



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral:

Estudio de cultivos bacterianos degradadores de PAH: desde los estudios de diversidad a la microbiómica funcional

Tesista:

Nieto, Esteban Emanuel

Director/a:

Coppotelli, Bibiana M

Año:

2023

El presente trabajo, para optar al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de la Plata, fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI), Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección de la y la Dra. Bibiana M. Coppotelli.

Los resultados de este trabajo de tesis han dado origen a las siguientes publicaciones:

Artículos publicados

1. **Nieto, E. E.**, Macchi, M., Valacco, M. P., Festa, S., Morelli, I. S., Coppotelli, B. M. (2023). Metaproteomic and gene expression analysis of interspecies interactions in a PAH-degrading synthetic microbial consortium constructed with the key microbes of a natural consortium. *Biodegradation*, 1-17. <https://doi.org/10.1007/s10532-022-10012-3>
2. Macchi Marianela, Festa Sabrina, **Nieto Esteban**, Irazoqui José M., Vega-Vela Nelson E.; Junca Howard, Valacco María P., Amadio Ariel, Morelli Irma S., Coppotelli Bibiana M (2021). "Design and evaluation of synthetic bacterial consortia for optimized phenanthrene degradation through the integration of genomics and shotgun proteomics". *Biotechnology Reports*. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00588>.

Publicaciones a Congreso:

1. **Análisis transcriptómico sobre las interacciones entre cepas degradadoras de PAH en un cultivo mixto.** **Nieto Esteban E.**; Festa Sabrina; Macchi Marianela; Morelli Irma S.; Coppotelli Bibiana M. IV Congreso Argentino de Microbiología Agrícola y Ambiental, Mar del Plata, Argentina 2018
2. **Reconstrucción automática de una red metabólica específica guiada por datos genómicos y filogenéticos en un consorcio bacteriano degradador de PAH.** Macchi Marianela; Irazoqui José Matías; **Nieto Esteban**; Amadio Ariel; Coppotelli Bibiana. IV Congreso Argentino de Microbiología Agrícola y Ambiental, Mar del Plata, Argentina 2018.
3. **Incursión en el estudio de señalización por Quorum Sensing entre las poblaciones bacterianas que conforman un consorcio bacteriano degradador de fenantreno** Velloso Inés; **Nieto Esteban**; Coppotelli Bibiana. XXIV Congreso Latinoamericano de Microbiología. Santiago de Chile, Chile 2018
4. **Biodegradación de fenantreno por cultivos sintéticos: identificación de roles metabólicos mediante análisis transcriptómico.** Macchi Marianela; Festa Sabrina; **Nieto Esteban E**; Coppotelli Bibiana M; Morelli Irma S. XXIV Congreso Latinoamericano de Microbiología. Santiago de Chile, Chile 2018
5. **Variaciones transcripcionales de la cepa degradadora de PAH Burkholderia sp. Bk en co-cultivo con otra cepa degradadora.** **Nieto Esteban**; Macchi Marianela; Morelli Irma; Bibiana Coppotelli. Primer Congreso ISME America Latina. Valparaiso, Chile 2019.

6. **Obtención de un consorcio natural degradador de pireno y caracterización de su diversidad por secuenciación de alto rendimiento.** Layun Florencia, Festa Sabrina, **Nieto Esteban E.**; Morelli Irma S.; Coppotelli Bibiana M. Primer Congreso ISME America Latina. Valparaiso, Chile 2019.
7. **Metaproteomic Analysis of a PAH-degrading Dual Synthetic Bacterial Consortium Constructed with the Key Microbes of a Natural Consortium.** Nieto Esteban E.; Macchi Marianela; Valacco María P.; Morelli Irma S.; Coppotelli Bibiana M. World Microbe Forum, 2021.
8. **Physiological Characterization of a Phenanthrene Degrading Co-culture of *Sphingobium* sp. AM and *Burkholderia* sp Bk in PAH Mixtures: Challenging Genomic Data.** Nieto Esteban E.; Festa Sabrina; Morelli Irma S.; Coppotelli Bibiana M. World Microbe Forum, 2021
9. **Bioaumentación de suelos contaminados con hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH). eficiencia de distintos consorcios bacterianos frente a suelos con distinta historia de contaminación.** Nieto Esteban E.; Festa Sabrina, Morelli Irma S.; Coppotelli Bibiana M. V Congreso Argentino de Microbiología Agrícola y Ambiental, La Plata, Argentina 2021.
10. **Metaproteómica de consorcios bacterianos sintéticos degradadores de hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH): validación de estudios genómicos y fisiológicos.** Macchi Marianela; **Nieto Esteban E.**; Valacco María P.; Morelli Irma S.; Coppotelli Bibiana M. V Congreso Argentino de Microbiología Agrícola y Ambiental, La Plata, Argentina 2021

Agradecimientos

Este trabajo de tesis representa para mí una meta alcanzada, un sueño cumplido. A lo largo de este camino estuve acompañado de un montón de personas que me apoyaron, y en los siguientes párrafos me gustaría agradecerles brevemente por ese aporte inmaterial que fue tan importante para llevar a cabo esta tesis.

Quiero agradecer a mi directora, Bibi. Gracias por dirigir este camino, por tu paciencia, por incentivar me a perfeccionarme y a viajar, y a innovar en el uso de distintas técnicas, que tanto aportaron a este trabajo. Gracias!

A todo el L5 que hizo que esta experiencia sea increíble.

A Irma, gracias por tener la humildad de los grandes, dándome la posibilidad de debatir resultados y conceptos de ecología microbiana, aun cuando fue difícil cambiar mi opinión.

Gracias Vivi (“*Starevicha*”), la mejor compañera que me pudo tocar y la gran amiga que me regaló este doctorado. Que estés en el laboratorio ya cambia mi humor, ¡no sabes lo que te extrañé cuando estuve afuera! Gracias por el apoyo, por bancar mi locura, por esas charlas cotidianas, y por las más profundas también. Gracias por las risas y llantos. Gracias por cuidarme y darme aliento cuando lo necesité. Te quiero muchísimo. Gracias Sabri. Los renglones no me son suficientes para decirte lo agradecido que estoy con vos. Trabajar con vos fue (y es) un placer. Gracias por todo lo que me enseñaste, desde ordenar un Excel hasta analizar secuencias de 16S. Gracias por escucharme, por debatir las ideas y tenerme la paciencia suficiente para tratar de ordenar esta cabecita. Y gracias también por tu cariño, sabés todo lo que te quiero. Gracias y más gracias.

A Mari P, gracias por tu paciencia infinita ¿Quién puede aguantar mis audios diarios y eternos como vos? Gracias por la compañía cuando estuve lejos, por los tips de cocina, gracias por los consejos y por escucharme siempre, gracias por tu amistad.

A Lina, (*vieji*) gracias por esas charlas infinitas de como hacer una mejor ciencia, por esa cabeza que nunca deja de sorprenderme, por el apoyo, las risas y la buena onda siempre.

A Marian, mi hermana académica, gracias por enseñarme la proteómica (aunque casi no me dejabas respirar jeje) y por esos consejos que tanto me ayudaron.

A Naty por tu alegría contagiosa que cambiaba toda la dinámica del laboratorio. Gracias por siempre estar dispuesta a ayudarme.

A Lau, gracias por tu buena onda, por esas charlas de ecología que tanto nos apasionan, porque si no me hubieras alentado a hablar con Irma tal vez hoy no estaría acá.

A Caro, porque algún día me gustaría ser tan ordenado como vos, por escucharme y por ese humor que me descoloca pero que me divierte tanto.

A Vero, por esos consejos académicos y por el apoyo.

A Rober y a Maca, que poco tiempo se ganaron un lugar en mi corazón. Rober gracias por esas charlas cotidianas y también por esas charlas que me contagiaron el amor por los fagos. Maca, gracias por tu onda tan especial que le aporta mucho al laboratorio.

A Marti, gracias por esas charlas de ciencia y de la vida. Gracias por tu gran compañerismo, por tu forma de pensar en todos, por tu dulzura. Gracias

A Mari G., por esas charlas y risas diarias, fue difícil cuando te fuiste, pero aun así la amistad continuó.

Gracias Tere por ser quien despertó mi amor por los microorganismos.

Gracias a Pepi, Ampí, Vicu que siempre me recibieron con buena onda, y a todos los tesinistas que han formado parte del L5.

Gracias a mi familia por el apoyo incondicional.

Agradezco a mis papás, Juan y Marcelina, por apoyarme siempre, aun cuando no entendían qué estaba estudiando, o porque me ponía mal cuando un ensayo no salía o el paper no se publicaba. Porque fueron los que más tuvieron que soportar mi mal humor o mi tristeza, pero también mis alegrías. Gracias por ser mis modelos a seguir, por enseñarme a esforzarme, por todos los sacrificios que hicieron por nosotros, sus hijos. Esta tesis se las dedico a ustedes. Los amo mucho.

A mis hermanos, ese clan hermoso que Dios me regaló. Marie, gracias por cuidarme cuasi-maternalmente, por prepararme a los desafíos que el sistema académico representaba, por todos aquellos detalles que siempre tenés hacia mí. Mariana (*"Moshu"*) gracias por ser siempre incondicional, por sufrir conmigo, y alegrarte de mis logros. Sil y Emi, gracias por el aguante en todo momento.

A mis amigas Sofi, Lau y Juli. Sofi gracias por el apoyo siempre, por bancarme en todas, por aun ser comprensiva en mis momentos de mayor sensibilidad. Te admiro muchísimo. Lau, gracias por estar incondicionalmente, por esas llamadas que aun estando tan lejos, hacían que te sienta tan cerca. Gracias por decirme siempre la verdad, aun cuando no me gustaba. Juli, gracias por la buena onda siempre, por tu energía y por tu amistad. Tener a este trío de amigas incondicionales es uno de los privilegios más grande que tengo. Las quiero muchísimo.

Gracias Fran por estar siempre, por transitar este doctorado juntos ¿Quién me escuchó tanto hablar de AM y Bk como vos? Gracias por esas charlas compartidas hablando de casi cualquier tema, desde filosofía de la ciencia hasta los temas más banales. Por todo lo que me enseñaste, por ese pensamiento crítico que tanto admiro. Gracias por tu amistad, por bancarme en todas, sé que no soy fácil. Sabés todo lo que te quiero y lo que significás para mí.

Gracias Aldi por todo, por ser la primera persona que me enseñó a trabajar en el laboratorio, por incentivar mi espíritu crítico, por ese amor por la biología y la docencia que me inspira. Gracias por estar siempre, por esos consejos, esas charlas, por escucharme y apoyar mi carrera científica siempre.

A los cumpas, Yani, Juanma, Pipi, Facu, Flor, Pau, Juli V, Cami y Florcita por el apoyo siempre.

A Nahue por su amistad

A Antonis Chatzinotas, mi supervisor en Alemania, por permitirme trabajar, no solo una sino dos veces, en el Laboratorio de Ecología de las Interacciones del UFZ. Gracias por esas charlas de ciencia, que podían durar hasta tres horas, pero que perfeccionaron mi criterio científico. Gracias por escuchar siempre mis ideas y también por tu calidad humana. Gracias

A Nicole, por la ayuda en el ensayo de sip. Por ayudarme con las centrifugaciones, precipitaciones y las secuenciaciones, que no fueron pocas, porque aprendí de tu excelencia a la hora de trabajar.

Gracias Steph, que en estos meses me enseñaste muchísimo. Por tus preguntas desafiantes y tu visión de la ecología microbiana, que admiro y que continuamente aprendo de vos.

Gracias Marta por tu amistad, por integrarme y por cambiar mi experiencia en Leipzig. A Krupa, Cannan y Fátima por la buena onda

A la Cátedra de Fisiología Animal de la Fcnym por cubrirme cuando realicé las estadías en Alemania, en particular, gracias Susana por darme un espacio para compartir mis ideas y el apoyo siempre, y a Ana Clara, gracias por tu amistad.

A todo el CINDEFI donde pasé la mayor parte de estos últimos años. Gracias Tato por la buena disposición siempre.

En particular quiero agradecer a Esteban, por todo lo que me enseñaste de cromatografía, por la paciencia cuando te llevaba 80 muestras para analizar, pero también por las charlas de filosofía y de la vida.

A Mariana, una de las mejores incorporaciones del L5, gracias también por la paciencia, por ayudarme siempre con el GC, aun cuando te llenaba de muestras. Gracias por las charlas y las historias que nunca dejan de asombrarme.

Gracias a Marina A., Julito y Gladys por la buena predisposición siempre.

A todos los becarios del CINDEFI, en especial a Flor y Bren que siempre me ayudaron, haciéndome un lugarcito en el L1.

A CONICET por otorgarme esta beca doctoral.

A DAAD por financiar la estadía en Leipzig

A la Universidad Nacional de La Plata, una institución pública que permitió mi formación profesional, pero que me llenó de buenas experiencias y me permitió conocer personas increíbles.

Y gracias a Dios por acompañarme en cada momento.

Índice



Índice

I. Introducción	16
I.1 Contaminación ambiental por Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos	16
I.2 Biorremediación de sitios contaminados con PAHs	17
I.2.1 Bioaumentación	18
I.2.2 Degradación microbiana de PAH	20
I.2.3 Degradación de mezclas complejas de PAH	20
I.2.4 Aplicación de consorcios microbianos en procesos de biorremediación	21
I.3 Interacciones microbianas	22
I.3.1 Consorcios microbianos como modelos de estudio	23
I.3.2 Cross-feeding y División del Trabajo (DoL)	24
I.4 El fenómeno de invasión biológica	25
I.5 Rol de los protistas en la dinámica del suelo	27
I.6 Aplicación de metodologías ómicas en ecología microbiana	29
II. Objetivos e Hipótesis	34
II.1 Objetivos	34
II.1.1 Objetivos Generales	34
II.1.2 Objetivos Específicos	34
II.2 Hipótesis	34
III. Materiales y Métodos	38
III.1 Materiales	38
III.1.1 Cepas aisladas	38
III.1.2 Medios de cultivos	38
III.1.3 Reactivos	39
III.1.4 Buffers y soluciones	40
III.1.4.1 Buffers y soluciones para PCR	40
III.1.4.2 Buffer y soluciones para Proteómica	40

III.1.4.3 Soluciones para SIP DNA.....	41
III.1.5 Kits	42
III.2 Metodología	43
III.2.1 Preparación de los cultivos utilizados como inoculantes	43
III.2.1.1 Preparación de las cepas	43
III.2.1.2 Preparación del cocultivo	43
III.2.1.3 Preparación de los consorcios sintéticos	43
III.2.2 Cinéticas de degradación de PAH.....	44
III.2.2.1 Determinación de la concentración de fenantreno y ácido-1-hidroxi-2-naftoico	44
III.2.2.2 Cinéticas de degradación de PAH en mezclas con fenantreno	44
III.2.3 Estudio de la dinámica de las poblaciones bacterianas durante la degradación de PAH.	45
III.2.3.1 Estudio de interacciones en placas	45
III.2.3.2 Recuento diferencial de las poblaciones del cocultivo durante la degradación de fenantreno y la producción de ácido 1-hidroxi-2-naftoico.....	45
III.2.3.3 Recuento diferencial de las poblaciones del cocultivo durante la degradación de mezclas de PAH.	45
III.2.4 Análisis de expresión génica diferencial mediante RT-qPCR.....	46
III.2.4.1 Preparación de cultivos	46
III.2.4.2 Extracción del ARN total mediante kit comercial.....	46
III.2.4.3 Síntesis de cDNA	47
III.2.4.4 Selección y diseño de primers	47
III.2.4.5 Amplificación mediante RT-qPCR	49
III.2.5 Análisis metaproteómico.....	50
III.2.5.1 Obtención de las proteínas del cocultivo AM-Bk y de los monocultivos de las cepas <i>Sphingobium</i> sp. AM y <i>Burkholderia</i> sp. Bk.	50
III.2.5.2 Lisado celular para la obtención de proteínas.	50
III.2.5.3 Determinación de la concentración de proteínas	51
III.2.5.4 Análisis de la integridad de las proteínas mediante SDS-PAGE.....	51

III.2.5.5	Análisis LC-MS/MS de los extractos proteicos	51
III.2.5.6	Análisis de datos - cuantificación de proteínas	52
III.2.6	Estudios de bioaumentación en suelos con contaminación aguda y en suelos crónicamente contaminados.	52
III.2.6.1	Caracterización edafológica de los suelos utilizados.....	52
III.2.6.2	Preparación de microcosmos de suelo con contaminación aguda con PAH.....	53
III.2.6.3	Preparación de los microcosmos de suelo crónicamente contaminados con PAH	54
III.2.6.4	Determinación de la concentración de hidrocarburos.....	55
III.2.6.5	Determinación del porcentaje de humedad	56
III.2.6.6	Extracción de ADN total de suelo	56
III.2.6.7	PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)	56
III.2.6.8	Análisis de secuenciación masiva	58
III.2.6.9	Predicción funcional mediante PICRUST2	58
III.2.6.10	Análisis de abundancia diferencial utilizando ANCOM-BC.....	59
III.2.7	Preparación de microcosmos de suelo con contaminación aguda y crónica inoculados con células marcadas con C ¹³	59
III.2.7.1	Preparación de los inoculantes	59
III.2.7.2	Preparación de los microcosmos.....	60
III.2.7.3	Extracción de ADN total de suelo	61
III.2.7.4	Ultracentrifugación y fraccionamiento	61
III.2.7.5	Precipitación con PEG.....	62
III.2.7.6	Análisis de secuenciación masiva del gen 16S rARN y 18S rARN	63
III.2.7.8	Análisis de las comunidad enriquecida	64
III.2.7.8a	Factor de Enriquecimiento (EF)	64
III.2.7.8b	Comparación entre las comunidades enriquecidas entre los suelos SP e IPK.....	64
III.2.7.8c	Supervivencia del inoculante	65
III.2.8	Análisis estadístico.....	65

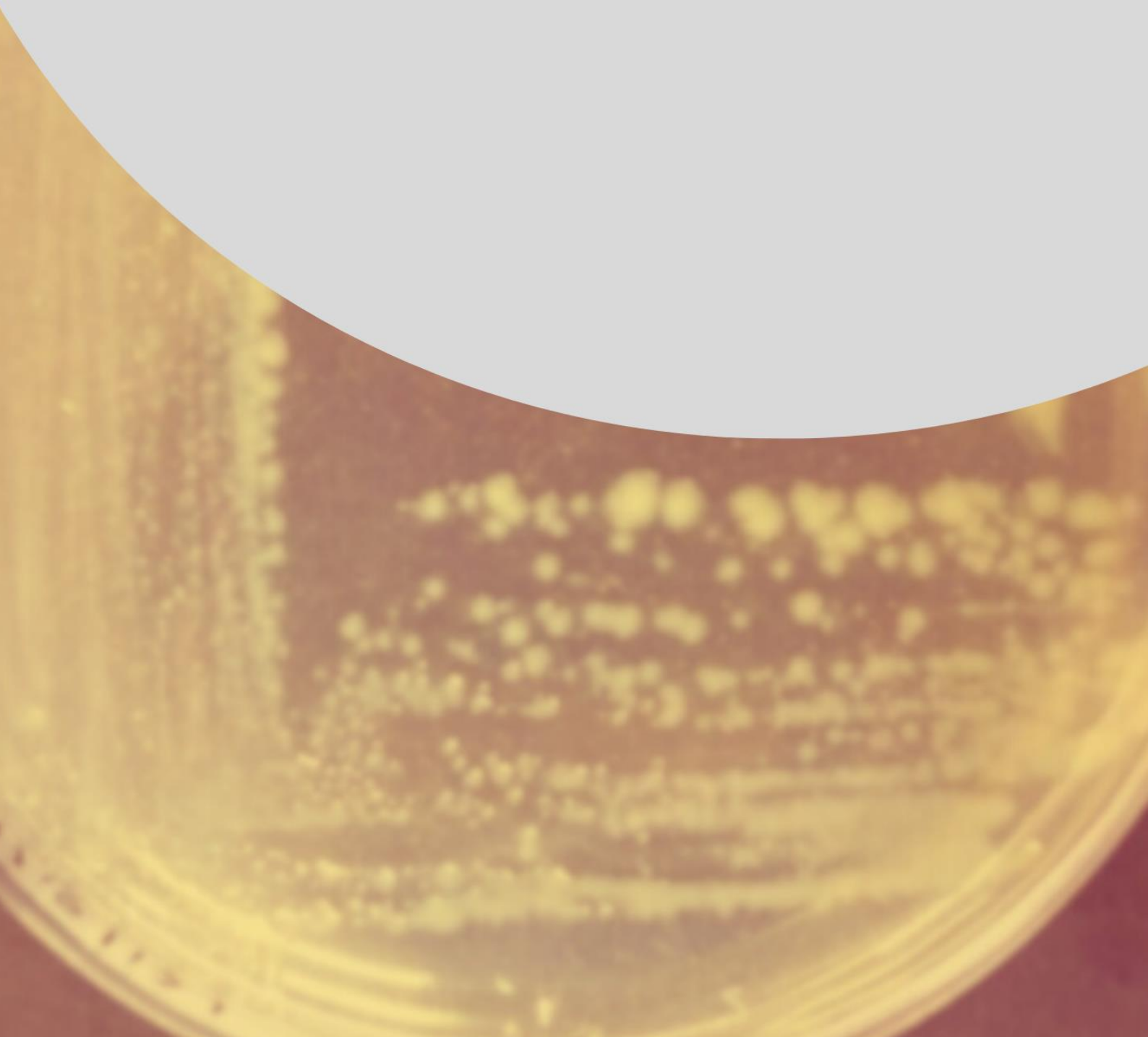
IV. Diseño de un consorcio microbiano degradador de PAH y estudio de las interacciones entre sus miembros	68
.....	
IV.1 Diseño del cocultivo AM-Bk a partir de las cepas <i>Sphingobium</i> sp AM y <i>Burkholderia</i> sp. BK	69
IV.1.2 Evaluación exploratoria de interacciones en placas de Petri	69
IV.1.3 Cinética de degradación de fenantreno y acumulación de ácido 1-hidroxi 2-naftoico (AHN) del cocultivo AM-Bk	70
IV.1.4 Dinámica poblacional del cocultivo AM-Bk durante la degradación de fenantreno	71
IV.2 Análisis comparativo de la degradación de distintos PAH en mezcla con fenantreno	72
IV.2.1 Degradación de dibenzotiofeno como UFCE y en mezcla con fenantreno	73
IV.2.2 Degradación de fluoreno como UFCE y en mezcla con fenantreno	75
IV.3 Análisis comparativo de la expresión de genes catabólicos durante la degradación de fenantreno en el cocultivo AM-Bk	78
IV.3.1 Cuantificación de la expresión relativa de genes catabólicos específicos de la cepa <i>Sphingobium</i> sp. AM en el cocultivo AM-Bk mediante RT-qPCR	79
IV.3.2 Cuantificación de la expresión relativa de genes catabólicos específicos la cepa <i>Burkholderia</i> sp. Bk en el cocultivo AM-Bk mediante RT-qPCR	81
IV.4 Análisis metaproteómico diferencial del cocultivo AM-Bk durante la degradación de fenantreno	83
IV.4.1 Degradación de xenobióticos	87
IV.4.2 Respuesta al estrés celular	89
IV.4.3 Metabolismo de hidratos de carbono	89
IV.4.4 Metabolismo de aminoácidos	90
IV.4.5 Metabolismo de lípidos	90
IV.4.6 Transportadores	92
IV.4.7 Transcripción, traducción y ciclo celular	92
IV.4.8 Metabolismo de Fe	92
IV.4.9 Movilidad	93
IV.5 Discusión	93

V. Estudio de la inoculación con distintos consorcios degradadores de PAH sobre un suelo contaminado con hidrocarburos en forma aguda	104
V.1 Degradación de los PAH suplementados	105
V.2 Dinámica poblacional y cuantificación de genes específicos mediante qPCR	106
V.3 Análisis de la diversidad de la comunidad microbiana	108
V3.1 Estructura de la comunidad microbiana de los microcosmos a nivel de Filo y Orden	112
V.3.2 Estructura de la comunidad microbiana a nivel de género	113
V3.3 Monitoreo de los géneros inoculados e identificación de los ASVs correspondientes a las cepas inoculadas.....	116
V3.4 Análisis de abundancia diferencial a nivel de género.	117
V.4 Predicción funcional mediante PICRUST2.....	120
V.4.1 Análisis de abundancia diferencial de los genes ortólogos de KEGG (KO) en base a la predicción de PICRUST2	121
V.4.2 Análisis de contribución de los distintos géneros a los KOs predichos por PICRUST2	123
V.5 Discusión	126
VI. Estudio del efecto de las interacciones tróficas sobre los procesos de bioaumentación en suelos	137
VI.1 Estudio de bioaumentación con CS AM-Bk sobre un suelo crónicamente contaminado con PAH.....	137
VI.1.1 Cuantificación de PAH presentes en IPK durante el bioaumentación con CS AM-Bk	137
VI.1.2 Dinámica poblacional y cuantificación de genes específicos mediante qPCR	139
VI.1.3 Cuantificación de PAH presentes en IPK durante la estrategia combinada de bioaumentación y bioestimulación mediada por un surfactante	140
VI.2 Estudio de las interacciones tróficas entre el inoculante y la comunidad nativa de los suelos mediante SIP-DNA.....	142
VI.2.1 Factor de Enriquecimiento (EF).....	143
VI.2.2 Estudio de los géneros bacterianos enriquecidos a lo largo del tiempo mediante secuenciación masiva del gen 16S rARN en el suelo SP	145
VI.2.3 Estudio de los grupos eucariotas enriquecidos a lo largo del tiempo mediante secuenciación masiva del gen 18S rARN en el suelo SP	146

VI.2.4 Estudio de los géneros bacterianos enriquecidos a lo largo del tiempo mediante secuenciación masiva del gen 16S rARN en el suelo IPK.....	148
VI.2.5 Estudio de los grupos eucariotas enriquecidos a lo largo del tiempo mediante secuenciación masiva del gen 18S rARN en el suelo IPK.....	150
VI.2.6 Análisis comparativo de las comunidades enriquecidas y del comportamiento del inoculante en los suelos IPK y SP	151
VI.3 Discusión	155
VII. Conclusiones Generales.....	164
VII.2 Perspectivas	166
VIII. Bibliografía	169
Anexo I	187
Anexo II	198
Anexo III	203

Capítulo I

Introducción



I. Introducción

I.1 Contaminación ambiental por Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos

Los hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs) son contaminantes orgánicos ubicuos compuestos por dos o más anillos bencénicos fusionados de átomos de carbono e hidrógeno, los cuales pueden adoptar una configuración lineal, angular o agrupada (Patel et al. 2020). En relación con el número de anillos presentes, los PAHs pueden ser clasificados como PAH de bajo peso molecular (LMW), teniendo 2 o 3 anillos aromáticos como el naftaleno, antraceno y fenantreno, y PAH de alto peso molecular (HMW) con 4 o más anillos aromáticos, como el pireno, benzo[a]pireno, criseno, etc. Estos compuestos se caracterizan por su baja solubilidad en agua, baja presión de vapor y altos puntos de fusión y ebullición (Haritash & Kaushik, 2009; Patel et al., 2020). La presencia de electrones π de los anillos aromáticos son responsables de su alta resistencia al ataque nucleofílico (Haritash & Kaushik, 2009), confiriéndole a estos compuestos gran estabilidad dificultando su degradación.

En base al origen y al modo de distribución, las fuentes de producción de PAHs pueden ser clasificadas en tres grandes grupos: **pirogénicas**, **petrogénicas** y **diagenéticas-biogénicas** (Bertrand et al, 2015; Dhar et al, 2019). La combustión incompleta de combustibles fósiles y biomasa durante la pirólisis (ruptura térmica irreversible de la materia orgánica a alta temperatura) libera grandes cantidades de PAHs. Las fuentes **pirogénicas** pueden ser de origen natural o antropogénico. Muchos eventos naturales, como las erupciones volcánicas o los incendios forestales, generan la liberación de PAHs al ambiente. Las fuentes antropogénicas pueden dividirse en cuatro subclases: industrial, doméstica, transporte y agrícola (Ravindra et al.,2008). Los PAHs de origen **petrogénico** son constituyentes del petróleo incluyendo el crudo, lubricantes, y sus derivados. Las fuentes petrogénicas también pueden ser naturales o antropogénicas. Las filtraciones de petróleo espontáneas de los yacimientos naturales de crudo desde la roca sedimentaria liberan PAHs al ambiente. La fuente más significativa de contaminación por PAHs es la liberación de PAHs de origen petrogénico por actividades humanas (Dhar et al.,2019). El uso indiscriminado de combustibles fósiles tiene efectos severos de contaminación debido a la liberación, accidental o intencional, de crudo o de sus derivados. Finalmente, la producción de PAHs por organismos por procesos **diagenéticos** o **biogénicos**, contribuye también, aunque de manera minoritaria, a la presencia de estos compuestos al ambiente.

La Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (US EPA) considera a 16 PAHs como contaminantes prioritarios debido a sus altas concentraciones ambientales, su mayor exposición, naturaleza recalcitrante y toxicidad (Patel et al.,2020). La toxicidad de los PAHs es dependiente de la naturaleza del mismo, y no todos tienen el mismo efecto sobre la salud (Abdel-Shafy y Mansour, 2016). Muchos PAHs muestran propiedades mutagénicas, carcinogénicas, teratogénicas e inmunotóxicas. El modo, la duración y la dosis de exposición son

parámetros importantes en la severidad de los efectos tóxicos. Los efectos a la exposición aguda incluyen irritación ocular, vómitos, diarrea, confusión, irritación de la piel e inflamación. Efectos crónicos sobre la salud pueden incluir cataratas, daños hepáticos y renales, inmunodepresión, problemas respiratorios (Patel et al.,2020).

El metabolismo de algunos PAHs en mamíferos también genera intermediarios reactivos (diol-epóxidos, quinonas, derivados de hidroxialquilos), que no son suficientemente polares para ser excretados, y forman enlaces covalentes con ácidos nucleicos que conducen a efectos genotóxicos (Patel et al.,2020). Varios órganos son susceptibles a la formación de tumores debido a la exposición a largo plazo con PAHs incluyendo, pulmones, piel, colon, páncreas y vejiga (Rajpara et al., 2017).

Si bien los PAHs pueden ser encontrados en ambientes acuáticos y terrestres, e incluso en la atmosfera, debido a su hidrofobicidad, estos contaminantes son fácilmente adsorbidos en las partículas de suelo y, por lo tanto, los suelos funcionan como un reservorio de PAHs (Lu et al., 2011; Kuppusamy et al., 2017).

I.2 Biorremediación de sitios contaminados con PAHs

Debido al impacto en el funcionamiento ecosistémico, y consecuentemente, el efecto en las actividades humanas, la eliminación de PAHs en los ambientes contaminados es una preocupación global y prioritaria. Las estrategias de remediación consisten en la reducción de los contaminantes ambientales hasta alcanzar valores seguros, mediante procesos de degradación o transformación en los sistemas contaminados (Patel et al.,2020).

Existen varias estrategias de remediación que incluyen métodos físicos, químicos y biológicos. Los métodos físicos y químicos aprovechan las propiedades fisicoquímicas de estos compuestos a fin de extraer o transformar los PAHs de los sitios contaminados. Entre estas metodologías se encuentran el *soil washing* con solventes (Kuppusamy et al., 2017), tecnologías térmicas que incluyen la incineración de PAHs a partir de suelos contaminados y desechos industriales (Gan et al.,2009, Kuppusamy et al., 2017), y la oxidación química utilizando oxidantes como ozono, reactivo de Fenton, permanganato de potasio ($KMnO_4$) y persulfato de sodio activado ($Na_2S_2O_8$) (Kuppusamy et al., 2017; Sakshi y Haritash, 2019; Patel et al., 2020). Sin embargo, las metodologías de remediación que utilizan procesos fisicoquímicos son costosas, complejas y pueden generar contaminantes secundarios (Sakshi y Haritash, 2019).

La **biorremediación** es una metodología sustentable y de bajo costo, que consiste en el aprovechamiento de las capacidades metabólicas de los organismos a fin de acumular, transformar y degradar los contaminantes ambientales. Generalmente estas tecnologías permiten la mineralización completa de los contaminantes (Nwankwegu et al.,2021). Dentro de los métodos de biorremediación, la **atenuación natural**, el **biaumento** y

la **bioestimulación** son las tecnologías más frecuentemente utilizadas para la recuperación de sitios contaminados (Kuppusamy et al., 2017).

La **atenuación natural** consiste en la reducción natural de la concentración de contaminantes mediante procesos biológicos. Es un proceso de bajo costo, sin embargo, debido que uno de los objetivos de la biorremediación es la reducción significativa de los contaminantes tan rápido como sea posible, esta estrategia no garantiza una recuperación significativa de los sitios contaminados. Debido a la hidrofobicidad de los PAH, a medida que transcurre el tiempo, la asociación entre el contaminante y el suelo aumenta, disminuyendo la **biodisponibilidad** de los mismos, es decir, la fracción que puede ser utilizada o transformada por los microorganismos, limitando la actividad biodegradadora de la comunidad (Madrid et al., 2019). En la mayoría de los procesos de atenuación natural, los contaminantes tienen el tiempo suficiente para establecer toxicidad crónica e irreversible, causando una reducción de la productividad de los ecosistemas (Nwankwegu et al., 2022).

La **bioestimulación** es un método de remediación en el que las actividades de los microorganismos autóctonos pueden fomentarse mediante la adición de nutrientes (N, P, S y K), fertilizantes de liberación lenta/rápida, residuos orgánicos, ácido húmico y/o aceptores de electrones terminales. (Singh & Haritash 2019; Patel et al., 2020). Un tipo particular de bioestimulación es la aplicación de surfactantes, moléculas anfipáticas que aumentan la solubilidad en agua de compuestos hidrofóbicos (SERB, del inglés *Surfactant Enhanced Bioremediation*).

El **bioaumentación** consiste en el uso de microorganismos autóctonos, alóctonos o genéticamente modificados a fin de tratar los ambientes contaminados. La introducción de distintos microorganismos representa una alternativa más adecuada para abordar las problemáticas relacionadas a la toxicidad en suelos y plantas y a la eutrofización (Nwankwegu et al., 2022).

Para matrices complejas, como suelos con contaminación crónica con baja biodisponibilidad de PAH, la aplicación combinada de bioaumentación y bioestimulación es una estrategia que ha mostrado ser eficiente en la remoción de estos contaminantes (Wolf & Gan 2018; Chaudhary et al., 2021; Behera et al., 2022; Teng et al., 2022)

I.2.1 Bioaumentación

El bioaumentación puede ser definido como la técnica para el mejoramiento de la capacidad de una matriz contaminada para remover un contaminante, mediante la introducción de cepas o consorcios microbianos (El Fantroussi y Agathos, 2005). El bioaumentación es empleado cuando la capacidad de degradación de los microorganismos autóctonos es insuficiente o las poblaciones nativas carecen de las vías catabólicas

necesarias para metabolizar los contaminantes (Cycon et al., 2016). El método más común de bioaumentación es la adición de microorganismos con capacidades específicas de degradación de los contaminantes, lo cual aumenta la capacidad de degradación y mejora la tasa de remoción de un ambiente específico (Gao et al., 2022).

La relación de los microorganismos inoculados con su nuevo ambiente, incluyendo sus componentes bióticos y abióticos, en términos de supervivencia, actividad y migración, pueden ser decisivos en el éxito de cualquier estrategia de bioaumentación (El Fantroussi and Agathos, 2005). Las fluctuaciones o extremos en la temperatura y el pH, la disponibilidad de agua, la falta de nutrientes y la concentración de los contaminantes pueden impedir el crecimiento microbiano (Tyagi et al., 2011). Algunos factores bióticos que podrían limitar el bioaumentación son la falta de adaptación de los microorganismos inoculados al medio, la competencia entre el inoculante y los microorganismos autóctonos, y la predación por protozoos (Bouchez et al., 2000; El Fantroussi and Agathos, 2005).

Las estrategias de bioaumentación incluyen I) el uso de microorganismos autóctonos a los sitios contaminados; II) el uso de microorganismos alóctonos, ya sea cultivos puros de cepas o consorcios microbianos; III) el uso de microorganismos modificados mediante ingeniería genética.

El bioaumentación basado en el aislamiento de microorganismos autóctonos capaces de degradar PAH para ser posteriormente reinoculado en el suelo ha mostrado ser una estrategia eficiente. Sin embargo, además de buscar la eficiencia del proceso, es necesaria la caracterización de cepas degradadoras para cada nuevo sitio contaminado, lo cual es costoso y requiere mucho tiempo y trabajo (Horemans et al., 2016; Brzeszcz et al., 2020).

Dado que la velocidad de decontaminación es un parámetro importante a la hora de evaluar la efectividad de una tecnología de remediación, en aquellos casos en los que la biodiversidad autóctona carece de enzimas y rutas metabólicas apropiadas para la rápida degradación de los contaminantes, la introducción de poblaciones alóctonas es considerada la intervención más efectiva (Nwankwegu et al., 2022).

La selección de cepas se basa en las características específicas de las mismas, como la habilidad de soportar altas concentraciones de contaminantes sin mostrar signos de citotoxicidad, de crecer rápidamente y de ser fácilmente cultivables. La inoculación de microorganismos alóctonos en medios contaminados dirige la dinámica de crecimiento microbiano a un perfil activo trofofásico/ logarítmico con un pequeño período de latencia, mientras que la comunidad autóctona requeriría un largo período de adaptación antes de poder utilizar los contaminantes como fuente de carbono y energía (Nwankwegu et al., 2022).

I.2.2 Degradación microbiológica de PAH

Las bacterias poseen un alto potencial degradador de PAH debido a la rápida adaptabilidad, diversidad y la capacidad de generar intermediarios metabólicos menos tóxicos (Iman et al.,2022). Este proceso puede darse tanto en condiciones aeróbicas, donde el oxígeno funciona como el aceptor final de electrones y también como cosustrato para la hidroxilación del anillo aromático, así como en condiciones anaeróbicas, donde la ruptura del anillo se realiza a partir de reacciones reductoras utilizando aceptores de electrones alternativos, como NO_3^- , SO_2^{-2} , etc.

La degradación aeróbica de PAH es el proceso predominante en suelos, la cual puede dividirse en dos etapas principales. La primera consiste en la activación del anillo aromático a través de la incorporación de átomos de oxígenos, mediante la acción de enzimas dioxigenasas, dando lugar a la formación de cis-dihidrodiol (vía **alta**). En la segunda etapa, estos intermediarios pueden ser posteriormente clivados por una intradiol o extradiol dioxigenasa, dependiendo si la ruptura del enlace C-C se realiza entre los carbonos hidroxilados (**ortoclivaje**) o entre un carbono hidroxilado y otro no hidroxilado (**metaclivaje**) respectivamente. Esto da lugar a intermediarios del metabolismo central, como protocatecuato y catecoles que finalmente son transformados en intermediarios del ciclo de Krebs (**vía baja**) (Peng et al.,2008; Bertrand et al.,2015; Patel et al.,2020). De esta manera, los microorganismos son capaces de utilizar los PAH como fuente de carbono y metabolizarlos en productos con menor impacto ambiental como CO_2 y H_2O (Imán et al.,2022).

Si bien todos los PAH poseen este esquema de degradación común, la cinética y eficiencia de ésta, así como los intermediarios metabólicos producidos, dependen de la estructura del compuesto y del número de anillos (Cahuahan et al.,2008). Los HMW-PAH son mucho más resistentes a la degradación microbiana como consecuencia de las complejas estructuras aromáticas, siendo termodinámicamente más estables, hidrofóbicos y menos biodisponibles, que los LMW-PAH (Iman et al.,2022).

I.2.3 Degradación de mezclas complejas de PAH

La mayoría de los trabajos evalúan el potencial degradador de los microorganismos a partir de la caracterización de las rutas y cinéticas de degradación de cada PAH de manera aislada (Peng et al.,2008; Festa et al.,2013; Wanapaisan et al.,2018; Mai et al.,2021). No obstante, esta aproximación es una simplificación que dista de las condiciones ambientales reales, donde las comunidades bacterianas están expuestas a la coexistencia de distintos PAH, la cual puede aumentar los efectos tóxicos de estos compuestos (Chauhan et al.,2008; Yuan et al.,2018).

El cometabolismo es un proceso especialmente importante durante la degradación de mezclas de PAH (Chauhan et al.,2008; Premnath et al.,2021). Dalton y Starling definen al **cometabolismo** como *la transformación de un sustrato que no es utilizado para el crecimiento en presencia obligada de un sustrato*

utilizado para el crecimiento (Dalton & Starling 1982). El cometabolismo de un PAH puede tener efectos sinérgicos en la degradación de otros PAH, siendo particularmente importante para la degradación de HMW-PAH (Bouchez et al.,1994; van Herwijen et al.,2003; Ghosal et al.,2016; Laothameep et al.,2021). Uno de los principales mecanismos que explican el cometabolismo es la baja especificidad de las enzimas que participan en el proceso. La degradación de HWM-PAH mediante cometabolismo ha sido previamente documentada en varios microorganismos, incluyendo *Burkholderia*, *Rhodococcus*, *Stenotrophomonas*, *Sphingomonas*, entre otros (Nzila 2013). La mayoría de estos microorganismos utiliza PAH de un número de anillos menor como sustrato para crecer, los cuales producen enzimas que podrían cometabolizar los PAH más complejos (Nzila 2013). Si bien los mecanismos que explican el cometabolismo no son del todo conocidos, la implementación de técnicas ómicas ha permitido profundizar en los procesos moleculares que actúan durante el mismo. Se ha observado que en combinaciones binarias de PAH, el aumento de la degradación de un PAH se ve favorecida por la presencia del segundo PAH, el cual induce la expresión de genes catabólicos vinculados a este último compuesto (Yuan et al.,2018, Laothameep et al.,2021).

También se ha observado cometabolismo de HMW-PAH con sustratos de crecimiento no aromáticos como la glucosa, el succinato, el glicerol, la peptona y el extracto de levadura (Feng et al.,2012; Zhou et al.,2020).

No obstante, la combinación de distintos PAH puede tener efectos inhibitorios sobre la degradación de los compuestos implicados (Bouchez et al.,1994, van Herwijnen et al.,2003b). Esto puede darse como producto de la acumulación de metabolitos tóxicos o por interacciones metabólicas competitivas (Stringfellow & Aitken 1994, van Herwijnen et al.,2003).

Por este motivo, el estudio de la degradación de sistemas complejos con mezclas de contaminantes y los mecanismos que operan sobre esta representa un área de gran importancia a la hora de la aplicación de estrategias de biorremediación eficiente.

1.2.4 Aplicación de consorcios microbianos en procesos de biorremediación

La selección del inoculante resulta un paso crítico en la eficiencia del proceso de bioaumentación. En numerosos estudios se han utilizado inóculos degradadores monoespecíficos. Sin embargo, cuando los sitios contaminados muestran una mezcla de contaminantes, la degradación utilizando una única cepa se vuelve significativamente más lenta y casi imposible (Nwankwegu et al., 2022). En el último tiempo ha incrementado el interés en la utilización de consorcios degradadores de PAH como inoculantes (Kumari et al., 2018; Wanapaisan et al.,2018; Ferraro et al., 2021, Laothameep et al.,2021).

Los consorcios microbianos ofrecen ventajas frente a los monocultivos, incluyendo la división de trabajo, la organización espacial y la robustez frente a las perturbaciones ambientales (McCarty y Ledesma-Amaro, 2018; Chen & Men 2019). Se ha demostrado que los consorcios microbianos constituyen una estrategia de

biorremediación superior en ambientes contaminados complejos debido a sus capacidades metabólicas múltiples (Zhang et al.,2021), la cual es producto de la cooperación metabólica entre los miembros del mismo (Wanapaisan et al., 2017; Kumari et al., 2018). Durante el proceso de degradación por un consorcio microbiano, la biotransformación de un intermediario metabólico producido por una bacteria puede ser usado como la base del metabolismo y crecimiento de los otros miembros, lo que promueve la degradación continua con baja o nula toxicidad (Nwankwegu et al., 2022, Zhang et al.,2022). Además, la existencia de interacciones interespecíficas positivas entre los miembros de un consorcio aumenta la estabilidad y robustez del mismo (Steniut y Agathos, 2015; Che y Men, 2019), lo cual aumenta la probabilidad de establecimiento del inoculante.

I.3 Interacciones microbianas

En la naturaleza, los microorganismos no actúan como entidades aisladas, sino que forman parte de comunidades complejas de distintas poblaciones que pueden interactuar metabólicamente unas con otras (Che & Men 2019). Estas interacciones dan lugar a propiedades emergentes a nivel comunitario (p ej. nuevas funcionalidades, robustez, etc.), que no son observables a nivel poblacional, y que son importantes para la comprensión de los procesos de degradación (Xu & Yu 2021).

Cuando dos especies coexisten pueden establecerse interacciones bidireccionales o unidireccionales, las cuales a su vez pueden ser positivas, negativas o neutras. Cuando dos especies utilizan distintos sustratos y ninguna produce compuestos inhibitorios, la presencia de la una no afecta a la otra, lo cual se conoce como **neutralismo**. El **mutualismo** se define como aquella relación que beneficia a ambas especies. El comensalismo y el amensalismo describen interacciones unidireccionales, en las que una de las especies afecta al crecimiento de otra especie, ya sea positiva (**comensalismo**) o negativamente (**amensalismo**), sin ser la primera afectada por la presencia de esta última. La **predación**, describe la relación en la cual una de las especies se alimenta de la otra, donde la dinámica poblacional muestra oscilaciones continuas. Finalmente, la **competencia** es una interacción negativa, en la cual la presencia de una especie afecta al crecimiento de una segunda especie, y cuyo crecimiento, a su vez, es afectado por la presencia de esta última. Cuando dos especies compiten por los mismos recursos, la especie de crecimiento más rápido tiende a dominar sobre la especie de crecimiento más lento (Roell et al.,2019; Che & Men 2019; Ibrahim et al.,2021).

Sin embargo, esta clasificación mencionada es una simplificación de los procesos que ocurren en la naturaleza, ya que las interacciones interespecíficas son dependientes del contexto y pueden cambiar tanto la magnitud y la naturaleza de las mismas a lo largo del tiempo y el espacio (Dolinsek et al.,2016). A su vez, las distintas categorías propuestas en la naturaleza no se presentan como estructuras rígidas. Interacciones estrictamente positivas, por ejemplo, son improbables de ocurrir y la mayoría de las interacciones positivas también tienen elementos competitivos (Dolinsek et al.,2016).

I.3.1 Consorcios microbianos como modelos de estudio

Los consorcios microbianos, entendidos como un grupos de dos o más especies que coexisten en los cuales e interactúan metabólicamente (Brenner et al.,2007; McCarty et al.,2018), son utilizados como modelos para el estudio de las interacciones microbianas a fin de reducir la complejidad de las comunidades naturales (Großkopf and Soyer 2015, Gilmore et al.,2019). En bibliografía es posible encontrar distintas definiciones y clasificaciones de consorcio microbianos, es por esto que Massot et al.,(2022) proponen unificar la clasificación de los consorcios considerando tanto el origen de los microorganismos integrantes del consorcio, así como el grado de intervención humana, ampliando de esta manera la clasificación propuesta por Berstein y Carlson (2012). Estos autores proponen tres categorías: consorcios naturales, artificiales y sintéticos. Los **consorcios naturales** son comunidades conformadas por microorganismos obtenidos a partir de un mismo ambiente, que han co-evolucionado y están adaptados a compartir recursos entre sus miembros. A su vez, los consorcios naturales pueden ser clasificados como **no definido** (cuando los miembros de la comunidad no son aislados, sino que son resultado de procesos de enriquecimiento) o **definido** (cuando miembros de la comunidad son aislados, caracterizados y cultivados conjuntamente) (Ibrahim et al.,2021). Los **consorcios artificiales** están conformados por dos o más poblaciones provenientes de distintos ambientes y que son combinadas con un criterio específico. Por último, estos autores definen a los **consorcios sintéticos** como un tipo particular de consorcio artificial que requiere la inclusión de miembros considerando una tarea o función específica, conocida y definida, normalmente complementaria a las de otros miembros (Massot et al.,2022), pudiendo incluir microorganismos modificados genéticamente.

Los consorcios naturales definidos tienen la ventaja de utilizar especies que naturalmente coexisten, maximizando la semejanza a la comunidad natural al conservar las interacciones moduladas por los procesos de coevolución, al mismo tiempo que reduce la diversidad del sistema, simplificando los análisis en comparación a los consorcios naturales no definidos (Ponomarova & Patil, 2015).

Las interacciones interespecíficas entre los miembros de un consorcio aumentan la robustez del sistema en comparación con los monocultivos (Qian et al.,2020). La **robustez**, entendida como la resistencia y la resiliencia de la comunidad frente a cualquier perturbación interna o externa en relación con las dinámicas estructurales y funcionales previas a la perturbación (Stenuit & Agathos, 2015), está correlacionada con la composición y la estructura de la comunidad (McCarty & Ledesma Amaro, 2019; Ziesack et al., 2019). Bajo fluctuaciones ambientales, la biodiversidad estabiliza los atributos de la comunidad como consecuencia de los procesos asincrónicos de la respuesta de las distintas poblaciones a la perturbación y la complementariedad temporal de nicho; y permite la selección y compensación funcional de las poblaciones más tolerantes a la perturbación (Stenuit & Agathos 2015). Consorcios basados en interacciones positivas (mutualismo, comensalismo) son más probables de alcanzar un crecimiento estable y mayor robustez, ya que promueven la coexistencia de sus

miembros, mientras que la existencia de interacciones competitivas es un factor que contribuye a la inestabilidad del sistema (Che & Men, 2019; Xu 2020; Xu & Yu, 2021).

