* (pp. 3777–3785). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-77587-4_297

Stepanova, A. Y., Gladkov, E. A., Osipova, E. S., Gladkova, O. V., & Tereshonok, D. V. (2022). Bioremediation of Soil from Petroleum Contamination. In *Processes* (Vol. 10, Issue 6). MDPI. <https://doi.org/10.3390/pr10061224>

Tikka, K., Levine, E., & Asa-Awuku, A. (2023). Oil in the sea IV. In *Oil in the Sea IV*. National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/26410>

Timmis, K. N. (2010). *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Springer.

Umar, Z. D., Aziz, N. A. A., Zulkifli, S. Z., & Mustafa, M. (2017). Rapid biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) using effective *Cronobacter sakazakii* MM045 (KT933253). *MethodsX*, 4, 104–117. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2017.02.003>

U.S. EIA. (2024, July 17). *U.S. Energy Information Administration*. What Countries Are the Top Producers and Consumers of Oil? <https://www.eia.gov/tools/faqs/faq.php?id=709&t=6>

- Vivas, A., Moreno, B., Del Val, C., MacCì, C., Masciandaro, G., & Benitez, E. (2008). Metabolic and bacterial diversity in soils historically contaminated by heavy metals and hydrocarbons. *Journal of Environmental Monitoring*, 10(11), 1287–1296. <https://doi.org/10.1039/B808567F>
- Wang, W., Li, Z., Zeng, L., Dong, C., & Shao, Z. (2020). The oxidation of hydrocarbons by diverse heterotrophic and mixotrophic bacteria that inhabit deep-sea hydrothermal ecosystems. *The ISME Journal*, 14(8), 1994–2006. <https://doi.org/10.1038/S41396-020-0662-Y>
- Wang, W., Zhong, R., Shan, D., & Shao, Z. (2014). Indigenous oil-degrading bacteria in crude oil-contaminated seawater of the Yellow sea, China. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(16), 7253–7269. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5817-1>
- Wang, X., Wang, Q., Zhang, D., Liu, J., Fang, W., Li, Y., Cao, A., Wang, Q., & Yan, D. (2024). Fumigation alters the manganese-oxidizing microbial communities to enhance soil manganese availability and increase tomato yield. *Science of the Total Environment*, 919. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.170882>
- Wu, M., Ye, X., Chen, K., Li, W., Yuan, J., & Jiang, X. (2017). Bacterial community shift and hydrocarbon transformation during bioremediation of short-term petroleum-contaminated soil. *Environmental Pollution*, 223, 657–664. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2017.01.079>
- Xu, X., Pioppi, A., Kieseewalter, H. T., Strube, M. L., & Kovács, Á. T. (2024). Disentangling the factors defining *Bacillus subtilis* group species abundance in natural soils. *Environmental Microbiology*, 26(9), e16693. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.16693>
- Yalaoui-Guellal, D., Fella-Temzi, S., Djafri-Dib, S., Brahmi, F., Banat, I. M., & Madani, K.

- (2020). Biodegradation potential of crude petroleum by hydrocarbonoclastic bacteria isolated from Soummam wadi sediment and chemical-biological proprieties of their biosurfactants. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, 184. <https://doi.org/10.1016/j.petrol.2019.106554>
- Yan, Y., Yang, J., Zhu, R., Nie, Y., Jin, B., & Li, S. (2020a). Performance evaluation and microbial community analysis of the composite filler micro-embedded with *Pseudomonas putida* for the biodegradation of toluene. *Process Biochemistry*, 92, 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.02.027>
- Yan, Y., Yang, J., Zhu, R., Nie, Y., Jin, B., & Li, S. (2020b). Performance evaluation and microbial community analysis of the composite filler micro-embedded with *Pseudomonas putida* for the biodegradation of toluene. *Process Biochemistry*, 92, 10–16. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2020.02.027>
- Yang, J., Wang, T., Sun, Y., Ni, Y., & Guo, Y. (2024). Soil pH is the Primary Factor Driving the Transformation of Plant Cuticular Wax in Saline Soils. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 24(2), 3389–3405. <https://doi.org/10.1007/s42729-024-01761-6>
- Zadjelovic, V., Gibson, M. I., Dorador, C., & Christie-Oleza, J. A. (2020). Genome of *Alcanivorax* sp. 24: A hydrocarbon degrading bacterium isolated from marine plastic debris. *Marine Genomics*, 49. <https://doi.org/10.1016/j.margen.2019.05.001>
- Zang, M., Ma, Z. H., Xu, Y. L., & Long, X. F. (2024a). Taxonomic identification, phenol biodegradation and soil remediation of the strain *Rhodococcus sacchari* sp. nov. Z13T. *Archives of Microbiology*, 206(7). <https://doi.org/10.1007/s00203-024-04048-7>
- Zang, M., Ma, Z. H., Xu, Y. L., & Long, X. F. (2024b). Taxonomic identification, phenol biodegradation and soil remediation of the strain *Rhodococcus sacchari* sp. nov. Z13T.

Archives of Microbiology, 206(7), 1–19. <https://doi.org/10.1007/S00203-024-04048-7/FIGURES/5>

Zhao, X., Li, J., Zhang, D., Huang, Z., Luo, C., Jiang, L., Huang, D., & Zhang, G. (2022). Mechanism of salicylic acid in promoting the rhizosphere benzo[a]pyrene biodegradation as revealed by DNA-stable isotope probing. *Science of The Total Environment*, 810, 152202. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2021.152202>