I.3.2 Cross-feeding y División del Trabajo (DoL)

Generalmente, los organismos que coexisten evolucionan reduciendo el solapamiento de nicho, ya que el resultado de la competencia entre organismos tendería a la exclusión de organismos menos competitivos. De este modo, las interacciones negativas pueden imponer una selección que resulte en la reducción de la competencia y promueva la coexistencia (Dolinsek et al.,2016). Un mecanismo que posibilita la coexistencia de múltiples especies que compiten por un mismo recurso es la alimentación cruzada o “*cross-feeding*” (Xu & Yu 2021), que puede ser definida como la interacción entre cepas bacterianas en la cual las moléculas resultantes del metabolismo de una cepa son posteriormente utilizadas por otra cepa (Smith et al.,2019).

Este tipo de interacciones metabólicas están ampliamente distribuidas en la naturaleza, no solo entre especies bacterianas, sino también entre bacterias y miembros de otros reinos, incluyendo hongos, protistas, animales y plantas (D’Souza et al.,2018). Las principales ventajas de este tipo de interacciones están relacionadas con la economía celular. Cualquier función biosintética que consume recursos representa un costo metabólico para la célula, limitando la cantidad de recursos disponibles para otras funciones (Giri et al.,2020). Debido a que en el ambiente tanto los nutrientes como los recursos celulares son limitados, el anabolismo de una bacteria está íntimamente relacionado con su fitness, es decir su capacidad de multiplicarse y transferir su información génica a las generaciones subsiguientes. (Gonzales-Cabaleiro et al.,2015, D’Souza et al.,2018). El hecho de que muchas reacciones diferentes generalmente se realizan en un mismo ambiente intracelular puede generar incompatibilidades entre las reacciones a nivel molecular. Este problema puede resolverse mediante la separación de procesos antagónicos en distintas células (**compartimentalización**) o mediante la separación temporal (Giri et al.,2020). El cross-feeding es un tipo de interacción en la cual, mediante compartimentalización, ambos miembros invierten parte de sus recursos en la producción de la maquinaria necesaria para llevar a cabo una función común, reduciendo la carga metabólica por miembro (D’Souza et al.,2018). Esta coordinación metabólica a través de la división del trabajo les otorga a los consorcios la capacidad de realizar funciones complejas en paralelo o secuencialmente (Che & Men 2019).

La **división del trabajo (DoL)** puede ser definida como la interacción en la cual los organismos que cooperan se especializan en llevar a cabo funciones específicas (West et al.,2016). Según Giri et al.,(2020) para que una interacción se considere como DoL no solo debe existir complementariedad funcional, sino también debe tener una ventaja sinérgica para todos los miembros de la interacción, los cuales deben ser capaces de coexistir (selección negativa por frecuencia) y ser favorecida por la selección natural (emparejamiento positivo). La DoL se puede establecer tanto entre miembros de una misma especie como entre organismos de

distintas especies, pudiendo ser uni- o bidireccionales. Sin embargo, en base a estos criterios no cualquier relación unidireccional clasificaría como DoL. Las relaciones unidireccionales entre microorganismos de distintas especies (comensalismo) no clasificarían como DoL, ya que el fitness de uno de los participantes no se ve favorecido (West et al.,2016; Giri et al.,2020).

La DoL afecta el crecimiento de las diferentes poblaciones, la distribución final de los productos e incluso la emergencia de nuevos fenotipos en las comunidades microbianas sin ninguna modificación genética (Rafieenia et al.,2021). Las comunidades microbianas utilizan DoL como una estrategia evolutiva para disminuir la carga metabólica entre las especies, para acelerar el consumo de compuestos inhibitorios y aumentar la resistencia a compuestos tóxicos, para la utilización de sustratos complejos y para mantener la biodiversidad (Roell et al.,2019; Rafieenia et al.,2021). Además, la DoL favorece las interacciones positivas entre los miembros de un consorcio al optimizar la utilización de sustratos, el balance redox y el crecimiento celular, aumentando la estabilidad y la eficiencia del mismo (Che & Men 2019; Xu & Chu 2021). Es por esto que el estudio de los procesos de *cross-feeding* metabólico y DoL representa un enfoque adecuado para tener en cuenta en el diseño de consorcios con aplicaciones biotecnológicas (Roell et al.,2019).

I.4 El fenómeno de invasión biológica

El bioaumentación, al introducir microorganismos alóctonos o incrementar la abundancia relativa de microorganismos autóctonos con capacidades metabólicas específicas, puede considerarse en el marco de las invasiones biológicas mediadas por humanos (Mawarda et al.,2020). Tales introducciones generalmente tienen un impacto en la comunidad nativa, pudiendo influenciar los procesos ecosistémicos.

De acuerdo con Mallon et al.,(2015) las invasiones biológicas siguen una secuencia de eventos que consisten en: 1) la introducción; 2) el establecimiento; 3) crecimiento y propagación y 4) impacto. En el caso de la inoculación la fase de **introducción** está artificialmente modulada por la actividad humana. Distintos parámetros, como el número de inoculaciones o el tamaño del inóculo, pueden ser regulados a fin de asegurar un proceso de bioaumentación exitoso (Schwartz & Scow 2001; El Fantroussi & Agathos 2005; Innemanová et al.,2018). La habilidad del inoculante de resistir a las nuevas condiciones ambientales y sobrevivir a la presión ejercida por los organismos nativos en el momento de la introducción representa una transición a la segunda fase de la invasión: el **establecimiento**. La fase de **crecimiento y propagación** de una invasión está asociada con el grado con el cual el inoculante puede acceder a los recursos locales. Finalmente, los microorganismos invasores que se propagan y crecen pueden **impactar** la comunidad receptora, teniendo efectos neutros, beneficiosos o perjudiciales en su nuevo hábitat.

La inoculación puede tener un efecto en la comunidad, incluso cuando la abundancia del inoculante disminuye (Mawarda et al.,2020). Aquellos inoculantes que permanecen viables por más tiempo tienen un impacto

mayor que los inoculantes de vida corta, sin embargo, algunos estudios muestran que cambios en la comunidad pueden persistir incluso cuando la densidad del inoculante disminuye (Mallon et al.,2018), lo cual podría deberse a la liberación de nutrientes causada por la lisis celular de las células del inoculante, que a su vez podría promover un aumento de la abundancia de algunos taxones residentes (Mawarda et al.,2020).

Las comunidades microbianas forman redes de interacción complejas entre las especies, y los inoculantes tienen el potencial de alterar la estructura de las interacciones (Mallon et al.,2015). Se han propuesto distintos mecanismos para explicar el impacto de la inoculación sobre la comunidad nativa. Uno de ellos es la competencia por los recursos disponibles. Un bajo solapamiento entre el nicho de la comunidad nativa y el nicho del inoculante aumenta la probabilidad de una inoculación exitosa. En otras palabras, a mayor número de nichos vacantes, mayor es la probabilidad de que el inoculante se pueda establecer exitosamente (Mawarda et al.,2020). Este fenómeno está directamente vinculado con la riqueza, ya que a mayor riqueza la amplitud de nicho de la comunidad receptora también aumenta, disminuyendo consecuentemente la disponibilidad de nichos vacantes (Mallon et al.,2015). Una vez que el inoculante se establece, su abundancia puede inhibir especies con una funcionalidad similar o estimular a especies que no están funcionalmente relacionadas al mismo.

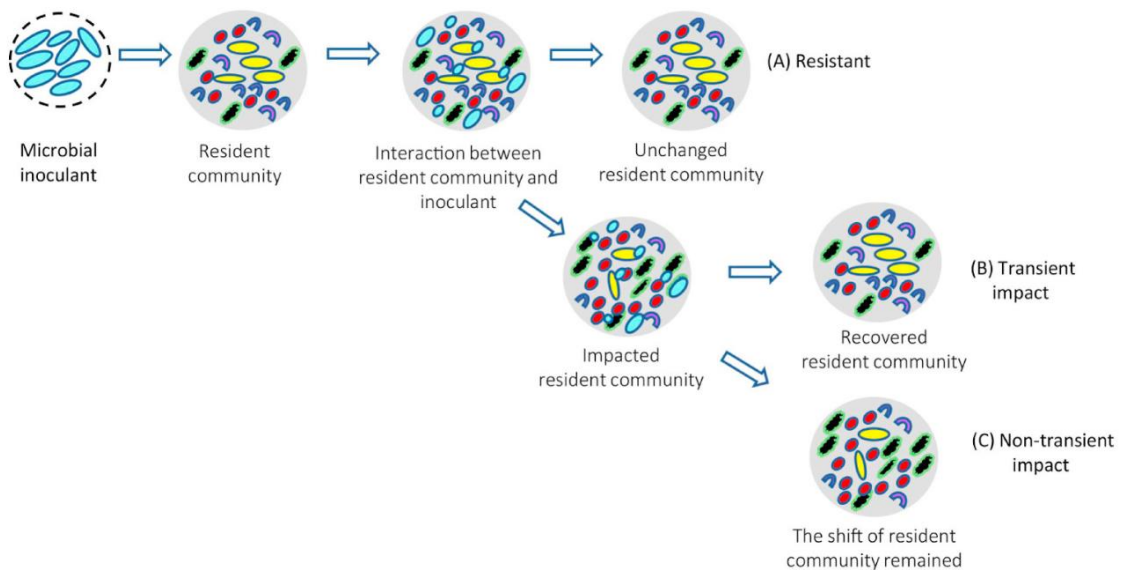


Figura I.1: Posibles efectos temporales sobre la estructura de la comunidad microbiana nativa como consecuencia de la introducción de un inoculante, donde se puede observar la ausencia de cambios después de la inoculación (A), cambios temporales (B) o cambios permanentes (C) en la estructura de la comunidad (Adaptada de Mawarda et al., 2020).

La figura I.1 muestra distintos escenarios posibles luego de la inoculación. En el primer caso, tras la inoculación, la comunidad resiste, es decir, la estructura de la comunidad no cambia. En el segundo escenario, los inoculantes microbianos cambian la composición inicial de la comunidad residente. Aquí la invasión inicial por los inoculantes puede aumentar o disminuir la abundancia de ciertas poblaciones nativas. Tras la exclusión de los inoculantes, la composición microbiana inicialmente afectada puede recuperarse y volver a su estado inicial (resiliencia completa). En el tercer escenario, los inoculantes microbianos cambian permanentemente la composición inicial de la comunidad residente, es decir, el cambio inducido por la inoculación en la composición de la comunidad permanece y la comunidad alcanza un estado estable alternativo (Mawarda 2020).

I.5 Rol de los protistas en la dinámica del suelo

La supervivencia del inoculante resulta clave para que los procesos de bioaumentación sean eficientes. La mayoría de los trabajos se centran en el análisis de la competencia por los recursos disponibles y relaciones antagónicas con la comunidad nativa como mecanismo para explicar la incapacidad del inoculante de mantener densidades poblacionales altas luego de la introducción (Mawarda et al.,2022). Otros mecanismos que involucran a bacteriófagos y protistas también pueden controlar las densidades bacterianas en los suelos. La predación por protistas constituye una de las causas principales de mortalidad, sin embargo, sus efectos sobre los inoculantes y, en general, sobre la estructura de las comunidades bacterianas están poco estudiados (Geisen et al.,2018; Wu et al.,2022).

El término protista hace referencia a todos los eucariotas que están por fuera de las plantas, animales y hongos (Figura I.2). La variación morfológica y funcional de este grupo es inmensa en relación con la naturaleza polifilética del grupo. Debido a los avances metodológicos (microscopía electrónica, estudios genómicos y filogenéticos moleculares, etc), la clasificación de los protistas está en continuo cambio. En la actualidad se reconocen numerosos supergrupos incluyendo Amebozoa, Obazoa (incluye a los Opisthokonta), Archaeplastida (incluye Cryptista) SAR (Stramenopila, Alveolata y Rhizaria) y Excavata.

La utilización de los términos alga, protozoo y protistas fungoides está ampliamente generalizada en la bibliografía. El término alga se refiere a aquellos protistas fotoautótrofos, siendo los grupos Stramenopiles (Diatomea, Eustigmatophyceae y Xanthophyceae) y Archaeplastidae (Chlorophyceae and Trebouxiophyceae) los dominantes en suelo.

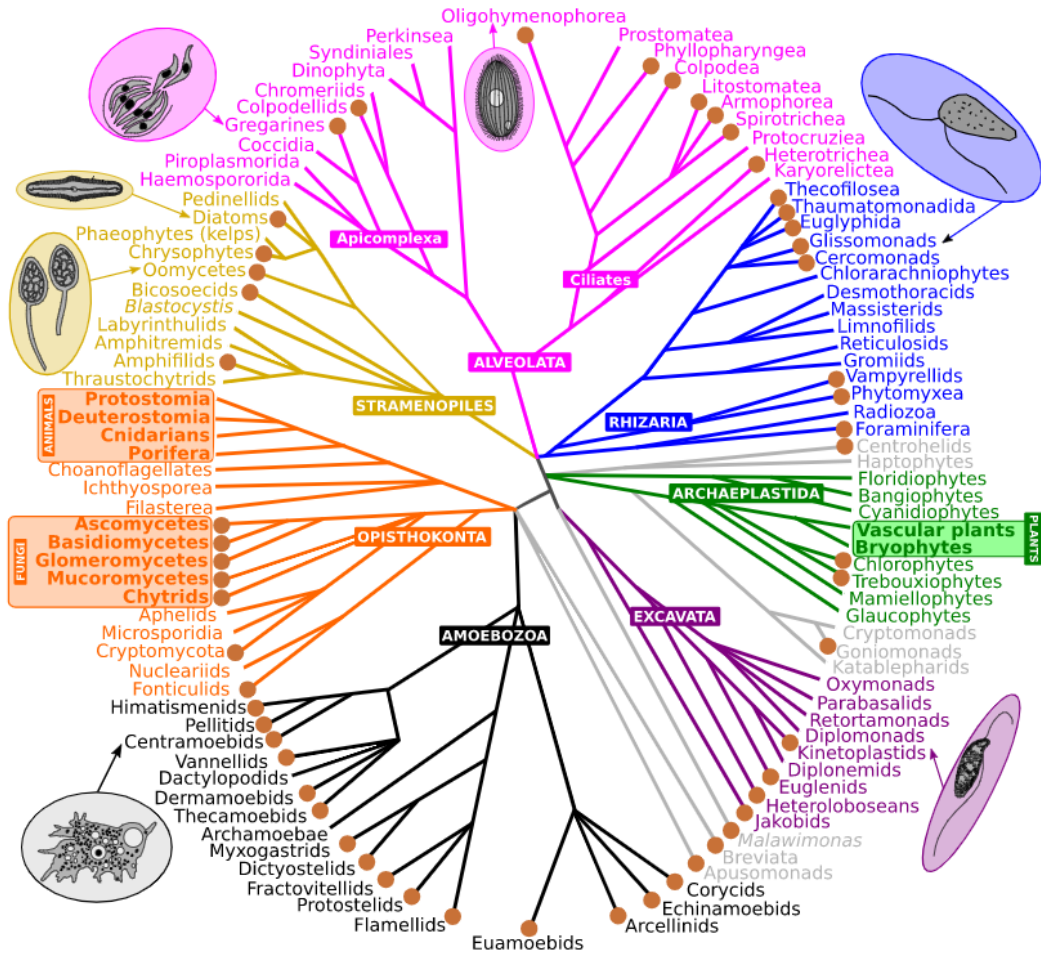


Figura I.2: Representación esquemática del árbol filogenético de los eucariotas. Los puntos marrones representan grupos especialmente diversos y abundantes en los suelos. Los grupos cuya filiación aún es objeto de debate se muestran en gris claro (Tomado de Geisen et al., 2018).

El término hongos inferiores se utiliza para referirse a miembros del grupo Oomycota, un grupo monofilético dentro de Stramenopiles, que incluye organismos osmótrofos y lisotróficos de vida libre o parásitos de animales, plantas, hongos e incluso otros oomicetes. Otro grupo importante de protistas fungoides son los “mohos mucilaginosos” cuyos representantes más importantes se encuentran dentro del supergrupo Amoebozoa, aunque también existen representantes dentro de Opisthokonta, SAR y Excavata.

Los protozoos (protistas heterótrofos) pueden ser clasificados en base a su morfología en tres grandes grupos: flagelados, ciliados y amebas desnudas o tecadas. Los flagelados tienen células que se mueven mediante flagelos o cilios, constituyendo un grupo parafilético y con representantes en los distintos supergrupos de eucariota. En suelos se observan representantes de Excavata, Biscooecea y Chrysophyta dentro de Stramenopiles. Las amebas son organismos con forma celular flexible capaces de formar pseudópodos. La mayoría de los miembros del supergrupo Amoebozoa, y un gran porcentaje de los miembros de Rhizaria (SAR),

son ameboides. Dentro de Rhizaria se incluyen los Glissomonada y Cercomonada, que se encuentran entre los protistas más abundantes en suelos (Geisen et al.2014, 2015). Los ciliados son un grupo monofilético dentro de Alveolata en el supergrupo SAR. Las células de los ciliados se caracterizan por tener dos tipos de núcleos, y un sistema de infraciliatura que puede tener numerosos cillios (a excepción de los Suctoria que carecen de cilios). Entre todas las clases de ciliados, Colpodea y Haptoria son mucho más diversas y están mejor representadas en los sistemas terrestres que en los acuáticos.

Si bien la aplicación de técnicas de secuenciación masiva ha permitido profundizar en la identificación y clasificación de los protistas, uno de los principales desafíos es la selección de marcadores “universales” para protistas. La mayoría de los estudios utilizan primers para la región hipervariable V4 o V9 del gen 18S rARN, sin embargo, la selección del set de primers genera un fuerte sesgo en lo que se amplifica (Adl, Habura & Eglit 2014). Además, la presencia de intrones y otras inserciones (comunes en protistas) es otro problema en la identificación de estos organismos (Geisen et al.,2018).

En los suelos, una gran variedad de protistas son bacterívoros y constituyen una de las principales causas de mortalidad bacteriana (de Ruiter, Neutel y Moore 1995; Clarholm 2005). En condiciones ambientales adecuadas, estos organismos se activan, y su densidad está correlacionada con el aumento de sus presas bacterianas (Clarholm 1981; Adl & Coleman 2005).

La predación tiene consecuencias directas en la dinámica de la población y en la composición de la comunidad de sus presas. No solo tiene un efecto regulador de la densidad de la presa (Wu et al.,2022), pudiendo tener alto grado de selectividad (Geisen et al.,2018), sino que también ayuda a mantener la diversidad de la comunidad bacteriana del suelo (Saleem et al. 2012). Además, la actividad de los protistas desempeña un papel clave en los ciclos biogeoquímicos y la transferencia de carbono. Debido a la mayor relación C:N de los protistas con respecto a sus presas bacterianas, el nitrógeno se excreta como producto de desecho, el cual es liberado, junto con otros nutrientes, quedando a disposición de todos los organismos, incluidos los microorganismos y las plantas en un proceso denominado "*microbial loop*".

I.6 Aplicación de metodologías ómicas en ecología microbiana

La ecología microbiana proporciona un marco conceptual para describir los procesos que regulan la estructura y la función de la comunidad, que resulta clave para entender y optimizar los procesos de biorremediación. La ecología microbiana intenta responder tres preguntas fundamentales: ¿qué microorganismos están presentes? ¿qué funciones están cumpliendo? ¿Cómo interactúan con el ecosistema? (Jansson et al.,2012; Biwas & Sakar 2018). La posibilidad de responder a estas preguntas está íntimamente vinculada al desarrollo de herramientas metodológicas que permitan la comprensión de los procesos ecológicos.

Antes de la década de 1980, la identificación de las especies microbianas estaba limitada al aislamiento y caracterización fenotípica, sin embargo los microorganismos cultivables representan menos del 1% del total de microorganismos presentes en el ambiente, y de esta manera restringen la interpretación de los procesos ecológicos que rigen las comunidades (Villanova & Porcar 2016). El surgimiento y el avance en las herramientas moleculares posibilitaron el estudio de los organismos no cultivables, permitiendo ampliar la comprensión de esos procesos (Chandran et al.,2020).

El término "ómica" se refiere a la cuantificación o caracterización de un conjunto de moléculas de naturaleza biológica para detectar la función, la estructura, fisiología y los mecanismos moleculares de un conjunto de organismos (Biwas & Sakar 2018).

La identificación de los microorganismos mediante la secuenciación de amplicones dirigidos a la región hipervariable del gen 16S rARN es una de las estrategias más ampliamente utilizadas, permitiendo la caracterización de la estructura de la comunidad microbiana así como el cálculo de parámetros de diversidad (α y β) de la misma. Sin embargo una limitante de esta técnica es que no brinda información sobre la funcionalidad de la comunidad (Douglas et al.,2020). La metagenómica implica la secuenciación del ADN total de la comunidad; de esta manera ofrece la posibilidad de caracterizar la diversidad genética y genómica de la comunidad analizada, así como las funciones potenciales y novedosas presentes en la comunidad estudiada (Ortiz-Estrada et al.,2017; Perez-Cobaz et al.,2020). Sin embargo es una técnica mucho más costosa, siendo difícil de aplicar cuando el número de muestras es alto (Langille et al.,2013; Douglas et al.,2020, Pérez-Cobaz et al.,2020). Como alternativas se han desarrollado softwares que permiten la predicción funcional de la comunidad a partir de datos de secuenciación de amplicones, como PICRUSt (Langille et al. 2013) y Tax4Fun (Abhauer et al. 2015). Esta predicción depende de la disponibilidad de genomas de referencia estrechamente relacionados en bases de datos o de la similitud de la región 16S rRNA. De modo que estas predicciones funcionales son útiles, pero no pueden considerarse sustitutas de la metagenómica (Perez-Cobas et al.,2020). Los datos metagenómicos sólo representan la capacidad metabólica potencial de un sistema. El ADN que se secuencia puede proceder de células muertas o inactivas. Además, incluso los microorganismos activos sólo expresan una fracción de sus genes en un momento dado (Jansson et al.,2012). Una aproximación para determinar qué organismos están activos y qué genes están expresando, es el estudio del mARN (metatranscriptómica). El enfoque metatranscriptómico resulta más complejo que la metagenómica porque el ARN es menos estable que el ADN y porque la mayoría del ARN que se extrae es el ARN ribosómico, sin embargo se han desarrollado metodologías para concentrar el mARN mediante la sustracción del rARN previo a la secuenciación (Janson et al.,2012).

La metaproteómica es una herramienta que aporta pruebas directas de la función y la regulación génica de una comunidad. Este vínculo directo con la función sugiere que un enfoque proteómico es más apropiado para

responder a preguntas ecológicas sobre las actividades e interacciones reales de las especies detectadas (Chignell et al.,2017).

Otra metodología aplicada para la identificación de microorganismos que activamente participan en un proceso ecosistémico particular es *Stable Isotope Probing* (SIP) (Neufeld et al.,2006; Wang & Yao 2021, kim et al., 2023). La base de esta técnica es proporcionar a la comunidad microbiana un sustrato marcado con isótopos estables más “pesados” y cuya abundancia en la naturaleza es menor, con el fin de estudiar el destino de la marca y así identificar a los microorganismos metabólicamente activos. Los microorganismos que utilizan el sustrato marcado con isótopos estables consecuentemente los incorporan a los componentes celulares. El análisis del ADN con la incorporación de isótopos estables (SIP-DNA) representa un método directo para la identificación de los microorganismos activos (Kim et al., 2023). Si bien esta técnica puede ser aplicada al ARN, mostrando incluso mayor sensibilidad (SIP-RNA), la menor estabilidad de ARN en comparación con el ADN ha sido una limitante para su aplicación (Wang & Yao, 2021). El aumento en la densidad del ADN en los microorganismos que incorporan el sustrato marcado, posibilita la separación de los mismos mediante ultracentrifugación isopícnica en gradiente de CsCl (Hungate et al.,2015). De esta manera, esta técnica permite rastrear el flujo de elementos químicos en diferentes sustancias y organismos del medio ambiente (Wang & Yao 2020). La aplicación de SIP acoplada a la secuenciación de ácidos nucleicos (ADN o ARN) es ampliamente utilizada para estudiar los flujos de carbono en las redes tróficas así como en procesos de mineralización de biomasa (Lueder et al.,2006; Chatzinotas et al.; 2013; Kramer et al., 2016). En el campo de la biorremediación esta técnica ha permitido la identificación de organismos activos en la degradación de contaminantes (Li et al.,2018; Li et al.,2021; Teng et al.,2021; Teng et al.,2022).

A pesar de que la integración de los datos multi-ómicos es capaz de generar una gran cantidad de resultados, el análisis de estos sets de datos muchas veces ignora la búsqueda de conclusiones con relevancia ecológica y se centra en aumentar los registros de especies, genes expresados o metabolitos (Vilanova & Porcar 2016). La identificación y caracterización de especies o consorcios bacterianos mediante estrategias multiómicas puede no ser suficiente cuando el interés del estudio se centra en especies raras o cuando se persiguen aplicaciones biotecnológicas. Las funciones nuevas pueden no ser predichas por los enfoques multi-ómicos, ya que pueden estar vinculadas a secuencias de función desconocida en las bases de datos. De esta manera, se establece una interdependencia entre los métodos multi-ómicos y los métodos dependientes de cultivo. La metodologías multi-ómicas dependen de la caracterización de más genomas de referencia para analizar mejor los microbiomas nuevos y complejos, y los ecólogos microbianos necesitan la multi-ómica para saber que microorganismos están presentes y, por tanto, qué pueden intentar cultivar (Vilanova & Porcar 2016).

Capítulo II

Objetivos e Hipótesis



II. Objetivos e Hipótesis

II.1 Objetivos

II.1.1 Objetivos Generales

- Contribuir al mejoramiento de los conocimientos básicos que permitan diseñar, validar y optimizar procesos de biorremediación de sitios contaminados con hidrocarburos.
- Producir un aporte a los conocimientos relacionados con la ecología microbiana de consorcios bacterianos degradadores de PAH, las rutas metabólicas cooperativas y las interacciones entre sus miembros.

II.1.2 Objetivos Específicos

- Evaluar la respuesta funcional de los microorganismos y las interacciones que pueden darse entre los miembros de consorcios degradadores de PAH durante la degradación de hidrocarburos, mediante la aplicación de herramientas de metaproteómica y de expresión de génica.
- Estudiar el efecto de la inoculación de consorcios sintéticos degradadores de PAH sobre la comunidad bacteriana de suelos contaminados con PAH.
- Estudiar mediante la técnica DNA-SIP las interacciones tróficas que se establecen entre un inoculante y la comunidad nativa (a nivel de procariotas y eucariotas).

II.2 Hipótesis

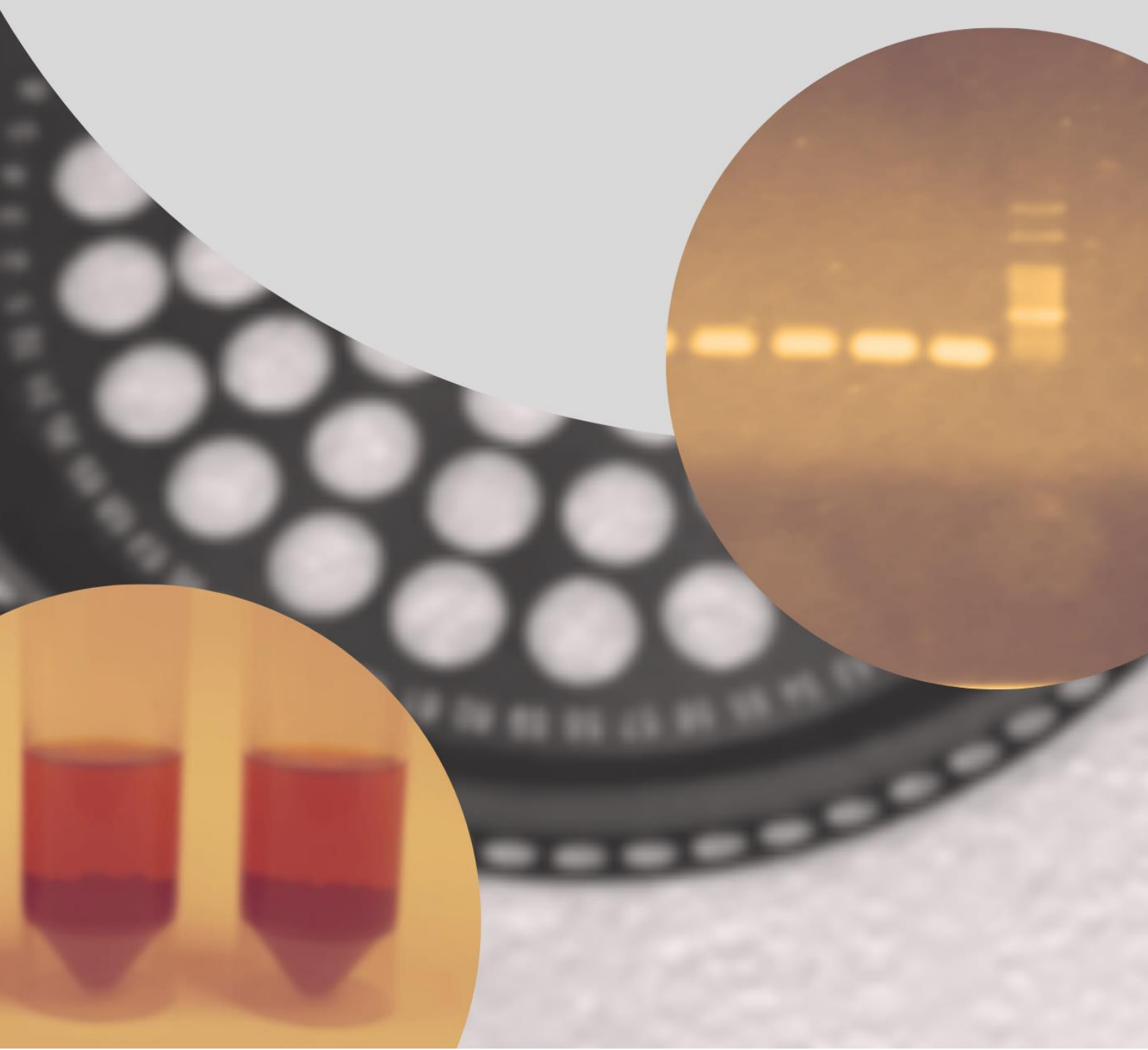
1. Las propiedades emergentes de los consorcios microbianos degradadores son más que la suma de las propiedades de los cultivos que los componen, ya que las interacciones interespecíficas modulan su funcionalidad.
2. La degradación microbiana de cada PAH es afectada en presencia de mezclas complejas de estos compuestos, ya que su coexistencia puede afectar (positiva o negativamente) la performance de los cultivos microbianos.
3. Para el diseño de consorcios microbianos degradadores se privilegia la utilización de consorcios con alto número de especies, debido a que tienen mayor eficiencia de degradación de los contaminantes

por la presencia de mayor cantidad de rutas catabólicas, lo que aumenta la probabilidad del establecimiento en ambientes naturales.

4. La inoculación de consorcios con microorganismos alóctonos tiene la ventaja de que los mismos producen bajo efecto residual en la estructura de la comunidad, ya que no permanecen en ella una vez que se elimina el contaminante.
5. Durante la inoculación, entendida como un proceso de invasión, los consorcios interactúan con la comunidad nativa, no solo por el uso de los recursos, si no también formando parte del flujo de carbono mediante la existencia de relaciones tróficas.
6. La historia de contaminación del suelo afecta la biodisponibilidad de los contaminantes ocasionando una limitación en la eficiencia de degradación durante procesos de bioaumentación.

Capítulo III

Materiales y métodos



III. Materiales y Métodos

III.1 Materiales

III.1.1 Cepas aisladas

Las cepas utilizadas en esta tesis fueron aisladas a partir de un cultivo de enriquecimiento degradador de fenantreno (CON) obtenido a partir de un suelo crónicamente contaminado con PAH. A partir de recuentos en placa de R2A se aislaron las cepas *Sphingobium* sp., (AM) (α -Proteobacteria), *Pseudomonas* sp. (Bc-h y T) y *Klebsiella aerogenes* (B) (δ -Proteobacteria), identificadas mediante la secuenciación del gen 16S rRNA (Festa et al., 2013). Posteriormente se aislaron las cepas *Burkholderia* sp Bk (β -Proteobacteria) y la cepa *Inquilinus limosus* Inq (α -Proteobacteria), a partir de placas de medio EMA y medio Mueller Hinton respectivamente (Macchi et al. 2021).

III.1.2 Medios de cultivos

Todos los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave a 121°C durante 20 minutos. La composición de los medios está expresada como gramos por litro de agua destilada.

Caldo R2 (Reasoner y Geldreich 1985)

0,5 g Extracto de levadura

0,5 g Proteasa peptona

0,5 g Ácido casamino

0,5 g Glucosa

0,5 g Almidón

0,3 g Ácido Pirúvico

0,3 g K₂HPO₄

0,05 g MgSO₄

El pH se ajustó a 7,2

Agar R2 (Reasoner y Geldreich 1985)

Se agregan 15 g/L de agar (Britania) al medio de cultivo caldo R2.

Caldo R3 (Reasoner y Geldreich 1985)

1 g Extracto de levadura
1 g Proteasa peptona
1 g Ácido casamino
1 g Glucosa
1 g Almidón
0,5 g Piruvato de sodio
0,6 g K₂HPO₄
0,1 g MgSO₄
El pH se ajustó a 7,2

Agar R3 (Reasoner y Geldreich 1985)

Se agregan 15 g/L de agar (Britania) al medio de cultivo caldo R3.

Medio Mineral Líquido (MML) (Vecchioli et al., 1990)

5 g NaCl
1 g K₂HPO₄
1 g (NH₄)H₂PO₄
1 g (NH₄)₂SO₄
0,2 g MgSO₄
3 g KNO₃
El pH se ajustó a 7,2.

III.1.3 Reactivos

Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos (PAH)

Antraceno
Dibenzotiofeno
Fenantreno
Fluoreno
Pireno

Intermediarios de rutas de degradación de fenantreno:

Ácido 1-hidroxi-2-naftoico (AHN)

Otros reactivos

Triton® X-100 (ultrapuro, USB Corporation, USA): surfactante no iónico formado por una mezcla de compuestos p-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-fenoxipoli(etilenglicoles) que en promedio tienen 9,5 subunidades de etilenglicoles, con un peso molecular promedio de 625 g/mol.

III.1.4 Buffers y soluciones

Solución fisiológica (SF)

0,85 % p/v

8,5 g/L NaCl

III.1.4.1 Buffers y soluciones para PCR

Buffer TAE 40X

Composición en 0,5 L

96,8 g Tris

22,85 ml Acético Glacial

7,445 g EDTA

500 ml Agua destilada

Gel de Agarosa

0,96 g Agarosa

80 ml Buffer TAE 1X

III.1.4.2 Buffer y soluciones para Proteómica

SDS-PAGE

Solución de resolución 10%

1,67 ml Acrilamida-bisacrilamida

1,875 ml Tris-HCl pH 8,8

1,38 ml Agua bidestilada

50 µl Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) 10%

2,7 µl N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamina (Temed)

27 µl Persulfato de Amonio (PAS) (10%)

Solución de concentración 4%

325 µl Acrilamida-bisacrilamida
312,5 µl Tris-HCl pH 8,8
1875 µl Agua bidestilada
25 µl SDS 10%
2,5 µl Temed 12,5 µl PAS (10%)

Buffer de carga (2x) pH=6,8

1 ml Tris-HCl 4 ml SDS 10%
2 ml Glicerol (al 20%)
0,4 ml EDTA (0,1M)
2,6 ml Agua bidestilada
0,08 g Azul de bromofenol

Buffer de corrida Tris- Glicina-SDS 5x pH=8,3

Composición en g/L en agua bidestilada

15,14 g Tris (125 mM)
72,06 g Glicina (965mM)
5 g de solución SDS 0,5 %

Tinción coomasie coloidal

Solución fijadora

30% Etanol
2% Ácido fosfórico (N.B. De stock de 85%, ie 2,35 ml/100)

III.1.4.3 Soluciones para SIP DNA

Buffer gradiente

0,1 M Tris, pH 8
0,1 M KCl
1 mM EDTA, pH 8

Solución de CsCl

1,85 gr/ml CsCl (en H₂O DEPC)

Solución PEG

30% de PEG 6000

1,6 M NaCl

Buffer TE

10 mM Tris-HCl

1 mM EDTA

pH 8

III.1.5 Kits

Kit de purificación de producto de PCR

NucleoSpin[®] Extract II (Macherey-Nagel, GmbH & Co. KG, Alemania)

Kit de extracción de RNA

RNeasy Protect Bacteria Mini Kit (Qiagen)

Reactivos y buffers utilizados para la RT-qPCR

β -Mercaptoetanol

Lisozima 20 mg/ml en H₂O DEPC

Retrotranscripción

Transcriptasa Inversa M-MLV (Invitrogen)

Primer Hexameral Random (Thermo Scientific)

Kit de extracción de DNA de suelo

E.Z.N.A.[™] Soil DNA (Omega Bio-tek, Norcross, GA, USA)

NucleoSpin[™] Soil (Macherey-Nagel, GmbH & Co. KG, Alemania)

III.2 Metodología

III.2.1 Preparación de los cultivos utilizados como inoculantes

III.2.1.1 Preparación de las cepas

Para aquellos ensayos en los que se emplearon cultivos axénicos de las cepas a *Sphingobium* sp. AM y *Burkholderia* sp. Bk, las mismas se crecieron en medio R3 durante 24 horas a 28°C y 150 r.p.m. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, los cultivos se centrifugaron a 6000 r.p.m durante 10 minutos, y fueron lavados dos veces con SF. Se inocularon $1 \cdot 10^7$ UFC/ml. La cantidad inoculada se determinó por medio de la medida de la densidad óptica (D.O) a 580 nm, utilizando la relación conocida entre densidad óptica y UFC/ml para cada cepa.

III.2.1.2 Preparación del cocultivo

Para el diseño de un cocultivo degradador de PAH, se seleccionaron las cepas *Sphingobium* sp. AM y la cepa *Burkholderia* sp. Bk, ambas aisladas a partir de un cultivo de enriquecimiento degradador de fenantreno (CON). Ambas fueron crecidas independientemente en R3 líquido durante 24 horas a 28°C y 150 r.p.m. Posteriormente, los cultivos fueron centrifugados a 6000 r.p.m. durante 10 minutos, y se realizaron 2 lavados con SF 0,85%, a fin de eliminar cualquier fuente de carbono remanente. Se definió una densidad de $2 \cdot 10^7$ UFC/ml en una proporción de 65:35, siendo mayoritaria la cepa AM. La cantidad inoculada se determinó midiendo D.O. a 580 nm.

III.2.1.3 Preparación de los consorcios sintéticos

Para la preparación de los consorcios sintéticos fueron crecidas independientemente en R3 líquido durante 24 horas a 28°C y 150 r.p.m. Los cultivos fueron centrifugados a 6000 r.p.m. durante 10 minutos, y se realizaron 2 lavados con SF 0,85%, a fin de eliminar cualquier fuente de carbono remanente. Se definió una densidad de $5 \cdot 10^7$ UFC/ml. La cantidad inoculada se determinó midiendo D.O. a 580 nm.

III.2.2 Cinéticas de degradación de PAH

III.2.2.1 Determinación de la concentración de fenantreno y ácido-1-hidroxi-2-naftoico

Para evaluar la degradación de fenantreno y la producción de ácido-1-hidroxi-2-naftoico (AHN), tanto en los monocultivos como en el cocultivo, se suplementó una concentración de 200 mg/L de fenantreno como única fuente de carbono y energía (UFCE) en MML. Los sistemas inoculados se incubaron durante 15 días a 28°C a 150 rpm, tomándose muestras a los días 0, 4, 7 y 15. Se utilizaron como control abiótico frascos suplementados sin inocular que se incubaron juntamente con los tratamientos. Cada determinación se realizó por triplicado y en cada muestreo se sacrificaron los cultivos. Se realizaron extracciones seriadas utilizando acetato de etilo como solvente de extracción (relación 1:2 acetato de etilo/cultivo por cada extracción). La mezcla de acetato de etilo y cultivo se agitó durante 30 minutos a 150 rpm a temperatura ambiente y se conservó la fase orgánica. Este procedimiento se repitió tres veces. El extracto fue conservado en frascos color caramelo a -20°C hasta su procesamiento. La determinación de la concentración de fenantreno y AHN se llevó a cabo mediante Cromatografía Líquida de Alta Precisión (HPLC) en fase reversa utilizando un cromatógrafo Waters® España. Los espectros de absorción al UV (254 nm) se obtuvieron utilizando un detector 2996 photodiode array (Waters®, España) y se analizaron con el software Empower.

III.2.2.2 Cinéticas de degradación de PAH en mezclas con fenantreno

Se estudió la degradación de distintos PAH por los monocultivos y el cocultivo, a saber: dibenzotiofeno, fluoreno, antraceno y pireno. La degradación para cada uno PAHs se evaluó como UFCE en comparación con la degradación de los mismos en mezcla con fenantreno. Se suplementó 100 mg/L cada PAH en MML, tanto para los sistemas UFCE como los sistemas mezclas. En el caso de estos últimos se suplementó con 200 mg/L de fenantreno. Los cultivos se inocularon por triplicado durante 15 días a 28°C a 150 rpm, tomándose muestras a los días 0, 4 y 15. Se utilizó como control abiótico frascos suplementados sin inocular que se incubaron juntamente con los tratamientos. Cada determinación se realizó por triplicado y en cada muestreo se sacrificaron los cultivos. Los cultivos se acidificaron a un pH 2 con HCl concentrado y se realizaron extracciones seriadas utilizando diclorometano (DCM) como solvente de extracción (relación 1:2 DCM/cultivo por cada extracción). La mezcla de DCM-cultivo se agitó durante 30 minutos a 150 rpm a temperatura ambiente y se conservó la fase orgánica. Este procedimiento se repitió 4 veces. El extracto fue evaporado y posteriormente resuspendido en 2 mL en una mezcla acetona:hexano v/v 1:1 de calidad cromatografía. El análisis de los extractos se realizó por cromatografía gaseosa (GC). 2 µl de cada muestra se inyectaron en un cromatógrafo gaseoso Clarus 500 (Perkin Elmer) equipado con una columna PE-5HT (30 m x 0,25 mm x 0,10 µm) y acoplado a un detector de ionización de llama (GC-FID).

III.2.3 Estudio de la dinámica de las poblaciones bacterianas durante la degradación de PAH.

III.2.3.1 Estudio de interacciones en placas

Para estudiar las interacciones microorganismo-microorganismo se realizaron cocultivos en medio sólido utilizando las cepas AM y Bk (cocultivos binarios). A partir de cultivos overnight en R2 de cada cepa, se sembraron 3 spots de 5µl de cada cepa en placa de R2A. Cada uno de los spots de cada cepa se sembró a una distancia de 1 cm entre sí, mientras que la distancia entre los spots de ambas cepas fue de 0,5 cm. Las placas fueron incubadas a 30°C durante 7 días.

III.2.3.2 Recuento diferencial de las poblaciones del cocultivo durante la degradación de fenantreno y la producción de ácido 1-hidroxi-2-naftoico.

Con el fin de evaluar los cambios en las densidades poblacionales de las cepas *Sphingobium* AM y *Burkholderia* sp. Bk durante la degradación de fenantreno y la producción de AHN, se realizaron recuentos en placa a los distintos tiempos de incubación. Estos se realizaron de un cultivo de 100 ml de MML suplementado con 200 ppm de fenantreno como única fuente de carbono y energía. Los cultivos se inocularon por triplicado durante 15 días a 28°C a 150 rpm, tomándose muestras a los días 0, 4, 7 y 15. La determinación del número de bacterias cultivables se realizó mediante diluciones seriadas (1/10) en SF (Reasoner y Geldrich, 1985). Luego se sembraron 100 µl de cada dilución, por duplicado, en placas de medio R2A, los cuales se distribuyeron utilizando una espátula de Drigalsky. Estas placas fueron incubadas durante 7 días a 24°C. Debido a que las morfologías de las cepas son claramente diferenciables, se contaron las colonias y se calculó el número de unidades formadoras de colonias por ml (UFC/ml).

III.2.3.3 Recuento diferencial de las poblaciones del cocultivo durante la degradación de mezclas de PAH.

Se evaluó el comportamiento de las poblaciones de las cepas AM y Bk en cocultivo durante la degradación de mezclas de PAH en comparación con dicho comportamiento cuando el hidrocarburo se suplementa como UFCE. Se seleccionaron el dibenzotiofeno, fluoreno y antraceno como PAH de bajo peso molecular y el pierno de alto peso molecular. Cada uno se combinó con fenantreno y se comparó con el PAH suplementado como UFCE. Se suplementó 100 ppm de cada PAH tanto para sistemas en los que se suplemento como UFCE como para los sistemas en donde se suplementó la mezcla con fenantreno, suplementándose 200 ppm del mismos. Ambos sistemas fueron inoculados con $2 \cdot 10^7$ UFC/ml del cocultivo AM-Bk. Los cultivos se inocularon por

duplicado durante 15 días a 28°C a 150 rpm, tomándose muestras a los días 0,1, 4, 7 y 15. Se determinó el número de UFC/ml para cada uno de los sistemas por recuento en placa, siguiendo la metodología previamente descrita.

III.2.4 Análisis de expresión génica diferencial mediante RT-qPCR

III.2.4.1 Preparación de cultivos

Se estudió el comportamiento de una selección de genes involucrados en la degradación de fenantreno en el cocultivo en relación con el comportamiento de los mismos en los cultivos axénicos de las cepas AM y Bk. Se prepararon cultivos de ambas cepas en 100 ml de R3 líquido, los cuales fueron incubados durante 24 horas a 28°C. Posteriormente, se centrifugaron a 6000 rpm, durante 10 minutos, y el pellet generado se inoculó en 100 ml de MML sin ninguna fuente de carbono y energía. Estos cultivos se incubaron durante 7 días a 28°C y 150 rpm. Se realizó un recuento en R2A al inicio y al final del periodo de hambreado para asegurar la sobrevivencia del inóculo.

Se centrifugaron los cultivos durante 10 minutos a 6000 rpm y se resuspendió el pellet en SF. Se determinó la DO_{580nm} y se inocularon de $2 \cdot 10^7$ UFC/ml del cocultivo AM-Bk, en la proporción 65:35, y $1 \cdot 10^7$ UFC/ml para los monocultivos de las cepas AM y Bk en 50 ml de MML suplementado con 200 ppm de fenantreno. Se tomaron muestras a las 2, 8 y 72 horas de incubación, con sacrificio de los cultivos para cada tiempo seleccionado. Cada cultivo se realizó por triplicado. Al momento de toma de muestra, se filtraron los cultivos, a fin de eliminar los cristales remanentes de fenantreno, que podrían interferir en la cuantificación posterior. Una vez filtrados, los cultivos se centrifugaron, se resuspendieron en RNAlater® y se conservaron a -80 °C para evitar la degradación del ARN.

III.2.4.2 Extracción del ARN total mediante kit comercial

Los cultivos conservados a -80°C se descongelaron en hielo, y posteriormente, fueron centrifugados a 10000 rpm durante 15 min a 4°C para eliminar el RNAlater. Se realizó un tratamiento con lisozima durante 10 min a temperatura ambiente para aumentar la eficiencia de extracción del ARN. La extracción del ARN total se realizó utilizando el kit comercial RNeasy Protect Bacteria Mini Kit (Qiagen) siguiendo las indicaciones del fabricante. Se eluyó el ARN en 2 pasos agregando 30-50 µl de RNase Free water.

Se evaluó la concentración del ARN extraído mediante la medida de la absorbancia en un espectrofotómetro (Nanodrop 2000, Thermo-Scientific™). Además, se utilizó la relación DO_{260nm}/DO_{280nm} como estimador de la pureza de ARN extraído. Valores cercanos a 2 indican baja contaminación del ARN extraído. También se evaluó

la integridad del ARN mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% durante 10 min a 120-140 V. Se consideró que el ARN estaba íntegro cuando fue posible distinguir 3 bandas nítidas, correspondientes a las subunidades ribosomales 23S, 5S y 16S.

Se fraccionó el ARN extraído en alícuotas de 2 µg de muestra y se conservó a -80°C.

III.2.4.3 Síntesis de cDNA

A fin de eliminar el ADN genómico que podría estar presente en la muestra, los 2 µg de muestra fueron incubados con DNasa I (Promega RQ1) durante 45 minutos a 37°C. La ausencia de ADN genómico fue corroborada mediante PCR del gen 16S rARN. La incubación con la DNasa se repitió hasta corroborar la ausencia de ADN en la muestra. El ARN libre de ADN fue utilizado como molde para la síntesis de cDNA, para lo cual se realizó una incubación con la transcriptasa inversa M-MLV (Invitrogen) y utilizando Hexameral Random primers (Thermo Scientific), siguiendo las indicaciones del fabricante. Posteriormente, se eliminó el ARN remanente utilizando RNasa (40 U/µl). La obtención de cDNA fue corroborada mediante PCR del gen 16S rARN. El cDNA obtenido fue conservado a -80°C.

III.2.4.4 Selección y diseño de primers

Para estudiar los cambios en la expresión de genes catabólicos vinculados en la degradación de fenantreno en las cepas AM y Bk en cocultivo con respecto a sus respectivos monocultivos, se seleccionaron set de primers específicos para cada cepa para genes que codifican enzimas que actúan en la vía alta y baja de la ruta de degradación de fenantreno. Seleccionó el gen 16S rARN como gen de referencia.

Para la cepa AM se utilizaron sets de primers propuestos por Khara et al.,2014, y corroborando en nuestro laboratorio la especificidad para la cepa AM. La tabla III.1 muestra un detalle de los primers utilizados

Para la cepa Bk se utilizó el set de primers dirigido al gen 16S rARN del género *Burkholderia* propuesto por Bacosa et al., (2012).

Los primers utilizados para genes que codifican enzimas que participan en la degradación de fenantreno, fueron diseñados en esta tesis y se muestran en la tabla III.2. Con este objetivo, se tomaron las secuencias de ADN de genes específicos a partir del genoma de la cepa Bk. Se utilizó el software Primer3Plus (<https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) para la selección de los primers y se analizaron las características de estos mediante la herramienta OligoAnalyzer tool (<https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>).

Una vez seleccionado el mejor set de primers, se corroboró *in silico* la especificidad de los mismos sobre el genoma de Bk utilizando el software Artemis. Además, se verificó la ausencia de hibridación de los primers con el genoma de la cepa AM. Se corroboró la amplificación mediante PCR de los primers diseñados sobre el

ADN de la cepa Bk, al mismo tiempo que se corroboró la ausencia de amplificación sobre el ADN de la cepa AM.

En aquellos casos donde se observó amplificación inespecífica, se ajustó la temperatura de *annealing* hasta observar una única banda correspondiente al tamaño deseado. Los productos de amplificación de PCR fueron purificados y secuenciados por el servicio de secuenciación de MacroGen Inc. por el método de Sanger.

Gen	Primer set	Secuencia (5'-3')	Temperatura de annealing	Referencia
<i>Sphingobium</i> 16S rRNA	16S rRNA_RT_F	GTAGGCGGCGATTAAAGT C	62	Khara et al, 2014
	16S rRNA_RT_R	ACAATCGTCCAGTGAGC C		Khara et al, 2014
Catechol 2,3-dioxygenase (xylE)	xylE_RT_F	CGTGGATATAGCCAGTTC G	60	Khara et al, 2014
	xylE_RT_R	TACCGTCTTCGGGATAG C		Khara et al, 2014
(2Fe-2S)-binding protein (ahdB)	ahdB_RT_F	GATGTCCGCAATTATGTC G	55	Khara et al, 2014
	ahdB_RT_R	CTTACGTTGACGCCGAA G		Khara et al, 2014
2,3 dihydroxybiphenyl 1,2- dioxygenase (ahdC)	ahdC_RT_F	ATGACCTGGCCTACATGG	55	Khara et al, 2014
	ahdC_RT_R	GATCTCGGTCCGATTGCC		Khara et al, 2014
Benzoate 1,2-dioxygenase subunit alpha (ahdA1d)	ahdA1d_RT_F	AGCATTTCGCTGGAGCG	58	Khara et al, 2014
	ahdA1d_RT_R	ATAGCCCAGAACCTTGA CC		Khara et al, 2014
Benzoate 1,2-dioxygenase subunit aa (ahdA1c)	ahdA1c_RT_F	CTGAGACAGTTACGCAC CG	58	Khara et al, 2014
	ahdA1c_RT_R	AAGCTCCAATTCCCGC		Khara et al, 2014
(2Fe-2S)-binding protein (ahdA3)	ahdA3_RT_F	GCAGTATATAATGTTGAT GGCG	55	Khara et al, 2014
	ahdA3_RT_R	ATCGCCACTTGGCAGG		Khara et al, 2014
Naphthalene dioxygenase (ahdA1f)	ahdA1f_RT_F	ACAAGGGCTTCATTTTCG	55	Khara et al, 2014
	ahdA1f_RT_R	CTCGGTCCGGACTTTCC		Khara et al, 2014

Tabla III.1: Detalle de los sets de primers dirigidos para el género *Sphingobium* utilizados para los ensayos de RT-qPCR. Se muestra el nombre de los genes, la secuencia de los primers y la temperatura de annealing de los mismos.

Como último control, se seleccionaron aquellos sets de primers cuya eficiencia de amplificación por qPCR se encontró entre 90 y 110. Esta determinación se realizó mediante diluciones seriadas (1:10) del molde de cDNA. El cálculo de la eficiencia siguió la fórmula: % Eficiencia de la PCR: $E = 10^{(-1/\text{pendiente})} - 1 \times 100$.

Gen	Primer set	Secuencia (5'-3')	Temperatura de annealing	Referencia
<i>Burkholderia</i> 16S rRNA	Burk_F	CTGCATTTGTGACTGGCGG	60	Bacosa et al, 2012
	Burk_R	ACGTTACCAAGTCAATGAAGA		
		C		
Catechol 2,3-dioxygenase	cat_F	CCGCGATGAAGCATTACGTG	60	
	cat_R	TCAAGGTCGGCCTCTGTTTC		
Naphthalene/biphenyl dioxygenase	Naph_F	TCCGGATAAGGTGTATTCGCT	60	
	naph_R	CGGCGTTACGTACGGTAAA		
Biphenyl 2,3 dioxigenase	Biph_F	CAGGCCCTGAAGAATTTGAC	60	
	Biph_R	ATGATATGACCGAGCCCTTG		
Salicylate	Sal_F	TTCTCACCGATGACTGCAC	60	
	Sal_R	CCTCCTCGACCTCTTTGATG		
Large subunit toluate/benzoate dioxygenase	Tol_F	CGGAAAATACCCGTGATCCA	60	
	Tol_F	TCCTCCTTGCTAGAACCGGA		

Tabla III.2. Detalle de los sets de primers diseñados dirigidos para el género *Burkholderia*, utilizados para los ensayos de RT-qPCR. Se muestra el nombre de los genes, la secuencia de los primers y la temperatura de annealing de los mismos.

III.2.4.5 Amplificación mediante RT-qPCR

Las reacciones de RT-qPCR se llevaron a cabo en un volumen final de reacción de 10 µl, para lo cual se usaron 2 µl de molde de cDNA, 1 µl de cada set de primer, 5 µl de 2x SsoAdvanced™ Universal SYBR Green Supermix (Bio Rad) y agua miliQ para completar el volumen. La reacción fue llevada a cabo en un Rotor-Gene Q QIAGEN, y el programa consistió en un primer paso de desnaturalización a 95°C durante 10 minutos, seguido por 45 ciclos de desnaturalización a 95°C por 10 segundos, alineamiento a 55°C (para los primeros de AM) o de 60°C (para los primer de Bk) por 15 segundos, elongación a 72°C por 15 segundos y un paso de extensión final a 72°C por 5 minutos. Además, a cada corrida se le agregó un ciclo hasta los 95°C a fin de evaluar la temperatura de melting.

Cada reacción fue llevada a cabo por triplicado, incluyendo las reacciones de los controles. Éstos consistieron en la mezcla de reacción (control de mix), y la misma con el agregado de 2 µl de agua miliQ (control de agua). Los resultados fueron analizados mediante el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, que asume que la eficiencia de reacción es cercana a 1 y que no hay diferencias significativas entre las eficiencias del gen de interés y el gen de referencia. El gen 16S rARN fue utilizado como gen de referencia. Las diferencias de Ct en cada muestra para cada gen de interés se calcularon de la siguiente manera: Ct gen de interés – Ct de gen 16S rARN como gen marcador de referencia, para un tiempo determinado. Esta diferencia es referida a la diferencia entre Ct de la condición control. Se seleccionaron las 2 horas como condición control. El resultado se expresó como $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

III.2.5 Análisis metaproteómico

III.2.5.1 Obtención de las proteínas del cocultivo AM-Bk y de los monocultivos de las cepas *Sphingobium* sp. AM y *Burkholderia* sp. Bk.

Se estudió los cambios en el perfil proteómico del cocultivo AM-Bk durante la degradación de fenantreno, en comparación con los monocultivos de las cepas AM y Bk. Se prepararon 500 ml de MML suplementado con 200 ppm de fenantreno como UFCE para cada uno de los cultivos. Cada cultivo se realizó por triplicado, los cuales fueron incubados a 28°C y 150 rpm durante 72 hs. Trascurrido el periodo de incubación, se filtraron los cultivos con el objetivo de eliminar los cristales de fenantreno remanente. Los filtrados se centrifugaron a 6000 rpm durante 10 min, y el pellet fue lavado 2 veces con agua bidestilada. Se concentró cada muestra hasta obtener una D.O._{580nm} superior a las 20 unidades. Las muestras fueron conservadas a -80°C para su posterior procesamiento.

III.2.5.2 Lisado celular para la obtención de proteínas.

A cada muestra se le agregaron 2,5 µl de un cóctel de inhibidores de proteasas y 5 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF). La lisis celular se alcanzó mediante la ruptura mecánica utilizando un homogeneizador Precellys R 24 (Bertin Technologies, France) y perlas de vidrio, mediante tres ciclos de 30 segundos a 6500 rpm. Luego de la ruptura, los restos celulares se lavaron 2 veces, centrifugando 10 minutos a 6000 g reteniendo el sobrenadante. Se adicionaron 3 volúmenes del buffer de solubilización suplementado con fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) 5 mM e inhibidor de proteasa (recién preparado). Las muestras se mezclaron con agitación suave durante 60 minutos en esa solución de solubilización y se centrifugan a 13.000 g durante 10 minutos.

III.2.5.3 Determinación de la concentración de proteínas

La determinación de la concentración de proteínas se realizó utilizando el reactivo de Bradford (Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent). Como curva de calibración se utilizaron diluciones de un patrón de albumina (rango 0,08-0,5 g/l). Se realizó la medida de la D.O._{595nm}. Debido a que el buffer de solubilización contiene urea, las muestras fueron diluidas 1:10 para la realización de la medida.

III.2.5.4 Análisis de la integridad de las proteínas mediante SDS-PAGE

A fin de evaluar la integridad de los extractos proteicos, se prepararon geles de acrilamida y se sembraron las proteínas solubilizadas con el buffer de carga en la parte superior. La electroforesis se realizó utilizando un Mini-PROTEAN Tetra Cell, 4 gel System (Bio-Rad) a 100V durante 2 horas (se aumenta el voltaje de 50V a 100V una vez que las muestras hayan llegado al final del gel concentración) hasta que la migración frontal en el gel llega al final del mismo. Los geles SDS-PAGE se calibraron con un marcador de peso molecular PageRuler™ Presence Protein Ladder (10-170 kDa) (Pierce Endogen) y se tiñeron con Coomassie blue G 250.

III.2.5.5 Análisis LC-MS/MS de los extractos proteicos

La digestión de proteínas y el análisis por Espectrometría de Masas se realizaron en el Centro de Proteómica CEQUIBIEM, de la Universidad de Buenos Aires-CONICET de la siguiente manera: Las muestras de proteínas fueron reducidas con ditioneitol (DTT) en 50mM de bicarbonato de amonio a una concentración final de 10 mM (45 min, 56°C) y alquiladas con yodoacetamida en el mismo solvente a una concentración final de 30 mM (40 min, RT, en oscuridad). Las proteínas se digirieron con tripsina (Promega V5111). A continuación, los péptidos se purificaron y desalaron con columnas ZipTip C18 (Millipore).

Los extractos digeridos se analizaron por nanoLC-MS/MS en un espectrómetro de masas Thermo Scientific Q Exactive acoplado a un nanoHPLC EASY-nLC 1000 (Thermo Scientific). Para el análisis LC-MS/MS, se cargó aproximadamente 1 µg de péptidos en la columna y se eluyó durante 120 minutos utilizando una columna de fase inversa (C18, 2 µm, 100A, 50 µm x 150 mm) Easy-Spray Column PepMap RSLC (P/N ES801) adecuada para separar complejos proteicos con un alto grado de resolución. El caudal utilizado para la nano columna fue de 300 nL min⁻¹ y el intervalo de disolventes del 7% B (5 min) al 35% (120 min). El disolvente A fue ácido fórmico al 0,1% en agua, mientras que el B fue ácido fórmico al 0,1% en acetonitrilo. El volumen de inyección fue de 2 µl. El equipo de espectrometría de masas tiene una célula de disociación de alta colisión (HCD) para la fragmentación y un analizador Orbitrap (Thermo Scientific, Q-Exactive). Se utilizó un voltaje de 3,5 kV para la ionización por electroaspersión (Thermo Scientific, EASY-SPRAY).

Para la adquisición de datos y la configuración del equipo se utilizó el software XCalibur 3.0.63 (Thermo Scientific), que permite la identificación de péptidos al mismo tiempo que su separación cromatográfica. Los

espectros de masas de barrido completo se adquirieron en el analizador Orbitrap. El rango de masas escaneado fue de 400-1800 m/z, con una resolución de 70000 a 400 m/z y los doce iones más intensos en cada ciclo, fueron secuencialmente aislados, fragmentados por HCD y medidos en el analizador Orbitrap. Los péptidos con carga +1 o con estado de carga no asignado se excluyeron de la fragmentación para MS2.

III.2.5.6 Análisis de datos - cuantificación de proteínas

Los datos obtenidos se procesaron con el software Proteome Discoverer (versión 2.1.1.21 Thermo Scientific) y se buscaron en las bases de datos de secuencias genómicas preliminares con números de acceso: LRU01 (AM), NHOM01 (Bk) con especificidad de tripsina y un máximo de un error de escisión por péptido

Las búsquedas en Proteome Discoverer se realizaron con una tolerancia de masa precursora de 10 ppm y una tolerancia de producto iónico de 0,05 Da. Las modificaciones estáticas se fijaron en carbamidometilación de Cys, y las modificaciones dinámicas en oxidación de Met y acetilación N-terminal.

Las coincidencias de proteínas se filtraron en busca de coincidencias de péptidos de alta confianza con una tasa máxima de falsos descubrimientos de proteínas y péptidos del 1% calculada empleando una estrategia de base de datos inversa. Las coincidencias de proteínas que no sumaban al menos 5 PSM (Peptide spectrum matches) entre las tres muestras replicadas se excluyeron del análisis.

Los datos obtenidos del área para cada proteína se procesaron con el programa Perseus (Instituto Max Planck de Bioquímica, versión 1.5.5.3) que permite un análisis estadístico más profundo. Se realizaron diferentes gráficos de dispersión según las muestras comparadas. Para cada par de muestras, se trazó el valor $\log p$ (-Log Student T-test p-value A_B) en el eje y frente a la diferencia Student T-test A_B en el eje x. Las proteínas que aparecían en el volcano plot con un cambio de pliegue superior a 2 (inferior a -1 o superior a 1 en el eje x del gráfico) y un valor p inferior a 0,05 (superior a 1,3 en el eje y del gráfico) se consideraron expresadas diferencialmente.

III.2.6 Estudios de bioaumentación en suelos con contaminación aguda y en suelos crónicamente contaminados.

III.2.6.1 Caracterización edafológica de los suelos utilizados

Para los ensayos de bioaumentación se seleccionaron dos suelos con historias de contaminación distinta. Se seleccionó un suelo no contaminado proveniente del Parque Pereyra, La Plata, provincia de Buenos Aires (34°51'24.6"S 58°06'54.2"W). Este suelo, denominado en esta tesis SP, fue utilizado para los ensayos de bioaumentación de suelos con contaminación aguda. Para los estudios de bioaumentación en suelos crónicamente contaminados se utilizó un suelo proveniente de una planta petroquímica aledaña a la ciudad de Ensenada,

provincia de Buenos Aires (34° 53' 19" S 57° 55' 38"W). Este suelo, denominado en esta tesis IPK, provenía de un tratamiento de *landfarming* de un barro petroquímico, el cual se llevó a cabo durante dos años con recargas sucesivas. Ambos suelos fueron caracterizados por el laboratorio de Edafología de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata. La tabla III.3 muestra las características fisicoquímicas de los suelos empleados.

Determinación	Suelo SP	Suelo IPK
Textura	Franco-arenoso	Franco
pH	5,8-5,9	8
Materia orgánica (%)	6,21	9,88
Carbono (%)	3,60	5,73
Nitrógeno (%)	0,3	0,13
Fosforo (mg. Kg ⁻¹)	4,20	25
C/N	12,16	42
Conductividad Eléctrica (mS.cm ⁻¹)	1,1	2,72

Tabla III.3: Caracterización fisicoquímica de los suelos seleccionados para los estudios de bioaumentación en microcosmos.

III.2.6.2 Preparación de microcosmos de suelo con contaminación aguda con PAH

Se prepararon microcosmos de 150 gr de suelo tamizado (malla de 2 mm de poro) en frascos de vidrio con una capacidad de 250 ml. Los mismos fueron contaminados con una mezcla de PAH. Esta mezcla estaba constituida por 600 mg de fenantreno (Sigma Aldrich, 98% de pureza), 150 mg de fluoreno (Carlo Erba), 150 mg de pireno (sigma Aldrich) y 100 mg de antraceno (Merk) por kilo de suelo seco. La mezcla de PAH fue administrada a través de una solución de acetona, mediante goteo, con mezcla para una distribución homogénea de la misma. El agregado de los hidrocarburos se realizó 1 día antes de la inoculación.

Se realizaron tres tratamientos, cada uno de los cuales se analizó por triplicado:

- SP AM-Bk: suelo contaminado con mezcla de PAH inoculado con 5x10⁷ ufc del cocultivo AM-Bk por g de suelo seco.
- SP CS-1: suelo contaminado con mezcla de PAH inoculado con 5x10⁷ ufc de CS-1 por g de suelo seco.
- SP CS-4: suelo contaminado con mezcla de PAH inoculado con 5x10⁷ ufc de CS-4 por gramo de suelo seco.

Como controles se utilizó el suelo prístino sin contaminar (SP) y contaminado con la mezcla de PAH (SP+PAH), también realizados por triplicado.

Los microcosmos fueron incubados a 24 ± 2 °C durante 60 días, manteniendo la humedad al 23 ± 1 % corrigiendo cuando fuere necesario con el agregado de agua destilada.



Figura III.1: Fotografía de los microcosmos realizados con suelo SP, tomando como ejemplo los triplicados inoculados con CS-1

III.2.6.3 Preparación de los microcosmos de suelo crónicamente contaminados con PAH

Se prepararon microcosmos con suelo crónicamente contaminado siguiendo el protocolo previamente mencionado para los microcosmos con suelo artificialmente contaminado. Para el suelo crónicamente contaminado se realizaron dos tratamientos diferentes, para evaluar diferencias en la eficiencia del bioaumentación debido a modificaciones en la matriz del suelo. El primer tratamiento consistió en la inoculación de los consorcios degradadores al suelo tamizado sin ninguna modificación adicional (sistema denominado IPK). El segundo tratamiento consistió en la inoculación de los consorcios en el suelo crónicamente contaminado al cual se lo suplementó con 11 mg. g⁻¹ de suelo seco del surfactante no iónico Tritón X-100 (Cecotti et al.,2018) (IPK-Triton). Estos tratamientos fueron inoculados con 5x10⁷ ufc por g de suelo seco de consorcio CS AM-Bk.

Cada tratamiento se realizó por triplicado (Figura III.2) y como controles se utilizó al suelo sin inocular (control IPK) y al suelo sin inocular con el agregado de Tritón X-100 (IPK-Tritón), cada uno por triplicado.

Los microcosmos fueron incubados a 24 ± 2° C durante 60 días en oscuridad. El porcentaje de humedad se mantuvo 19,9 ± 2,5 corrigiendo cuando fuere necesario con el agregado de agua destilada.



Figura III.2: Fotografía de los microcosmos realizados con suelo IPK, tomando como ejemplo los triplicados control sin inoculara.

III.2.6.4 Determinación de la concentración de hidrocarburos

Para la extracción de hidrocarburos totales se tomaron 5 gr de suelo en falcon de 50 ml, el cual fue secado por vacío (Liofilizador L-3, provisto por RIFICOR). A partir del suelo liofilizado se procedió a la extracción exhaustiva de hidrocarburos totales por mezcla de solventes orgánicos agregando 15 ml de hexano:acetona 1:1 (v/v) de calidad cromatográfica con sonicación durante 30 min (ultrasonicador TestLab, 400W, 40KHz). Posterior a la sonicación, se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos, conservando la fase orgánica en frascos color caramelo. Este procedimiento se repitió tres veces, recolectando las fracciones orgánicas en el mismo frasco color caramelo y se dejó evaporar.

Las muestras del suelo artificialmente contaminado se resuspendieron en 2 ml de la mezcla hexano: acetona 1:1 (v/v), mientras que las muestras de suelo crónicamente contaminado, con y sin el agregado de Triton X-100, fueron resuspendidas en 10 ml de la misma mezcla. Posteriormente, las muestras fueron sonicadas durante 10 min y filtradas a través de una membrana de nylon de 0,45 μm de poro.

Las muestras fueron inyectadas en un cromatógrafo gaseoso (Claurus 500, Perkin Elmer) acoplado a un detector de ionización de llama (GC-FID) y equipado con una columna PE-5HT (30 m x 0,25 mm x 0,10 μm).

Las muestras del suelo artificialmente contaminado fueron analizadas con un programa corto que consistió una temperatura inicial del horno a 100 °C durante 2 minutos seguida de un aumento en una primera rampa hasta 170 °C a 40 °C por min; a ésta le sigue una segunda rampa hasta 190 °C a una tasa de 10 °C por min y una tercera rampa hasta los 250 °C a 40 °C por minuto. A continuación, le sigue una fase de extensión donde se mantienen la temperatura alcanzada durante 2 min.

Las muestras del suelo crónicamente contaminado, con y sin el agregado de Triton X-100 (IPK e IPK^{Triton}), se analizaron con el programa de temperatura utilizado por Morelli et al., (2005). La temperatura del puerto de inyección se mantiene a 280 °C y el detector a 300 °C durante la corrida. La temperatura inicial del horno se mantuvo a 50 °C durante 4 minutos seguida de un aumento en una primera rampa hasta 150 °C a 4 °C por min; a ésta le sigue una segunda rampa hasta 280 °C a una tasa de 10 °C por min y una tercera rampa hasta los 300 °C a 15 °C por minuto. A continuación, le sigue una fase de extensión donde se mantienen la temperatura alcanzada durante 12 min.

La identificación y cuantificación de cada hidrocarburo se realizó mediante la utilización de patrones comerciales de concentración conocida para PAH (Restek, NJEPH Aromatic Frac. Check Mix y 610 PAH Calibration Mix A), a través de curvas de calibración.

III.2.6.5 Determinación del porcentaje de humedad

Se pesó aproximadamente 4 gr de suelo húmedo y se llevó a una estufa a $105 \pm 5^{\circ}\text{C}$ hasta alcanzar peso constante. Posteriormente se midió nuevamente el peso del suelo seco, y esta diferencia se expresó como porcentaje de humedad.

III.2.6.6 Extracción de ADN total de suelo

El ADN total de las muestras de suelo fue extraído y purificado a partir de 1 g de suelo utilizando el Kit comercial E.Z.N.A TM Soil DNA (Omega Bio-tek, Norcross, GA, USA). En el caso de los microcosmos de suelo crónicamente contaminado se realizó una modificación del protocolo del kit, ya que el primer paso de lisis se repitió 2 veces.

III.2.6.7 PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)

Se cuantificó el gen funcional que codifica la subunidad alfa de enzimas hidroxilantes de anillo aromático de bacterias Gram negativas (PAH-RHD α GN), que actúan en los primeros pasos de la degradación aeróbica de PAH, y el gen C230, que codifica para la catecol 2,3 dioxigenasa, que actúa en la vía baja de degradación de PAH, brindando información acerca del potencial degradador de la comunidad. A su vez se cuantificó el número de copias del gen constitutivo 16S rARN para estudiar la dinámica de la comunidad bacteriana total. La tabla III.4 muestra los primers seleccionados para cada gen y su referencia bibliográfica.

La cuantificación se llevó a cabo mediante curvas de calibración a partir de diluciones de plásmidos que contenían el gen target como inserto. Se graficó los valores de Ct en función del logaritmo del número de copias por μl .

Gen	Primer set	Secuencia (5'-3')	Referencia
16S rARN	1055F	ATGGCTGTCGTCAGCT	Harms et al., 2003
	1392R	AACGCGAAGAACCTTAC	
Subunidad α de dioxigenasas PAH-RHD de bacterias GN	PAH-RHD α GNF	GAGATGCATACCACGTKGGTTGGA	Cebon et al., 2008
	PAH-RHD α GNR	AGCTGTTGTTCCGGGAAGAYWGTGCMGTT	
catecol 2,3-dioxigenasa.	C230F	AAGAGGCATGGGGGCGCACCGGTTCGA	Sei et al., 1999
	C230R	CCAGCAAACACCTCGTTGCGGTTGCC	

Tabla III.4: primers utilizados para la determinación del número de copias de los genes específicos.

Los plásmidos fueron clonados y purificados (Lillis et al., 2010) por la Dra. Laura Madueño en el Laboratorio de Biorremediación de Suelos contaminados con Hidrocarburos del CINDEFI, UNLP-CONICET, La Plata, Argentina. Brevemente, productos PCR de los genes a cuantificar se clonaron utilizando el vector pGEM-T Easy vector (3015 pb) y el vector recombinante obtenido se purificó con Qiaprep miniprep kit (Qiagen). Se comprobó la presencia del producto PCR ligado al vector utilizando los mismos cebadores utilizados para generar el producto PCR en el paso inicial.

El vector recombinante se cuantificó con Nanodrop TM (Thermo Scientific) y el número de copias de cada gen por μ l se calculó usando el tamaño del plásmido recombinante y un promedio de masa molecular de 650 Da por par de nucleótidos utilizando la siguiente formula:

$$N^{\circ} \text{ copias}/\mu\text{l} = [\text{ng}/\mu\text{l}] \times 6,022 \times 10^{23} / (\text{longitud del inserto en pb} + 3015) \times 109 \times 650$$

La reacción de amplificación fue realizada en un termociclador Rotor-Gene Q 2plex (QIAGEN). El volumen de reacción final fue de 10 μ l, utilizando 2 μ l de ADN molde, 2x SsoAdvancedTM Universal SYBR Green Supermix (Bio Rad), 0,4 μ M de cada primer, 0,3 g/L de seroalbúmina bovina (BSA), y agua MiliQ para completar el volumen. Como control negativo, el volumen de muestra se reemplazó por agua MiliQ. Para el 16S el programa utilizado consistió en un paso inicial de desnaturalización durante 5 min a 95°C, 40 ciclos de 95°C por 30 s, 53°C por 30 s, y 72°C por 30 s, y una elongación a 72°C por 7 minutos. Por último, se agregó una rampa de temperatura para analizar la temperatura de melting. El programa para el gen PAH-RHD α GN y para C230 consistió en un paso inicial de desnaturalización durante 5 min a 95°C, 50 ciclos de 95°C por 30 s, 57°C por 30 s, y 72°C por 30 s, y una elongación a 72°C por 7 minutos. Al igual que para el caso anterior, se agregó una rampa de temperatura para analizar la temperatura de melting.

III.2.6.8 Análisis de secuenciación masiva

Para estudiar el efecto del bioaumentación sobre la estructura de la comunidad nativa se realizó el análisis de secuenciación masiva del gen 16S rARN. Se seleccionaron las muestras correspondientes al control sin inocular (SP) al tiempo inicial de incubación del suelo con contaminación aguda. Además, se seleccionaron las muestras correspondientes a los microcosmos inoculados y a sus respectivos controles a los 15 y 58 días de incubación. La secuenciación masiva se llevó a cabo mediante el servicio de secuenciación masiva de Novogene Corporation Inc en la plataforma de secuenciación Illumina Novaseq 6000. Se seleccionó el set de primer 515F y 806R que está dirigido a la región hipervariable V4 del gen 16S rARN.

El análisis de datos de secuenciación fue llevado a cabo utilizando el software QIIME™ 2 versión 2022.2. Se utilizó el plugin DADA2 para el paso de *denoising* y filtrado de secuencias. En base a la calidad de las secuencias, se seleccionó un corte de 225 bp para el primer F y de 224 bp para el primer R. La asignación taxonómica de las Amplicon Sequence Variants (ASVs) se realizó utilizando la base de datos pre-entrenada Silva v.138. Posteriormente se filtraron aquellas reads de baja frecuencia, asignadas a cloroplastos o mitocondrias, o que solo fueron asignadas a nivel de phylum. Después de los pasos de *denoising*, limpieza y filtrado se obtuvieron un total de 937697 de secuencias y 2394 ASVs finales. La construcción del árbol filogenético se realizó utilizando SEPP fragment insertion utilizando como referencia Silva 128 reference tree.

Los análisis de alfa y beta diversidad se obtuvo después de realizar la rarefacción (submuestreo aleatorio sin reemplazo) de las muestras, a una profundidad de 72046 reads por muestra. Las medidas de diversidad alfa (riqueza, índice de Shannon, Simpson y Faith) se obtuvieron utilizando *q2 diversity*. Los estudios de beta diversidad y el análisis estadístico se realizaron utilizando el paquete *phyloseq* v.1.42.0. Para la construcción del objeto *phyloseq* a partir de los archivos de salida de QIIME2 se utilizó el paquete *qiime2R* v.1.99.6. Se utilizó el índice de disimilitud de Bray Curtis, para los estudios de beta diversidad. A partir de la matriz de disimilitud se realizó un análisis de coordenadas principales (PCoA). Las diferencias entre los grupos se estudiaron mediante la función *adonis2* del paquete *vegan* (v.2.6-4) y el paquete *pairwiseAdonis* v. 0.4. Los diagramas de Venn fueron construidos utilizando aquellos ASVs cuya abundancia relativa fue mayor al 0.5%. Para filtrar los ASVs se utilizó el paquete *microbiome* v.1.20.0 y para la construcción de los diagramas de Venn se utilizó el paquete *VennDiagram* v.1.7.3.

III.2.6.9 Predicción funcional mediante PICRUST2

A partir del análisis de diversidad taxonómica se realizó la predicción de la abundancia de genes ortólogos de KEGG (KO) y de las rutas metabólicas (MetaCyc) utilizando el software PICRUST2 (Douglas et al., 2020). El análisis fue realizado siguiendo el protocolo sugerido por los desarrolladores. Brevemente, el protocolo consiste en 4 pasos claves: ubicación de las secuencias, predicción de los genomas mediante la aplicación de

algoritmos *hidden-state*, predicción de los metagenomas, predicción de las vías metabólicas. El índice NSTI (Nearest Sequenced Taxon Index) fue utilizado como estimador de la precisión de la predicción.

III.2.6.10 Análisis de abundancia diferencial utilizando ANCOM-BC

Para el análisis de abundancias diferenciales tanto de los taxa como de las vías metabólicas se utilizó la metodología ANCOM-BC. Esta metodología permite la implementación de test estadísticos en relación a las abundancias absolutas diferenciales de los taxa individuales y provee de intervalos de confianza válidos; permite corregir el sesgo introducido por las fracciones muestrales dentro de las muestras. Además, permite controlar el FDR manteniendo un poder estadístico adecuado (Lin and Peddada 2020). Se utilizó el paquete *ANCOMBC* v2.0.0 para la interfaz R. El análisis de los taxones diferencialmente abundantes se realizó a nivel de género. Se evaluó efecto del tratamiento y del tiempo. Se utilizó una prevalencia de 0,1 como línea de corte y una significancia de 0.05. Como método de ajuste de los p-valores y de mdFDR se utilizó el método de holm.

III.2.7 Preparación de microcosmos de suelo con contaminación aguda y crónica inoculados con células marcadas con C¹³

Los ensayos de SIP-DNA fueron realizados en el marco de dos estancias (Octubre 2019-Febrero 2020 y Marzo 2022-Mayo 2022) realizadas en el Laboratorio de Ecología de las interacciones microbianas del departamento de Microbiología ambiental en el Centro Helmholtz para la Investigación ambiental (Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung – UFZ, Leipzig, Alemania). Este proyecto formó parte del plan de una beca de estadía corta otorgada por la DAAD, y bajo la dirección del Prof. Dr. Antonis Chatzinotas. Durante estas estancias se realizó la preparación de los microcosmos, así como la ultracentrifugación, fraccionamiento, precipitación y secuenciación masiva de amplicones 16S rARN y 18S rARN, con la ayuda de la técnica Nicole Steinbach. El análisis posterior de los datos de secuenciación fue realizado en colaboración con la Dra. Stephanie Jurburg.

III.2.7.1 Preparación de los inoculantes

Las cepas *Sphingobium* sp. AM y *Burkholderia* sp Bk fueron incubados en R2 líquido overnight, a 28° C y 150 rpm. A partir de estos cultivos, se tomaron 100 µl de cada cultivo, que fueron centrifugadas a 6000 rpm durante 10 min. Cada pellet fue lavado 2 veces con solución fisiológica 0,85%, y fueron resuspendidos en 100 µl de solución fisiológica. Esta suspensión celular fue inoculada en 100 ml de MML suplementada con 2 g. l⁻¹ de glucosa, tanto marcada con C-13 como con C-12 (como control). Estos cultivos fueron incubados a 28°C y 150 r.p.m durante 48 horas. Se midió la D.O. a 580 nm para calcular la concentración del inóculo. Los microcosmos fueron inoculados con cocultivo AM-Bk, conformado por las cepas *Sphingobium* sp. AM y *Burkholderia* sp Bk, en una proporción 65:35, donde la cepa *Sphingobium* AM es mayoritaria.

III.2.7.2 Preparación de los microcosmos

Se prepararon microcosmos de 50 g con el suelo tamizado (1 mm tamaño de poro) de Pereyra y el suelo IPK, en Erlenmeyer de 100 ml de capacidad (Figura III.3). La humedad del suelo fue llevada a 20% con el agregado de agua destilada estéril. El suelo Pereyra fue contaminado con una mezcla de PAH. Esta mezcla estaba constituida por 600 mg de fenantreno (Sigma Aldrich, 98% de pureza), 150 mg de fluoreno (Carlo Erba), 150 mg de pireno (sigma Aldrich) y 100 mg de antraceno (Merk) por kilo de suelo seco. La mezcla de PAH fue administrada a través de una solución de acetona, mediante goteo, con mezcla para una distribución homogénea de la misma. El agregado de los hidrocarburos se realizó 1 día antes de la inoculación. Los microcosmos fueron inoculados con:

- SP AM-Bk C-12: suelo contaminado con mezcla de PAH inoculado con 5×10^7 ufc del cocultivo AM-Bk por g de suelo seco.
- SP AM-Bk C-13: suelo contaminado con mezcla de PAH inoculado con 5×10^7 ufc del cocultivo AM-Bk por g de suelo seco.
- IPK AM-Bk C-12: suelo crónicamente contaminado inoculado con 5×10^7 ufc del cocultivo AM-Bk por g de suelo seco.
- IPK AM-Bk C-13: suelo crónicamente contaminado inoculado con 5×10^7 ufc del cocultivo AM-Bk por g de suelo seco.

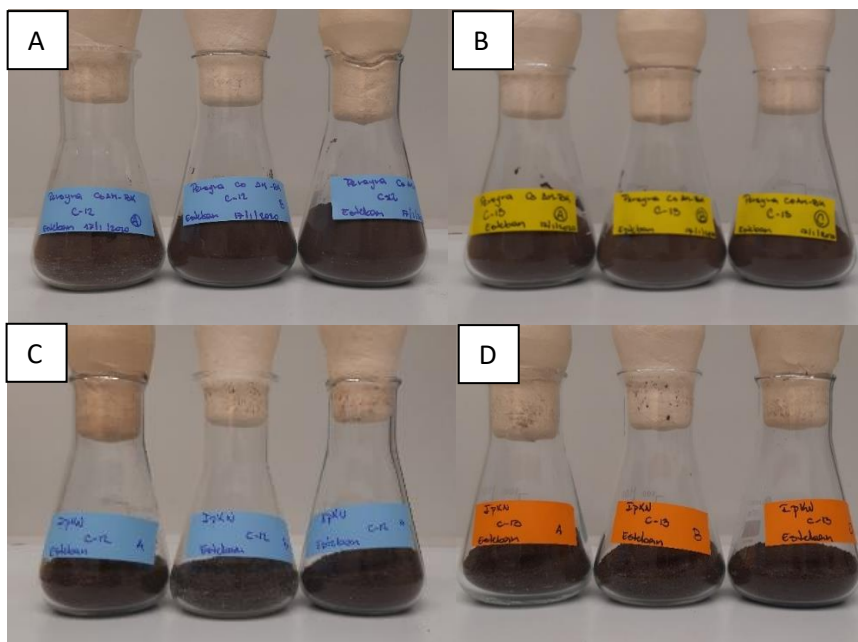


Figura III.3: Fotografía de los microcosmos utilizados para el ensayo de SIP-DNA, donde se muestran los triplicados para cada uno de los tratamientos: (A) microcosmos SP inoculados con ^{12}C CS AM-Bk, (B) microcosmos SP inoculados con ^{13}C CS AM-Bk, (C) microcosmos IPK inoculados con ^{12}C CS AM-Bk y (D) microcosmos IPK inoculados con ^{13}C CS AM-Bk.

III.2.7.3 Extracción de ADN total de suelo

El ADN total de las muestras de suelo fue extraído y purificado a partir de 0,5 g de suelo utilizando el Kit comercial NucleoSpin® Soil (Macherey-Nagel, GmbH & Co. KG, Alemania). Para el caso de las muestras de suelo crónicamente contaminado, se dividió la cantidad de suelo en partes iguales y se realizaron los pasos de lisis de esta manera. Posteriormente se unificaron estas fracciones y se continuó con el procesamiento de la muestra. La concentración de ADN fue cuantificada mediante el uso del Qubit™ fluorometer (Invitrogen™, Thermofisher) utilizando el Qubit dsDNA BR Assay Kit 2–1,000 ng.

III.2.7.4 Ultracentrifugación y fraccionamiento

Para la separación de las fracciones pesadas y livianas se realizó mediante ultracentrifugación isopícnica en gradiente de cloruro de cesio (CsCl) siguiendo el protocolo de Neufeld et al. (2007). Se realizó una curva de calibración con un gradiente de densidad mezclando la solución de CsCl con el buffer gradiente (BG) en distintas proporciones CsCl/BG para determinar la relación entre la densidad y el índice de refracción. A cada uno de estos puntos se le midió el índice de refracción en un refractómetro digital (AR200 Reichert, Seefeld, Alemania) (Figura III.4A). 2 µg de ADN fueron mezclados con BG hasta alcanzar un volumen de 1,2 ml. A esta mezcla se le agregó 4,8 ml de la solución de CsCl. A partir de la curva de calibración se corrigió la densidad de las mezclas a 1,72 g.ml⁻¹, utilizando en el índice de refracción (1,4043 a 22°C). Las muestras con la densidad ajustada fueron transferidas a tubos de polipropileno 5.2 ml Quick-Seal® (Beckam Coulter), equilibrando los pesos, y los tubos fueron cerrados por calor. Las muestras se centrifugaron a 44100 rpm con vacío a 20°C durante 36 horas en una ultracentrífuga Optima XPN-80 (Beckam Coulter) (Figura III.B y III.C). Los tubos fueron perforados en la parte superior conectada a una bomba peristáltica con un reservorio de agua estéril. Se realizó una perforación en la porción inferior del tubo y se activó la bomba con una velocidad de bombeo de 1 ml.min⁻¹ (Figura III.4D). El contenido del gradiente fue fraccionado en tubos eppendorf, con un goteo de 25 segundos por tubo, permitiendo la recolección de 12 fracciones (Figura III.4E). Se colectaron un total de 492 fracciones. A cada una de estas fracciones se le midió el índice de refracción y se calculó la densidad de cada una de estas fracciones a partir de la curva de calibración previamente mencionada.

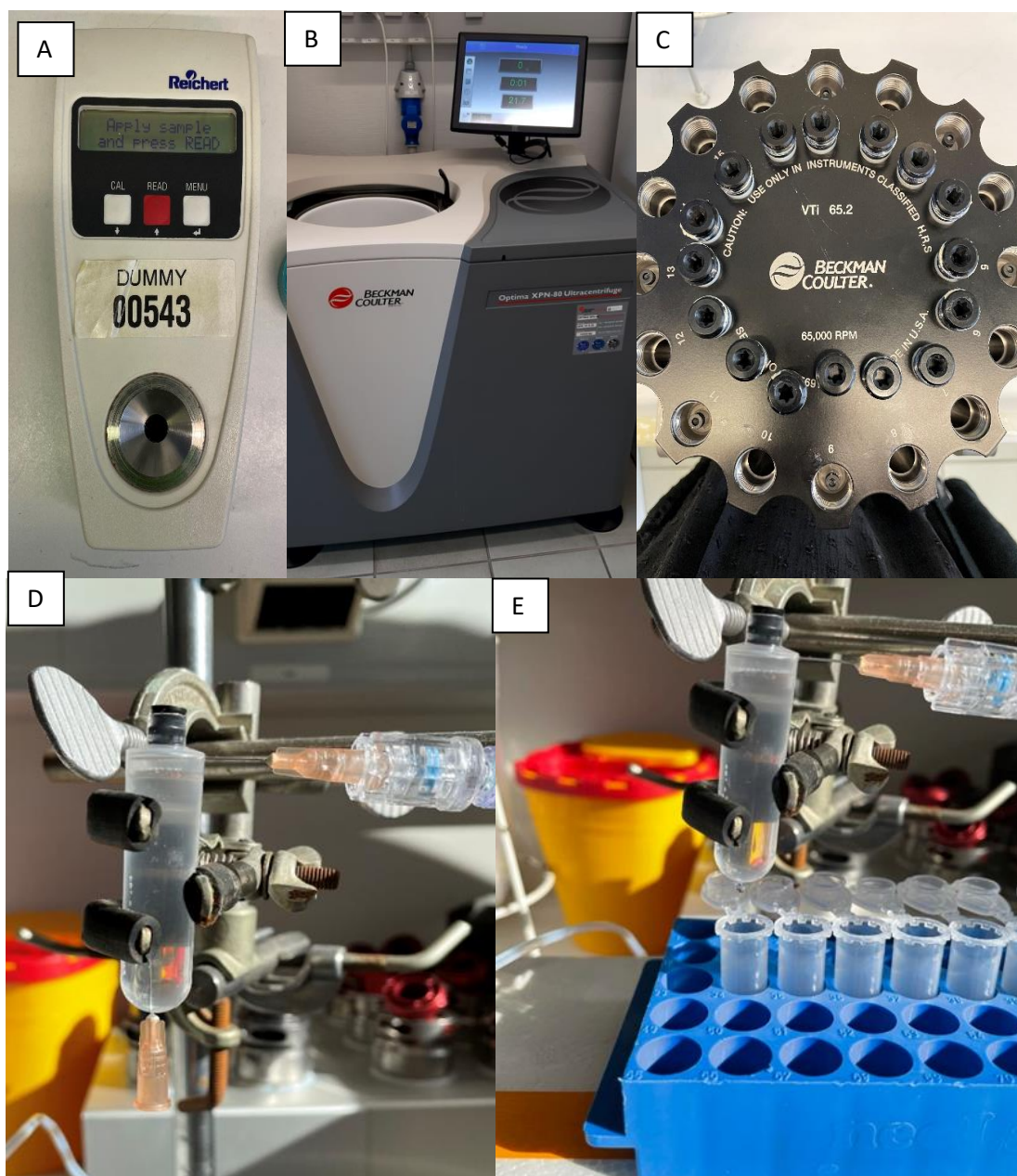


Figura III.4: Fotografía del refractómetro (A), la ultracentrífuga (B) , el rotor (C) y detalle del dispositivo utilizado para la recolección de las fracciones (D y E)

III.2.7.5 Precipitación con PEG

Se precipito el ADN de cada una de las fracciones utilizando el método glucógeno/polietilenglicol. A cada fracción se le agrego 1 μ l de glucógeno (20 μ g) y dos volúmenes de la solución de PEG. Se incubaron las muestras overnight a 4°C y posteriormente se centrifugaron a velocidad máxima durante 30 min. Se descarto el sobrenadante y se lavaron las muestras con EtOH al 70%. El sobrenadante se descartó nuevamente y las

muestras se secaron al vacío durante 15 minutos. Las muestras se resuspendieron en 30 μ l de buffer TE. muestra. La concentración de ADN fue cuantificada mediante el uso del Qubit™ fluorometer (Invitrogen™, Thermofisher) utilizando el Qubit dsDNA HS Assay Kit 0,1–120 ng. A partir esta cuantificación, se realizaron los perfiles de concentración de ADN de acuerdo con las densidades de cada fracción por cada muestra. A partir de los perfiles de densidad-concentración de ADN, las fracciones de ADN se agruparon en dos pools, correspondientes a las fracciones pesadas (aquellas fracciones que se encontraban entre 1.72-1.735 $\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) y a las fracciones livianas (fracciones cuyas densidades se encontraban entre 1.70-1.715 $\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Debido al perfil anómalo que presentaron la muestras del suelo IPK a los 30 días de incubación se excluyeron de los análisis posteriores. También se descartaron aquellas pools que no amplificaron para los genes 16S rARN y 18S rARN, de esta manera se obtuvieron un total de 82 muestras para el gen 16S rARN y 81 muestras para el gen 18S rARN.

III.2.7.6 Análisis de secuenciación masiva del gen 16S rARN y 18S rARN

La composición de la comunidad bacteriana y eucariota en los suelos SP e IPK, para los pools de las fracciones livianas y pesadas de cada muestra para los microcosmos inoculados con ^{13}C CS AM-Bk y ^{12}C CS AM-Bk, se evaluó mediante la secuenciación de la región hipervariable V3-V4 del gen 16S rRNA, para el total de las 82 muestras previamente mencionadas, y la región hipervariable V8-V9 del gen 18S rRNA, para un total de 81 muestras. Estas regiones se amplificaron con 25 ciclos de PCR, utilizando los sets de primers 16S_Illu_V3_F (TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG) y 16S_Illu_V4_R (GTCTCGTGGGCTCGAGATGTGTAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC) para el gen del ARNr 16S y 18S_ILLU_1422F (TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTAAGAGAGACAGATAACAGGTCTGTGATGCCCT) y (GTCTCGTGGGCTCGAGAGATGTGTAAGAGACCTTCYGCAGGTTACCTAC) para el gen 18S rRNA. Los productos de la PCR se comprobaron mediante electroforesis en gel y la secuenciación se realizó con un secuenciador MiSeq (Illumina Inc., San Diego, CA) utilizando un kit de 600 pb.

El procesamiento de los datos de secuenciación se realizó en R (R Core Team, 2014). A partir de las lecturas (*reads*) de secuenciación de los genes 16S rRNA y 18S rRNA se realizó el filtrado, *trimming*, la eliminación de quimeras y el *merging* utilizando el paquete (v1.16.0), utilizando los siguientes parámetros: TruncLen = 260, 220; maxEE= 4; trimLeft= 10 para las lecturas del gen 16S rRNA; y TruncLen = 220, 190; maxEE= 5; trimLeft= 10 para las lecturas del gen 18S rRNA. Las lecturas se asignaron con el clasificador SILVA v.138 para procariontes y v.132 para eucariotes. Los análisis posteriores se realizaron con los paquetes phyloseq (v. 1.42.0) y vegan (v. 2.6-4). Las muestras secuenciadas de 16S rRNA tenían un rango de 67-69417 lecturas por muestra y las muestras de 18S rRNA tenían un rango de 74584-169040 lecturas, y se normalizaron a 22159 y 74584 lecturas por muestra, para 16S y 18S rRNA respectivamente (función *rarefy_even_depth*, con *seed* =1).

III.2.7.8 Análisis de las comunidad enriquecida

III.2.7.8a Factor de Enriquecimiento (EF)

Para determinar aquellos géneros que mostraron enriquecimiento en la fracción pesada, se realizó una modificación al factor de enriquecimiento (EF) propuesto por Kramer *et al.* (2016)

$$EF_{Kramer} = \frac{pesada^{C13}}{liviana^{C13}} - \frac{pesada^{C12}}{liviana^{C12}}$$

La modificación propuesta en esta tesis define el cálculo del EF como la diferencia entre las abundancias relativas de los distintos géneros en la fracción pesada de los microcosmos^{C13} marcados en relación con la abundancia relativa de dicho género en ambas fracciones en los microcosmos^{C13} y las abundancias relativas de los distintos géneros en la fracción pesada de los microcosmos^{C12} no marcados en relación con la abundancia relativa de dicho género en ambas fracciones en los microcosmos^{C12}.

$$EF = \frac{pesada^{13C}}{pesada^{13C} + liviana^{13C}} - \frac{pesada^{12C}}{pesada^{12C} + liviana^{12C}}$$

Donde ***pesada^{13C}*** y ***liviana^{13C}*** representan las abundancias relativas de los géneros en la fracción pesada y liviana de tratamiento inoculado con las cepas AM y Bk marcadas con C¹³, mientras que ***pesada^{12c}*** y ***liviana^{12c}*** representan las abundancias relativas de los géneros en el control inoculado con las cepas AM y Bk C¹². Se analizaron los géneros cuya abundancia relativa fue mayor al 0.5% y cuya prevalencia fue mayor al 5% en los microcosmos analizados en al menos un tiempo de incubación.

A fin de preservar la variabilidad de los resultados obtenida a partir de los microcosmos la diferencia entre tratamiento C¹³ y C¹² se realizó mediante la combinatoria (*bootstrapping*) de las proporciones para cada triplicado. Se consideraron como enriquecidos aquellos géneros que mostraron valores positivos de EF.

Valores de EF>0 implican cierto grado de enriquecimiento, por lo cual establecimos un umbral de EF> 0,015 (es decir, un aumento del 1,5% en la abundancia relativa de ese género en relación con los C¹²microcosmos) para definir el enriquecimiento de los géneros.

III.2.7.8b Comparación entre las comunidades enriquecidas entre los suelos SP e IPK

Se compararon las comunidades enriquecidas de los géneros bacterianos y eucariotas de la fracción pesada de los microcosmos inoculados con C¹³CS AM-Bk para los suelos SP e IPK. Se calculó el índice de Bray-Curtis para la combinatoria de cada triplicado de los microcosmos de suelo SP a un tiempo con cada triplicados de los microcosmos de suelo IPK para el mismo tiempo. Se construyó una matriz de disimilitud utilizando la función *vegdist* del paquete *vegan* (v.2.6-4) y la función *dist2list* del paquete *spaa* (v 0.2.2).

III.2.7.8c Supervivencia del inoculante

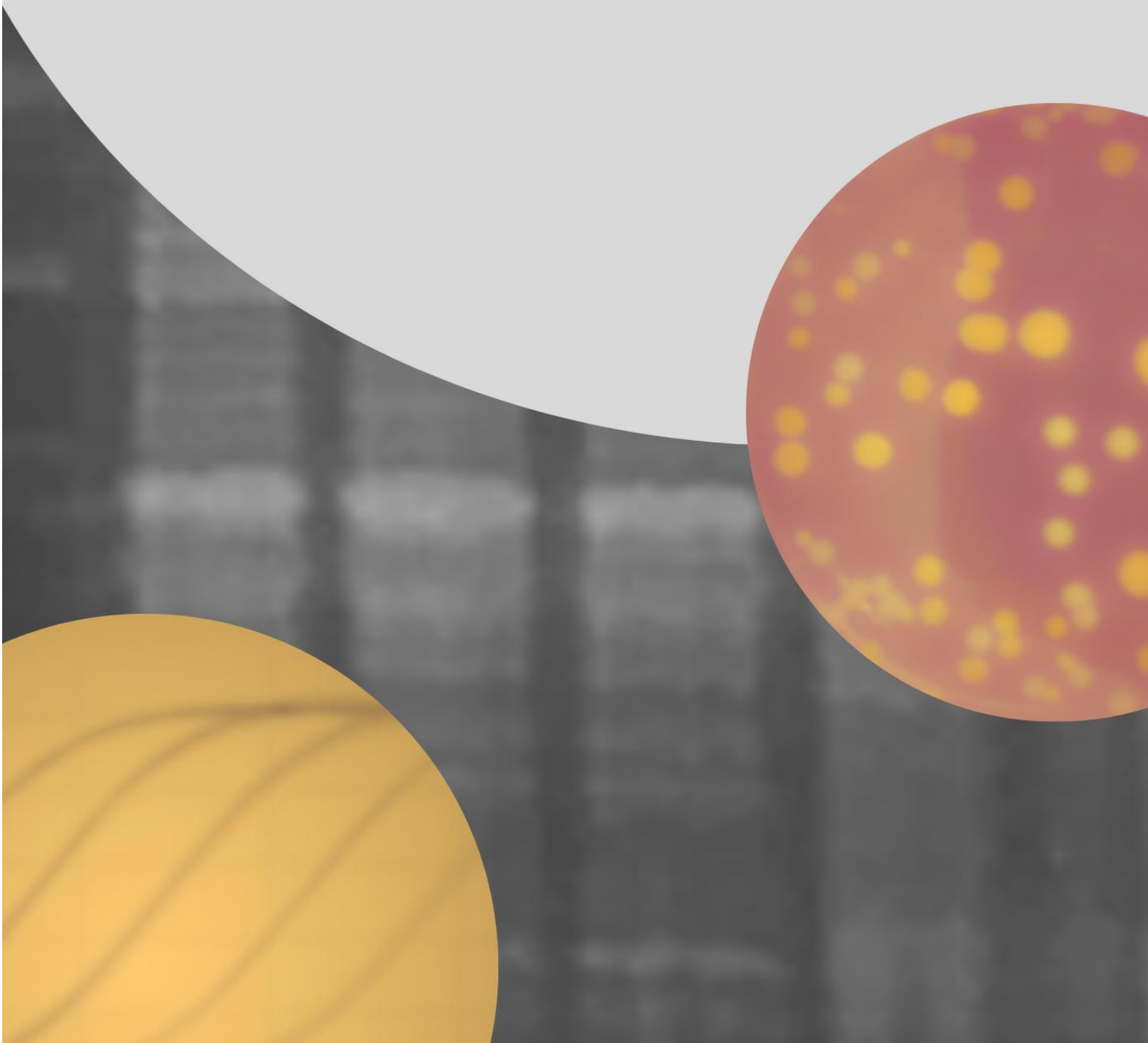
Como estimador de la supervivencia de los géneros inoculados se utilizaron el número de *reads* correspondientes a los géneros inoculados *Sphingobium* y *Burkholderia* en la fracción pesada de los microcosmos inoculados con ¹³C AM-Bk para los suelos SP e IPK. El cálculo de la supervivencia se determinó como la proporción de *reads* de las muestras rarefaccionadas, correspondientes a los géneros *Sphingobium* y *Burkholderia*, a un tiempo dado con respecto al número de *reads* de estos géneros al tiempo de muestreo anterior.

III.2.8 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos obtenidos para la concentración de PAH, el número de copias de genes específicos y los índices de diversidad se realizó mediante un análisis de la varianza (ANOVA) de dos vías, cuando los sistemas fueron sacrificados y las medidas independientes, o mixto, cuando los sistemas fueron remuestreados (ensayos con microcosmos). En cada caso, se comprobó los supuestos de normalidad y la homocedasticidad mediante la aplicación de las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene, respectivamente. Las pruebas post-hoc se realizaron mediante las comparaciones de a pares utilizando la prueba t de Student utilizando el método de ajuste de Benjamini-Hochman (BH). Todas estos cálculos se realizaron utilizando el paquete *rstatix* (v. 0.7.2). En aquellos casos que no se cumplieron los supuestos de normalidad u homocedasticidad, se realizaron ANOVA robusto utilizando el paquete WRS2 (v. 1.1-4)

Capítulo IV

Diseño de un consorcio microbiano degradador de PAH y estudio de las interacciones entre sus miembros



IV. Diseño de un consorcio microbiano degradador de PAH y estudio de las interacciones entre sus miembros

Este capítulo muestra los resultados del estudio de la degradación de fenantreno por parte de un cocultivo diseñado a partir de las cepas *Sphingobium* sp. AM y *Burkholderia* sp Bk, y las interacciones microbianas que ocurren entre ellas durante la degradación del contaminante estudiadas mediante RT-qPCR de genes específicos y metaproteómica. Estas cepas, que fueron aisladas a partir de un cultivo de enriquecimiento degradador de fenantreno (CON), fueron seleccionadas debido a su capacidad de utilizar el fenantreno como única fuente de carbono y energía

El cultivo de enriquecimiento CON fue obtenido a partir de un suelo crónicamente contaminado con PAH, mediante repiques sucesivos en MML suplementado con fenantreno como presión de selección (Festa et al., 2013). Este cultivo de enriquecimiento fue capaz de degradar el 59% del fenantreno luego de 7 días de incubación, acumulando ácido 1-hidroxi-2-naftoico (AHN), un intermediario metabólico tóxico que se produce durante la degradación de fenantreno.

El estudio de la diversidad taxonómica de CON mostró la presencia de 7 órdenes principales, pertenecientes al filo Proteobacteria. En base a sus abundancias relativas, Sphingomonadales representó el orden mayoritario alcanzando un 87,2%, seguido por el orden Enterobacteriales (7,6%), Burkholderiales (2,5%), Rhodospirillales (1,2%), Xanthomonadales (0,7%), Pseudomonadales (0,6%) y Rhizobiales (0,3%) (Festa et al., 2016).

A partir de CON se aislaron un total de 6 cepas que se identificaron por secuenciación del gen 16S rARN como *Sphingobium* sp., (AM) (α -Proteobacteria), *Pseudomonas* sp. (Bc-h y T), *Klebsiella aerogenes* (B) (δ - Proteobacteria) (Festa et al., 2013), *Inquilinus limosus* (Inq) α -Proteobacteria y *Burkholderia* sp. (Bk) β -Proteobacteria (Macchi et al., 2021).

Los genomas de estas cepas fueron secuenciados (Illumina HiSeq) y el análisis genómico reveló que las 6 cepas poseen genes que codifican enzimas que pueden participar en la ruta de degradación de compuestos aromáticos, siendo la cepa Bk la que cuenta con un mayor número de genes relacionados a la degradación de xenobióticos. A partir de los genomas de las cepas, se construyó una red metabólica a fin de inferir el aporte de cada cepa durante la degradación de fenantreno (Macchi et al., 2021). De acuerdo con esta red, solo la cepa *Sphingobium* sp AM y *Burkholderia* sp. Bk (Figura IV.1) son capaces de actuar en los primeros pasos de la ruta de degradación de fenantreno, mientras que las otras cepas poseen genes que codifican para enzimas que podrían actuar en la parte baja de la vía.

Estos resultados fueron corroborados mediante estudios fisiológicos, donde las cepas AM y Bk fueron capaces de utilizar el fenantreno como única fuente de carbono y energía.

La evaluación cualitativa de la degradación de otros PAH indicó que tanto AM como Bk pueden degradar antraceno, fluoreno y dibenzotiofeno (Macchi et al., 2021).

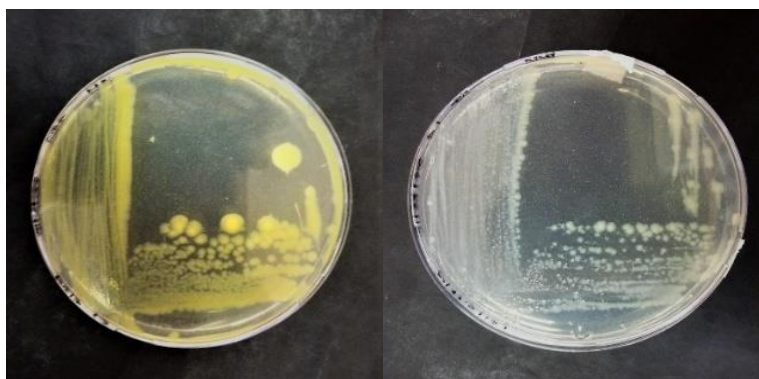


Figura IV.1: fotografía de una placa de R2A de la cepa *Sphingobium* sp. AM y *Burkholderia* sp. Bk

IV.1 Diseño del cocultivo AM-Bk a partir de las cepas *Sphingobium* sp AM y *Burkholderia* sp. BK

Con el objetivo de estudiar las interacciones interespecíficas se diseñó un cocultivo conformado por las cepas claves aisladas a partir del cultivo de enriquecimiento CON degradador de fenantreno, *Sphingobium* sp AM y *Burkholderia* sp. Bk. La selección de las cepas AM y Bk se basó en que ambas son las únicas cepas capaces de utilizar el fenantreno como única fuente de carbono y energía. Debido a que las interacciones interespecíficas están influenciadas por la densidad poblacional se escogió una proporción 65:35, siendo la cepa AM la cepa mayoritaria. Esta relación fue definida con el objetivo de mantener las proporciones naturales encontradas en CON, donde el orden Sphingomonadales fue mayoritario.

IV.1.2 Evaluación exploratoria de interacciones en placas de Petri

Con el objetivo de realizar una evaluación exploratoria de las interacciones entre las cepas AM y Bk, se realizó un enfrentamiento de ellas en placa, que consistió en la siembra de cultivos de cada cepa en R2A en la disposición que muestra la Figura IV.2, donde los extremos distales de los puntos de siembra de cada cepa representan los controles de crecimiento. No se observó un efecto inhibitorio del crecimiento de una cepa sobre la otra, tampoco se observaron cambios en la morfología de las mismas.

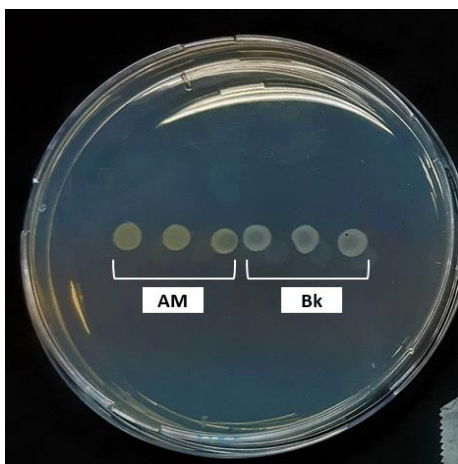


Figura IV.2: Ensayo de enfrentamiento en placa de R2A entre las cepas *Sphingobium* sp AM y *Burkholderia* sp Bk.

IV.1.3 Cinética de degradación de fenantreno y acumulación de ácido 1-hidroxi 2-naftoico (AHN) del cocultivo AM-Bk

Se estudió la cinética de degradación de fenantreno y la acumulación de AHN en el cocultivo AM-Bk en comparación con la degradación de los monocultivos de las cepas *Sphingobium* sp AM y *Burkholderia* sp. Bk, durante 15 días de incubación en MML suplementado con 200 mg. l⁻¹ de fenantreno como única fuente de carbono y energía (UFCE).

La figura IV.3 muestra que los tres sistemas lograron degradar el fenantreno suplementado al final del período de incubación. La cepa AM logró degradar un 44% de fenantreno durante el primer día. A los 7 días se alcanzó un 88% de degradación, y a los 15 días se alcanzó un 97% de degradación de fenantreno. Durante este proceso, se detectó un pico de acumulación de HNA a los 4 días de incubación (73.21 ± 5.86 mg.l⁻¹), el cual fue metabolizado hasta alcanzar valores de 4.10 ± 0.10 mg.l⁻¹ al final del período de incubación.

La cepa Bk no mostró degradación de fenantreno durante primer día de incubación, pero alcanzó un 97% de degradación a los 7 días y más del 99% después de los 15 días de incubación. En relación a la producción de HNA, la cepa Bk mostró una menor acumulación de este metabolito, observándose una producción de 15.23 ± 4.51 mg.l⁻¹ a los 4 días de incubación. Al final del período de incubación la concentración de este metabolito se mantuvo en concentraciones de 13.55 ± 2.02 mg.l⁻¹.

El cocultivo AM-Bk degradó alrededor del 55% del fenantreno durante el primer día de incubación, alcanzando más del 99% de degradación a los 7 días, mientras que al final del período de incubación la concentración del fenantreno mostró valores por debajo del límite de detección. A los 4 días de incubación, el AHN alcanzó una concentración de 64.62 ± 17.72 mg.l⁻¹, siendo el pico de producción máximo, mientras que después de 7 días este metabolito no fue detectable.

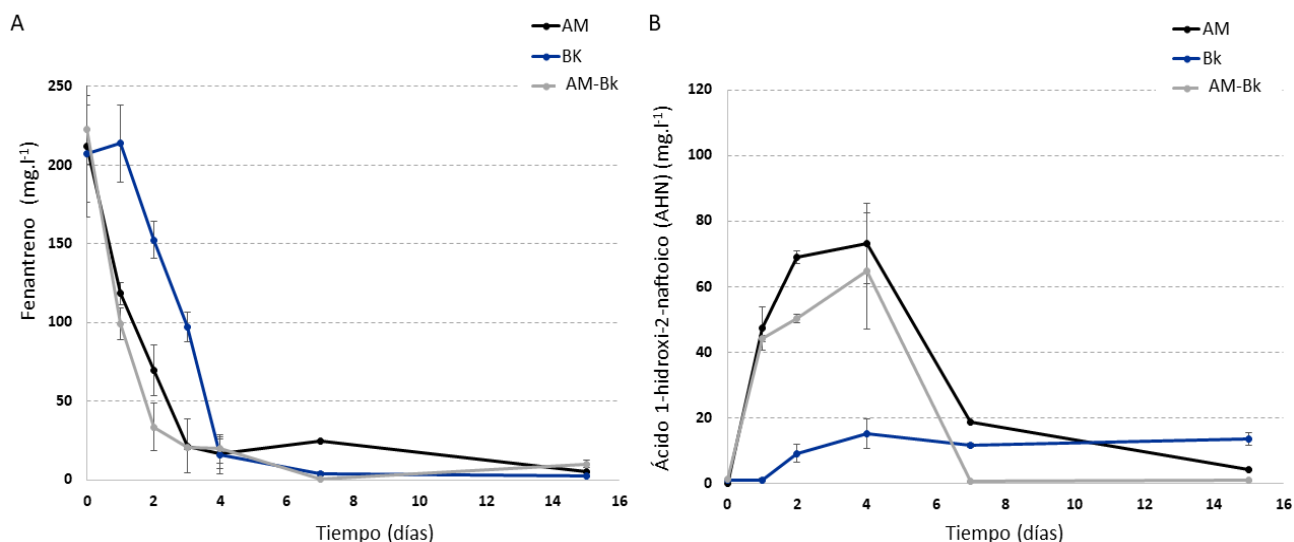


Figura IV.3: Concentración de fenantreno (A) y de AHN (B) en los cultivos de *Sphingobium* sp. AM, *Burkholderia* sp. Bk y el cocultivo AM-Bk en MML suplementado con 200 mg.l⁻¹ de fenantreno durante 15 días de incubación. Se muestran los valores promedio de los triplicados con sus respectivos desvíos estándar.

En comparación con los monocultivos, el cocultivo AM-Bk mostró una degradación de fenantreno significativamente superior ($p < 0.05$) a los 7 días de incubación, siendo el sistema más eficiente, alcanzando un 99% de degradación, seguido por la cepa Bk (97%), y por AM (88% de degradación).

Con respecto a la acumulación de AHN, los tres cultivos mostraron la máxima acumulación a los 4 días de incubación; no se observaron diferencias significativas entre el cocultivo AM-Bk y el monocultivo de la cepa AM, mientras que el monocultivo de la cepa Bk mostró concentraciones de AHN significativamente menores ($p < 0.05$) a los 4 días de incubación. A los 7 días de incubación el cultivo de la cepa AM mostró las concentraciones más altas de AHN (18.66 mg.l⁻¹), seguido por el cultivo de la cepa Bk (11.65 mg.l⁻¹), mientras que este intermediario metabólico no fue detectado en el cocultivo AM-Bk. Al final del período de incubación la concentración de AHN se mantuvo constante en el cultivo de la cepa Bk, mientras que en los cultivos de la cepa AM este valor descendió hasta una concentración final de 4.10 mg.l⁻¹ \pm 0.10 (Figura IV.1B).

IV.1.4 Dinámica poblacional del cocultivo AM-Bk durante la degradación de fenantreno

Se realizaron recuentos en placa con el objetivo de evaluar cambios en el número de individuos de las poblaciones de las cepas AM y Bk en el cocultivo durante la degradación de fenantreno (Figura IV.4). Se inocularon ambas cepas en relación 65:35 AM-Bk en MML suplementado con 200 mg.l⁻¹ como UFCE durante 15 días de incubación. Debido a que ambas cepas tienen morfologías fácilmente identificables (Figura IV.1), se

realizó un recuento diferencial de las colonias en placas de R2A. La cepa AM no mostró cambios significativos en su densidad poblacional en el cocultivo, fue la cepa mayoritaria durante los primeros 4 días. No obstante, se observó un crecimiento de la cepa Bk en los primeros días de incubación, quien partió desde valores iniciales de $1,5 \cdot 10^5$ UFC/ml hasta alcanzar densidades similares a la de la cepa AM del orden de 10^7 UFC/ml a los 6 días de incubación. Al final del período de incubación fue posible observar la coexistencia de ambos morfotipos de colonia con una densidad de $1,3 \cdot 10^8$ UFC/ml.

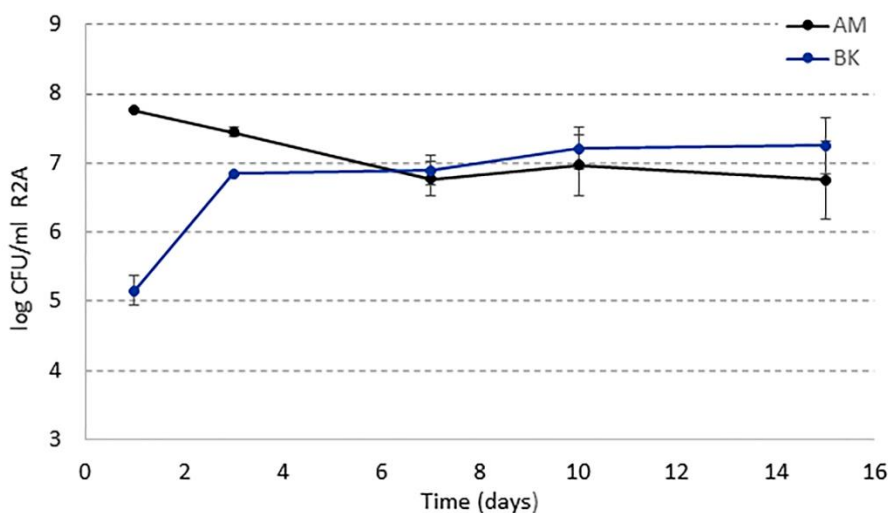


Figura IV.4: Recuento diferencial de las cepas *Sphingobium* sp AM y *Burkholderia* sp Bk en el cocultivo durante la degradación de fenantreno como única fuente de carbono y energía. Se muestran los valores promedios de los triplicados biológicos con sus respectivos desvíos estándar.

IV.2 Análisis comparativo de la degradación de distintos PAH en mezcla con fenantreno

Debido a que los suelos contaminados con PAH típicamente contienen una mezcla de distintos compuestos, y a que su degradación está influenciada por la presencia de los otros compuestos (Sawulski et al., 2015), se estudió la degradación de mezclas de distintos PAH en cultivos puros de las cepas *Sphingobium* sp. AM, *Burkholderia* sp Bk y del cocultivo AM-Bk durante 15 días de incubación. Se seleccionaron el antraceno, el dibenzotiofeno y el fluoreno como modelos de PAH de bajo peso molecular, y el pireno como PAH de alto peso molecular. Se comparó la eficiencia de degradación de cada cultivo para los 4 PAH cuando fueron suplementados como UFCE en relación con la eficiencia de degradación de los mismos en mezcla con fenantreno. Además, se estudió el efecto de la mezcla de PAH sobre la dinámica poblacional del cocultivo, para lo cual se realizaron recuentos diferenciales en placa de R2A a partir de cada cultivo a los días 0, 1, 4, 7 y 15 de incubación.

En este capítulo se describen los resultados obtenidos para los sistemas suplementados con dibenzotiofeno y fluoreno, ya que para estos sistemas se analizaron tres tiempos de muestreo y las tendencias de degradación fueron similares a las de las otras combinaciones. Los resultados con antraceno y pireno se muestran en Anexo I (Figuras AI.2, AI.3, AI.4 y AI.5).

IV.2.1 Degradación de dibenzotiofeno como UFCE y en mezcla con fenantreno

La figura IV.5 muestra el porcentaje remanente de dibenzotiofeno (DBT) a los 4 y 15 días de incubación para los monocultivos de las cepas AM y Bk, y el cocultivo AM-Bk, cuando se suplementa como UFCE y en la mezcla con fenantreno. Además, se muestra el efecto de la presencia de dibenzotiofeno en la degradación de fenantreno.

La cepa AM degradó un $69 \pm 25.5\%$ del dibenzotiofeno (UFCE) a los 4 días de incubación, sin mostrar diferencias significativas con ese valor a los 15 días. En la mezcla con fenantreno, AM mostró un $80 \pm 17.33\%$ de degradación del dibenzotiofeno a los 4 días y un $99 \pm 1.87\%$ de degradación luego de 15 días de incubación (Figura IV.5A), valor significativamente superior ($p < 0.05$) a cuando este PAH se suplementa como UFCE. En mezcla, se observó también un aumento significativo de la degradación de fenantreno ($p < 0.05$), que alcanzó un 99% de degradación (Figura IV.5B).

La cepa Bk no mostró degradación del dibenzotiofeno (UFCE) a los 4 días de incubación; no obstante, alcanzó un $81 \pm 3.47\%$ de degradación a los 15 días. En mezcla, la cepa Bk alcanzó un $79 \pm 9.88\%$ de degradación del dibenzotiofeno a los 4 días y un $99 \pm 0.48\%$ a los 15 días de incubación (Figura IV.5C), siendo estos valores significativamente superiores ($p < 0.05$) a los alcanzados en los cultivos con dibenzotiofeno como UFCE. La degradación del fenantreno no mostró diferencias significativas entre los sistemas comparados (Figura IV.5D). Con respecto al cocultivo AM-Bk, este alcanzó un $66 \pm 5.61\%$ de degradación del dibenzotiofeno como UFCE a los 4 días, alcanzando un $93 \pm 0.79\%$ de degradación a los 15 días de incubación. En mezcla con fenantreno, el cocultivo fue capaz de degradar un $87 \pm 6.25\%$ de dibenzotiofeno a los 4 días, significativamente superior ($p < 0.05$) al observado en el cultivo con dibenzotiofeno como UFCE, alcanzando un $97 \pm 2.94\%$ de degradación a los 15 días de incubación (Figura IV.5E). En la degradación del fenantreno no se observaron diferencias significativas entre los sistemas comparados (Figura IV.5F).

Al comparar la eficiencia de degradación entre sistemas, en mezcla con fenantreno no se observaron diferencias significativas en relación con la degradación de dibenzotiofeno. Sin embargo, cuando el dibenzotiofeno se suplementó como UFCE, el cocultivo AM-Bk mostró una eficiencia de degradación significativamente superior ($p < 0.05$) a la del monocultivo de Bk a los 4 días de incubación, y a la del monocultivo de AM al final del período de incubación.

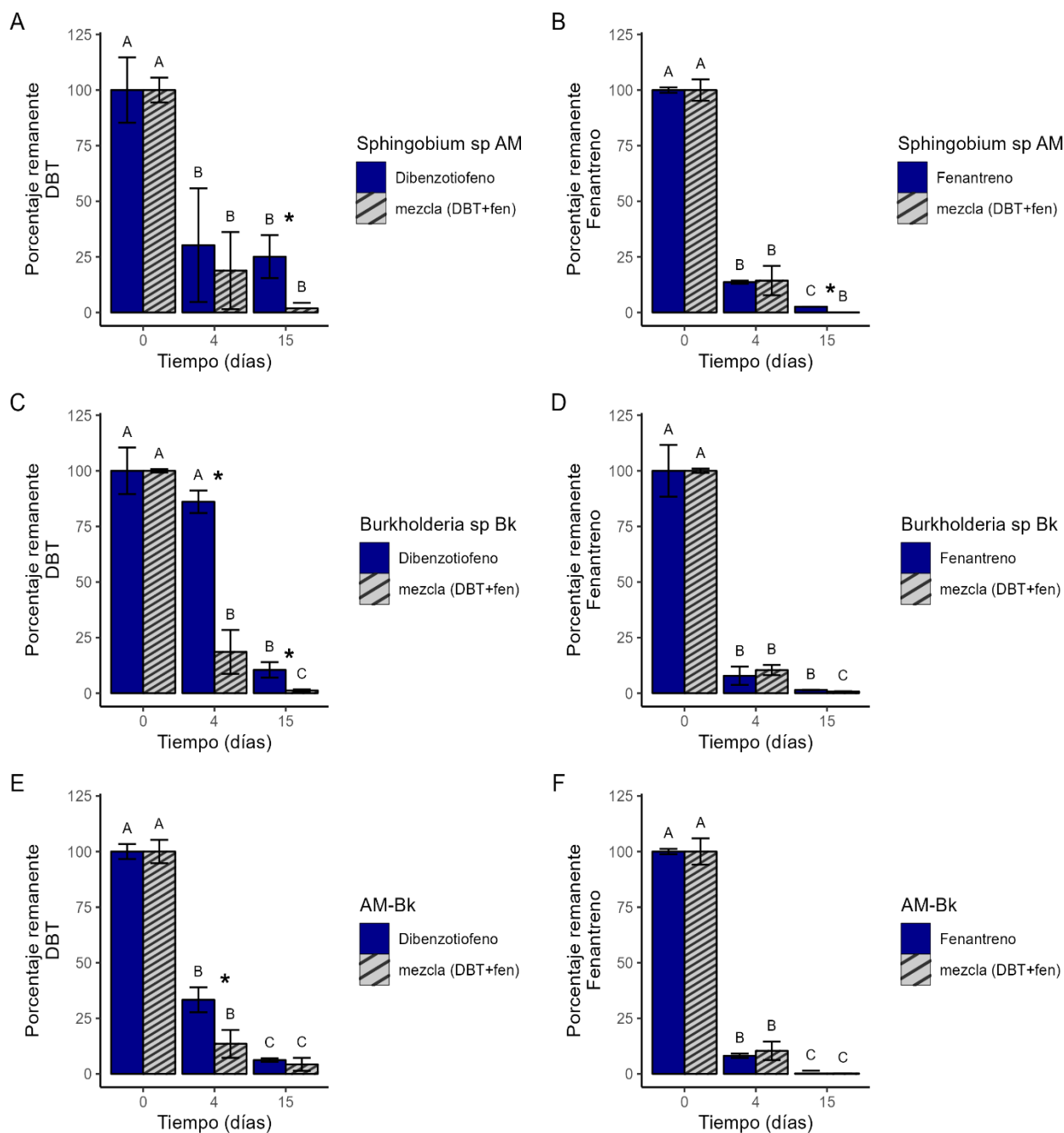


Figura IV.5: Porcentaje remanente de dibenzotiofeno (A, C y E) y fenantreno (B, D y F) cuando se los suplementa como UFCE y en mezcla, en los cultivos de las cepas AM, Bk y el cocultivo AM-Bk durante 15 días de incubación. Se muestran los valores promedio de los triplicados con sus respectivos desvíos estándar.

La figura IV.6 muestra la dinámica poblacional de las cepas AM y Bk en el cocultivo AM-Bk en MML con dibenzotiofeno como UFCE y en la mezcla con fenantreno. En el cultivo con dibenzotiofeno como UFCE se puede observar que AM se mantuvo predominante a lo largo de todo el período de incubación. Al final del período de incubación, hubo un descenso en la densidad poblacional de ambas cepas.

En mezcla con fenantreno, se observó una predominancia de AM durante los primeros días de incubación y luego se observó un crecimiento marcado de la cepa Bk, siendo la cepa mayoritaria a partir del día 4, que continuó creciendo hasta el día 7 de incubación donde alcanzó su densidad máxima ($2,90 \cdot 10^8$ UFC.ml⁻¹), en comparación con el tiempo inicial ($2,50 \cdot 10^6$ UFC.ml⁻¹). Con respecto a la cepa AM, se observó un descenso en la densidad final ($7 \cdot 10^6$ UFC.ml⁻¹) en relación con los valores iniciales ($4,98 \cdot 10^7$ UFC.ml⁻¹).

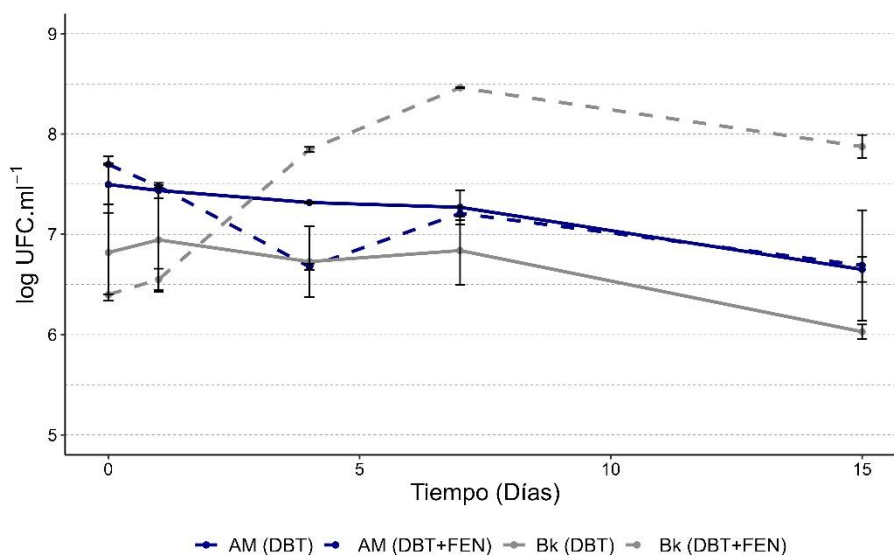


Figura IV.6: Recuento diferencial en placas de R2A del CS AM-Bk en MML suplementado con 100 mg.l⁻¹ de dibenzotiofeno como UFCE (líneas continuas) y mezcla de 100 mg.l⁻¹ de antraceno y 200 mg.l⁻¹ de fenantreno (línea punteada) durante 15 días de incubación. Se grafican los valores promedios y los desvíos estándar de los duplicados biológicos grafica.

IV.2.2 Degradación de fluoreno como UFCE y en mezcla con fenantreno

La figura IV.7 muestra el porcentaje remanente de fluoreno (FLU) suplementado como UFCE y en mezcla con fenantreno a los 4 y 15 días de incubación para los monocultivos de las cepas AM y Bk y el cocultivo AM-Bk. También se evaluó el efecto de la mezcla sobre la degradación de fenantreno.

El cultivo de la cepa AM alcanzó un 41±11.75% de degradación de fluoreno al día 4 como UFCE, alcanzando un 85±2.78% de degradación a los 15 días de incubación. En mezcla con fenantreno, se observó un aumento significativo ($p < 0.05$) de la degradación del fluoreno al día 4 alcanzando un 62±6.56% del fluoreno. Al final del período de incubación, no se observaron diferencias significativas de la degradación de fluoreno en la mezcla con respecto al cultivo con fluoreno como UFCE (Figura IV.7A). Sin embargo, a los 15 días el porcentaje de degradación de fenantreno de AM fue significativamente menor (63±2.11 %, $p < 0.05$) en comparación al 98±0.04% alcanzado con el fenantreno como UFCE (Figura IV.7B). A los 15 días en los cromatogramas (GC-FID)

de los cultivos con mezcla, se observó la presencia de picos adicionales a los picos identificados para fluoreno y fenantreno (Anexo I, Figura AI.1).

El cultivo de la cepa Bk mostró un $31 \pm 8.1\%$ de degradación del fluoreno (UFCE) al día 4 de incubación, aumentando hasta el $65 \pm 7.88\%$ a los 15 días. En mezcla con fenantreno, se observó un $84 \pm 11.41\%$ de degradación del fluoreno al día 4, llegando hasta el $99 \pm 0.05\%$ al final del período de incubación (Figura IV.7C). Estos porcentajes de degradación fueron significativamente superiores ($p < 0.05$) a los alcanzados por Bk, con el fluoreno como UFCE. Con respecto a la degradación de fenantreno (Figura IV.7D), al día 4 de incubación, el porcentaje de degradación alcanzado por Bk fue significativamente menor ($p < 0.05$) en la mezcla ($65 \pm 6.87\%$ de degradación) al porcentaje alcanzado en fenantreno como UFCE ($99 \pm 0.33\%$).

El cocultivo AM-Bk mostró un $40 \pm 5.57\%$ de degradación del fluoreno (UFCE) a los 4 días de incubación, alcanzando un $95 \pm 3.14\%$ de degradación a los 15 días. En mezcla con fenantreno, el cocultivo alcanzó $92 \pm 7.43\%$ de degradación de fluoreno a los 4 días, logrando un $99 \pm 0.12\%$ al final del período de incubación. Se observó un aumento significativo ($p < 0.05$) de la degradación del fluoreno en la mezcla al día 4 de incubación, en comparación con el porcentaje de degradación del fluoreno como UFCE. Con respecto a la degradación de fenantreno, no se observaron diferencias significativas con respecto a la eficiencia de degradación en los cultivos con fenantreno como UFCE (Figura IV.7F).

El cocultivo AM-Bk mostró una eficiencia de degradación significativamente superior ($p < 0.05$) a la del monocultivo de Bk a los 15 días de incubación, cuando el fluoreno fue suplementado como UFCE. En mezcla con fenantreno, el cocultivo mostró una eficiencia de degradación de fenantreno significativamente superior a la de los monocultivos ($p < 0.05$) al día 4 de incubación. Esta diferencia se mantuvo a los 15 días de incubación con respecto al monocultivo de AM.

La figura IV.8 muestra el comportamiento de las poblaciones de las cepas AM y Bk en cocultivo cuando se las inocula en MML suplementado con fluoreno como UFCE y en mezcla con fenantreno, durante 15 días de incubación. En los cultivos con fluoreno como UFCE, se observó una predominancia de AM hasta el final del período de incubación, aunque se observó un descenso de las abundancias en ambas poblaciones bacterianas. Cuando se inoculó al cocultivo en mezcla de fluoreno con fenantreno, también se observó que la cepa AM es mayoritaria durante los primeros días. Se observó un aumento en las densidades de ambas cepas, alcanzando valores máximos a los 7 días de incubación, mientras que al final del período de incubación las densidades de ambas poblaciones fueron similares.

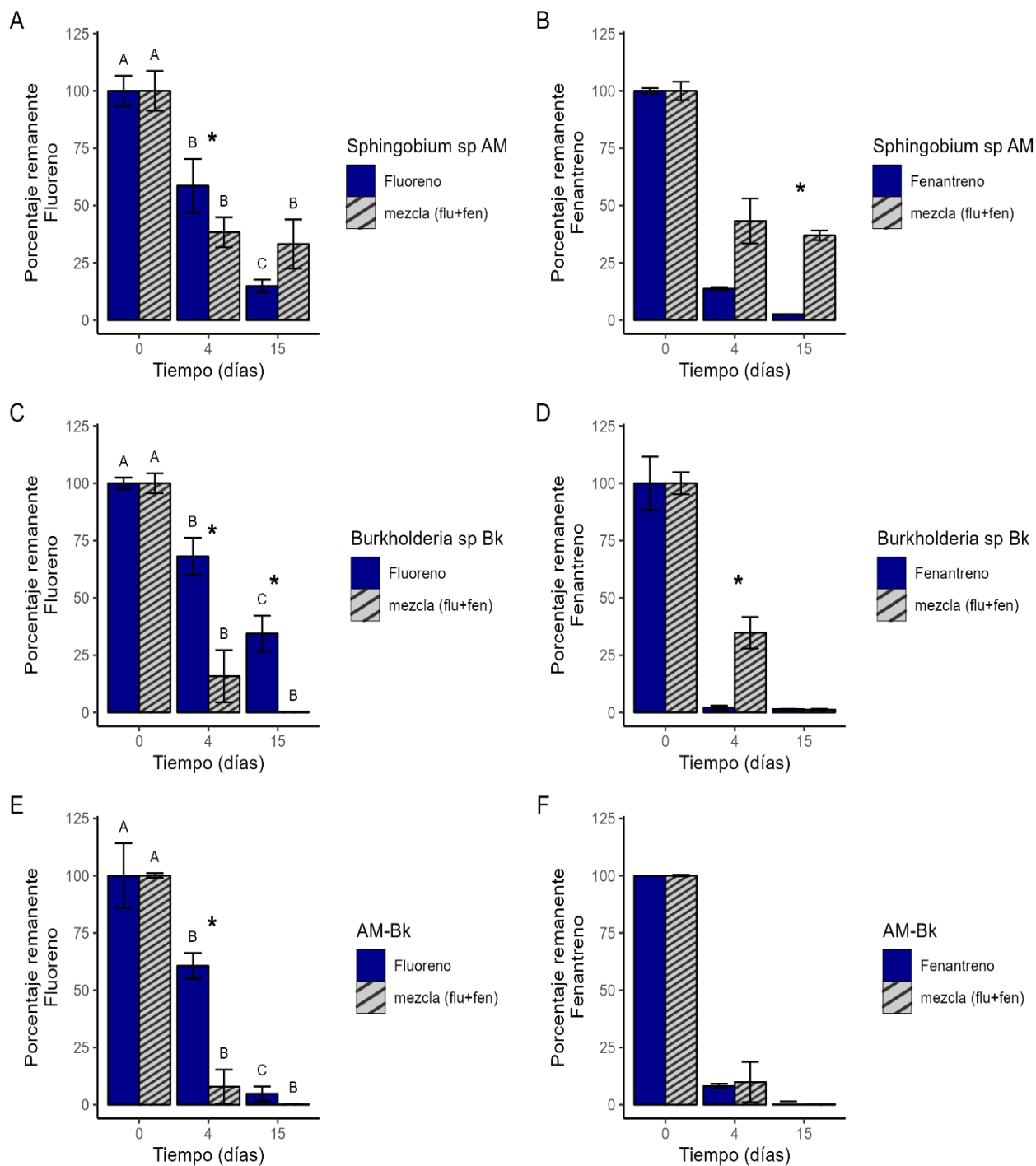


Figura IV.7: Porcentaje remanente de fluoreno (A, C y E) y fenantreno (B, D y F) cuando se los suplementa como UFCE y en la mezcla de los mismos para cultivos de las cepas AM, Bk y el cocultivo AM-Bk durante 15 días de incubación. Se muestran los valores promedios de los triplicados con sus respectivos desvíos estándar.

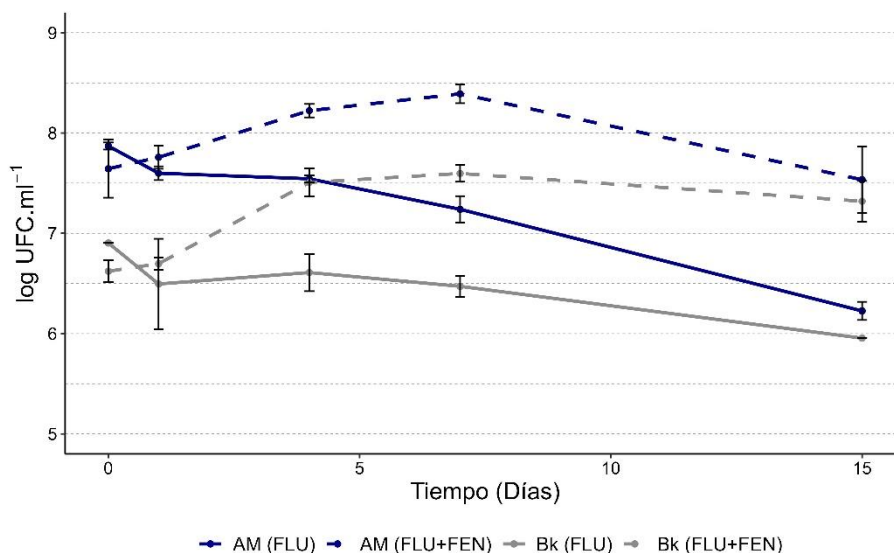


Figura IV.8: Recuento diferencial en placas de R2A del CS AM-Bk en MML suplementado con 100 mg.l⁻¹ de fluoreno (líneas continuas) y mezcla de 100 mg.l⁻¹ de fluoreno y 200 mg.l⁻¹ de fenantreno durante 15 días (líneas punteadas) de incubación. Se grafican los valores promedios y los desvíos estándar de las 2 réplicas biológicas.

IV.3 Análisis comparativo de la expresión de genes catabólicos durante la degradación de fenantreno en el cocultivo AM-Bk

En base a los resultados obtenidos que indicaron que el fenantreno fue el único PAH que soportó el crecimiento de las cepas, se eligió este compuesto como modelo para estudiar las interacciones que se establecen entre las cepas *Sphingobium* sp. AM y *Burkholderia* sp. Bk cuando se las cocultiva durante la degradación de dicho compuesto.

Con el fin de dilucidar el rol que cada cepa cumple en la degradación de fenantreno en el cocultivo AM-Bk, y si la presencia de la otra cepa podría modificar la expresión de genes vinculados a la degradación de fenantreno, se estudiaron los cambios en la expresión relativa de genes catabólicos que codifican enzimas que participan en la ruta de degradación de fenantreno. La figura IV.9 muestra la ruta de degradación propuesta para las cepas AM y Bk. A fin de tener una visión generalizada del proceso se seleccionaron genes que codifican para enzimas que participan tanto en la vía alta (desde fenantreno hasta la producción de HNA) como de la vía baja de degradación de fenantreno (desde HNA hasta los intermediarios del ciclo de Krebs).

Se estudió la expresión relativa de genes catabólicos específicos para las cepas AM y Bk en el cocultivo AM-Bk durante la degradación de fenantreno en comparación con la expresión relativa de dichos genes en los monocultivos de las cepas AM y Bk. Se tomaron muestras a las 2, 8 y 72 horas de incubación. Se utilizó como gen de referencia al gen 16S rARN específico para los géneros *Sphingobium* y *Burkholderia*.

IV.3.1 Cuantificación de la expresión relativa de genes catabólicos específicos de la cepa *Sphingobium* sp. AM en el cocultivo AM-Bk mediante RT-qPCR

Para estudiar el rol que la cepa *Sphingobium* sp AM desempeña en la degradación de fenantreno en el cocultivo AM-Bk, se seleccionaron 7 set de primers dirigidos a genes que codifican enzimas involucradas en las vías alta y baja de la ruta de degradación de fenantreno. Se comparó la expresión relativa de dichos genes en el cocultivo AM-Bk en relación con la expresión relativa en el monocultivo de la cepa AM durante la degradación de fenantreno.

Los genes analizados para el género *Sphingobium* (Khara et al., 2014) codifican para:

- 1) Enzimas que participan en los primeros pasos de la degradación: ***ahdA1f***, subunidad mayor naftaleno/bifenil dioxigenasa, que podría participar en los pasos 1 y 3 de la ruta de degradación; ***ahdC***, 2,3-dihidroxibifenil 1,2-dioxigenasa, que podría participar en los pasos 1, 3 y 7.
- 2) Enzimas que participan en la vía baja de degradación: ***ahdA1c***, gen que codifica la subunidad mayor toluato/benzoato dioxigenasa, podría participar en el paso 10 y 21 de la ruta; ***ahdA1d***, codifica para la subunidad mayor de otra enzima toluato/benzoato dioxigenasa, pudiendo actuar en los pasos 10, 19 y 21; y ***xylE*** codifica para la enzima catecol 2,3-dioxigenasa y que puede actuar en el paso 23 de la ruta.
- 3) Enzimas que pueden participar en ambas vías de la ruta de degradación: ***ahdB***, que codifica para la enzima dihidrodiol-deshidrogenasa, que puede actuar en los pasos 2 y 11 de la ruta; y ***ahdA3***, que codifica una dioxigenasa hidroxilante de anillo aromático junto a la ferredoxina, enzima que participaría en diferentes pasos de la ruta como 1, 3, 10, 15, 19, 21.

La figura IV.10A-G muestra la expresión relativa de los 7 genes catabólicos analizados para la cepa AM en el cocultivo AM-Bk y en el monocultivo de la cepa AM. La expresión relativa se calculó mediante el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, utilizando como gen de referencia al gen 16S rARN. Se tomaron muestras a las 2, 8 y 72 horas de incubación, utilizando a las 2 horas de incubación como condición de referencia.

En el monocultivo de la cepa AM solo se observó un aumento en la expresión relativa del gen ***ahdB***, el cual mostró un aumento significativo ($p < 0.05$) a las 8 horas de incubación en comparación a la condición referencia (2 horas de incubación), manteniéndose este nivel de expresión a las 72 horas de incubación (Figura IV.10). También fue posible observar un aumento significativo ($p < 0.05$) en el nivel de expresión del gen ***xylE*** a las 72 horas de incubación, en relación con la condición de referencia (Figura IV.12G). La expresión relativa de los genes ***ahdA1f***, ***ahdA1c***, ***ahdA1d***, ***ahdC*** y ***ahdA3*** no mostró diferencias significativas a lo largo del período de incubación en el monocultivo de la cepa AM.

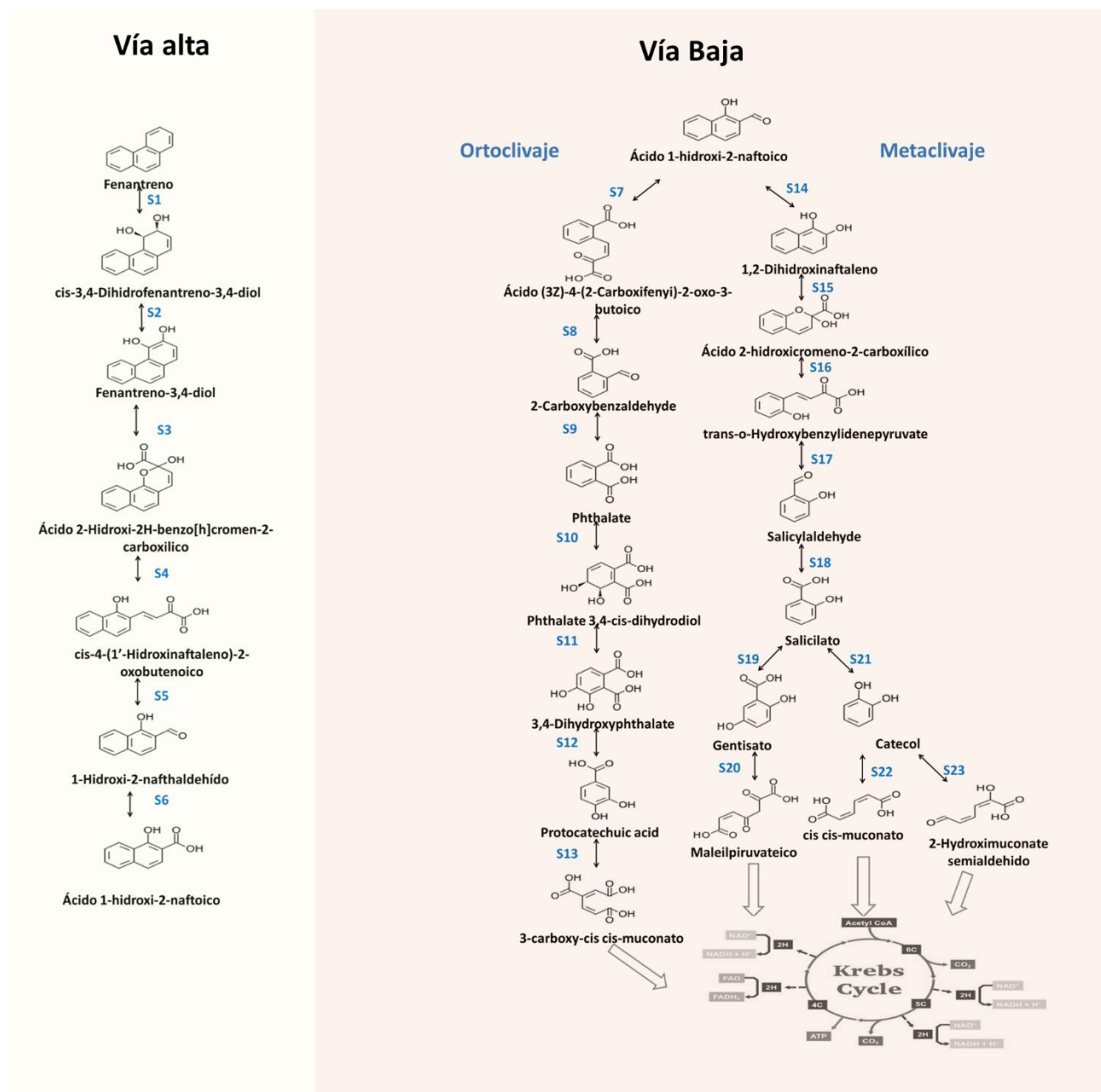


Figura IV.9: Ruta de degradación de fenantreno propuesta para las cepas *Sphingobium* sp AM y *Burkholderia* sp. Bk donde se esquematizan los intermediarios metabólicos, señalando los respectivos pasos, hasta su ingreso al ciclo de Krebs.

Cuando se cultiva AM en el cocultivo AM-Bk se observó una disminución significativa ($p < 0.05$) en la expresión relativa de los genes *ahdA1f*, *ahdA1c*, *ahdA1d*, *ahdC* y *ahdA3* en comparación con la condición de referencia (Figura IV.10). El gen *xyIE* no mostró cambios significativos en la expresión durante el período analizado. Por otra parte, el gen *adhB* mostró un aumento significativo de la expresión ($p < 0.05$) a las 72 horas de incubación, en relación con la condición de referencia.

Al comparar el comportamiento de la cepa AM durante la degradación de fenantreno en el cocultivo AM-Bk en comparación con el monocultivo de dicha cepa, no se observaron diferencias significativas en los niveles

de expresión de los genes *ahdA1f*, *ahdA1c*, *ahdC* y *ahdA3* (Figura IV.10). Sin embargo, la cepa AM en cocultivo AM-Bk mostró una disminución significativa ($p < 0.05$) en el nivel de expresión del gen *ahdB* tanto a las 8 como a las 72 horas con relación al monocultivo. También se observó una disminución significativa ($p < 0.05$) en los niveles de expresión de los genes *ahdA1d* y *xylE* a las 72 horas de incubación en relación con monocultivo (Figura IV.10F y G).

IV3.2 Cuantificación de la expresión relativa de genes catabólicos específicos de la cepa *Burkholderia* sp. Bk en el cocultivo AM-Bk mediante RT-qPCR

Se estudió el cambio de la expresión relativa de genes catabólicos que codifican enzimas vinculadas a la degradación de fenantreno específicos para la cepa *Burkholderia* sp Bk. Se comparó la expresión relativa de dichos genes cuando se inocula el cocultivo AM-Bk en relación con la expresión relativa en el monocultivo de la cepa Bk durante la degradación de fenantreno.

Los sets de primers utilizados para la cepa Bk fueron diseñados para esta tesis a partir del genoma de la cepa Bk utilizando el software Primer3Plus. La especificidad de los primers se corroboró *in silico* utilizando el software ARTEMIS, y al mismo tiempo la ausencia de pegado inespecífico con la cepa AM. Posteriormente se realizó una confirmación mediante PCR, y los productos de amplificación fueron secuenciados utilizando el servicio de secuenciación de MACROGEN. Finalmente se seleccionaron aquellos primers cuya eficiencia de reacción se encontró entre 90-110%.

Los sets de primers utilizados están dirigidos a genes que codifican enzimas que participan en distintas partes de la ruta de degradación (Figura IV.11), a fin de tener representatividad de tanto la vía alta como la baja de la ruta de degradación de fenantreno.

Los genes analizados codifican para:

- 1) Enzimas que participan en los primeros pasos de la degradación: ***naph***, subunidad mayor naftaleno/bifenil dioxigenasa, que podría participar en los pasos 1 y 3 de la ruta de degradación; ***biph***, biphenil 2,3 dioxigenase, que podría participar en los pasos 1, 3 y 7.
- 2) Enzimas que participan en la vía baja de degradación: ***tol***, gen que codifica la subunidad mayor toluato/benzoato dioxigenasa, podría participar en el paso 10; ***sal***, gen que codifica la enzima salicilato hidroxilasa que podría actuar en 14 y 19 de la ruta; y ***cat***, que codifica para la enzima catecol 2,3-dioxigenasa y que puede actuar en el paso 23 de la ruta.

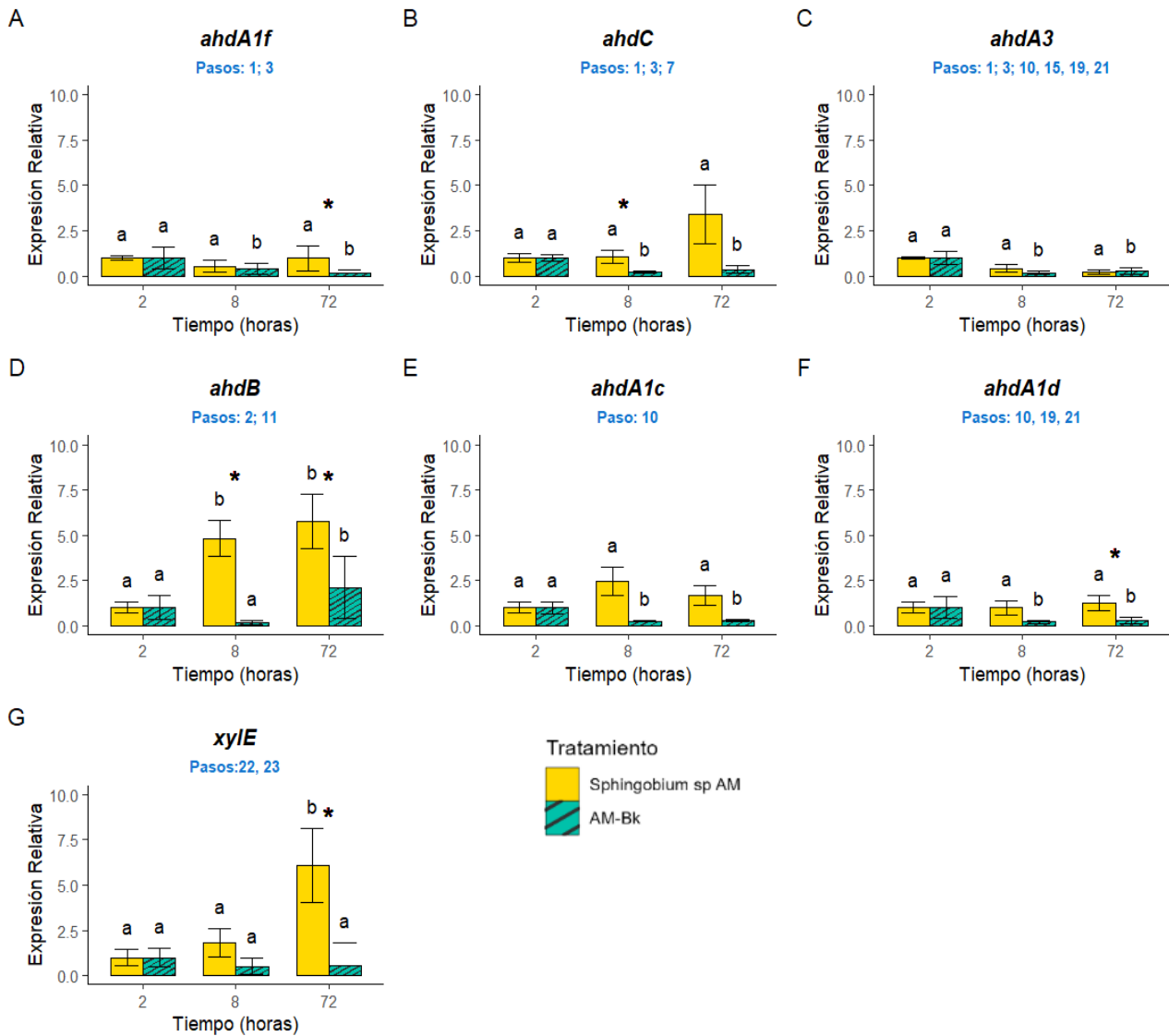


Figura IV.10: Expresión relativa de genes estudiados durante la degradación de fenantreno en cultivos de AM y AM-Bk (a: *ahdA1f*, b: *ahdC*, c: *ahdA3*, d: *ahdB*, e: *ahdA1c*, f: *ahdA1d* y g: *XylE*). Los valores son expresados como el *fold-change* de la expresión, y representan los promedios \pm STD de triplicados independientes y tres réplicas de medida e indican el cambio en los niveles de mRNA de los genes estudiados en comparación con las condiciones de control (valor de 1). La diferencia significativa de la expresión génica entre las condiciones (diferentes tiempos) del mismo cultivo (AM o AM-Bk) se muestran con letras diferentes (a, b, c y d) y la diferencia significativa entre cultivos (AM y AM-Bk) para cada tiempo se muestra con asterisco (*) y fueron determinadas por el test de Student's usando un valor P de \pm 0.05 (ANOVA two-ways, Tukey test).

La figura IV.11A-E muestra el nivel de expresión relativa de los 5 genes seleccionados para la cepa Bk en cocultivo AM-Bk en comparación a la expresión relativa de dichos genes en el monocultivo de la cepa Bk durante la degradación de fenantreno. La expresión relativa se calculó mediante el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, utilizando

como gen de referencia al gen 16S rARN específico para el género *Burkholderia*. Se tomaron muestras a las 2, 8, 24 y 72 horas de incubación, utilizando a las 2 horas de incubación como condición de referencia.

En el monocultivo de la cepa Bk se observó un aumento significativo ($p < 0.05$) de la expresión relativa de *naph* y *biph*, ambos genes pertenecientes a la vía alta, a las 72 horas de incubación (Figura IV.11A-B). De los genes de la vía baja, solo en el gen *sal* (Figura IV.11D) se observó un aumento significativo de la expresión relativa a las 8 horas, mientras que para los genes *tol* y *cat* se observa un aumento ($p < 0.05$) del nivel de expresión a las 72 horas de incubación (Figura IV.11 C y D).

En el cocultivo, se observó un aumento significativo ($p < 0.05$) de todos los genes analizados para la cepa Bk durante el tiempo analizado. Con respecto a los genes de la vía alta, el gen *naph* mostró un aumento significativo de la expresión a las 8 horas en relación con la condición de referencia (2 horas de incubación) (Figura IV.11A), mientras que el gen *biph* mostró un aumento significativo a las 72 horas (Figura IV.11B). El gen *tol* mostró un aumento de la expresión a las 8 horas en relación con la condición de referencia. A las 72 horas los tres genes de la vía baja (*tol*, *sal* y *cat*) mostraron un aumento significativo del nivel de expresión en la cepa Bk en el cocultivo en relación con la condición de referencia.

Cuando se comparan los niveles de expresión relativa para los genes catabólicos de la cepa Bk en cocultivo con relación al monocultivo, se observó que ambos genes de la vía alta mostraron una disminución significativa ($p < 0.05$) en el nivel de la expresión relativa a las 8 y 72 horas, para el caso del gen *biph*, y a las 72 horas para el gen *naph*. Con respecto a los genes de la vía baja, *sal* mostró una disminución significativa de la expresión en relación con el monocultivo a las 8 horas, mientras que a las 72 horas no hubo diferencias con respecto al monocultivo.

IV.4 Análisis metaproteómico diferencial del cocultivo AM-Bk durante la degradación de fenantreno

Con el objetivo de profundizar el estudio de las interacciones entre las cepas durante la degradación de fenantreno en el cocultivo AM-Bk, se estudiaron las proteínas expresadas en relación con su expresión en los monocultivos. Se cosecharon las proteínas totales a las 72 horas de incubación de los monocultivos de las cepas AM y Bk y del cocultivo AM-Bk en MML suplementado con 200 mg.l⁻¹ de fenantreno como UFCE. Las proteínas diferencialmente expresadas identificadas por (LC-MS/MS) con tecnología Orbitrap fueron clasificadas funcionalmente utilizando la base de datos de BlastKOALA y complementada con curación manual, utilizando como referencia la base de datos del NCBI.

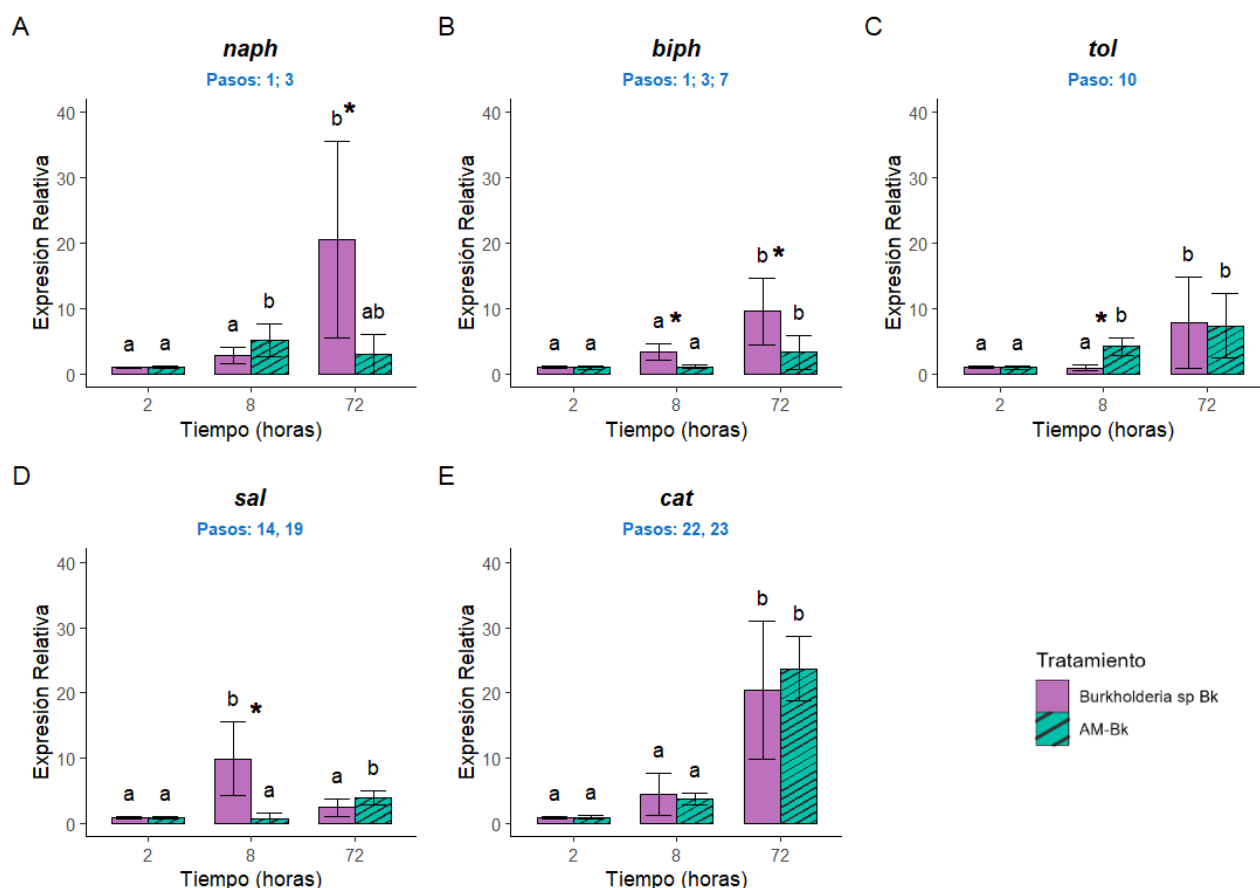


Figura IV.11: Nivel de expresión de genes claves regulados durante la degradación de fenantreno en cultivos de Bk y AM-Bk. Los valores son expresados como las veces que cambia la expresión, y representan los promedios \pm STD de triplicados independientes y tres réplicas de medida e indican el cambio en los niveles de mRNA de los genes estudiados en comparación con las condiciones de control (valor de 1). La diferencia significativa de la expresión génica entre las condiciones (diferentes tiempos) del mismo cultivo (Bk o AM-Bk) se muestran con letras diferentes (a, b, c y d) y la diferencia significativa entre cultivos (Bk y AM-Bk) para cada tiempo se muestra con asterisco (*) y fueron determinadas por el test de Student's usando un valor P de \pm 0.05 como corte (ANOVA two-ways, Tukey test).

Se identificaron un total de 641, 962 y 820 proteínas para los monocultivos de las cepas AM y Bk y para el cocultivo AM-Bk. Se construyó un modelo lineal para la evaluación estadística de los resultados obtenidos a partir de los espectros de masa de las proteínas totales de los monocultivos de las cepas AM y Bk y del cocultivo AM-Bk, con el objetivo de identificar la distribución de las proteínas diferencialmente expresadas entre los sistemas. Se graficó el logaritmo del p valor en el eje de las y ($-\log$ Student T-test p-value AM-COCULT o Bk-COCULT) y la diferencia del valor de Student T-Test AM-COCULT o BK-COCULT en el eje de las x. Se consideraron como diferencialmente expresadas aquellas proteínas con un *fold change* mayor a 2 (es decir menor a -1 o mayor a 1 en el eje de las x) y un p-valor por debajo de 0.05 (por encima de 1.3 en el eje de las y) (Figura IV.12 y 14). Debido a que en el cocultivo, las densidades de las cepas no son iguales, se construyó

una mezcla de los extractos de las proteínas totales de los monocultivos de las cepas AM y Bk, con el objetivo de disminuir el efecto de la mezcla en la estimación de las proteínas diferencialmente expresadas.

La figura IV.11 muestra un volcano plot donde se observa la distribución de las proteínas totales para la cepa AM en el cocultivo AM-Bk en comparación con las proteínas presentes en el monocultivo de dicha cepa. Los cuadrados negros representan las proteínas de la cepa AM que mostraron diferencias significativas en la expresión en el cocultivo AM-Bk en relación con el monocultivo de la cepa AM.

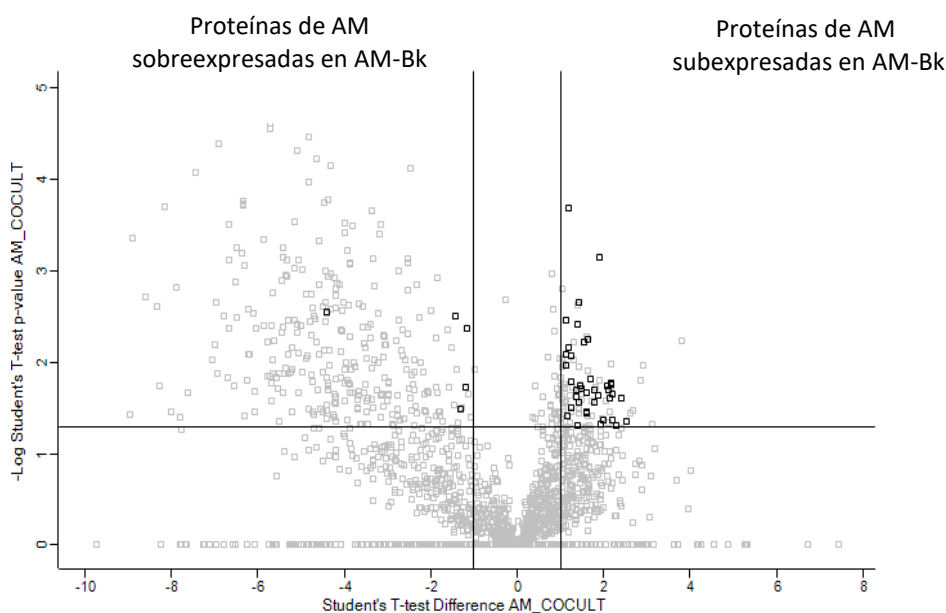


Figura IV.12: Volcano plot de las diferencias en las abundancias de las proteínas expresadas a las 72 horas de incubación en MML suplementado con 200 mg.l⁻¹ de fenantreno. Se muestra la distribución de las abundancias en función de la significancia estadística con un *fold change* mayor a 2 (es decir, menor a -1 el cocultivo AM-Bk o mayor a 1 en el cultivo de AM sobre el eje de las x en el gráfico) y con un p-valor obtenido a partir de test de t menor a 0.05 (valores mayores a 1.3 en el eje de las y). Los cuadrados negros indican las proteínas pertenecientes a la cepa AM, que mostraron diferencias significativas en el cocultivo AM-Bk en relación con el monocultivo de la cepa AM. Aquellas proteínas que no mostraron diferencias significativas en las abundancias entre los dos cultivos se muestran en gris.

Solo 5 proteínas fueron identificadas como sobreexpresadas en el cocultivo AM-Bk en relación al monocultivo de la cepa AM. Se identificaron un total de 39 proteínas pertenecientes a la cepa AM subexpresadas en el cocultivo en relación con el monocultivo de dicha cepa. De acuerdo a la clasificación funcional de dichas proteínas, las rutas metabólicas que mayor cambios experimentaron fueron las rutas de degradación de xenobióticos, las proteínas vinculadas a la respuesta frente al estrés celular, el metabolismo de hidratos de carbono y el metabolismo de aminoácidos (Figura IV.13).

En la tabla AI.1 (Anexo I) se muestra el detalle de las proteínas de la cepa AM diferencialmente expresadas en el cocultivo AM-Bk en comparación con el monocultivo de la cepa. Se identificó solo una proteína perteneciente a la cepa AM que se expresó únicamente en el cocultivo, y 4 proteínas que se expresaron únicamente en el monocultivo de la cepa AM (Anexo I, Tabla AI.2).

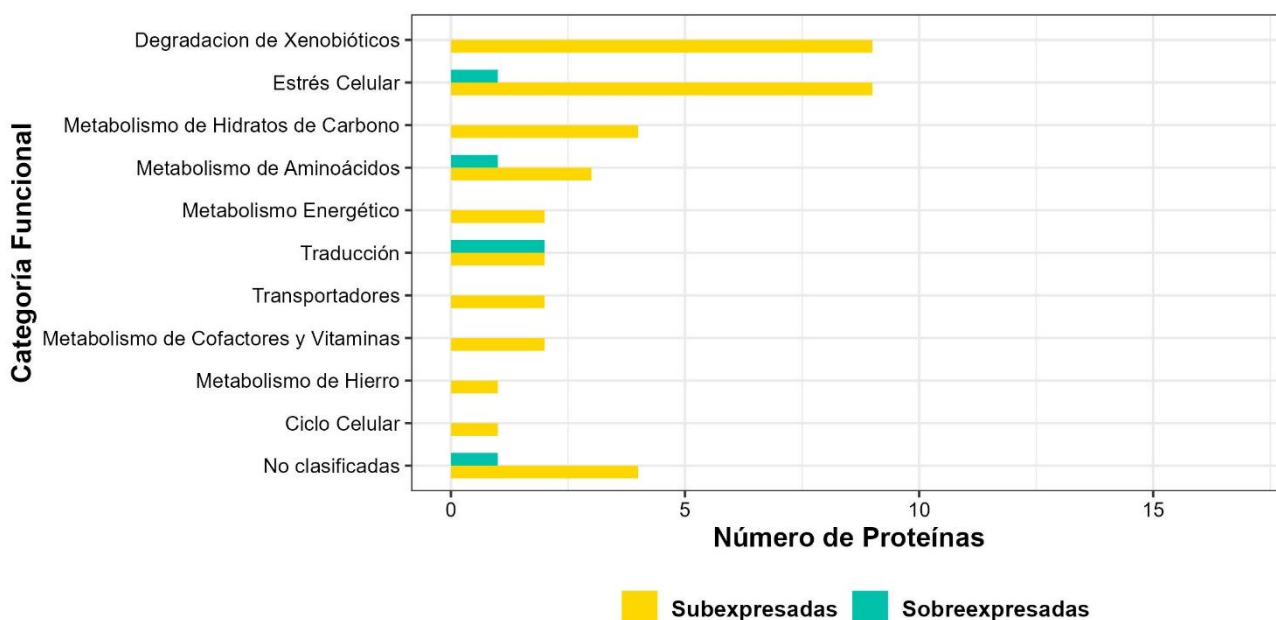


Figura IV.13: Clasificación funcional de las proteínas de AM sobreexpresadas (verde) y subexpresadas (amarillas) en el cocultivo AM-Bk de acuerdo con sus abundancias con respecto al monocultivo de AM.

La figura IV.14 muestra un volcano plot donde se observa la distribución de las abundancias de las proteínas totales identificadas para la cepa Bk en el cocultivo AM-Bk en comparación al monocultivo de dicha cepa. Los cuadrados negros indican las proteínas de Bk diferencialmente expresadas en el cocultivo en comparación con el monocultivo de la cepa Bk a las 72 horas de incubación en MML suplementado con fenantreno como UFCE. Se identificaron un total de 20 proteínas pertenecientes a la cepa Bk sobreexpresadas en el cocultivo AM-Bk, con relación al monocultivo. Por otra parte, se identificaron un total de 110 proteínas subexpresadas en el cocultivo en comparación al monocultivo de la cepa Bk.

En base a la clasificación funcional de dichas proteínas, las principales rutas metabólicas que mostraron mayores cambios, en relación con la abundancia de las proteínas, pertenecen al metabolismo de aminoácidos, a la degradación de xenobióticos, el proceso de traducción y el estrés celular (Figura IV.15).

En la tabla AI.3 (Anexo I) se muestra un detalle de las proteínas diferencialmente expresadas pertenecientes a la cepa Bk en el cocultivo en comparación con el monocultivo de la cepa Bk, y sus respectivos *fold change*. Además, se identificó una proteína expresada únicamente en el cocultivo, y 14 proteínas expresadas únicamente en el monocultivo de la cepa Bk (Anexo I, Tabla AI.4).

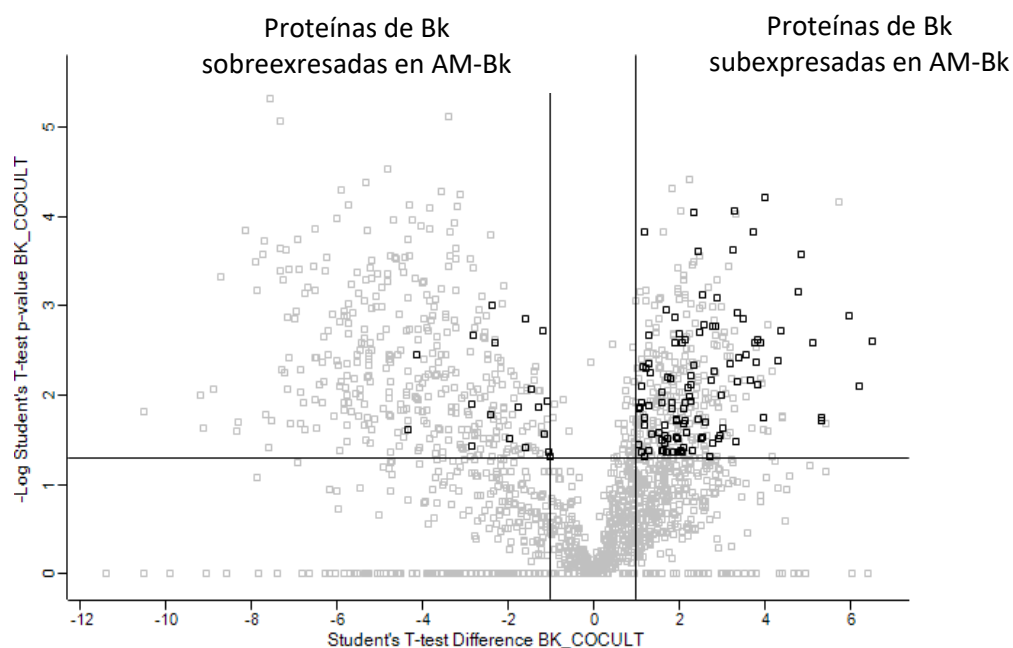


Figura IV.14: Volcano plot de las diferencias en las abundancias de las proteínas expresadas a las 72 horas de incubación en MML suplementado con 200 mg.l⁻¹ de fenantreno. Se muestra la distribución de las abundancias en función de la significancia estadística con un *fold change* mayor a 2 (es decir, menor a -1 el cocultivo AM-Bk o mayor a 1 en el cultivo de Bk sobre el eje de las x en el gráfico) y con un p-valor obtenido a partir de test de t menor a 0.05 (valores mayores a 1.3 en el eje de las y). Los cuadrados negros indican las proteínas pertenecientes a la cepa Bk, que mostraron diferencias significativas en el cocultivo AM-Bk en relación con el monocultivo de la cepa Bk. Aquellas proteínas que no mostraron diferencias significativas en las abundancias entre los dos cultivos se muestran en gris.

IV.4.1 Degradación de xenobióticos

En relación a la degradación de xenobióticos, 9 proteínas pertenecientes a la cepa AM se subexpresaron en el cocultivo AM-Bk en relación al monocultivo de la cepa AM (Figura IV.13). Entre las proteínas subexpresadas vinculadas a la degradación de aromáticos, se encontraron la 4-hidroxi-2-oxovalerato aldolasa (que puede actuar en los pasos 5, 8 y 17 de la ruta de degradación de fenantreno, Figura IV.9), 4-oxalocrotonato decarboxilase (paso 8), 2-hidroxi-6-oxo-6-phenilhexa-2,4-dienoato hidrolasa (paso 9), benzoate/toluato 1,2 dioxigenase (paso 10), y la 1,2-dioxygenase anthranilate (paso 10). De acuerdo a la clasificación obtenida a partir del BlastKoala, estas proteínas pueden participar en la degradación de benzoato y xileno (metabolitos intermediarios de la ruta de degradación de PAHs) (Figura IV.16) y pertenecientes a la vía del ortoclivaje. La única enzima subexpresada vinculada a la vía del metaclivaje fue una aldolasa, que puede actuar en el paso 17 de la ruta de degradación de fenantreno, puede participar también en la ruta de degradación de naftaleno.

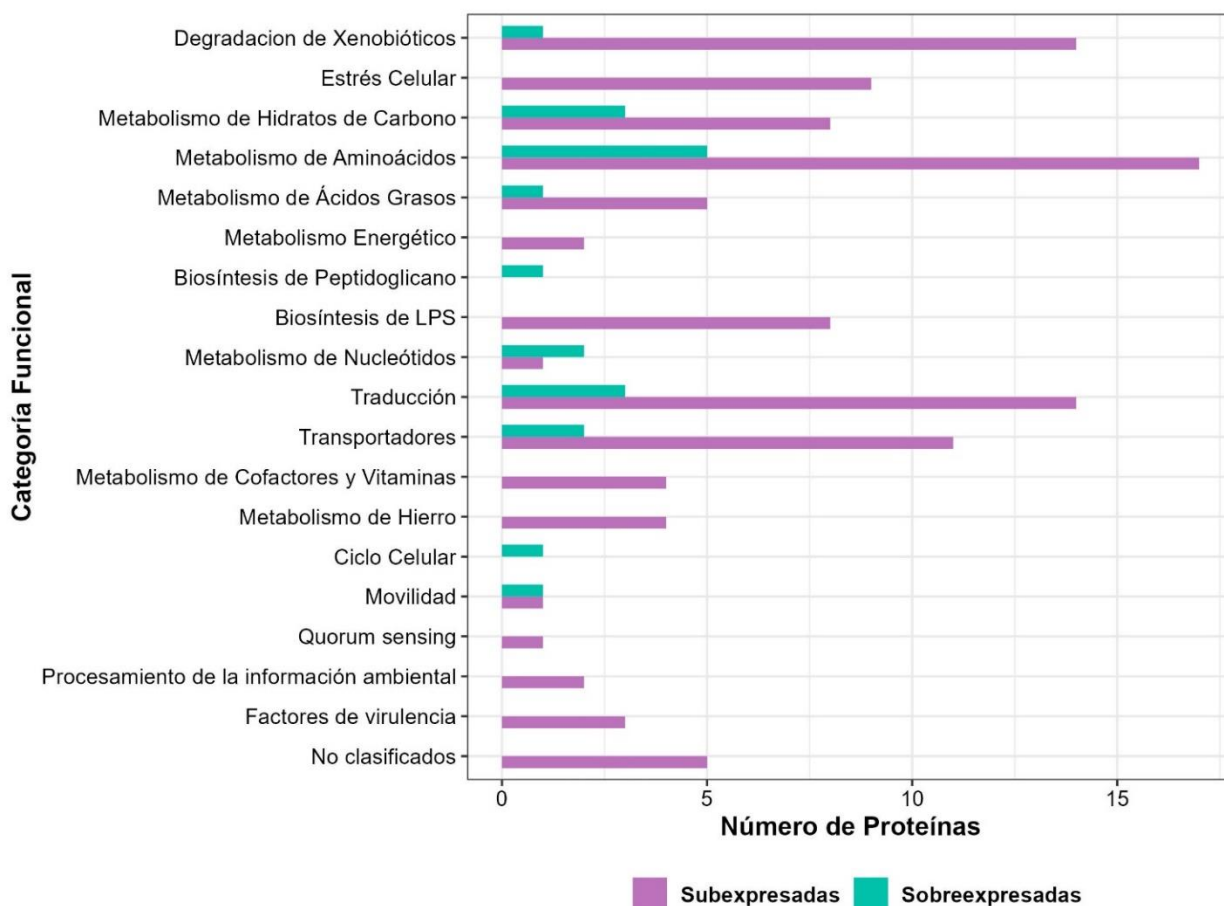


Figura IV.15: Clasificación funcional de las proteínas pertenecientes a la cepa Bk sobreexpresadas (verde) y subexpresadas (violeta) en el cocultivo AM-Bk de acuerdo con sus abundancias con respecto al monocultivo de Bk.

Otra proteína encontrada, 4-cresol deshidrogenasa, puede actuar en la degradación de tolueno y otros compuestos relacionados. No obstante, no se encontró ninguna proteína perteneciente a la cepa AM, vinculada a la degradación de compuestos aromáticos, sobreexpresada en el cocultivo AM-Bk en relación con el monocultivo de la cepa AM.

Con respecto a la cepa Bk, se encontraron 14 enzimas, vinculadas a la degradación de compuestos aromáticos, subexpresadas en el cocultivo AM-Bk en comparación con el monocultivo de la cepa Bk (Figura IV.15). Dentro de este grupo, se encontraron dos enzimas que podrían actuar en la vía alta de degradación de fenantreno, la biphenil-2,3-diol 1,2-dioxigenasa (pasos 1, 3 y 7) y la subunidad beta de la dioxigenasa hidroxilante de anillo (pasos 1 y 10) (Figura IV.9).

Las proteínas restantes fueron clasificadas dentro de la vía baja de la ruta de degradación de fenantreno (Figura IV.16). Dentro de la vía del ortoclivaje se encontraron subexpresadas la 4-oxalocrotonato decarboxilasa (paso 8), la aldehído deshidrogenasa (paso 9), la subunidad mayor y la subunidad menor de la antranilato 1,2-dioxigenasa (paso 10). Entre las enzimas pertenecientes a la vía del metaclivaje se encontró la aldolasa (paso

17), 2-keto-4-pentenoato hidratasa (paso 17), acetaldehído deshidrogenasa (pasos 6 y 18) y catecol 2,3-dioxigenasa (pasos 22 y 23). También se subexpresó una hidratasa que podría participar tanto en el metaclivaje como en el ortoclivaje (pasos 8 y 17). La enzima 3-oxoadipyl-CoA thiolasa, que puede actuar en los últimos pasos de la ruta, dando lugar a compuestos que pueden entrar en el ciclo de Krebs, también se subexpresó en el cocultivo AM-Bk.

Solo una proteína vinculada a la degradación de compuestos aromáticos, perteneciente a la cepa Bk, se sobreexpresó en el cocultivo AM-Bk, la aldehído deshidrogenasa (Figura IV.15). Esta enzima podría actuar en el paso 9 de la ruta de degradación de fenantreno (Figura IV.9).

Tres enzimas vinculadas a la degradación de compuestos aromáticos, la proteína de unión (2Fe-2S) (paso 10), la 1,6-dihidroxiclohexa-2,4-diene-1-carboxilato deshidrogenasa (pasos 2 y 11), la catecol 1,2 dioxigenasa (paso 22) se expresaron únicamente en el monocultivo de la cepa Bk (tabla AI.4).

IV.4.2 Respuesta al estrés celular

En relación con la respuesta celular frente al estrés, solo una proteína, la chaperona dependiente de ATP ClpB, perteneciente a la cepa AM se sobreexpresó en el cocultivo AM-Bk en comparación con el monocultivo de la cepa AM. Esta proteína se expresa principalmente en la fase estacionaria. Por otra parte, 9 proteínas de AM vinculadas a la respuesta frente al estrés celular, se subexpresaron en el cocultivo AM-Bk (Figura IV.13). Entre ellas se encontró el regulador PhyR. También se subexpresaron proteínas vinculadas al estrés oxidativo, como la glutatión S-transferasa y la glutatión peroxidasa, que participan en el metabolismo del glutatión, y la exodeoxyribonucleasa III, vinculada a la reparación del DNA doble hebra, en particular, debido a daño por H₂O₂. Además, se observó la expresión de una peroxidasa, vinculada al estrés oxidativo, únicamente en el monocultivo de la cepa AM.

No se observó sobreexpresión de ninguna proteína vinculada al estrés celular perteneciente a la cepa Bk en el cocultivo AM-Bk. No obstante, 9 proteínas vinculadas al estrés se subexpresaron en el cocultivo en comparación con el monocultivo de la cepa Bk (Figura IV.15). Entre las proteínas subexpresadas se encontraron la peroxirredoxina, proteína de resistencia al peróxido de hidrógeno, así como la exodeoxyribonucleasa III y el factor de intercambio nucleotídico GrpE (tabla AI.1 y AI.3).

IV.4.3 Metabolismo de hidratos de carbono

En relación con el metabolismo de hidratos de carbono, en el cocultivo AM-Bk se subexpresaron 4 proteínas de la cepa AM vinculadas al glucólisis y al ciclo de Krebs (malato deshidrogenasa, aldehído deshidrogenasa, subunidad alfa de la succinato--CoA ligasa, fosfoglicerato quinasa) (Figura IV.13). No se observó sobreexpresión de ninguna proteína vinculada al metabolismo de hidratos de carbono.

En cuanto a las proteínas de la cepa Bk, se observó sobreexpresión en el cocultivo AM-Bk de 3 proteínas relacionadas al metabolismo de hidratos de carbono (Figura IV.15). Entre ellas, la acetato--CoA ligasa y la piruvato oxidasa, que participan en la oxidación del piruvato, y alfa-1,4-glucan--maltosa-1-fosfato maltosiltransferasa, que actúa en la biosíntesis de alfa-glucanos ramificados. Entre las proteínas de Bk vinculadas al metabolismo de hidratos de carbono subexpresadas en el cocultivo se encontraron la dihidroxiacetona quinasa subunidad DhaK, la fosfoglicerato mutasa, fructosa-bisfosfatasa clase I y la isocitrato deshidrogenasa (dependiente de NADP (+)).

IV.4.4 Metabolismo de aminoácidos

Solo 3 proteínas de la cepa AM, vinculadas al metabolismo de aminoácidos, se subexpresaron en el cocultivo AM-Bk, mientras que 1 proteína se sobreexpresó (el factor transcripcional trifuncional prolina deshidrogenasa/L-glutamato gamma-semialdehído deshidrogenasa) en comparación al monocultivo de la cepa AM.

En el caso de la cepa Bk, el metabolismo de aminoácidos fue una de las categorías funcionales que más cambios sufrió entre el cocultivo AM-Bk y el monocultivo de la cepa Bk (Figura IV.15). Se sobreexpresaron un total de 5 proteínas de la cepa Bk en el cocultivo, dihidrolipoil deshidrogenasa y acil-CoA deshidrogenasa (una isovaleril-CoA deshidrogenasa) vinculadas a la degradación de aminoácidos, y la NAD-glutamato deshidrogenasa, la argininosuccinato sintasa y la subunidad pequeña de la acetolactato sintasa a la síntesis de aminoácidos. Por otra parte, un total de 19 proteínas vinculadas al metabolismo de aminoácidos, se subexpresaron en el cocultivo AM-Bk en relación con el monocultivo de la cepa Bk (Figura IV.15).

IV.4.5 Metabolismo de lípidos

Con respecto al metabolismo de lípidos, no se observaron cambios en las proteínas pertenecientes a la cepa AM.

De las proteínas de cepa Bk, implicadas en la degradación de ácidos grasos se sobreexpresó 1 proteína en el cocultivo AM-Bk, la acil-CoA deshidrogenasa. Además, se subexpresaron 5 proteínas, vinculadas a la biosíntesis de ácidos grasos en el cocultivo AM-Bk en relación al monocultivo de la cepa Bk. También se observó la subexpresión en el cocultivo de 7 proteínas de Bk relacionadas a la síntesis de lipopolisacárido (LPS) y componentes de la membrana externa. Además, dos proteínas vinculadas a la síntesis de LPS se expresaron únicamente en el monocultivo de la cepa Bk (glycosyltransferasa y 3-deoxy-manno-octulosonate citidililtransferasa) (Tabla AI.3).

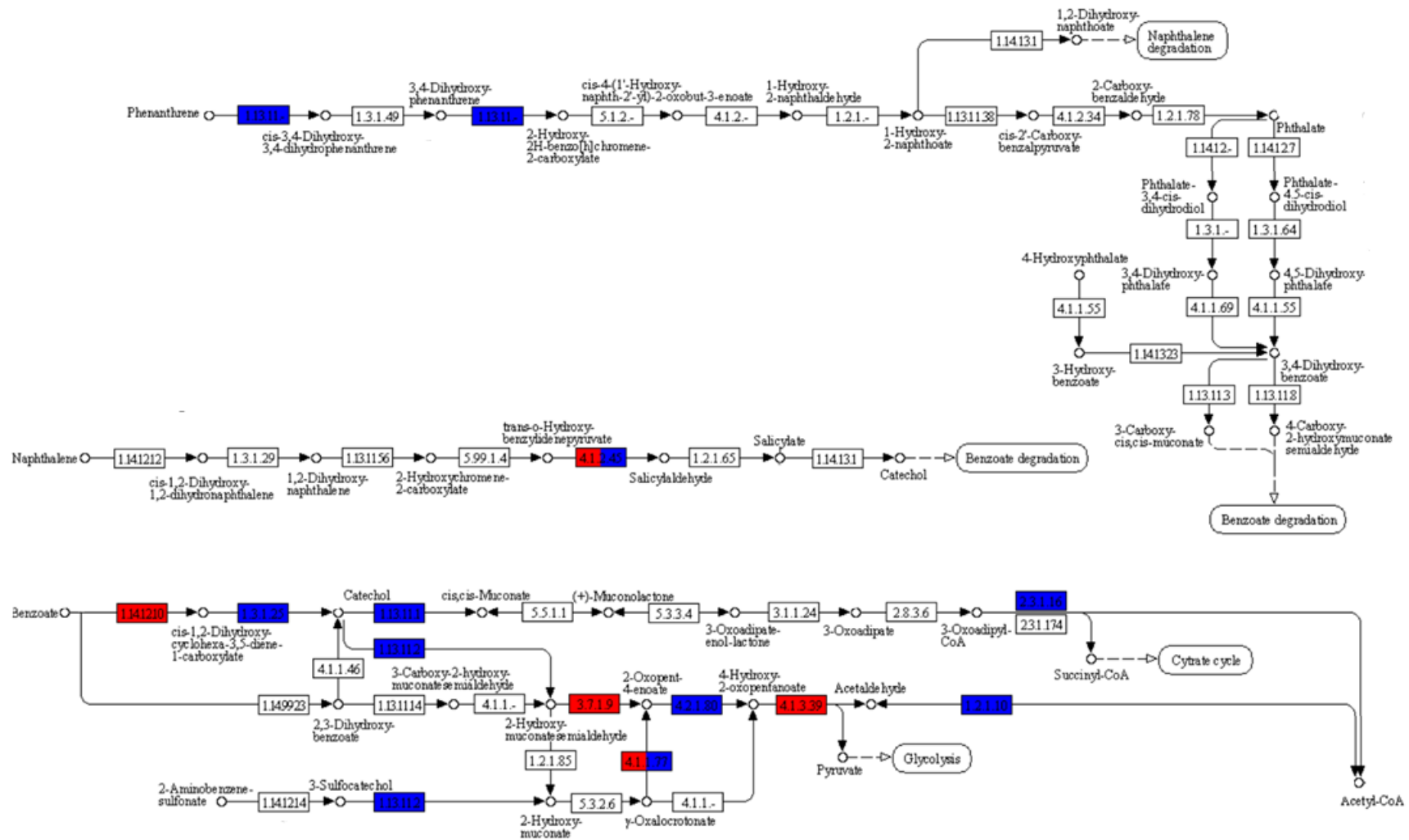


Figura IV.16: Mapeo de las proteínas subexpresadas en el cultivo, pertenecientes a la cepa AM (rojo) o Bk (azul), relacionadas a la degradación de compuestos aromáticos, obtenido a partir de la herramienta KEGG Mapper.

IV.4.6 Transportadores

Se subexpresaron dos proteínas transportadoras de AM en el cocultivo. Estos transportadores están relacionadas a bombas de flujo de membrana, asociados a la resistencia a antibióticos en bacterias gramnegativas. No se observó sobreexpresión de ninguna proteína transportadora en el cocultivo en comparación con el monocultivo de la cepa AM.

Un total de 12 transportadores pertenecientes a la cepa Bk se subexpresaron en el cocultivo entre ellos, transportadores de tipo ABC de glúcidos, aminoácidos y metales (tabla A1.3). Sin embargo, 2 transportadores ABC, uno de azúcares y otro de aminoácidos, se sobreexpresaron en el cocultivo con respecto al monocultivo de la cepa Bk.

IV.4.7 Transcripción, traducción y ciclo celular

De las proteínas pertenecientes a la cepa AM en el cocultivo se observó la sobreexpresión de una histidin fosfotransferasa, ChpT, vinculada a la regulación del ciclo celular. Además, se sobreexpresaron dos enzimas vinculadas a la maduración de los ribosomas y la modificación postranscripcional (una ribonucleasa y una isoprenilcisteína carboxil metiltransferasa). Sin embargo, se subexpresaron 2 proteínas vinculadas a los ribosomas y a la traducción, la 30S proteína ribosomal S18 y un trigger factor.

Con respecto a las proteínas pertenecientes a la cepa Bk sobreexpresadas en el cocultivo, se encontró una ribonucleasa E/G, vinculada a la regulación transcripcional, una ARN polimerasa y una alanina—tARN ligasa. Sin embargo, se subexpresaron 11 proteínas de la cepa Bk vinculadas a los ribosomas en el cocultivo AM-Bk en comparación al monocultivo.

En la cepa Bk también se sobreexpresaron en el cocultivo una hidrolasa dependiente de Zn y una fosforibosilformilglicinamida ciclo ligasa, relacionadas con la síntesis de bases nitrogenadas, una UDP-N-acetylglucosamin 1-carboxiviniltransferasa, vinculada a la síntesis de peptidoglicano, y una septum site-determining proteína, MinD, vinculada a la división celular.

IV.4.8 Metabolismo de Fe

En el cocultivo se observó subexpresión de proteínas vinculadas al metabolismo del Fe y porfirinas en comparación con los respectivos monocultivos tanto de la cepa *Sphingobium* sp. AM como de la cepa *Burkholderia* sp. Bk. En el caso de la cepa AM se observó subexpresión de una proteína vinculada al metabolismo del Fe, una bacterioferritina, mientras que para la cepa Bk se subexpresaron 4 proteínas vinculadas a la biosíntesis de porfirinas y metabolismo de Fe (porphobilinogeno sintasa; receptor sideróforo dependiente de TonB; glutamate-1-semialdehyde-2,1-aminomutase; ATP—cob(I)alamin adenosiltransferasa).

IV.4.9 Movilidad

Solo se observaron cambios en proteínas vinculadas a la movilidad en la cepa Bk. En el cocultivo se sobrexpresó la proteína flagelina, constituyente del flagelo bacteriano. Sin embargo, se subexpresó la proteína MotB, constituyente del motor flagelar.

La proteína quimotáctica aceptora de metilos perteneciente a la cepa Bk, que media la quimiotaxis frente a distintas señales, alterando el patrón de desplazamiento, solo fue expresada en el cocultivo AM-Bk (tabla AI.4).

IV.5 Discusión

Cuando dos especies bacterianas se ponen en contacto físico o químico se establecen interacciones entre las mismas, desencadenando cambios fenotípicos (Khan et al., 2018), modulando la estructura y la funcionalidad de las comunidades microbianas (Che & Men 2019). Los consorcios definidos pueden ser utilizados como un modelo para el estudio del efecto de las interacciones sobre los parámetros de la comunidad de una manera controlada y simplificada (Großkofft & Soyer 2014, Dolinsek et al., 2016, Xu et al., 2020). Los consorcios construidos con cepas aisladas del mismo ambiente maximizan la semejanza con la comunidad natural, manteniendo las interacciones seleccionadas por coevolución (Ponomarova & Patil 2014). Las actividades metabólicas de los consorcios microbianos y los procesos ecológicos que ocurren entre sus miembros pueden influir en la eficiencia de degradación de los contaminantes.

En este capítulo se diseñó un cocultivo constituido por las cepas *Sphingobium* sp AM y *Burkholderia* sp Bk, evaluando la eficiencia en la degradación de distintos PAH, ya sea como única fuente de carbono y energía (UFCE) o en mezclas. Estas cepas fueron aisladas a partir de un cultivo de enriquecimiento degradador de fenantreno llamado CON (Festa et al., 2016; Macchi et al., 2021) y fueron seleccionadas en relación con su capacidad degradativa siendo las únicas cepas, dentro de un total de 6 cepas aisladas a partir de CON, capaces de utilizar el fenantreno como UFCE. Se estudiaron, además, los efectos de la interacción de ambas cepas durante la degradación de fenantreno mediante técnicas moleculares (RT-qPCR y metaproteómica).

El cocultivo AM-Bk mostró una alta eficiencia de degradación del fenantreno, que fue significativamente superior a la de los monocultivos de las cepas AM y Bk después de 7 días de incubación, y alcanzó la eliminación total del mismo después de 15 días (Figura IV.3). En trabajos previos la participación de microorganismos pertenecientes a los órdenes Sphingomonadales y Burkholderiales durante la degradación de fenantreno había sido inferida por estudios metaproteómicos realizados sobre CON (Festa et al., 2017). En el presente trabajo la expresión de transcriptos (Figura IV.10 y IV.11) y de enzimas catabólicas (Anexo I, Tabla AI.1 y AI.3)

de las vías alta y baja de la degradación de fenantreno en el cocultivo evidenciaron la participación de ambas cepas en el proceso de degradación.

Con respecto a la acumulación y degradación del intermediario AHN, en el cocultivo AM-Bk se observó un patrón de acumulación que durante los primeros 4 días fue similar al de la cepa AM (Figura IV.3B), lo cual podría estar relacionado con la predominancia de esta cepa durante este período, siendo la responsable del ataque inicial al fenantreno y produciendo de esta manera mayores cantidades de AHN que Bk. A diferencia de los monocultivos, en los cultivos de AM-Bk el AHN no fue detectado después de los 7 días de incubación, lo que demuestra la eliminación completa del mismo. De esta manera el cocultivo no solo mostró una mayor degradación del fenantreno sino también de su metabolito intermediario, el cual se sabe que posee efectos tóxicos (Carney et al., 2008; Macchi et al., 2018; Naduvilpurakkal et al., 2022).

Debido a que los sitios contaminados generalmente poseen mezcla de contaminantes, estudiamos el efecto de la combinación de PAH sobre la eficiencia de degradación de los inoculantes. El cocultivo mostró una eficiencia superior de degradación de dibenzotiofeno, fluoreno y antraceno en comparación a la de los monocultivos cuando estos hidrocarburos se suplementan como UFCE (Figura IV.5, IV.7; Anexo I Figura AI.3). Este mejor desempeño también se observó al analizar la eficiencia de degradación de esos PAH en mezcla con fenantreno.

En este capítulo se muestran distintos efectos posibles de la presencia de mezclas de PAH sobre la eficiencia de degradación tanto en los monocultivos de AM y Bk como en el cocultivo AM-Bk. La mezcla de fenantreno con fluoreno produjo un aumento de la degradación de este último compuesto en los tres cultivos, sin embargo, en ambos monocultivos la degradación de fenantreno se vio reducida (Figura IV.7). Debido a la aparición de picos accesorios en los cromatogramas de estas mezclas (Anexo I, Figura AI.1), hipotetizamos que en monocultivos de la cepa AM la acumulación de metabolitos intermediarios podría estar limitando la degradación de fenantreno. La inhibición en la degradación de la mezcla de fluoreno y fenantreno fue previamente documentada en cultivos de *Sphingomonas* sp. LB126 (van Herwijnen et al., 2003) y en cultivos de *Pseudomonas stutzeri* P-16 y *P. saccharophila* P-15 (Stringfellow & Aitken 1995). En el cocultivo, no obstante, la presencia del fluoreno no afectó la degradación de fenantreno. Para la mezcla de fenantreno y dibenzotiofeno, en cambio, la presencia del fenantreno tuvo un efecto positivo aumentando la eficiencia de degradación del dibenzotiofeno sin tener un efecto sobre la degradación del mismo (Figura IV.5).

Al analizar la dinámica poblacional de las cepas AM y Bk en el cocultivo en ausencia de fenantreno, no se observó un aumento en el número de UFC.ml⁻¹ para ninguno de los PAH analizados (Figura IV.6, IV.8, Anexo I, Figura AI.3), por lo que, en las mezclas el fenantreno estaría sustentando el crecimiento de las cepas AM y Bk. En base a la definición propuesta por Dalton y Starling (1982) la degradación de un sustrato que no permite el crecimiento (“*non-growth*”) en presencia obligada de un sustrato que permite el crecimiento u otro

compuesto transformable se define como **cometabolismo**, mientras que la transformación de los *non-growth* sustratos en ausencia de un cosustrato lo denominan **metabolismo fortuito** (Dalton & Starling, 1979).

El cometabolismo es un proceso clave a la hora de estudiar la efectividad de degradación de los inoculantes en el ambiente ya que la capacidad degradadora se puede ver ampliada por la presencia de otros compuestos. Distintos mecanismos se han propuesto para explicar este fenómeno, entre los cuales se encuentran la inespecificidad de las enzimas vinculadas a la degradación del sustrato que permite el crecimiento y la inducción de enzimas específicas del cosustrato por parte del primero (Nzila, 2013). Estos procesos mencionados están principalmente relacionados a la similitud entre el sustrato y el cosustrato, y han sido documentados para los géneros *Sphingomonas* y *Burkholderia* (Nzila, 2013). Laothamteep et al., (2021) utilizaron como modelo un consorcio definido degradador de pireno, constituido por las cepas *Mycolicibacterium* PO1 y PO2, *Novosphingobium pentaromativorans* PY1 y *Bacillus subtilis* FW1, para estudiar el efecto de la mezcla de distintos PAH con pireno. Observaron que la mezcla de pireno con fenantreno, antraceno y fluoreno facilitaba la degradación de pireno. Por otra parte, el fluoranteno retrasó la degradación de pireno, mientras que su degradación se facilitó. Mediante estudios transcriptómicos observaron que los genes vinculados a la degradación de pireno aumentaron su expresión en la mezcla, mientras que los genes específicos de la degradación de fluoranteno no mostraron diferencias significativas. De esta manera, el aumento de la degradación de fluoranteno sería producto de la inespecificidad de las enzimas relacionadas a la degradación de pireno más que a la inducción de vías específicas de la degradación de fluoranteno.

Si bien nuestros resultados no permiten precisar que mecanismos operan, sí se puede inferir que eventos similares a los resultados de Laotahmeep ocurren en nuestros sistemas. Esto está soportado no solo por los resultados de la degradación sino también por los recuentos (Figura IV.6 y IV.8), donde solo en las mezclas se observó un aumento en las densidades poblacionales de las cepas AM y Bk. Además, estos resultados permiten inferir el rol que cada una posee en la degradación. Por ejemplo, en los sistemas dibenzotiofeno-fenantreno, se observó un marcado crecimiento de la cepa Bk durante todo el período de incubación, mientras que la cepa AM no mostró diferencias con respecto al sistema con dibenzotiofeno como UFCE, por lo cual la cepa Bk tendría un rol predominante en la degradación de este compuesto. Esta idea se ve reforzada también por la información genómica de dicha cepa, la cual posee una región completa con los genes degradadores de dibenzotiofeno (Macchi 2018). Sin embargo, estas inferencias deben ser corroboradas mediante estudios ómicos a fin de develar los mecanismos implicados.

En base a lo expuesto en los párrafos anteriores, la interacción entre las cepas AM y Bk, reflejada por la eficiencia de degradación y la dinámica poblacional, sería dependiente de las condiciones en las cuales se incuban las cepas. Sin embargo, cabe destacar que en todos los sistemas analizados el cocultivo mostró una mayor eficiencia de degradación de los PAH suplementados en comparación a los monocultivos. A la vez, la eficiencia de degradación de fenantreno en AM-Bk no mostró cambios importantes independientemente de

los PAH analizados o sus mezclas con fenantreno (Figura IV.5 y IV.7). De esta manera, el cocultivo mostró mayor robustez que los monocultivos en relación con la degradación frente a las distintas condiciones experimentales analizadas.

Debido al efecto en la eficiencia de degradación, el estudio de las interacciones entre los miembros de los consorcios mediante la aplicación de técnicas ómicas y moleculares (genómica, transcriptómica, proteómica, RT-qPCR, etc.) ha cobrado mayor importancia en el último tiempo (Wanapaisan et al., 2018; Laothamteep et al., 2021; Macchi et al., 2021). A fin de dilucidar el rol que las cepas AM y Bk cumplen en la degradación de fenantreno se realizó un análisis detallado de los transcritos relacionados con la degradación de este compuesto, ya que, como se discutió previamente, fue el único PAH que sustentó el crecimiento de las cepas. En los monocultivos de la cepa AM, el gen *ahdB*, que puede actuar en los pasos 2 y 11 de la ruta de degradación, mostró una sobreexpresión a las 8 horas de incubación (Figura IV.10), cuando la concentración de fenantreno aún es detectable (Figura IV.3), y también se observó una sobreexpresión del gen *xylE* (pasos 22 y 23) a las 72 horas (Figura IV.10), coincidiendo con el aumento de la concentración de los metabolitos intermediarios de la vía baja de degradación (Figura IV.3B). En los monocultivos de la cepa Bk el gen *sal* (paso 14 y 19, Figura IV.11) mostró sobreexpresión a las 8 horas, mientras que los genes *naph*, *biph*, *tol* y *cat*, mostraron sobreexpresión a las 72 horas. Recién a las 24 horas se observó un aumento en la expresión de *naph*, *biph*, *tol* y *cat* en el monocultivo de Bk (Anexo I, Figura AI.2). Esta inducción tardía de la expresión de los genes se correlaciona con el período de latencia observado durante la degradación de fenantreno en el monocultivo de Bk (Figura IV.3), lo cual estaría indicando el tiempo necesario para la transcripción de genes catabólicos vinculados a la ruta de degradación. En el cocultivo AM-Bk se observó sobreexpresión de los 5 genes de Bk analizados (Figura IV.11), lo cual indicaría que la cepa Bk podría participar tanto en la vía alta como en la vía baja de degradación de fenantreno. De manera similar, el gen *ahdB* de la cepa AM, que puede participar en la ruta alta y baja de degradación, también estuvo sobreexpresado en AM-Bk (Figura IV.10). La expresión relativa de los genes de la vía alta de Bk (*naph* y *biph*) y los genes de AM tanto de la vía alta (*ahdA1f*, *ahdC*) como de la vía baja (*ahdB*, *ahdA1d* y *xylE*), mostraron una disminución en relación con los respectivos monocultivos. No obstante, la eficiencia de degradación de AM-Bk fue superior al de los monocultivos.

En el cocultivo constituido por las cepas degradadoras de fenol *Stenotrophomonas* sp. N5 y *Advenella* sp. B9 se observó la inducción de distintas dioxigenasas pertenecientes a ambas cepas durante la degradación de fenol (Li et al., 2020). La enzima fenol hidroxilasa (una enzima clave en degradación de fenol) presente en los monocultivos de N5 no se expresó en el cocultivo, sin embargo, esta cepa mostró un incremento en la expresión de enzimas vinculadas a la degradación de catecol (metabolito intermediario de la degradación de fenol). Por otra parte, la monooxidasa producida por la cepa B9 mostró cambios ligeros con respecto al monocultivo. En el cocultivo se observó un aumento de la degradación de fenol, por lo que estos autores proponen que cuando las cepas se cocultivan se produce división de trabajo, donde la cepa B9 comenzaría la

degradación del fenol mediante hidroxilación, y la cepa N5 utilizaría principalmente los metabolitos intermediarios más fácilmente asimilables, lo cual explicaría el efecto sinérgico observado en la degradación (Li et al., 2020). De manera semejante, nuestros resultados también mostraron una subexpresión de los genes de la vía en Bk en el cocultivo, mientras que los genes de la vía baja no mostraron diferencias significativas con respecto al monocultivo de Bk (Figura VI.11)

En un trabajo previo de nuestro laboratorio (Macchi et al., 2021) se diseñaron dos consorcios degradadores de fenantreno a partir de las cepas aisladas de CON. Uno de los consorcios, denominado CS-1, estaba conformado por la cepa AM, a la cual se le sumaba la cepas *Pseudomonas* Bc-h y T, *Klebsiella aerogenes* B e *Inquilinus limosus* Inq, mientras que el otro consorcio estaba constituido por las mismas cepas a las cuales se suma la cepa Bk. En base a los estudios genómicos, las cepas Bc-h, T, Inq y B también poseen genes vinculados a la ruta de degradación, y se corroboró la utilización de los intermediarios metabólicos AHN, catecol y 2,3 dihidroxibifenilo por parte de las cepas Inq, Bc-h y T, sin embargo, ninguna de estas cepas es capaz de utilizar fenantreno como UFCE (Macchi et al., 2021). Ambos consorcios mostraron una alta eficiencia de degradación de fenantreno, alcanzando la remoción total del mismo después de 7 días de incubación; el CS-4 mostró un porcentaje de degradación de fenantreno significativamente superior al CS-1 a los 3 días de incubación. Al analizar la producción y degradación de AHN, ambos sistemas logran la máxima acumulación alrededor del día 4, no obstante, en los cultivos de CS-1 se logró la eliminación completa luego de 7 días mientras que en los cultivos de CS-4 se observó una concentración remanente de AHN (Macchi et al., 2021). Al analizar la estructura de los consorcios, en ambos se observó una predominancia del orden Pseudomonadales y Sphingomonadales, pero en CS-4 a lo largo del período de incubación se observó un aumento marcado del orden Burkholderiales. Este comportamiento también fue observado en CS AM-Bk, donde durante el período de incubación se observó un incremento en el número de UFC, alcanzando densidades poblacionales similares a las de AM (Figura IV.4).

El empleo de técnicas metaproteómicas permite la confirmación de las funcionalidades mediante la cuantificación de las proteínas, el producto funcional de la expresión génica (Chingell et al., 2017). Esta relación con la funcionalidad del sistema posiciona a los enfoques metaproteómicos como una aproximación apropiada para responder preguntas ecológicas relacionadas al rol de las especies y a las interacciones entre ellas (Siggins et al., 2012). Nuestros resultados metaproteómicos mostraron que muchas rutas metabólicas experimentaron modificaciones en la expresión de proteínas entre el cocultivo AM-Bk y los monocultivos (Figura IV.12 y IV.14). En relación con las enzimas vinculadas a la degradación de compuestos aromáticos, se observó una disminución en la expresión en el cocultivo AM-Bk durante la degradación de fenantreno con respecto a los monocultivos. La subexpresión de las proteínas relacionadas a la degradación de xenobióticos es consistente con los resultados previamente comentados para la expresión génica (Figura IV.10 y IV.11), donde enzimas tanto de la vía alta como baja mostraron subexpresión. En relación con el rol, todas las proteínas

subexpresadas de AM en el cocultivo pertenecen a la vía baja de degradación (Figura IV.9, Anexo I, Tabla AI.1), mientras que para Bk se observó subexpresión tanto de enzimas de la vía alta (ej: bifenil 2,3 diol 1,2-dioxigenasa) como de la vía baja (ej: antranilato 1,2 dioxigenasa). La subexpresión de la bifenil 2,3 diol 1,2 dioxigenasa concuerda con los resultados observados en los ensayos de RT-qPCR donde se observó una subexpresión de *biph* en AM-Bk con respecto al monocultivo de Bk.

En el trabajo de Macchi et al., (2021) también se analizaron las proteínas expresadas por ambos consorcios CS-1 y 4 durante la degradación de fenantreno. En relación con las proteínas vinculadas con la degradación de PAH, varias proteínas pertenecientes a las cepas T, Bc-h, B e Inq mostraron abundancias relativas menores en CS-4 con respecto a CS-1), mientras que las proteínas pertenecientes a AM mostraron abundancias significativamente superiores en CS-4. Debido a la incapacidad de eliminación completa del AHN por parte del CS-4, sumado a la subexpresión de enzimas vinculadas a la degradación de compuestos aromáticos, ese trabajo propuso una modulación negativa entre la cepa Bk y las restantes cepas del consorcio (AM, Bc-h, B, T e Inq).

Los resultados de esta tesis permitieron profundizar el estudio de la relación entre las cepas AM y Bk, las cuales durante la degradación de fenantreno logran la eliminación total tanto del fenantreno como del AHN (Figura IV.3). Según estos datos, los resultados obtenidos por Macchi en CS-4 podrían atribuirse a interacciones competitivas entre las cepas T, Bc-h, B e Inq y Bk, las cuales estarían compitiendo por los productos metabólicos liberados por AM mientras que, sobre esta última, Bk favoreció la expresión de proteínas vinculadas a la degradación.

Otros autores estudiaron la eficiencia de degradación de hidrocarburos por parte de consorcios microbianos con distinto número de especies en medio líquido, y observaron que los consorcios más numerosos fueron los más eficientes (Ghazali et al., 2004, Shankar et al., 2014). Los resultados aquí expuestos mostrarían que la eficiencia de degradación no necesariamente está vinculada con un aumento de la diversidad de los consorcios, sino también con las relaciones entre sus miembros, las cuales afectan su eficiencia.

En base al modelo de Tillman de recursos y coexistencia ("resource-ratio"), se espera que la cepa capaz de utilizar más rápido el recurso, disminuyendo la disponibilidad del mismo, excluya al otro miembro del cocultivo. Sin embargo, nuestros resultados mostraron la coexistencia de ambas cepas durante todo el período analizado (Figura IV.4). Esto puede ser resultado del modo en el cual los microorganismos utilizan los recursos. Cuando una bacteria consume un recurso generalmente libera productos metabólicos, lo cual permite la coexistencia con las especies menos competitivas que puedan aprovechar eficientemente este nuevo nicho (Dolinsek et al., 2016; Pascual García et al., 2020).

De acuerdo con los resultados de este capítulo, la subexpresión tanto de transcriptos (Figura IV.10 y IV.11) como de proteínas (Figura IV.13 y IV.15), sumada a la coexistencia de ambas cepas en el tiempo (Figura IV.4) y al aumento en eficiencia en la degradación de fenantreno y AHN del cocultivo frente a la de los monocultivos

(Figura IV.3), sustenta la idea de la existencia de cooperación metabólica mediante “*cross-feeding*” entre las cepas. Si bien ambas cepas son capaces de degradar este compuesto, cuando se las cocultiva, la cepa AM tendría un rol predominante en los primeros pasos de la degradación mientras que la cepa Bk tendría un rol más activo en la vía baja de degradación. Esta idea está respaldada por el hecho de que en el monocultivo de Bk no se observó degradación de fenantreno durante el día 1 de incubación, mientras que el monocultivo de AM y el cocultivo AM-Bk alcanzaron un 45% y 55% de degradación respectivamente, y por el patrón de acumulación de AHN en el cocultivo, comentado previamente (Figura IV.3). Adicionalmente, en base a resultados previos (Macchi et al., 2021), la cepa Bk es capaz de utilizar los intermediarios metabólicos ácido salicílico y 2,3-dihidroxibifenilo, mientras que la cepa AM no es capaz de utilizar estos metabolitos exógenos cuando se los suplementa como UFCE. Cabe destacar que la enzima 1,6-dihidroxiclohexa-2,4-diene-1-carboxilato deshidrogenasa perteneciente a Bk solo se expresó en el monocultivo de la misma (Anexo I, Tabla AI.4), esta enzima puede actuar en los pasos 2 y 11 de la ruta de degradación de fenantreno. La ausencia de expresión de esta enzima en el cocultivo junto con la sobreexpresión del gen *ahdB* de la cepa AM, que actúa en los mismos pasos, representa otra evidencia de que ambas cepas son activas durante la degradación.

Este tipo de interacción entre AM y Bk podría definirse como una relación unidireccional (“*by-product cross-feeding*” de acuerdo con De Souza et al., 2018), donde no hay un gasto de energía adicional en la producción del metabolito por parte de AM. Ecológicamente, este tipo de interacción es equivalente al **comensalismo** (De Souza et al., 2018). De esta manera, se observa **división de trabajo *sensu lato*** mediante la compartimentalización de las funciones. En base a los criterios definidos por Giri et al., (2019), la relación unidireccional no se encuentra incluida dentro de la definición *sensu stricto* de división de trabajo que ellos proponen, ya que no cumple con la propiedad de que el fitness de todos los miembros involucrados se ve aumentado (en nuestro caso, el número de células de AM no se vio aumentado en AM-Bk, Figura IV.4). Sin embargo, el aumento en la eficiencia de degradación tanto de fenantreno como de AHN (producto metabólico tóxico de la degradación) permite extrapolar los principios básicos que operan en la división de trabajo en sentido amplio.

Cuando diversas reacciones bioquímicas tienen lugar en un mismo ambiente intracelular pueden surgir incompatibilidades entre las reacciones a nivel molecular (Giri et al., 2019). La separación de los procesos bioquímicos en diferentes bacterias permite reducir el conflicto generado por la distribución de los recursos celulares (ATP, precursores metabólicos, el uso de la maquinaria celular para la transcripción/traducción) (De Souza et al., 2018), reduciendo así la carga metabólica de las distintas especies, la cual permite acelerar la degradación de compuestos inhibitorios e incrementar la resistencia a compuestos tóxicos (De Souza et al., 2018; Giri et al., 2019; Roell et al., 2019; Rafieenia et al., 2022). Este fenómeno de especialización metabólica fue experimentalmente corroborado en *Escherichia coli* (Rosenzweig et al.1994; Treves, Manning and Adams 1998). En estos ensayos a partir de una población de *E. coli* degradadora de glucosa, se observó la

especialización metabólica, en donde dos genotipos coexisten, uno que consume glucosa más eficientemente y otro que consume acetato más eficientemente (metabolito producto de la degradación de glucosa). Cuando estos dos genotipos se ensamblan juntos, se alcanza una mayor biomasa en comparación al cultivo parental (Bernstein, Paulson and Carlson 2012). Este modelo es aplicado para estudiar los procesos evolutivos que ocurren en la naturaleza, donde el resultado de la evolución es la reducción del solapamiento de nicho y la competencia, permitiendo la coexistencia de las especies (Dolinsek et al., 2016).

A fin de tener una mayor comprensión de la respuesta de cada cepa durante el cocultivo, se analizó el comportamiento de proteínas no directamente relacionadas a la degradación de xenobióticos. En el caso de la cepa AM en cocultivo, la sobreexpresión de la chaperona ClpB, cuya función está vinculada a la prevención de conglomeración proteica, indicaría que esta cepa estaría en fase estacionaria (Schramm et al., 2019). Adicionalmente, se observó la subexpresión de la histidinofosfotransferasa ChpT, que participa en la regulación del ciclo celular (Fioracanti et al., 2012). Estos resultados concuerdan con los observados en la Figura IV.4, donde no se observaron cambios en el número de UFC de AM a lo largo del tiempo. Para la cepa Bk en cocultivo, se observó sobreexpresión de 3 proteínas vinculadas a la división celular, involucradas en la producción de peptidoglicano, transcripción y citoquinesis; estos resultados concuerdan con el aumento del número de células de Bk durante este período observado en la Figura IV.4

En el cocultivo, varias proteínas de AM y Bk relacionadas al estrés celular se encontraron subexpresadas con respecto a los monocultivos (Figura IV.13 y IV.15, Anexo I, Tabla AI.1 y AI.3). Entre las proteínas de AM vinculadas al estrés celular, se subexpresó en el cocultivo el regulador PhyR, un modulador de respuesta general al estrés a través de la activación de histidin-quinasas en alfaproteobacterias.; este regulador modula la expresión de enzimas tales como la glutatión S-transferasa y la alcano reductasa (Gottschilch et al., 2019) relacionadas a la protección frente al estrés oxidativo, las cuales también mostraron subexpresión en AM-Bk. La expresión de enzimas vinculadas a la respuesta frente a especies reactivas del oxígeno (ROS) está correlacionada a la degradación bacteriana de PAH, ya que su expresión resulta como consecuencia de la actividad de las enzimas involucradas en la degradación de compuestos aromáticos (Santos et al., 2004; Macchi et al., 2018).

La subexpresión de enzimas vinculadas al estrés también se observó en la cepa Bk en AM-Bk en comparación al monocultivo. Entre ellas se encontraron la proteína protectora del ADN de la fase estacionaria/inanición, la peroxidasa, y la proteína de resistencia al peróxido de hidrógeno orgánico, las cuales están directamente asociadas con el estrés oxidativo (Almiron et al., 1992, Molina & Segura 2021). También se observó la subexpresión de proteínas relacionadas a la respuesta frente al estrés general, como la transposasa (Vandecraen et al., 2017; Vigil-Stenman et al., 2017) y al estrés osmótico, como el efector ProP.

La subexpresión de proteínas relacionadas al estrés oxidativo durante la degradación de contaminantes (4-clorosalicilato) fue previamente documentada en un cocultivo conformado por *Pseudomonas reinekei* MT1 y

Achromobacter xylosoxidans MT3 en comparación con el monocultivo de *P. reinekei*, donde el cocultivo no mostró acumulación de un metabolito intermediario tóxico (Fazzini et al., 2010). De manera similar la subexpresión de enzimas vinculadas al estrés celular en el cocultivo AM-Bk estaría relacionada con el aumento en la remoción de AHN. Así, durante el cocultivo, la respuesta común en las cepas AM y Bk, relacionada a la subexpresión de las proteínas vinculadas a la degradación de xenobióticos y al estrés celular, refuerzan el concepto de división de trabajo, donde la compartimentalización de las funciones no solo implica un menor gasto en la biosíntesis de enzimas vinculadas a las respectivas rutas de degradación, sino que también reduce la respuesta al estrés (p.ej: menor producción de especies reactivas al oxígeno), lo cual tiene como consecuencia un aumento en la eficiencia del cocultivo (Zhang & Wang 2016; Bhatt et al., 2021).

En este capítulo se demostró el impacto de las interacciones entre microorganismos sobre los procesos de biodegradación. El cocultivo AM-Bk mostró un aumento en la degradación de los distintos PAH analizados en comparación a los monocultivos y se observó que la naturaleza de los PAH presentes en el sistema tiene influencia en la eficiencia del proceso, ya sea por estimulación o inhibición de la degradación de los contaminantes. El cocultivo mostró una mayor **robustez** frente a las mezclas de PAH analizadas, demostrando el efecto de las propiedades emergentes a nivel comunitario que se establecen entre AM y Bk, las cuales resultan en más que la suma de las propiedades individuales de dichos monocultivos. Durante el cocultivo se establecería **división de trabajo** entre AM y Bk mediante **“cross-feeding”** y la compartimentalización de funciones. La cepa AM predominaría en los pasos iniciales de la degradación mientras que la cepa Bk tendría una actividad predominante en los pasos de la vía baja de degradación, lo cual tiene como consecuencia la **coexistencia** de ambas cepas, la **carga metabólica** en cada cepa estaría reducida lo cual permite el establecimiento de relaciones **sinérgicas**, aumentando la eficiencia de degradación. Por todo esto, el cocultivo AM-Bk representa un buen candidato para ser utilizado como inoculante en procesos de bioaumento para la remediación de suelos contaminados con PAH.

Capítulo V

Estudio de la inoculación con distintos consorcios degradadores de PAH sobre un suelo contaminado con hidrocarburos en forma aguda



V. Estudio de la inoculación con distintos consorcios degradadores de PAH sobre un suelo contaminado con hidrocarburos en forma aguda

El estudio de los consorcios degradadores en medio líquido es una herramienta valiosa para caracterizar la eficiencia de degradación de estos potenciales inoculantes, y estudiar las interacciones entre sus miembros. Luego resulta imprescindible el estudio de la inoculación de estos consorcios en matrices ambientales, en nuestro caso suelo, para conocer su desempeño. Después de la introducción, el inoculante debe superar las barreras bióticas y abióticas de este nuevo ambiente para poder establecerse y ser eficiente en la remoción de los contaminantes. La relación entre el inoculante y la comunidad microbiana nativa puede ser determinante en la eficiencia del bioaumentación, ya que las interacciones competitivas pueden limitar el establecimiento del inoculante, y éste puede a su vez tener un impacto en la estructura de la comunidad nativa, pudiendo afectar la funcionalidad de la misma.

En el presente capítulo se estudió el efecto de la inoculación de distintos consorcios degradadores de PAH sobre la eficiencia de degradación de contaminantes en un suelo con contaminación aguda, y la respuesta de la comunidad nativa a la inoculación.

Para tal fin, se seleccionó un suelo no contaminado (SP) franco-arcilloso proveniente del Parque Pereyra, provincia de Buenos Aires. El mismo fue contaminado con una mezcla de PAH (600 mg de fenantreno, 150 mg de fluoreno, 150 mg de pireno y 100 mg de antraceno por Kg de suelo seco). A partir de este suelo artificialmente contaminado, se prepararon microcosmos que fueron tratados con tres inoculantes distintos:

- CS AM-Bk constituido por las cepas *Sphingobium* sp. AM y *Burkholderia* sp. Bk
- CS-1 constituido por las cepas *Sphingobium* sp. AM, *Pseudomonas* sp. Bc-h y T, *Inquilinus limosus* Inq y *Klebsiella aerogenes* B
- CS-4 constituido por las cepas *Sphingobium* sp. AM, *Burkholderia* sp Bk, *Pseudomonas* sp. Bc-h y T, *Inquilinus limosus* Inq y *Klebsiella aerogenes* B.

En CS AM-Bk la proporción de las cepas es 65:35 AM-Bk, mientras que tanto en CS-1 como CS-4 todas las cepas integrantes están en igual proporción. Se inocularon 5×10^7 UFC de cada consorcio por g de suelo seco por separado y se incubó cada sistema por 58 días. El suelo prístino sin contaminación (SP) y el suelo contaminado con la mezcla de PAH (SP+PAH) sin inocular fueron utilizados como controles.

V.1 Degradación de los PAH suplementados

Se determinó la concentración remanente de los PAH suplementados (fluoreno, fenantreno, antraceno y pireno) al tiempo inicial y a los 15, 30 y 58 días de incubación en los microcosmos inoculados con los consorcios AM-Bk, CS-1 y CS-4, así como en SP+PAH (control contaminado sin inocular).

La Figura V.1 muestra la concentración de los PAH suplementados durante los 30 días de incubación. Se excluyeron el control sin contaminar (Control) y el día 58 de todos los tratamientos, ya que la concentración de los PAH se encontró por debajo del límite de detección.

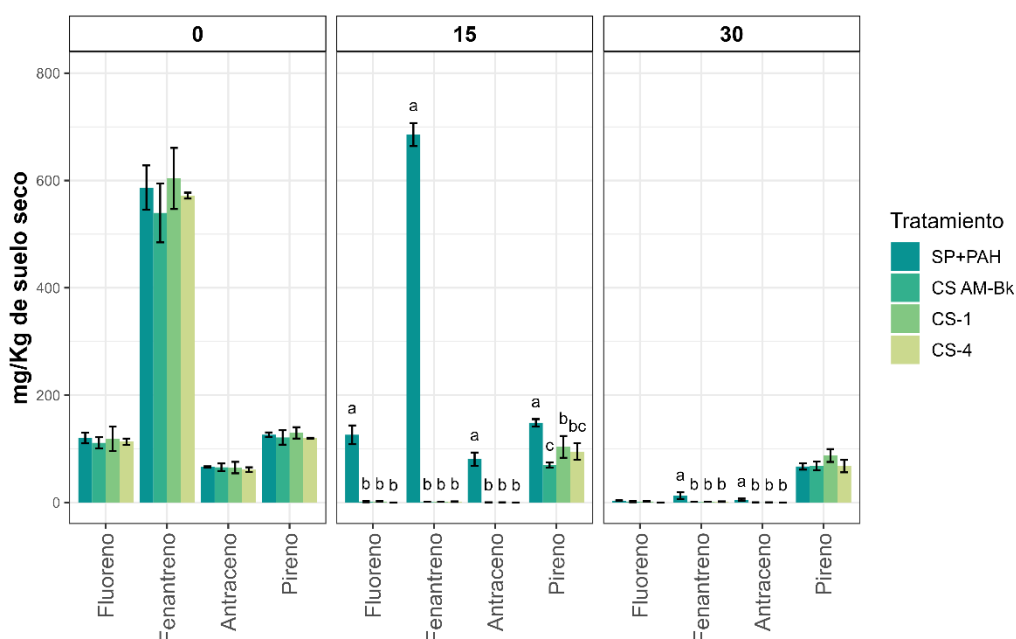


Figura V.1: Concentración de los PAH suplementados expresada como mg/Kg de suelo seco al día 0 (A) y al día 30 (B) de incubación en los microcosmos inoculados y en el control contaminado (SP+PAH). Se muestran los promedios de triplicados independientes con sus respectivos desvíos estándar.

Al día 15 se observó una disminución significativa ($p < 0,05$) de todos los PAH suplementados en los microcosmos inoculados. La eliminación de fluoreno, antraceno y fenantreno fue mayor al 99%, y no hubo diferencias significativas entre estos microcosmos. En relación con la degradación de pireno se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$), siendo mayor en los inoculados con CS AM-Bk, donde se alcanzó un 42% de degradación en comparación con los inoculados con CS-1 (19%). En SP+PAH no se observó degradación de ninguno de los PAH suplementados a los 15 días de incubación.

Recién a los 30 días de incubación, SP+PAH mostró degradación de los PAH suplementados, alcanzando la eliminación completa de fluoreno, un 97% de degradación de fenantreno, un 92% de antraceno y 46% de

pireno. En este tiempo, los microcosmos inoculados mostraron una mayor degradación ($p < 0,05$) de fenantreno y antraceno (valores de concentración menores a $1 \text{ mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$ de suelo seco) con respecto a SP+PAH, donde se observó una concentración remanente de $12,5 \text{ mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$ de suelo seco para el fenantreno y de $5,14 \text{ mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$ de suelo seco para el antraceno. En cuanto a la degradación de fluoreno y pireno no hubo diferencias significativas entre los microcosmos inoculados y SP+PAH a los 30 días de incubación.

Al final del período de incubación (día 58), la concentración de PAH se encontró por debajo del límite de detección.

V.2 Dinámica poblacional y cuantificación de genes específicos mediante qPCR

Con el fin de evaluar la dinámica de la comunidad bacteriana, se cuantificó el número de copias del gen 16S rARN. Además, para estimar el potencial degradador de PAH de la comunidad en los microcosmos, se estudió el número de copias de genes específicos relacionados a la degradación de PAH. Se seleccionaron dos genes involucrados en la vía alta y baja de las rutas de degradación de compuestos aromáticos. El gen PAH-RHD α -GN, que codifica la subunidad alfa de enzimas hidroxilantes de anillo aromático de bacterias Gram negativas, actúa en los primeros pasos de la ruta de degradación aeróbica de compuestos aromáticos (paso 1 de la ruta de degradación, Figura IV.9). El gen C230 codifica la enzima catecol dioxigenasa, que actúa en el metaclivaje del catecol (un metabolito común a muchas rutas de degradación de distintos PAH) (paso 22 y 23, Figura IV.9).

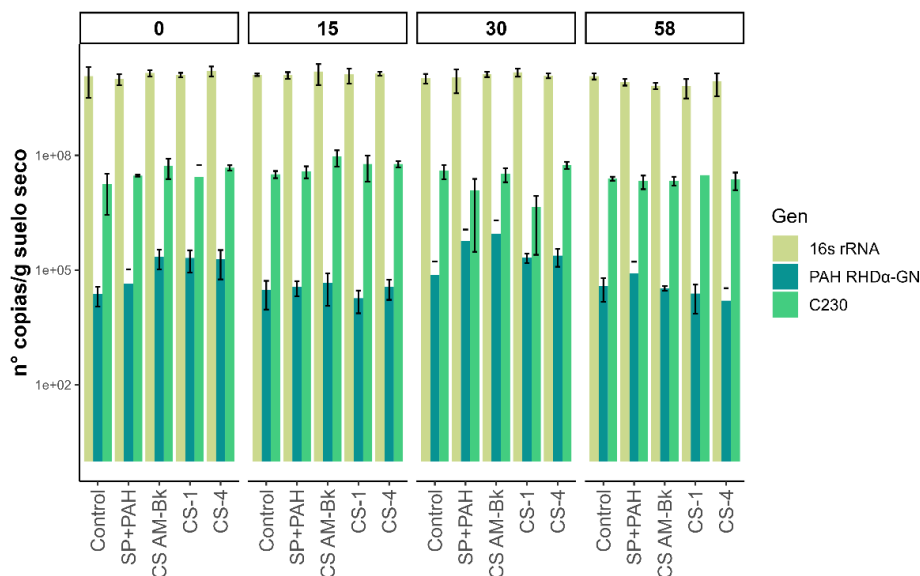


Figura V.2: Número de copias por gramo de suelo seco para el gen 16S rARN y genes específicos PAH RHD α -GN y C230, en los microcosmos inoculados a los distintos tiempos de incubación. Se muestran los promedios de triplicados con sus respectivas desviaciones estándar.

La figura V.2 muestra el número de copias por gramo de suelo seco para cada uno de los genes cuantificados a los distintos tiempos muestreados.

El número de copias del gen 16s rARN para todos los microcosmos fue del orden de 10^9 - 10^{10} copias/g de suelo seco, sin mostrar grandes variaciones a lo largo del tiempo. De manera similar, el número de copias del gen C230 fue alrededor del orden de 10^7 copias/g suelo seco, sin mostrar variaciones temporales ni entre los sistemas. Con respecto al gen PAH-RHD α GN, el número de copias al tiempo inicial fue mayor en los microcosmos inoculados (del orden de 10^5), siendo aproximadamente un orden mayor al observado en el Control y a SP+PAH (del orden de 10^4). Sin embargo, a los 30 días de incubación se observó un aumento del número de copias de este gen en el control SP+PAH, alcanzando valores similares a los microcosmos inoculados (del orden 10^5). A los 58 días de incubación, se observó un descenso en el número de copias de este gen en todos los microcosmos, llegando a valores del orden de 10^4 copias/g de suelo seco.

Con el objetivo de normalizar las variaciones en el número de copias de los genes específicos, se expresó la relación porcentual entre el número de copias del gen específico con respecto al 16S rARN. La figura V.3 muestra la relación gen específico/gen 16S rARN a lo largo del tiempo para los distintos tratamientos. No se observó un patrón en la relación gen C230/gen 16S rARN ni a lo largo del tiempo ni entre tratamientos. Sin embargo, se observó que en los microcosmos inoculados la relación gen PAH-RHD α GN/16S rARN es mayor con respecto al control y a SP+PAH al tiempo inicial de incubación; mientras que para el día 30 la relación aumentó en SP+PAH igualando a la de los sistemas inoculados. Al final del período de incubación esta relación fue similar para todos los sistemas.

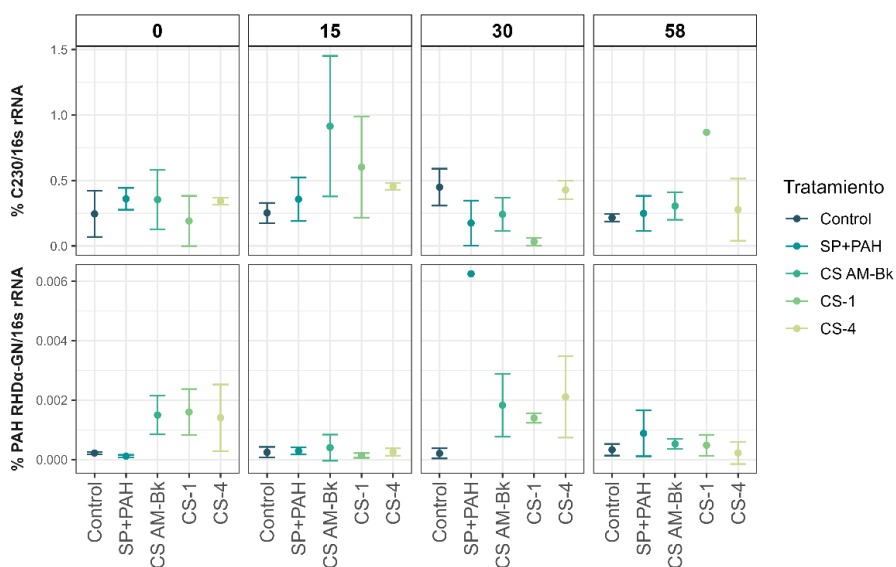


Figura V.3: Relación porcentual entre el número de copias del gen específico (gen C230 o gen PAH RDH α -GN) y el número de copias del gen 16S rARN para los microcosmos inoculados y los controles. Se grafican los promedios de duplicados con sus respectivas desviaciones estándar.

V.3 Análisis de la diversidad de la comunidad microbiana

Se estudió el efecto de la inoculación en la estructura de la comunidad bacteriana durante el proceso de bioaumentación en el suelo con contaminación aguda. Con tal fin, se realizó la secuenciación masiva de la región hipervariable V4 (515R-806F) del gen 16S rARN, utilizando la plataforma de secuenciación Illumina Novaseq 6000, de las muestras de los días de incubación 15 y 58 de los sistemas inoculados, sus respectivos controles, y la muestra del sistema Control al día 0.

Las secuencias fueron analizadas utilizando el paquete de análisis QIIME2 2022.2 y el paquete dada2 para inferir ASVs (amplicon sequence variants). Luego de los pasos de limpieza, filtrado y denoising se obtuvieron un total de 937697 secuencias y 2394 ASVs finales.

Para evaluar si la cobertura alcanzada en las muestras fue suficiente para cubrir la diversidad de las mismas, se calculó el índice de Good, cuyo valor se acerca a 1 cuando las secuencias obtenidas representan la mayoría de las secuencias presentes en la muestra. Las muestras analizadas mostraron valores superiores a 0,99 (Anexo II, Tabla AII.1). Este resultado coincide con el obtenido por las curvas de rarefacción mostradas en la figura V.4. Ambos resultados mostraron que la profundidad de secuenciación fue suficiente para cubrir la mayor parte de la diversidad de las muestras.

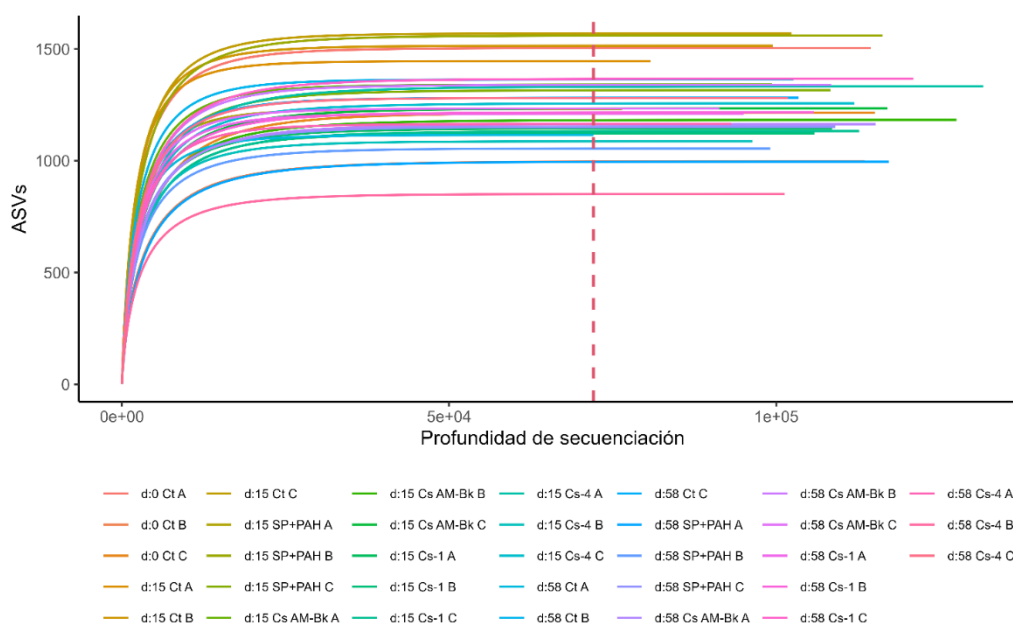


Figura V.4: Curvas de rarefacción de las muestras analizadas, donde se muestra el número de ASVs observados en relación con la profundidad de secuenciación. La línea roja punteada indica el número de secuencias utilizado como punto de corte para la rarefacción de las muestras.

Para poder estudiar y comparar la diversidad alfa y beta, las muestras fueron rarefaccionadas a una profundidad de 72046. Para evaluar diversidad alfa, se seleccionaron los índices de Chao1, Shannon y Faith. El índice de Chao1, como estimador de la riqueza de la muestra mostró valores promedio entre 1067 y 1510. A los 15 días de incubación se observaron diferencias significativas entre los microcosmos inoculados y el control (ANOVA, $p=0.018$, p -ajust: BH), mientras que al final del período de incubación no se observaron diferencias significativas entre los microcosmos analizados.

El índice de Shannon permite estimar la diversidad de las muestras teniendo en cuenta, no solo el número de ASVs sino también la abundancia relativa de los mismos. Para las muestras analizadas, éste tomó valores 7,52 y 9,39 al día 15 de incubación, el control mostró valores significativamente superiores de diversidad (ANOVA, $p=0.0058$, p -ajust: BH) con respecto a los sistemas contaminados, sin embargo, al final del período de incubación, no se observaron diferencias entre los microcosmos analizados. Se observó una disminución significativa del valor del índice de Shannon en el control al día 58 con respecto al día 15 de incubación, mientras que en el resto de los sistemas no se observaron cambios en los tiempos analizados.

El índice de Faith, considera además la distancia filogenética entre las especies. Este índice tomó valores entre 198 y 257 en las muestras analizadas. Al día 15, los sistemas inoculados mostraron valores significativamente menores (ANOVA, $p=0.004$, p -ajust: BH) con respecto al control y a SP+PAH. De manera similar al comportamiento de los índices previamente descritos, a los 58 días de incubación no se observaron diferencias entre los sistemas.

La estimación de la beta diversidad se realizó utilizando el método de disimilitud de Bray-Curtis a nivel de ASV. La figura V.6 muestra el análisis de coordenadas principales (PCoA) generado a partir de la matriz de disimilitud utilizando el método mencionado. La proximidad en el espacio de los puntos (muestras) en la figura refleja la similitud entre ellos. La variación explicada por el eje principal fue del 26,1% y la del eje secundario del 14,8%, logrando explicar más de un 40% de la variación.

A los 15 días de incubación, se puede observar mayor proximidad por un lado entre los microcosmos inoculados, y por otro entre los sistemas control y control SP+PAH. Sin embargo, a los 58 días de incubación, el control SP+PAH se aproximó más a los microcosmos inoculados, alejándose del control sin contaminar. Se observaron diferencias significativas en la composición de la comunidad tanto a nivel de tiempo (adonis2, $p<0.001$, n° permutaciones 999) como a nivel de tratamiento (adonis2, $p<0.001$, n° permutaciones 999).

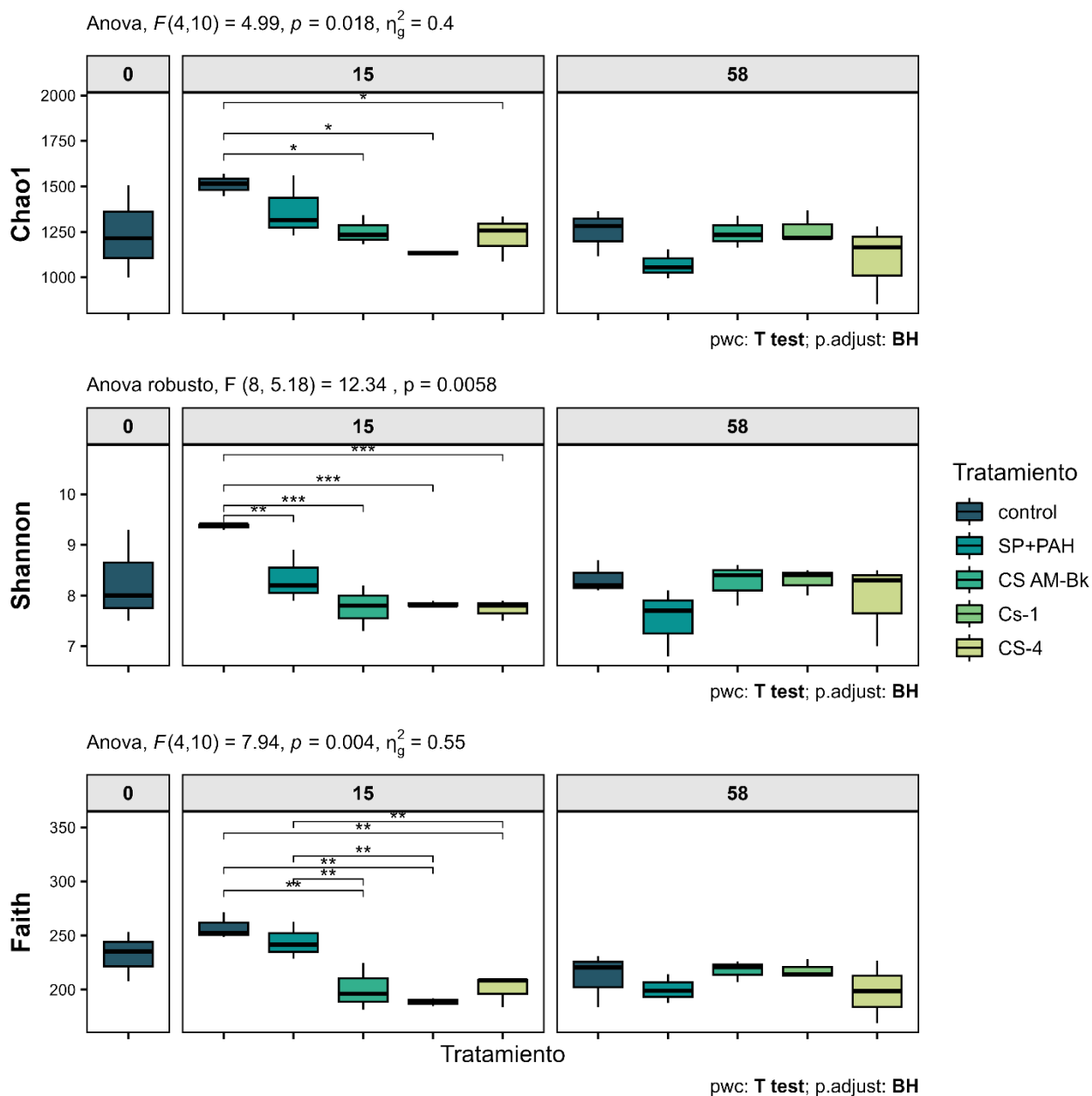


Figura V.5: Alfa diversidad. Índices de Chao1, Shannon y Faith a los 0 (Control), 15 y 58 días de incubación. Se muestran los resultados de los triplicados de cada sistema.

El análisis de comparaciones entre los tratamientos mostró diferencias significativas entre los microcosmos inoculados y los controles (pairwiseadonis2, $p > 0.05$, n° permutaciones 999); también se observaron diferencias significativas entre los microcosmos inoculados con CS AM-Bk y CS-1, mientras que los inoculados con CS-4 no mostraron diferencias significativas con respecto a CS-1 ni a CS AM-Bk. Además, SP+PAH fue significativamente diferente del control sin contaminar (pairwiseadonis2, $p < 0.05$, n° permutaciones 999).

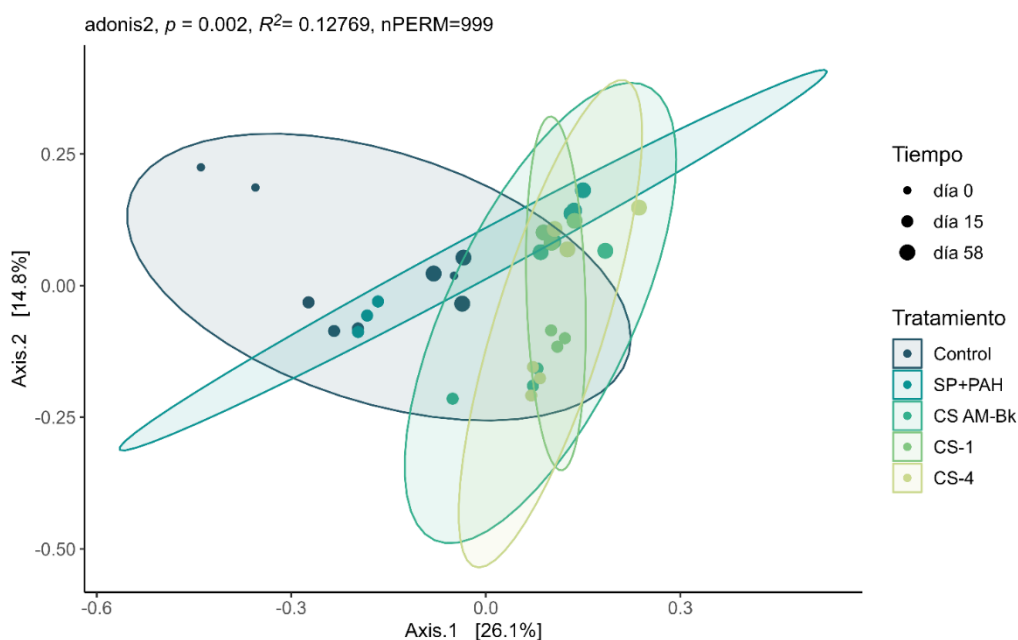


Figura V.6: Análisis de componentes principales (PCoA) construido a partir de la matriz de distancia utilizando el método de Bray-Curtis para la comparación de los microcosmos analizados a los distintos tiempos de incubación. Se muestran los dos ejes principales que explican la mayor parte de la variabilidad. El tamaño de los puntos indica el tiempo de incubación, mientras que los colores representan los distintos tratamientos.

La figura V.7 muestra los diagramas de Venn generados a partir de los ASVs cuya prevalencia fue mayor al 0.5, a los 15 y 58 días de incubación, donde se muestran el número de ASVs compartidos por los distintos microcosmos. Se observó un gran número de ASVs compartidas entre todos los microcosmos, 66 a los 15 días (24.5%) y 74 a los 58 días de incubación (32%). Los microcosmos inoculados con CS AM-Bk y CS-4 mostraron pocos ASVs exclusivos (menor al 2% en ambos tiempos), mientras que los microcosmos inoculados con CS-1 mostraron 19 ASVs exclusivos (7,06%) a los 15 días de incubación, disminuyendo a 7 ASVs (3.09%) a los 58 días de incubación. Con respecto a los controles, el control sin contaminar es el sistema que más ASVs propios tuvo tanto al día 15 (21,6%) como al día 58 de incubación (21,3%). En SP+PAH, por su parte, el número de ASVs exclusivo se mantuvo constante a lo largo del tiempo, 12 ASVs (5,22%). Sin embargo, a los 15 días de incubación, 26 ASVs fueron compartidos exclusivamente por ambos controles, representando el 9,67% de los ASVs totales, mientras que al día 58 se compartió un solo ASV (0,44%). Con respecto a los ASVs compartidos exclusivamente con los microcosmos inoculados, se observó un comportamiento opuesto, en donde a los 15 días de incubación solo se compartieron 9 (3.35%) ASVs mientras que a los 58 días de incubación se compartieron 23 (10%).

Día 15

día 58

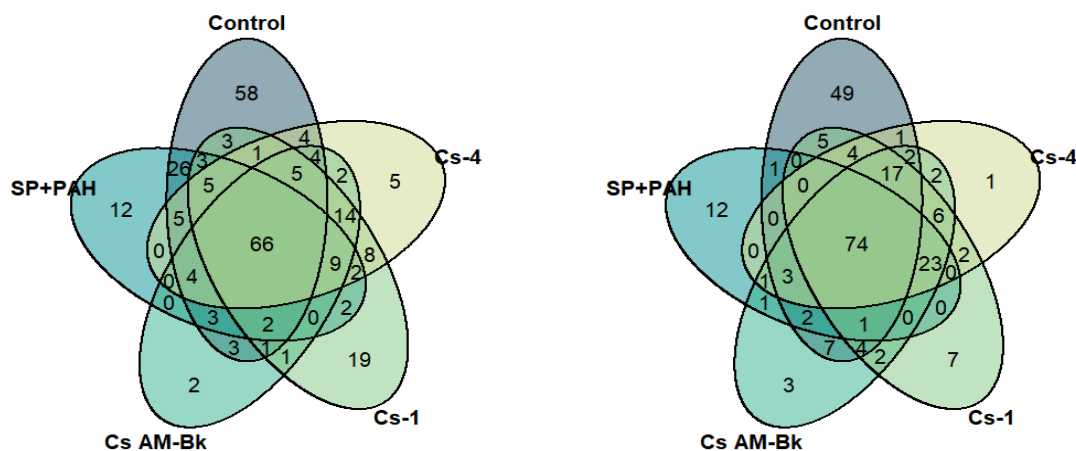


Figura V.7: Diagramas de Venn mostrando el número de ASVs mayoritarias (prevalencia 0.5) compartida por los distintos microcosmos a los 15 y 58 días de incubación.

V3.1 Estructura de la comunidad microbiana de los microcosmos a nivel de Filo y Orden

Se estudiaron los cambios en la estructura de la comunidad bacteriana en los microcosmos analizados a los 15 y 58 días de incubación. La figura V.8 muestra la abundancia relativa de los órdenes microbianos observados a los distintos tiempos de incubación (Anexo II, Tabla AII.3).

Al tiempo inicial se identificaron 5 filos predominantes en todos los microcosmos analizados, siendo mayoritario el filo Proteobacteria (32%), seguido por Actinobacteriota (15%) y Acidobacteriota (7%) y Verrucomicrobiota (6%). A los 15 días de incubación, esta estructura se mantuvo en los sistemas inoculados, observándose un aumento del filo Proteobacteria, que alcanza valores del 50%, mientras que en el microcosmos SP+PAH llegó al 37%, y en el control representó el 21%, teniendo una abundancia relativa similar a Actinobacteriota, que alcanzó valores de 22%.

Dentro del filo Proteobacteria, el orden Burkholderiales fue mayoritario en los microcosmos inoculados con CS AM-Bk (23%), CS-4 (24%) y en SP+PAH (20%). En los microcosmos inoculados con CS AM-Bk y CS-4, el segundo orden mayoritario fue Sphingomonadales (10%), mientras que en SP+PAH, este orden representó solo el 3%. En los microcosmos inoculados con CS-1, el orden Burkholderiales solo representa el 11%, siendo los órdenes Sphingomonadales y Chthoniobacterales (filo Verrucomicrobiota) los órdenes mayoritarios (ambos con abundancia relativa del 14%).

Los microcosmos control fueron los que más se diferenciaron del resto, el orden Gaielliales (8%, filo Actinobacteriota) fue mayoritario, seguido por el orden Nitrososphaerales (6%, filo Crenarchaeota).

A los 58 días de incubación, el filo Proteobacteria continuó siendo predominante en los microcosmos contaminados (42-47%), mientras que el segundo filo más abundante fue Verrucomicrobiota (13-18%). Si bien en el control sin contaminar se observó una predominancia del filo Proteobacteria, éste solo alcanzó un porcentaje del 20%, siendo muy próximo a los porcentajes del segundo y tercer filo más abundantes (Verrucomicrobiota 18%, Actinobacteriota 16%).

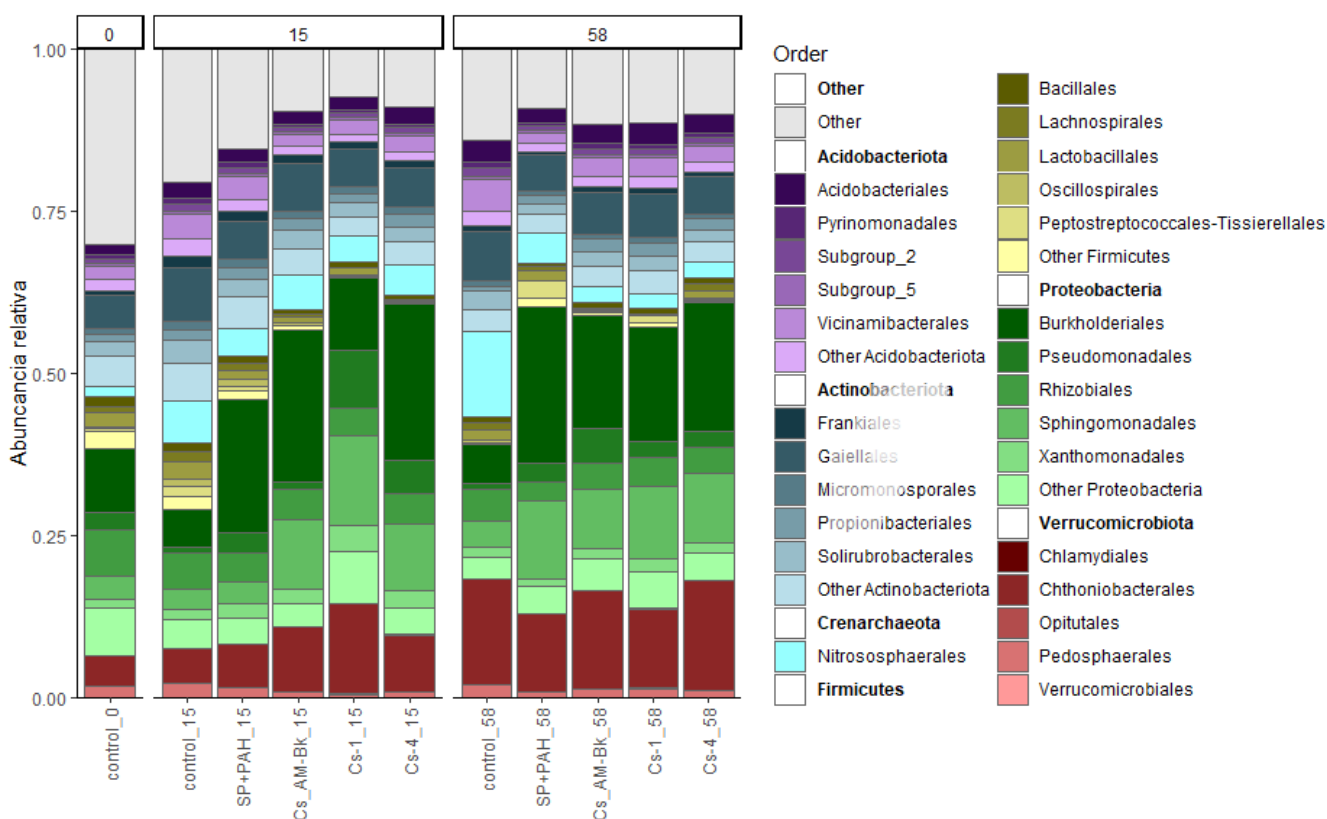


Figura V.8: Abundancia relativa de los órdenes más abundantes, presentes en los microcosmos analizados, en relación con los filos principales (abundancias relativas mayor al 5%). Se muestran los promedios de los triplicados por tiempo.

V.3.2 Estructura de la comunidad microbiana a nivel de género

La figura V.9 muestra un detalle de los géneros bacterianos cuya abundancia relativa superó el 1% en los microcosmos analizados a los 15 y 58 días de incubación. Estos géneros representaron más del 50% de la abundancia relativa de la comunidad (Anexo II, Tabla AII.4).

A los 15 días de incubación, *Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia* (orden Burkholderiales) fueron los géneros predominantes en los microcosmos inoculados, con CS AM-Bk y CS-4, alcanzando una abundancia relativa de 16% en ambos sistemas, mientras que representó solo el 3,5% en los microcosmos inoculados con CS-1, y no superó el 1% en los microcosmos SP+PAH y control.

En los microcosmos inoculados con CS-1, el género mayoritario a los 15 días de incubación fue *Candidatus Udeobacter* (13%, orden Chthoniobacterales), siendo el segundo género más abundante en los microcosmos inoculados con CS-4 (9%), CS AM-Bk (7%) y en los microcosmos SP+PAH (6%) y control (5%).

En los microcosmos SP+PAH el género predominante fue *Cupriavidus* (orden Burkholderiales) (15%), quien estuvo presente también en los microcosmos inoculados, alcanzando abundancias relativas menores al 4%, mientras que, en el control su abundancia relativa no superó al 1%.

En el microcosmos control los géneros predominantes fueron: un género no clasificado de la familia Nitrosphaeraceae (6%, orden Nitrosphaerales) y un género no cultivable del orden Gaiellales (6%). Estos géneros también se encontraron entre los géneros más abundantes en los demás microcosmos analizados contaminados.

Los géneros *Sphingobium* y *Sphingomonas* (orden Sphingomonadales) mostraron abundancias superiores al 4% y 5%, respectivamente, en los tres microcosmos inoculados mientras que en los microcosmos control y SP+PAH estos géneros mostraron valores menores al 1% y 3%.

El género *Acinetobacter* (orden Pseudomonadales) mostró una abundancia relativa superior al 3% en los microcosmos inoculados con CS-1 y CS-4, mientras que en los microcosmos restantes éste no superó valores de 0,5%.

El género *Inquilingus* (orden Azospirillales) mostró una abundancia del 4% a los 15 días de incubación en los microcosmos inoculados con CS-1, mientras que este género no superó el 1% en los otros microcosmos analizados.

A los 58 días de incubación se observó un comportamiento similar en los microcosmos SP+PAH y los microcosmos inoculados, donde *Candidatus Udeobacter* fue el género mayoritario (12-17%), seguido por *Sphingomonas* (9-11%) y *Sulfuritalea* (orden Burkholderiales) (5-10%). El género *Cupriavidus* mostró una abundancia relativa en los microcosmos SP+PAH de 7,3%, mientras que en los microcosmos inoculados este valor no superó al 2%. Con respecto al control no contaminado, la composición géneros más abundantes no varió en comparación con el día 15, pero si variaron las abundancias relativas; se observó un aumento del *Candidatus Udeobacter* (16%), que fue el género mayoritario, seguido por un género no clasificado de la familia Nitrosphaeraceae (13%).

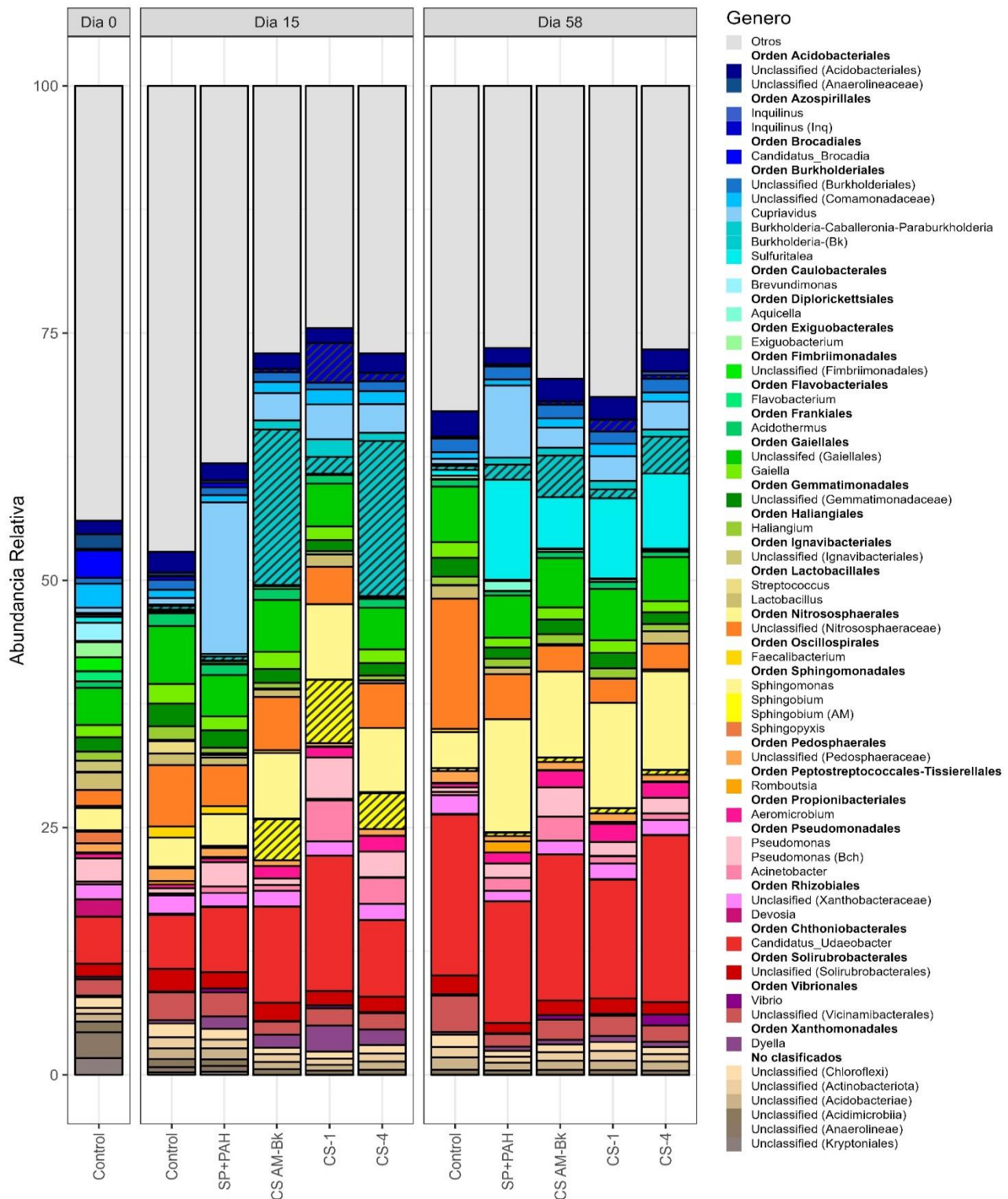


Figura V.9. Abundancias relativas de los géneros cuya abundancia supera al 1% en los microcosmos analizados a los 15 y 58 días de incubación. Se muestra el promedio de los triplicados para cada sistema. La trama de rayas identifica la contribución de cada ASVs identificado para cada una de las cepas al género correspondiente.

V3.3 Monitoreo de los géneros inoculados e identificación de los ASVs correspondientes a las cepas inoculadas.

A fin de estudiar el comportamiento de las cepas constituyentes de cada uno de los inoculantes a lo largo del tiempo, para ello se identificó el ASV correspondiente a cada una de las cepas inoculadas. Con este objetivo se compararon las secuencias de los ASVs totales con las secuencias conocidas del 16S rARN de cada cepa utilizando BLASTn. La tabla II.1 muestra el porcentaje de identidad entre el gen 16S rARN de cada cepa integrante de los consorcios y los ASVs identificados.

Cepas	Nombre del ASV identificado	% de identidad
<i>Burkholderia sp.</i> Bk	86f1248ee4ea85afd8c5b67cc1b04d4c	100
<i>Sphingobium sp.</i> AM	99fee6617d20f02a0e0641f4d5a57916	99,61
<i>Inquilinus limosus</i> Inq	b53094561082f2158e468e437235ead1	100
<i>Pseudomonas sp.</i> Bc-h	472466279b75a9efd1ce4fbc71e9f0bd	100
<i>Pseudomonas sp.</i> T	472466279b75a9efd1ce4fbc71e9f0bd	97,68
<i>Klebsiella aerogenes</i> B	945184b6386c192c0066e0a98a154780	99,61

Tabla II.1: ASVs identificados en las muestras de los microcosmos analizadas que mayor porcentaje de identidad mostraron para cada una de las cepas inoculadas, obtenido a partir de BLASTn.

La secuencia del gen 16S ARN de la cepa T fue la única a la cual no pudo asignarse ningún ASV, ya que el ASV identificado con mayor similitud no alcanzó un porcentaje de identidad superior al 99%. Además, este ASV se corresponde con el ASV identificado para la cepa Bc-h.

Una vez identificados los ASVs correspondientes a las cepas, se evaluó el aporte de los mismos a la abundancia relativa a nivel del género correspondiente.

Si bien en los sistemas no inoculados no fue posible descartar la presencia de los ASVs identificados para las cepas inoculadas, se observó un aumento de las abundancias relativas de los estos ASVs en todos los microcosmos inoculados.

El ASV identificado con la cepa AM estuvo presente en casi todas las muestras, aportando más del 99% a los ASVs correspondientes a al género *Sphingobium* en los microcosmos inoculados (CS AM-Bk, CS-1 y CS-4), mientras que en los sistemas no inoculados este valor fue variable (representando entre el 32% al 50%). Si bien, no fue posible descartar la presencia del ASV en los microcosmos no inoculados, la abundancia relativa del género *Sphingobium* fue menor al 0,5% (Figura V.9).

El ASV identificado para Bk aportó más del 90% al grupo de géneros conformado por *Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia* en los sistemas inoculados con Bk (CS- AM-Bk y CS-4) los primeros 15 días de incubación, descendiendo hasta el 80% al día 58. En los sistemas no inoculados con Bk, este ASV representó menos del 50% de los ASVs correspondientes al mismo grupo de géneros, donde representó menos del 5% (Figura V.9).

El ASV identificado para la cepa Inq aportó más del 90% al género *Inquilingus* en todas las muestras. No obstante, en relación con su abundancia relativa solo fue mayoritario en los microcosmos inoculados con CS-1.

Para la cepa B, el porcentaje de representación del ASV identificado fue mayor al 80% para un género no clasificado de la familia Enterobacteriaceae en todos los microcosmos analizados, sin embargo, la abundancia relativa de este grupo fue menor al 0,2%.

El ASV identificado para la cepa Bc-h fue el único que estuvo mayoritariamente ausente en los sistemas no inoculados con dicha cepa. Mientras que en aquellos inoculados con CS-1 y CS-4, este ASV no representó más del 5% de los ASVs correspondientes al género *Pseudomonas*.

V3.4 Análisis de abundancia diferencial a nivel de género.

A fin de estudiar el efecto de la inoculación sobre los géneros bacterianos en los microcosmos estudiados, se realizó un análisis de abundancia diferencial utilizando la metodología ANCOM-BC (*Analysis of Compositions of Microbiomes with Bias Correction*) (Lin y Das Peddada 2020). Esta metodología contempla la naturaleza composicional de los datos de secuenciación, utiliza abundancias absolutas, estima la fracción muestral y realiza una corrección teórica del sesgo vinculado a esta fracción entre muestras. A fin de obtener resultados robustos, el análisis se centró en aquellos géneros que superan una prevalencia del 10% (Nearing et al.,2022). La figura V.10 muestra los géneros para los cuales se observaron cambios significativos en las abundancias absolutas entre los microcosmos analizados a los 15 y 58 días de incubación. Los resultados se expresaron como el logaritmo del *fold-change* (lfc) de las comparaciones entre los tratamientos.

A los 15 días de incubación el 7 % de los géneros bacterianos presentes (un total de 38 géneros) mostraron cambios significativos en sus abundancias, (Figura V.10A). Las mayores diferencias se observaron entre los microcosmos inoculados y los microcosmos control. A los 15 días de incubación, los microcosmos inoculados con CS-1 mostraron el mayor número de géneros diferencialmente abundantes (20). Entre éstos, los géneros que mayor cambio experimentaron fueron: el género *Inquilingus* (lfc 4.6, orden Azospirillales), *Sphingobium* (lfc 4.0, orden Sphingomonadales), y un género no clasificado de la familia Rhodobacteriaceae (lfc 2.7, orden Rhodobacterales). Por otra parte, 12 géneros mostraron abundancias significativamente menores en los microcosmos inoculados con CS-1 en relación con el control. Entre estos, varios géneros no cultivables, el

género *Adhaeribacter* (lfc -2.7, orden Cytophagales), el género *Devosia* (lfc -2.4 orden Hyphomicrobiales) y el género *Birrii41* (lfc -2.2, orden Polyangiales).

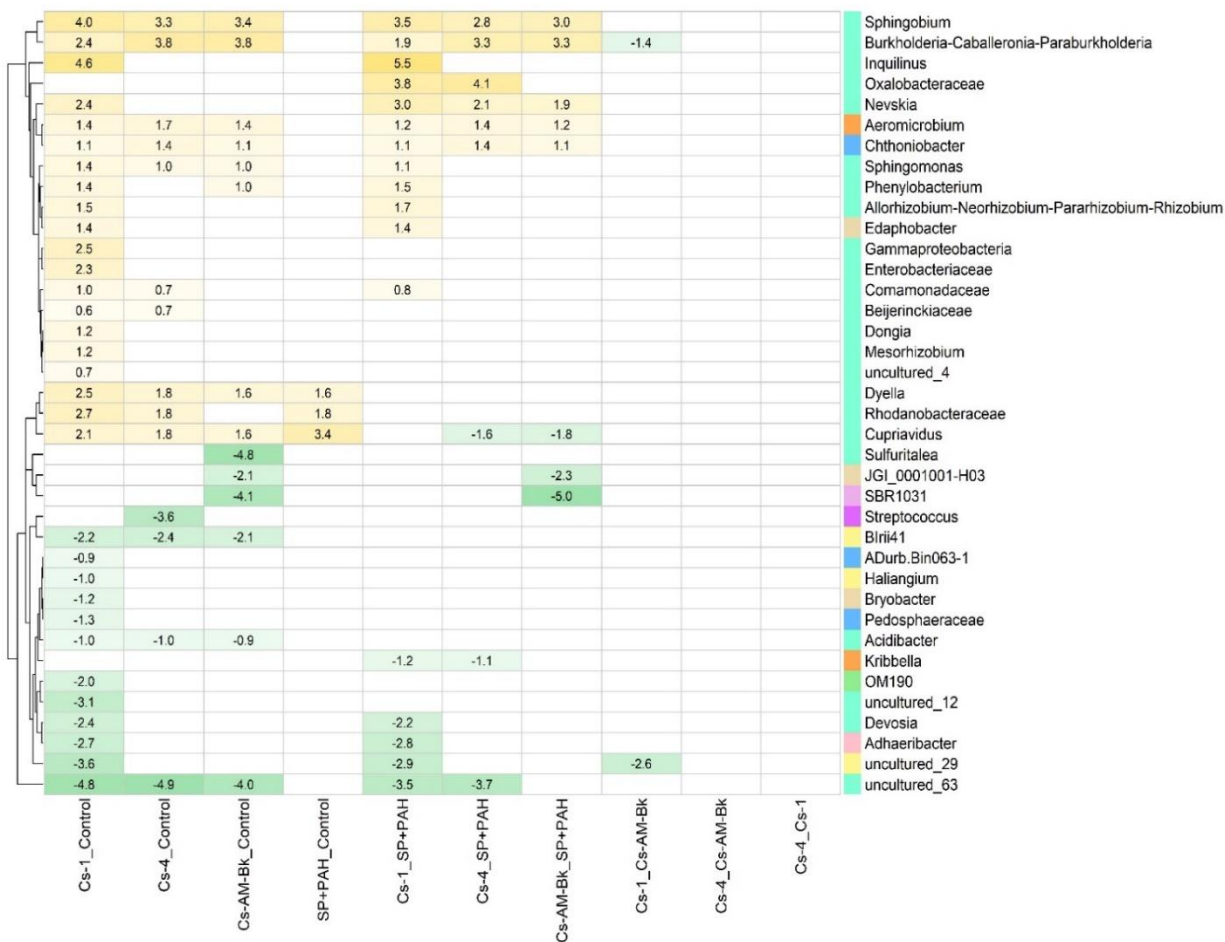
Tanto los microcosmos inoculados con CS AM-Bk como los microcosmos inoculados con CS-4 mostraron un total de 14 géneros con diferencias significativas en sus abundancias con respecto al control. De estos 14 géneros, 10 compartieron el mismo comportamiento en la comparación microcosmo inoculado- microcosmo control. Entre éstos, los géneros *Sphingobium* y *Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia* (orden Burkholderiales), fueron los que mayores cambios mostraron (lfc 3.3-3.4 y lfc 3.8 respectivamente), siendo más abundantes en los microcosmos inoculados. En relación a los géneros que mostraron una disminución significativa de la abundancia más pronunciada en los microcosmos inoculados en comparación al control no contaminado, se encontraron un género no cultivable de la familia Microscillaceae (lfc -4.9) y *Streptococcus* (lfc -3.6, orden Lactobacillales) para la comparación microcosmos inoculados con CS-4-microcosmos control ; mientras que para la comparación CS AM-Bk-microcosmos control, el género *Sulfuritalea* (lfc -4.8, orden Burkholderiales) fue el que mostró mayor cambio.

Un total de 7 géneros mostraron un comportamiento compartido en los 3 sistemas de microcosmos inoculados en comparación a los microcosmos control, siendo más abundantes en los sistemas inoculados; éstos fueron: los géneros *Sphingobium* y *Sphingomonas* (orden Sphingomonadales), *Aeromicrobium* (orden Propionobacteriales), *Chthoniobacter* (Orden Chthoniobacterales), *Burkholderia—Caballeronia-Paraburkholderia* y *Cupriavidus* (orden Burkholderiales) y *Dyella* (Orden Xanthomonadales). Un total de 3 géneros mostraron menores abundancias en esos sistemas con respecto al control estos fueron *Birrii41* (orden Polyangiales), *Acidibacter* y un género no cultivable de la familia Microscillaceae.

En la comparación con SP+PAH y el control, 3 géneros mostraron diferencias significativas presentando mayor abundancia en el microcosmo contaminado: el género *Cupriavidus* (lfc 3.8, orden Burkholderiales), un género de la familia Rhodanobacteracea y el género *Dyella* (lfc 1.8 y lfc 1.6 respectivamente, orden Xanthomonadales).

Al comparar los microcosmos inoculados con SP+PAH, se observó que los microcosmos inoculados con CS-1 mostraron 17 géneros con cambios significativos, mientras que los microcosmos inoculados con CS-4 y con CS AM-Bk mostraron 9 y 8 géneros con diferencias significativas con respecto a SP+PAH. Si bien la mayoría de estos géneros se comportaron de manera similar a lo observado en la comparación entre los microcosmos inoculados y al control, ciertos géneros mostraron una variación única en relación con SP+PAH. Por ejemplo, se observó una mayor abundancia de un género de la familia Oxalobacteracea (orden Burkholderiales) en los microcosmos inoculados con CS-1 (lfc 3.8) y con CS-4 (lfc 4.1) en comparación con SP+PAH. Entre los géneros que mostraron abundancias significativamente menores en relación con el SP+PAH, se encontraron *Cupriavidus* en los microcosmos con CS AM-Bk (lfc -1.6) y CS-4 (lfc -1.8) y *Kribbella* (orden Propionobacteriales) en los microcosmos con CS-1 (lfc -1.2) y CS-4 (lfc -1.1).

A



B

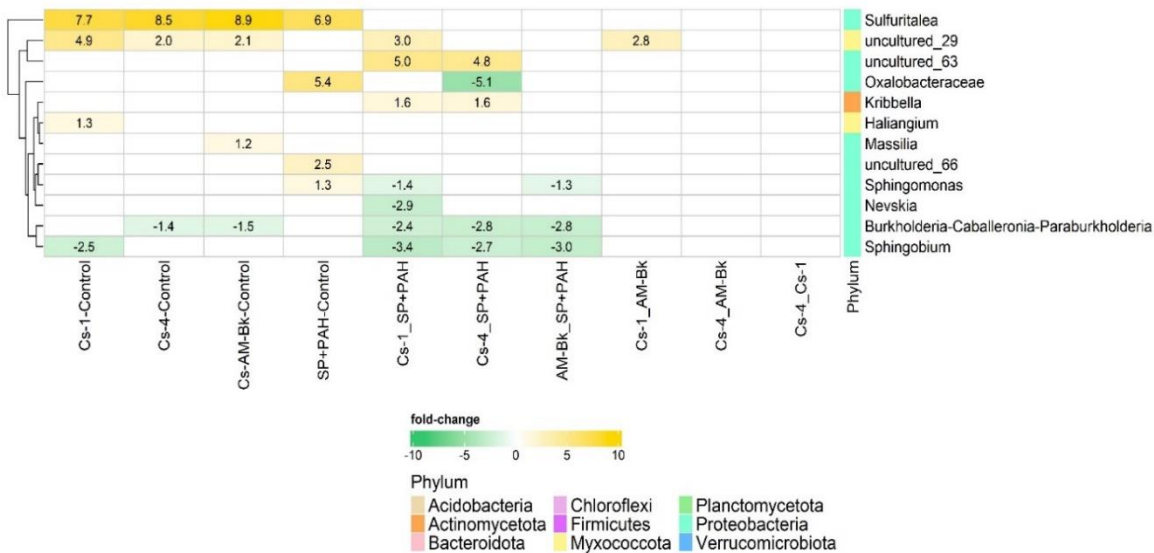


Figura V.10: Heatmap donde se muestran los géneros diferencialmente abundantes a los 15 (A) y 58 (B) días de incubación en los microcosmos analizados, obtenidos a partir del análisis de ANCOM-BC ($p < 0.05$, método de ajuste holm, comparaciones múltiples con test direccional con control mdfDR por método de holm). Para el análisis se seleccionaron aquellos géneros cuya prevalencia fue mayor al 10%. La intensidad del color refleja la magnitud del logaritmo del fold change (lfc). Cada columna indica el par comparado, donde en segundo lugar se indica la condición de referencia para la comparación.

Al comparar los distintos inoculantes, solo se observaron 2 géneros con abundancias significativamente menores entre los microcosmos inoculados con CS-1 y con CS AM-Bk. Estos géneros fueron: *Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia* (lfc -1.1) y un género no cultivable de la familia Sandaracinaceae (lfc -3.6). No se observaron cambios significativos en las abundancias entre las comparaciones de los microcosmos con CS-4 con los microcosmos con CS-1 o CS AM-Bk.

A los 58 días de incubación el 2 % de los géneros bacterianos presentes (un total de 12 géneros) mostraron cambios significativos entre los microcosmos analizados (Figura VI.10B). Solo 3 géneros mostraron cambios entre los microcosmos inoculados y el control, entre ellos el género *Sulfuritalea* fue el que mayores cambios experimentó, estando más representado en los microcosmos inoculados en comparación al control (lfc 7.7, 8.5 y 8.9 para CS-1, CS-4 y CS AM-Bk respectivamente).

SP+PAH mostró un total de 4 géneros significativamente más abundantes en comparación con el control sin contaminar: el género *Sulfuritalea* (lfc 6.9), el género *Sphingomonas* (lfc 1.3), un género no clasificado de la familia Oxalobacteraceae (lfc 5.4) y un género no cultivable de la familia Moraxellaceae (lfc 2.5). A su vez, los géneros *Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia* y *Sphingobium* mostraron abundancias significativamente mayores en SP+PAH con respecto a los microcosmos inoculados.

No se observaron diferencias significativas en los géneros en los microcosmos con CS-4 en comparación a los que contienen los otros dos inoculantes, y solamente un género no cultivable de la familia Sandaracinaceae estuvo más representado en los microcosmos con CS-1 en comparación con los microcosmos con CS AM-Bk.

V.4 Predicción funcional mediante PICRUSt2

A partir de los datos de secuenciación se analizó el potencial funcional de la comunidad de los microcosmos analizados, a partir de la predicción de los ortólogos de KEGG (KO) y de las rutas metabólicas (MetaCyc) utilizando PICRUSt2. Se utilizó el índice NSTI (*Nearest Sequenced Taxon Index*) como indicador de la precisión de la predicción de PICRUSt2, cuyos valores muestran una relación inversa con la precisión de la predicción. Los valores de NSTI para las muestras analizadas fueron cercanos a 0.2. (Anexo II, Tabla 4)

Se identificaron un total de 441 rutas metabólicas de acuerdo con la base de datos MetaCyc y un total de 7605 KO. Del total de rutas metabólicas y KOs predichos para los microcosmos analizados, 46 y 167 respectivamente, se relacionaron a la degradación de compuestos aromáticos. La figura V.11 muestra un análisis de componentes principales (PcoA) generado a partir de la matriz de disimilitud utilizando el método de Bray-Curtis, para el total de KOs (Figura V.11A) y para los KOs vinculados a la degradación de compuestos aromáticos (Figura V.11B) predichos por PICRUSt2. Al analizar el comportamiento de los KOs totales, es posible observar un comportamiento similar al de la estructura taxonómica, donde a los 15 días de incubación los microcosmos SP+PAH se asemejaron más al control, mientras que al final del período de incubación (día 58)

este se asemejó más a los microcosmos inoculados. Por el contrario, cuando se analizó el comportamiento de los KOs vinculados a la degradación de compuestos aromáticos, a los 15 días de incubación se observaron claras diferencias entre los microcosmos SP+PAH y los microcosmos control, observándose nuevamente una convergencia con los microcosmos inoculados a los 58 días de incubación.

V.4.1 Análisis de abundancia diferencial de los genes ortólogos de KEGG (KO) en base a la predicción de PICRUSt2

De manera análoga a lo analizado a nivel taxonómico, se realizó un análisis de aquellos KOs predichos por PICRUSt2 vinculados a la degradación de compuestos aromáticos que mostraron diferencias significativas entre los microcosmos analizados a los 15 y 58 días de incubación utilizando el método de ANCOM-BC. La figura V.12.A muestra el lfc de los 73 KOs que mostraron diferencias significativas en las comparaciones entre los microcosmos analizados a los 15 días de incubación.

En comparación con el control, los microcosmos con CS-4 fueron los que mostraron un mayor número de KOs (59) con un comportamiento diferencial, seguido por los microcosmos con CS-1 (57), los microcosmos SP+PAH (54), y los microcosmos con CS AM-Bk (49). Solamente en los microcosmos con CS-1 se observaron dos KOs, K10701 (acetophenone carboxylase [EC:6.4.1.8]) y K04109 (4-hydroxybenzoyl-CoA reductase subunit beta [EC:1.1.1.7.1]) vinculadas a la degradación de etil-benceno y de benzoato, respectivamente, que mostraron abundancias significativamente menores con respecto al control sin contaminar.

Con respecto a las comparaciones entre los microcosmos inoculados y los microcosmos SP+PAH a los 15 días de incubación, el número de KOs diferencialmente abundantes fue menor. En comparación con los microcosmos SP+PAH se observaron un total de 16 KOs diferencialmente más abundantes entre los microcosmos con CS-1, seguido por los microcosmos con CS-4 y CS AM-Bk, con un total de 10 KOs. De éstos, 7 KOs fueron compartidos entre los microcosmos inoculados, de los cuales 1 de ellos (K14581) está vinculado a los primeros pasos de la ruta de degradación de PAH, mientras que los 5 KOs restantes (K00455, K04100, K04101, K05921 y K10219) vinculados a la vía baja de degradación por orto-clivaje.

También se observaron varios KOs relacionados a la degradación de compuestos aromáticos que mostraron abundancias significativamente menores en los microcosmos inoculados con respecto a los microcosmos SP+PAH, observándose un total de 20 KOs en los microcosmos inoculados con CS AM-Bk, 18 KOs en los microcosmos con CS-4, y 16 KOs en los microcosmos con CS-1. Un total de 15 KOs con abundancias menores con respecto a los microcosmos SP+PAH fueron compartidos entre los microcosmos inoculados. Entre ellos, se encontraron 7 KOs vinculados a la degradación de tolueno (K00055, K15760, K15761, K15762, K15763, K15764, K15765), 4 KOs vinculados a la degradación de benzoato (K07535, K07536, K10621, K10622) y un KO vinculado a la degradación de ftalato (K18068).

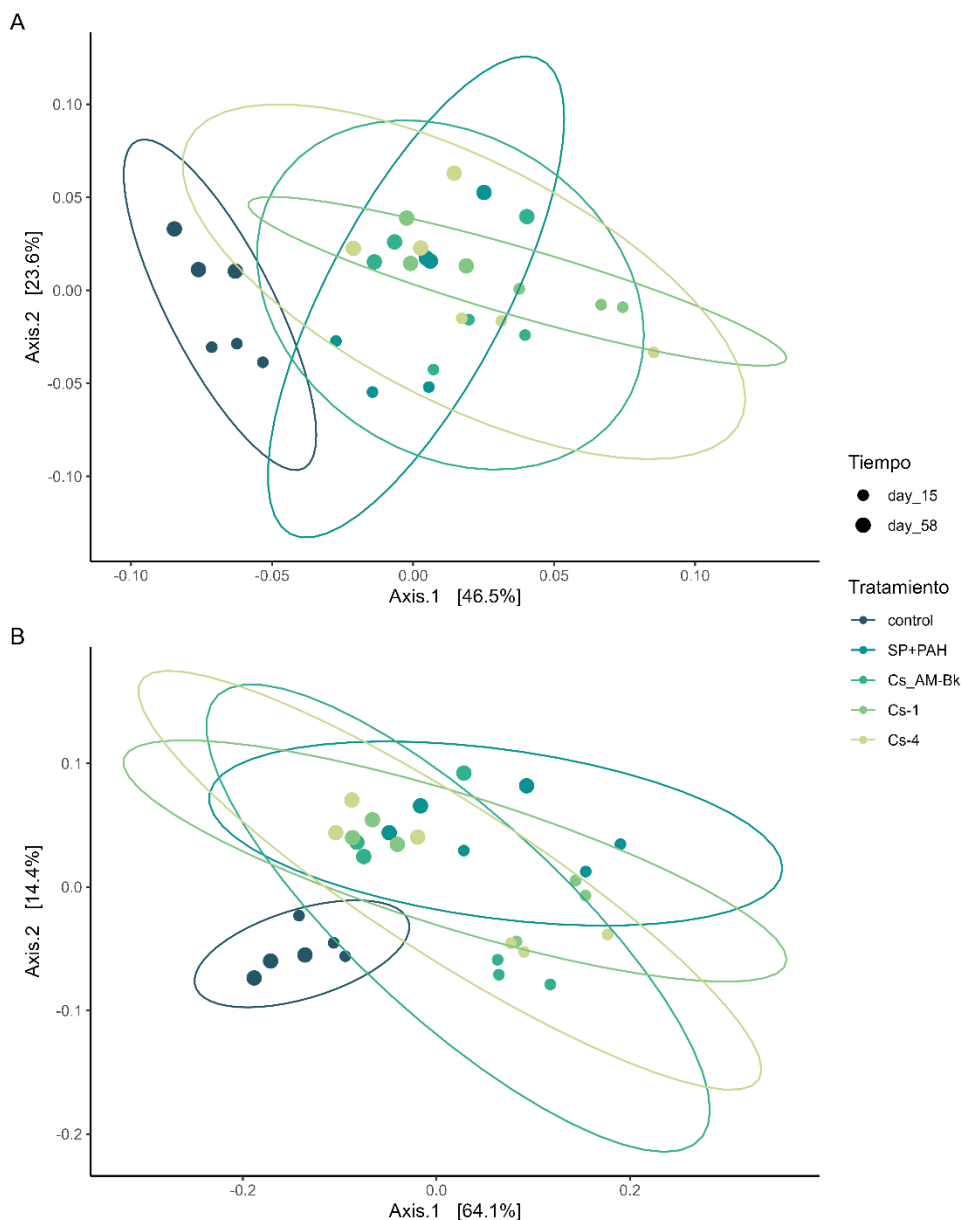


Figura V.11 Análisis de componentes principales (PcoA) construido a partir de la matriz de distancia utilizando el método de Bray-Curtis para el total de KO identificados (A) y relacionados a la degradación de compuestos aromáticos (B) en base a la predicción de PICRUSt2. Se muestran los dos ejes principales que explican la mayor parte de la variabilidad. El tamaño de los puntos indica el tiempo de incubación, mientras que los colores representan los distintos tratamientos. Se excluyó el día 0 debido a la variabilidad entre los triplicados.

Con respecto a la comparación entre los microcosmos inoculados se observaron 3 KO vinculados a la degradación de compuestos aromáticos (K14581, K00141 y K05921) que mostraron abundancias

significativamente menores en los microcosmos con CS-1 en comparación con los microcosmos con CS AM-Bk. Con respecto a los microcosmos con CS-4, no se observó ningún KO que mostrara diferencias significativas con respecto a los microcosmos con CS-1 o con CS AM-Bk.

A los 58 días de incubación, donde la concentración de PAH suplementados estuvo por debajo del límite de detección, se observó una reducción en el número de KOs que mostraron diferencias significativas en las abundancias para los microcosmos analizados, siendo un total de 19 KOs. Solo un KO mostró una abundancia mayor en los microcosmos SP+PAH con respecto al control (K14581), mientras que los microcosmos inoculados no mostraron ningún KO con abundancias significativamente mayores a la de los controles sin contaminar y SP+PAH (Anexo II, Figura AII.1).

V.4.2 Análisis de contribución de los distintos géneros a los KOs predichos por PICRUSt2

Se estudió la contribución de los distintos géneros a los KOs vinculados a la degradación de compuestos aromáticos únicamente a los 15 días de incubación, dado que a los 58 días de incubación ya no se detectaron PAH en los microcosmos analizados, a la vez que se observó una importante reducción en el número de KOs que mostraron diferencias significativas en las abundancias para los microcosmos analizados.

Del total de KOs vinculados a la degradación de compuestos aromáticos que mostraron diferencias significativas en las abundancias entre los microcosmos inoculados y con respecto a los microcosmos control y SP+PAH, 5 KOs se analizaron en profundidad en base al rol que cumplen en la degradación de PAH. Los KOs fueron seleccionados a fin de representar funciones vinculadas tanto a la vía alta (K14581) como baja (K05921, K00455, K10219 y K00141) de la ruta de degradación de PAH.

La Figura V.13 muestra diagramas de cuerdas donde se observa la contribución relativa de los géneros que contribuyen con un porcentaje mayor al 5% a los KOs seleccionados en al menos una condición. En la parte superior del diagrama se muestran los KOs seleccionados, donde se observa una escala numérica con la contribución relativa de los géneros, lo cuales se muestran en la parte inferior del diagrama. El grosor de la cuerda sobre la parte superior es indicativo de la contribución del género a esa función.

K14581 (naphthalene 1,2-dioxygenase ferredoxin reductase component), puede actuar en los primeros pasos de la degradación de PAH. Para los microcosmos SP+PAH, los géneros que más contribuyeron a esta función fueron *Reyranella* (orden Rhodospirillales) y *Cupriavidus* (orden Burkholderiales) los cuales contribuyeron con un 45% y 22% a este KO, respectivamente, y en menor proporción por los géneros *Burkholderia* (15%) y *Ramlibacter* (11%) (orden Burkholderiales). En los microcosmos inoculados con CS-1, el género *Burkholderia* (49%) fue el que más contribuyó a este KO, seguido por *Cupriavidus* (26%) y *Reyranella* (20%), mientras que en los microcosmos inoculados con CS-4 y CS AM-Bk el género *Burkholderia* contribuyó más del 90% de esta función.

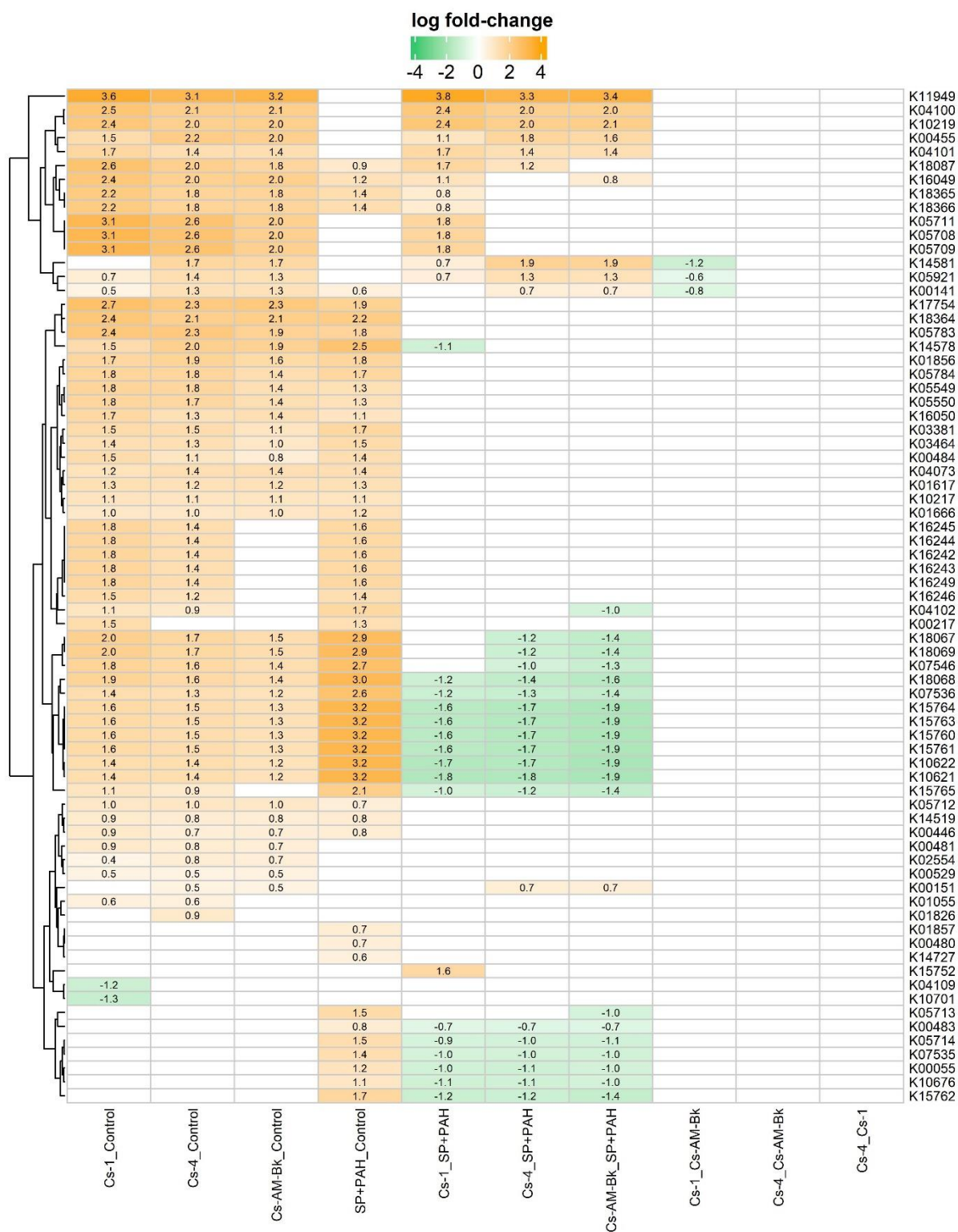


Figura V.12: Se muestran los KO vinculados a la degradación de compuestos aromáticos diferencialmente abundantes en los microcosmos analizados a los 15 días de incubación, obtenidos a partir del análisis de ANCOM-BC ($p < 0.05$, método de ajuste holm, comparaciones múltiples con test direccional con control mdFDR por método de holm). La intensidad del color refleja la magnitud del logaritmo del fold change (lfc). Cada columna indica el par comparado, donde en segundo lugar se indica la condición de referencia para la comparación.

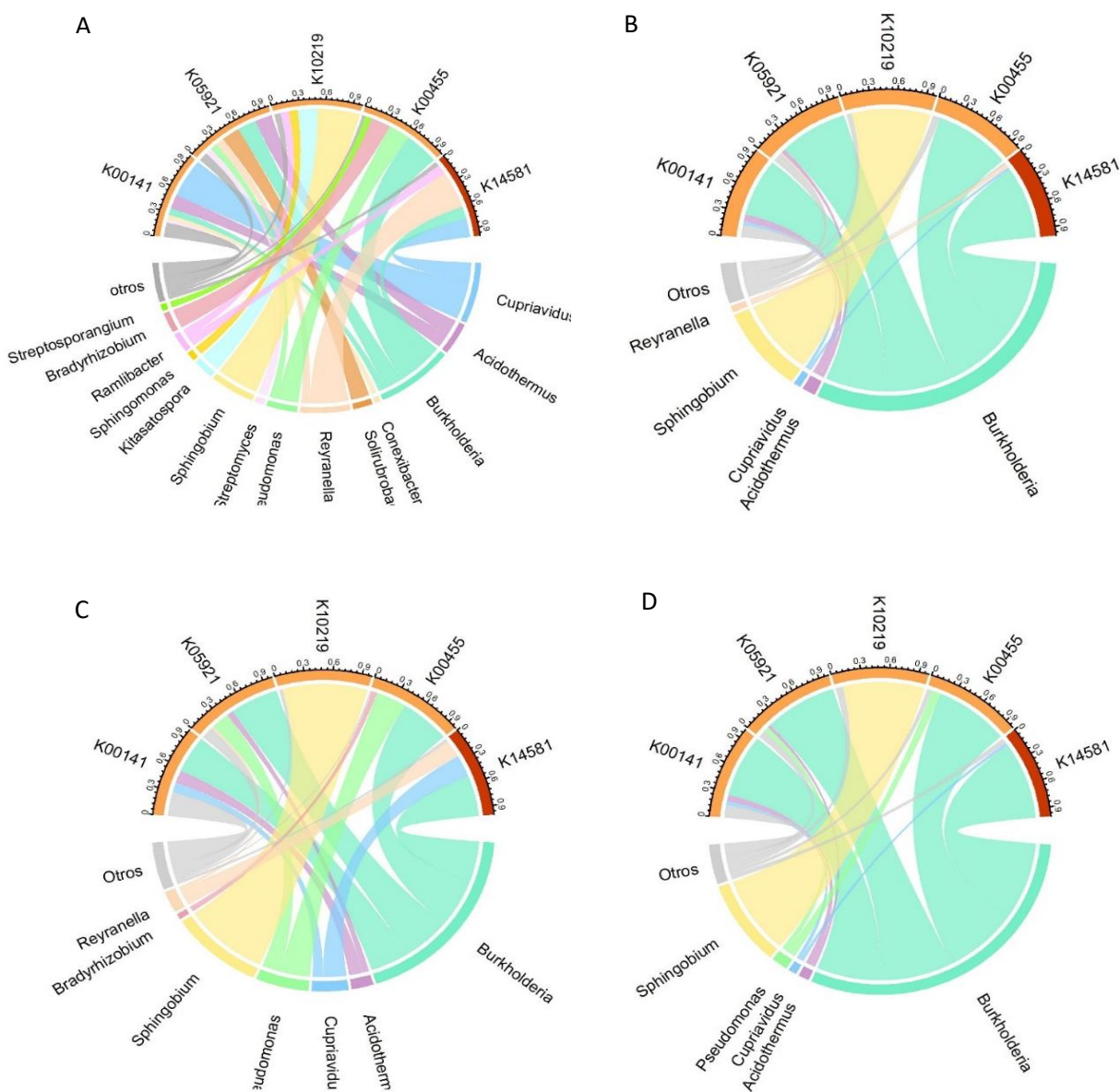


Figura V.13: Diagrama de cuerdas donde se muestra la contribución relativa para 5 KO's predichos por PICRUSt2, que mostraron diferencias significativas en los microcosmos contaminados SP+PAH (A), inoculados con CS AM-Bk (B), CS-1 (C) y CS-4 (D) a los 15 días de incubación. Se muestran los promedios de las contribuciones relativas para los géneros cuyas contribuciones relativas fue mayor al 5% en al menos una ruta. Aquellos KO's relacionados a la vía baja de degradación de PAH se muestran en naranja mientras que el KO vinculado a la vía alta de degradación se muestra en rojo.

K00455 (3,4-dihydroxyphenylacetate 2,3-dioxygenase) está vinculada a la degradación de homoprotocatecuato. En los microcosmos SP+PAH los géneros que más contribuyeron a esta función fueron *Burkholderia* (39%), *Pseudomonas* (25%) (orden Pseudomonadales) y *Bradyrhizobium* (6%) (orden

Rhizobiales). En los microcosmos inoculados con CS-1 también esta función se relacionó con los géneros *Burkholderia* (57%) y *Pseudomonas* (34%). En los microcosmos inoculados con CS-4 estos 2 géneros fueron los que más contribuyeron a este KO, sin embargo, *Burkholderia* contribuyó con más del 80%, mientras que *Pseudomonas* solo contribuyó con un 10%. Con respecto a los microcosmos inoculados con CS AM-Bk, *Burkholderia* contribuyó con más del 90% a esta función.

K00141 (benzaldehyde dehydrogenase (NAD)) puede actuar en degradación de xileno. En los microcosmos SP+PAH los géneros que contribuyeron más fueron *Cupriavidus* (47%) y *Acidothermus* (16%), mientras que en los microcosmos inoculados el género *Burkholderia* fue el que más contribuyó, sin embargo, en los microcosmos inoculados con CS-4 y CS AM-Bk este género contribuyó con más del 70%, mientras que en los microcosmos inoculados con CS-1 no superó una contribución del 45%.

K10219 (2-hydroxy-4-carboxymuconate semialdehyde hemiacetal dehydrogenase), puede actuar en la degradación de benzoato, cuya contribución mayoritaria en los microcosmos SP+PAH estuvo vinculada a los géneros *Sphingobium* (49%), *Sphingomonas* (10%) (orden Sphingomonadales) y *Kitasatospora* (22%) (orden Streptomycetales). Mientras que en los microcosmos inoculados el género *Sphingobium* contribuyó más del 90% a esta función.

K05219 (5-oxopent-3-ene-1,2,5-tricarboxylate decarboxylase / 2-hydroxyhepta-2,4-diene-1,7-dioate isomerase), también involucrada en la degradación de homoprotocatecuato, mostró una mayor contribución de los géneros *Burkholderia* (21%), *Acidothermus* (19%) y *Solirubrobacter* (21%) en los microcosmos SP+PAH. En los microcosmos inoculados con CS-1 los géneros que más contribuyeron a esta función fueron *Burkholderia* (55%), *Pseudomonas* (20%) y *Acidothermus* (7%), mientras que en los microcosmos inoculados con CS-4 y CS AM-Bk el género *Burkholderia* contribuyó más del 80% a esta función.

V.5 Discusión

La inoculación de microorganismos alóctonos capaces de la remoción de los contaminantes se propone como la estrategia de elección en biorremediación de suelos con contaminación aguda, ya que, al estar pre-adaptados a los contaminantes, pueden actuar rápidamente logrando su degradación (Nwankweg et al. 2022). El empleo de consorcios microbianos en procesos de biorremediación surge como una alternativa a los inoculantes mono-específicos, cobrando mayor relevancia en los últimos tiempos, ya que aprovecha las interacciones entre los miembros del consorcio para la optimización de los procesos degradativos (Massot et al., 2022). La mayor robustez frente a disturbios ambientales y la reducción de la carga metabólica, a través de la división del trabajo, les otorga a los consorcios la capacidad de realizar funciones complejas que no podrían ser realizadas por los monocultivos de sus miembros (Xu & Yu 2021). A partir de los resultados obtenidos en el capítulo IV se demostró que la combinación de las cepas degradadoras *Sphingobium* sp. AM y *Burkholderia*

sp. Bk en cocultivo aumentó la eficiencia de degradación de los PAH, como resultado de las interacciones sinérgicas, lo cual lo posiciona como un candidato para la aplicación en procesos de bioaumentación.

En este capítulo se analizó la eficiencia de degradación y la relación de los inoculantes con la comunidad microbiana nativa del suelo en un proceso de bioaumentación; para ello se seleccionaron tres consorcios degradadores de PAH, previamente caracterizados, con distinto número y composición de especies bacterianas, los consorcios CS-AM-Bk, CS-1 y CS-4, que fueron inoculados sobre un suelo contaminado en forma aguda con una mezcla de PAH.

Se evidenció que los tres consorcios fueron eficientes en la degradación de la mezcla de PAH suplementados al suelo, alcanzando la eliminación completa del fluoreno, fenantreno y antraceno (PAH de bajo peso molecular) y la degradación parcial del pireno suplementado (PAH de alto peso molecular) ya a los 15 días de incubación (Figura V.1). La única diferencia significativa entre los microcosmos inoculados con respecto a la eficiencia de remoción se observó en la degradación de pireno entre los microcosmos con CS-AM-Bk con respecto a los inoculados con CS-1, ya que los primeros alcanzan un porcentaje de degradación superior al 40%, mientras que los microcosmos con CS-1 solo alcanzan un 19% de degradación. Por su parte, los microcosmos inoculados con CS-4 mostraron un comportamiento intermedio (25%) en relación con la degradación del pireno. Si bien la degradación microbiológica de PAH de alto peso molecular es más difícil que la de los de bajo peso molecular, la presencia de estos últimos puede favorecer la degradación de los primeros (Nzila et al., 2018; Lu et al., 2019; Ferraro et al., 2021).

La degradación de los PAH está fuertemente relacionada con la abundancia de microorganismos degradadores presentes en el suelo (Haritash & Kaushik, 2009). Los microcosmos SP+PAH también fueron capaces de degradar los PAH suplementados, pero recién a los 30 días de incubación. Este período de latencia puede estar vinculado con el tiempo requerido para la selección de microorganismos degradadores de la comunidad nativa del suelo (Piskonen et al, 2005; Martin et al, 2012; Festa et al., 2016), los cuales en condiciones naturales podrían encontrarse en baja proporción. En concordancia con esto, al estimar el potencial de biodegradación de PAH mediante qPCR de los genes catabólicos específicos claves en su metabolismo, inicialmente el número de copias del gen PAH RHD α -GN fue mayor en los microcosmos inoculados con respecto a los controles (Figura V.2) lo cual es esperable como consecuencia de la introducción de microorganismos con capacidades metabólicas específicas para degradar los PAH. A los 30 días de incubación se observó en los microcosmos SP+PAH un aumento, tanto del número de copias de este gen como de su relación con respecto al gen 16S ARNr (Figura V.3). Esta inducción sería resultado de la presión de selección que ejercen los contaminantes sobre la comunidad nativa hacia una comunidad degradadora, lo cual se correlaciona con el aumento en la degradación observada en este tiempo (Figura V.1).

El gen C230 no mostró diferencias entre los microcosmos inoculados y los controles, esto puede deberse a que participa en la vía baja de degradación de compuestos aromáticos por meta-clivaje, participando también

en otras rutas metabólicas que involucran compuestos aromáticos de un anillo. Teng et al. (2022) estudiaron la correlación entre el número de copias de los genes RHD α -GN, RHD α -GP y C230 y la degradación de pireno, encontrando una correlación positiva solamente para el gen RHD α -GN para un proceso de atenuación natural. La introducción de nuevas especies durante el bioaumentación puede tener un impacto relevante sobre la comunidad nativa, incluso cuando la abundancia del inoculante disminuye (Mawarda et al.,2020). Si el inoculante logra desplazar especies claves que facilitan las interacciones en la comunidad, esto puede resultar en cambios que afecten la estructura de la misma, afectando también al funcionamiento ecosistémico (Mallon et al.,2015). Es por estos motivos que resulta clave estudiar la interacción entre los inoculantes y la comunidad nativa, ya que la eficiencia del proceso depende de la sobrevivencia del inoculante y, al mismo tiempo, se busca el menor impacto en la estructura y funcionalidad de la comunidad (Mawarda et al.,2020) luego de que el proceso de biorremediación concluya.

En los microcosmos estudiados en este capítulo el análisis de secuenciación masiva del 16S ARNr permitió develar no solo el impacto de la contaminación sobre la estructura de la comunidad, sino la permanencia del inoculante y su impacto en la funcionalidad de la comunidad. Se observó que la incubación tuvo un efecto estimulante sobre las poblaciones bacterianas de los microcosmos control a los 15 días de incubación, evidenciado por un aumento tanto en la riqueza como en la diversidad (Figura V.5). Sin embargo, este efecto no se observó en los microcosmos inoculados, donde a los 15 días mostraron valores significativamente menores de los índices de Chao1 y Shannon en relación con el control. Esto podría estar vinculado principalmente a la predominancia de los inoculantes como consecuencia de la inoculación. A su vez el índice de Faith mostró una disminución significativa en los microcosmos inoculados con respecto al control y a los microcosmos SP+PAH, lo que indicaría que la inoculación generó un rápido cambio en la comunidad hacia microorganismos cuyo parentesco filogenético es mayor. La disminución temprana de la diversidad es un efecto común observado en los procesos de bioaumentación, ya que uno de los principios básicos de esta metodología es incrementar la abundancia de microorganismos con funciones específicas (Festa et al.,2016; Chaudhary et al.,2020; Zhou et al.,2022). Resultados similares fueron encontrados en el trabajo realizado por Festa et al. (2016), donde la inoculación de la cepa *Sphingobium* sp AM en un suelo contaminado artificialmente con fenantreno mostró una reducción temprana de la diversidad a los 14 días de incubación. El análisis de β diversidad realizado aquí también mostró el impacto temprano que tuvo la inoculación en la estructura de la comunidad, ya que los microcosmos inoculados mostraron una mayor disimilitud en relación con los microcosmos control y SP+PAH a los 15 días (Figura V.6).

Con respecto a la estructura taxonómica de los microcosmos analizados, a los 15 días de incubación tanto los microcosmos inoculados con CS AM-Bk y con CS-4 como los microcosmos SP+PAH mostraron una predominancia del orden Burkholderiales (Figura V.8 y V.9). Entre los miembros de este orden se observa alta diversidad de genes codificantes para oxigenasas hidroxilantes de anillo, siendo predominantes en procesos

de biorremediación en ambientes contaminados con compuestos aromáticos (Pérez-Pantoja et al., 2012). De acuerdo con una revisión extensa realizada por Pérez-Pantoja et al. (2012), en la cual se estudia el potencial catabólico degradador de compuestos aromáticos de miembros del orden Burkholderiales, 3 géneros (*Burkholderia*, *Cupriavidus* y *Ralstonia*) poseen la mayor cantidad de genes codificantes para estas funciones catabólicas. En los microcosmos inoculados con CS AM-Bk y CS-4, es *Burkholderia* el género predominante (introducido al sistema durante la inoculación), mientras que en SP+PAH es *Cupriavidus* quien predomina. A su vez, en los microcosmos con CS AM-Bk y CS-4 la abundancia de *Cupriavidus* está significativamente reducida con respecto a SP+PAH (Figura V.10). Ambos géneros tienen una alta similitud en relación con su potencial metabólico (Pérez-Pantoja et al., 2012). Esto indicaría que ambos géneros podrían competir por los recursos, cumpliendo roles similares en la degradación de PAH, donde la predominancia de uno ya sea como producto de la inoculación o como parte de la comunidad nativa limita el crecimiento del otro.

En los microcosmos inoculados con CS-1 el orden Sphingomonadales fue uno de los órdenes predominantes, siendo *Sphingobium* y *Sphingomonas* los géneros mayoritarios, quienes también predominaron en los microcosmos con CS AM-Bk y CS-4 (Figura V.9). Si bien el aumento de miembros del orden Sphingomonadales es común a eventos de contaminación por PAH (Ding et al., 2012; Li et al., 2019; Thomas et al., 2019), la inoculación tuvo un efecto potenciador, no solo evidenciado por la presencia del género inoculado sino también por la estimulación de representantes de este orden presentes en la comunidad nativa (Figura V.9 y V.10). Si bien en los microcosmos con CS-1 la abundancia del género *Burkholderia* fue significativamente menor que en los microcosmos con CS AM-Bk y CS-4 (Figura V. 10), también se observó un aumento significativo de éste con respecto a los microcosmos SP+PAH, a pesar de que este género no forma parte de los miembros de dicho consorcio. Este incremento del género *Burkholderia* en los microcosmos inoculados indicaría que el agregado de la cepa *Sphingobium* (la única común a todos los inoculantes) favorece su presencia. Interacciones mutualistas entre los géneros *Burkholderia* y *Sphingobium* o *Sphingomonas* fueron ampliamente documentadas en medio líquido (Huang et al., 2008; Katsuyama et al. 2009, Willsey et al., 2015; Zhang et al., 2020). Festa et al., (2016b), también observó que la inoculación de la cepa AM produjo un incremento del orden Burkholderiales, incluso en sistemas no contaminados.

Resulta llamativo, que a pesar de que la proporción inicial de los géneros *Sphingobium* y *Burkholderia* difieren en la constitución de los consorcios CS AM-Bk con respecto a CS-4 (65:35 y 1:1 respectivamente), a lo largo del período de incubación sus abundancias relativas no mostraron diferencias significativas en los microcosmos inoculados con estos consorcios (Figura V.9 y V.10). Gao et al. (2020) demostraron que distintas proporciones iniciales entre un cocultivo de *P. putida* y *E. coli* (1:1000, 1:1 y 1000:1) pueden tener un efecto en la estructura y las interacciones que se establecen entre ambas cepas durante la utilización de diversas fuentes de carbono en medio líquido; para algunas fuentes de carbono analizadas, no obstante, no observaron diferencias significativas entre la proporción inicial y final de las cepas, lo cual podría estar vinculado a la convergencia

estructural debido a la misma condición de nicho (Goldford et al., 2018; Gao et al., 2020). Si bien estos ensayos fueron realizados en medio líquido, los principios ecológicos descritos que regulan el ensamblaje de la comunidad pueden aplicarse a sistemas de mayor complejidad.

Durante la inoculación, entendida como un proceso de invasión biológica, el establecimiento representa la fase donde los inoculantes se enfrentan con la resistencia biótica de la comunidad nativa. La riqueza y la equitatividad están negativamente relacionadas con el establecimiento exitoso, ya que la amplitud del nicho aumenta con estos parámetros reduciendo el número de nichos vacantes (Mallon et al., 2015; Mawarda et al., 2020). La identificación de ASVs con alto porcentaje de identidad en relación con las cepas inoculadas (>99%) permitió el seguimiento de éstas en los microcosmos a lo largo del período de incubación. Fue posible identificar el aporte mayoritario de las cepas AM, Bk, Inq y B a los géneros *Sphingobium*, *Burkholderia*, *Inquilinus* y Enterobacteriaceae no clasificada, respectivamente (Figura V.9, Tabla V.1).

El comportamiento de los consorcios puede variar significativamente cuando se inocula en suelo con respecto a la caracterización de los mismos en medio líquido, ya que la complejidad biótica y abiótica de la matriz aumenta. Macchi et al. (2021), realizó una detallada caracterización de los consorcios CS-1 y CS-4 durante la degradación de fenantreno en medio líquido. A partir del estudio de las abundancias relativas de las distintas cepas, observó un aumento del orden Burkholderiales a los 15 días de incubación en CS-4. Ese trabajo mostró la predominancia del orden Pseudomonadales tanto en CS-1 como CS-4, mientras que el ASV correspondiente al género *Inquilinus* mostró abundancias menores al 3% en ambos consorcios (Macchi et al., 2021). No obstante, nuestros resultados mostraron la presencia de este último dentro de los géneros más abundantes en los microcosmos con CS-1 (Figura V.9). En concordancia a los resultados mostrados por Macchi, la cepa Bk estaría generando un desplazamiento de la cepa Inq en los microcosmos inoculados con CS-4. De acuerdo con lo propuesto por Macchi y a los resultados obtenidos en el capítulo IV de esta tesis, este efecto podría estar vinculado al rol de la cepa Bk en la degradación de metabolitos intermediarios de la vía baja de compuestos policíclicos aromáticos, quien estaría desplazando a las cepas Inq, B, Bc-h y T, que también intervienen en esta vía. No obstante, las cepas T y Bc-h no desempeñarían un rol importante en la degradación de los PAH suplementados en los microcosmos analizados, ya que su aporte a las abundancias del género *Pseudomonas* fue bajo (Figura V.9), lo cual podría indicar la ausencia del establecimiento de dichas cepas como consecuencia de la competencia con representantes autóctonos de dicho género que muestren solapamiento del nicho. Teng et al. (2022) inocularon un consorcio definido constituido por 4 cepas degradadoras de pireno en un suelo suplementado con 13C-pireno a fin de identificar las poblaciones relacionadas a la degradación de este compuesto. Solamente una de las cepas introducidas, *Rhodococcus* sp. PSL, mostró una participación activa en la degradación de pireno, y a partir del análisis de redes ecológicas, evidenciaron que el ASV identificado para esta cepa fue el único, entre las cepas inoculadas, que mostró correlaciones positivas con la comunidad

degradadora, mientras que las otras cepas introducidas quedaron excluidas, lo que explicaría la no participación en la degradación de pireno (Teng et al. 2022).

A pesar de las diferencias observadas, la inoculación con los tres consorcios produjo efectos comunes en la estructura bacteriana de la comunidad del suelo. En estos sistemas hubo una predominancia del filo Proteobacteria (Figura V.8), el cual incluye varios miembros degradadores de PAH (Brzeszcz et al., 2016). Al analizar el aporte de los géneros inoculados, se observa que la predominancia de este filo no sólo fue producto de la inoculación si no también como resultado de la estimulación de miembros de la comunidad nativa, lo cual se correlaciona con los resultados observados a partir del índice de Faith previamente discutidos.

A partir del análisis de abundancias diferenciales también se observaron patrones comunes a los tres inoculantes (Figura V.10). Los géneros *Aeromicrobium* (Propionobacteriales) y *Nevskia* (Xanthomonadales, Proteobacteria), que mostraron abundancias mayores en los microcosmos inoculados con respecto a ambos controles, son géneros comúnmente encontrados en ambientes contaminados con PAH (Crapon et al. 2018; Wang et al., 2018), y la participación directa de ambos géneros en la degradación de PAH ha sido corroborada mediante ensayos de SIP DNA suplementados con ¹³C-fenantreno (Crapon et al., 2017; Li et al., 2021). De igual manera, un género no clasificado de la familia Oxalobacteriaceae (Burkholderiales) también mostró un aumento en su abundancia en los microcosmos inoculados con CS-1 y CS-4 con respecto a los microcosmos SP+PAH. La presencia de este grupo también es común en sistemas contaminados (Crapon et al., 2018), y su rol en la degradación de PAH también fue identificado a través de la incorporación de la marca en ensayos de SIP donde se suplementó benzopireno marcado (Song et al., 2015). Estos resultados demuestran que la inoculación de organismos degradadores no solo incrementa las capacidades metabólicas de la comunidad por los microorganismos adicionados, sino que también estimula a las poblaciones degradadoras nativas del suelo. Li et al. (2018) mostró este efecto en ensayos en microcosmos con aguas residuales contaminadas con PAHs a los cuales se le inoculaba con la cepa degradadora de fenantreno *Acinetobacter tandoii* LJ-5; si bien esta cepa no participó activamente en la degradación del fenantreno suplementado, generó un cambio en la comunidad degradadora aumentando la eficiencia de remoción del contaminante. En otros estudios donde el bioaumentación con consorcios degradadores definidos fue exitoso, a través de la estimación por redes de coocurrencia, se evidenció un aumento de las interacciones positivas de miembros del consorcio con la comunidad nativa degradadora (Mistry et al., 2023; Teng et al., 2022).

Chthoniobacter es un género que mostró abundancias significativamente mayores en los microcosmos inoculados con respecto a SP+PAH a los 15 días de incubación. Este género es un componente habitual en los suelos (Gran-Scheuch et al., 2020), su abundancia muestra una correlación negativa con la concentración de PAH (Redfern et al., 2019). Su mayor abundancia en los microcosmos inoculados podría estar relacionada con la degradación observada en los mismos, ya que mostraron casi la eliminación completa de fluoreno, fenantreno y antraceno.

Los microcosmos control fueron los que más divergieron con respecto a los microcosmos inoculados en relación con los grupos taxonómicos predominantes a los 15 días de incubación. En estos microcosmos predominaron un género no clasificado del orden Gaiellales y de la familia Nitrososphaeraceae, y el género *Candidatus Udaeobacter*.

Mediante la predicción funcional (PICRUSt2), de los KOs totales presentes, se observó que el comportamiento funcional de los microcosmos analizados fue semejante al composicional, donde hubo una clara diferenciación de los sistemas inoculados con respecto al Control, mientras que SP+PAH muestra una diferenciación intermedia (Figura V.11.A). Sin embargo, al analizarlos KOs vinculados a la degradación de compuestos aromáticos, a los 15 días de incubación se observó una clara separación de SP+PAH del Control (Figura V.11.B). Esto se vio reflejado en forma detallada al analizar el número de KOs que mostraron diferencias significativas (Figura V.12), ya que los microcosmos contaminados tuvieron un alto número de KOs relacionados a la degradación de compuestos aromáticos con abundancias mayores con respecto al control, mientras que al comparar los microcosmos contaminados el número de KOs diferenciales disminuyó.

Varios KOs mostraron mayores abundancias en los microcosmos inoculados con respecto a SP+PAH. Entre ellos K14581 (naphthalene 1,2-dioxygenase ferredoxin reductase component), el cual es el único KO vinculado a la degradación de compuestos aromáticos que puede actuar en los primeros pasos de la degradación de PAHs (fluoreno, antraceno, benzo[a]pireno) de acuerdo con la base de datos de KEGG. Además, Zhou et al.,(2020) proponen la participación de esta enzima en los primeros pasos de la degradación de pireno. La presencia de enzimas que actúan en la activación del anillo en los primeros pasos de la degradación de los PAH resulta clave en los procesos de biodegradación, ya que representan los pasos limitantes del proceso. También varios KOs vinculados a la degradación de protocatecuato, metabolito intermediario de la degradación de PAH, (K04100, K04101, K10219, K00455) mostraron mayores abundancias en los microcosmos inoculados, lo cual podría estar indicando la predominancia de la vía del orto-clivaje del hidrocarburo (Figura IV.9). Varios KOs mostraron mayores abundancias en los microcosmos SP+PAH, sin embargo, la mayoría de estos están vinculados con la degradación de tolueno, lo cual implica una respuesta menos específica en relación con la degradación de PAH.

Al analizar la contribución de los distintos géneros a KOs específicos (Figura V.13), los géneros *Burkholderia* y *Sphingobium* fueron los géneros que más contribuyeron a las funciones que mostraron diferencias significativas, de modo que las mayores abundancias observadas en estos microcosmos estarían vinculadas con la presencia de los inoculantes. Además, explicaría las diferencias encontradas entre los microcosmos inoculados con CS AM-Bk y CS-1.

En particular, *Burkholderia* fue el género que más contribuyó a K14581, lo cual podría explicar la mayor degradación de pireno observada en los microcosmos inoculados con CS AM-Bk a los 15 días de incubación (Zhou et al.,2020) (Figura V.1). Si bien la presencia de esta enzima fue inferida mediante la predicción realizada por

PICRUSt2, la expresión de la naftaleno 1,2 dioxigenasa por parte de Bk, también fue observada durante la degradación de fenantreno en medio líquido tanto en CS-4 (Macchi et al.,2021) como en AM-Bk (esta tesis). De esta manera, la predicción por PICRUSt2 junto al análisis de las abundancias relativas de los géneros *Sphingobium* y *Burkholderia*, indicarían que las cepas AM y Bk tienen un rol activo en la degradación de PAH durante el proceso de bioaumentación, en el cual la inoculación permite incrementar la capacidad catabólica de la comunidad a fin de disminuir la concentración de los contaminantes. Este efecto también fue observado en otros trabajos de bioaumentación, donde la inoculación aumentó la degradación de los contaminantes a la vez que se vio un incremento de las funciones (inferidas por PICRUSt2) vinculadas a dicho proceso (Cayetano et al.,2021; Teng et al.,2022; Zhou et al.,2022).

La divergencia estructural y funcional de la comunidad entre los microcosmos control y los contaminados disminuyó a los 58 días de incubación (Figura V.6) aumentando el número de ASVs mayoritarios compartidos por todos los microcosmos analizados (Figura V.7), no se observaron diferencias significativas en los índices de diversidad (Figura V.5), y a la vez el número de géneros y funciones diferencialmente abundante se redujo (Figura V.10B y Anexo II, Figura AII.1).

La principal diferencia entre los microcosmos control y los microcosmos contaminados es la abundancia significativamente mayor de *Sulfuritalea* en los microcosmos contaminados (Figura V.9 y V.10). Este género bacteriano comprende microorganismos quimiolitótrofos oxidantes de sulfuro, en cuyos genomas se encuentran genes para la degradación tanto aeróbica como anaeróbica de benzoato (Sperfeld et al.,2019). *Sulfuritalea* es un género comúnmente encontrado en suelos contaminados con PAHs (Guo et al.,2017; Dong et al.,2020; Yang et al.,2022), pudiendo ser clasificado como un taxón indicador tolerante a los hidrocarburos potencialmente involucrado en la degradación de estos o beneficiándose de la degradación de los subproductos (Cebren et al.,2022). Su presencia en los microcosmos contaminados al día 58 podría estar vinculada a un efecto residual de la contaminación sobre estos microcosmos. No obstante, en todos los microcosmos se observa una predominancia de *Candidatus Udaeobacter*, uno de los géneros de suelo más abundantes con distribución global (Brewer et al.,2016; Willms et al.,2020). Si bien no ha sido posible aislar este género, su genoma ha sido reconstruido mediante estudios metagenómicos de suelos, mostrando un genoma reducido con auxotrofías para la síntesis de aminoácidos y vitaminas B12, pero con numerosos transportadores para tales compuestos, lo que le otorgaría una ventaja adaptativa en la comunidad del suelo al reducir los costos energéticos (Brewer et al.,2016; Willms et al.,2020). La abundancia de este género está correlacionada con la salud del suelo, pudiendo ser considerado como un bioindicador del estado del mismo (Wilhem et al.,2023). Nuestros resultados, indicarían que la inoculación no solo fue efectiva en la remoción de los contaminantes, sino que al final del período de incubación el impacto de la inoculación se ve reducido ya que las comunidades contaminadas se asemejan más al control (Figura V.5, V.6, V.9, V.10B).

En base a los resultados previamente analizados y discutidos en este capítulo, se observó que el bioaumentación con los tres consorcios inoculados fue exitoso en la aceleración de la remoción de los contaminantes. Con respecto a los géneros inoculados, al final del período de incubación se observó una marcada reducción de su abundancia relativa, lo cual evidenciaría un establecimiento temporal del inoculante que podría estar vinculada con la desaparición de los contaminantes. Cuando se agrega un recurso a una comunidad (ej: PAH suplementados), el cambio de la disponibilidad del mismo puede permitir la supervivencia del inoculante, incluso cuando la comunidad nativa es diversa (Mallon et al.,2015). Esto resulta cierto cuando el inoculante posee un rasgo particular que lo hace competitivamente superior en la utilización de recursos (Mawarda et al.,2020). Sin embargo, una vez que la concentración de los contaminantes disminuyó, este nicho vacante también desaparece, y, debido a la alta diversidad de la comunidad nativa, el inoculante no es capaz de permanecer en la comunidad. Aquí además se pudo ver que independientemente del inóculo, los sistemas inoculados al final del período de incubación mostraron una estructura semejante a la de los microcosmos SP+PAH; por lo que luego de cumplir el efecto buscado con la inoculación, que es la aceleración de la degradación de los contaminantes, los inoculantes desaparecen y la sucesión ecológica conduce a una estructura comunitaria semejante en los microcosmos contaminados. El establecimiento temporal del inoculante, así como su bajo impacto en la microbiota nativa son objetivos buscados en los procesos de inoculación (Mawarda et al.,2020), por lo que los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran una ventaja significativa de la inoculación con microorganismos alóctonos.

Capítulo VI

Estudio del efecto de las interacciones tróficas sobre los procesos de bioaumentación en suelos



VI. Estudio del efecto de las interacciones tróficas sobre los procesos de bioaumentación en suelos

En este capítulo se muestran los resultados del análisis de transferencia de carbono y las interacciones tróficas que ocurren durante el bioaumentación con el consorcio AM-Bk en suelos con distinta historia de contaminación mediante la técnica de SIP-DNA.

Los suelos analizados fueron el suelo Pereyra con contaminación aguda (SP), cuyo análisis se mostró en el capítulo V, y un suelo crónicamente contaminado con PAH proveniente de una industria petroquímica llamado IPK.

Sobre el suelo IPK se estudió la eficiencia de degradación de CS-AM-Bk y su variación al aplicar la estrategia combinada de bioaumentación con bioestimulación, mediada por la adición de un surfactante.

VI.1 Estudio de bioaumentación con CS AM-Bk sobre un suelo crónicamente contaminado con PAH

Se seleccionó un suelo crónicamente contaminado con PAH (IPK), el cual fue obtenido a partir de una planta de tratamiento por *landfarming* de un residuo petroquímico con altas concentraciones de PAH, para estudiar la eficiencia del bioaumentación con el consorcio CS AM-Bk en la degradación de PAH en sitios con contaminación crónica. Con el suelo IPK se prepararon microcosmos los cuales fueron inoculados con 5×10^7 UFC de CS AM-Bk por g de suelo seco (IPK-CS AM-Bk). Como control se prepararon microcosmos con suelo IPK sin inocular (IPK).

Estos microcosmos fueron incubados durante 58 días, y se muestrearon al tiempo inicial, y a los 15, 30 y 58 días de incubación. Para cada tiempo de muestreo se determinó la concentración de PAH y se evaluó el potencial degradador mediante qPCR de los genes específicos para la degradación de PAH, RHD α -GN y C230

VI.1.1 Cuantificación de PAH presentes en IPK durante el bioaumentación con CS AM-Bk

La figura VI.1 muestra la concentración remanente de los PAH detectados presentes en el suelo IPK al tiempo inicial y a los 15, 30 y 58 días de incubación para los microcosmos inoculados con CS AM-Bk, así como para los microcosmos IPK. En la caracterización inicial de este suelo, el pireno fue el PAH predominante, con concentraciones de 200 ± 8 mg. Kg⁻¹ de suelo seco, el acenaftileno fue el segundo PAH mayoritario (152 ± 4 mg. Kg⁻¹). El resto de los PAH identificados fueron antraceno, fenantreno, criseno, benzo[a]antraceno,

benzo[a]pireno y fluoranteno, cuyas concentraciones estuvieron por debajo de 100 mg. Kg⁻¹ de suelo seco, donde el fenantreno fue el PAH que mostró concentraciones más bajas (menores a 40 mg. Kg⁻¹).

A lo largo de todo el período de incubación, los microcosmos IPK no mostraron variaciones significativas en la concentración de los PAH detectados (Figura VI.1). En los microcosmos IPK-CS AM-Bk se observó un descenso en la concentración del pireno y del criseno a los 58 días, sin embargo, la concentración de estos PAH no fue significativamente diferente a las observadas en IPK. Para los restantes PAH detectados no se observaron diferencias en su concentración a lo largo del período analizado.

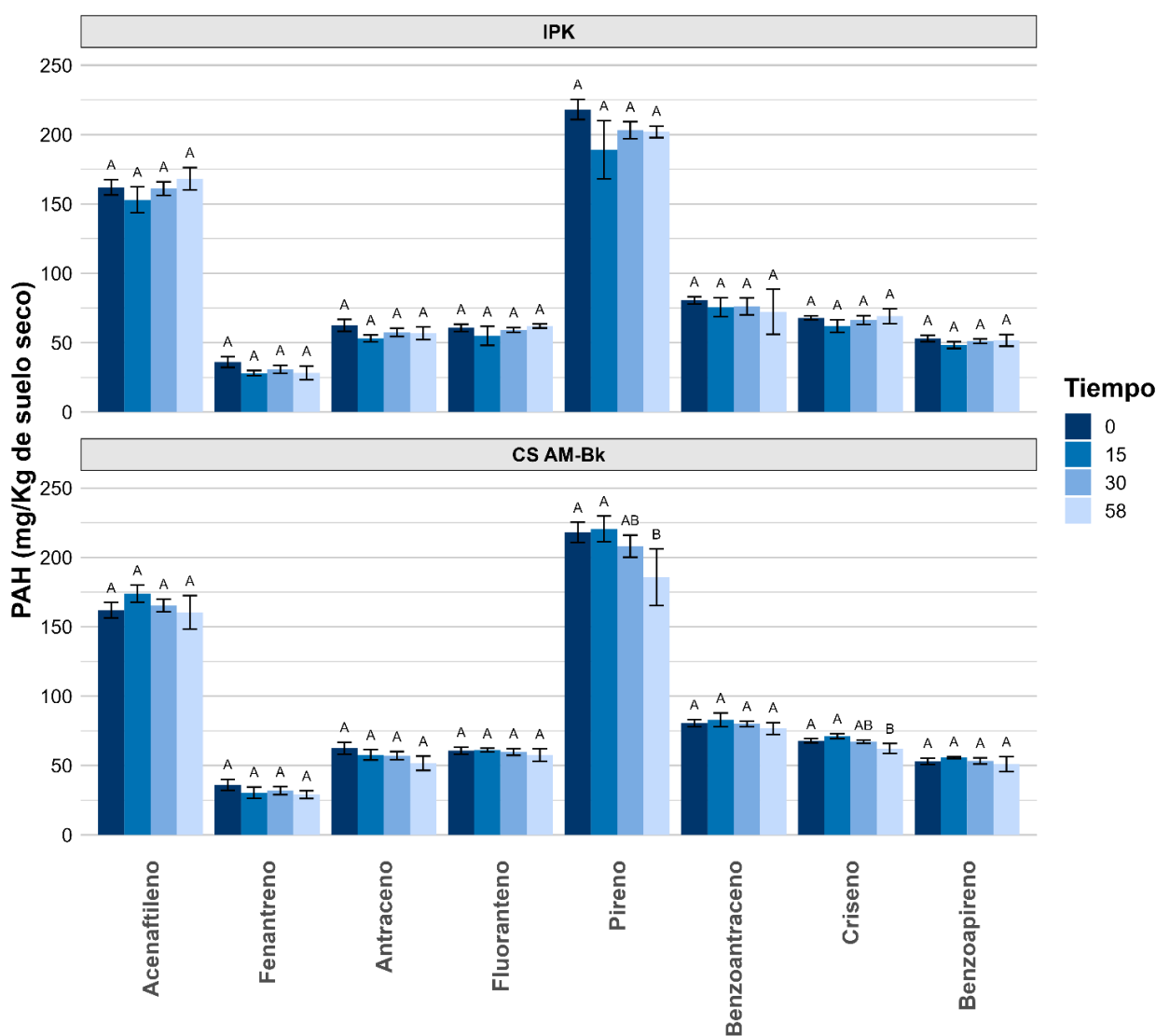


Figura VI.1: Concentración de los diferentes PAH detectados, expresada como mg/Kg de suelo seco, a los distintos tiempos de muestreo de los microcosmos IPK-CS AM-Bk y el control IPK. Se muestran los promedios de triplicados independientes con sus respectivos desvíos estándar.

VI.1.2 Dinámica poblacional y cuantificación de genes específicos mediante qPCR

La figura VI.2 muestra el número de copias por gramo de suelo seco para cada uno de los genes cuantificados a los distintos tiempos muestreados en los microcosmos IPK y en los microcosmos con CS AM-Bk.

El número de copias del gen 16S rARN para todos los microcosmos fue del orden de 10^8 - 10^9 copias/g de suelo seco, no se observaron variaciones a lo largo del tiempo de incubación. Con respecto a los genes específicos para la degradación de PAH, el número de copias de los genes C230 y PAH-RHD α GN mostraron valores del orden de 10^7 y 10^5 copias/g suelo seco respectivamente, no se observaron variaciones temporales ni entre los sistemas.

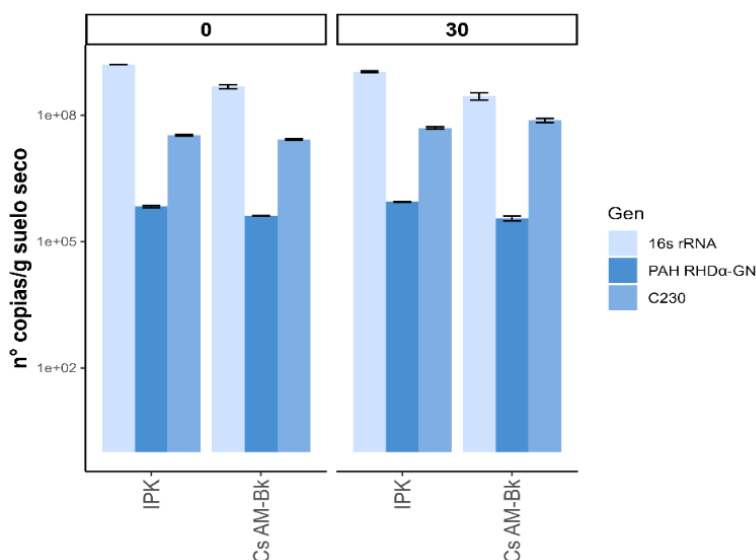


Figura VI.2: Número de copias por gramo de suelo seco para el gen 16S rARN y genes específicos PAH RHD α -GN y C230, en los microcosmos inoculados a los distintos tiempos de incubación. Se muestran los promedios de duplicados con sus respectivas desviaciones estándar.

La figura VI.3 muestra la relación gen específico/gen 16S rARN a lo largo del tiempo para los microcosmos con CS AM-Bk e IPK. Al tiempo inicial de incubación se observó que en los microcosmos inoculados la relación gen PAH-RHD α GN/16S rARN fue mayor con respecto a los microcosmos control IPK. Luego de 30 días de incubación, se observó un aumento de esta relación en los microcosmos control, alcanzando valores similares a los microcosmos inoculados. Con respecto a la relación C230/16S rARN, al tiempo inicial no se observaron diferencias entre los microcosmos analizados. Sin embargo, a los 30 días se observó un aumento de esta relación en los microcosmos con CS AM-Bk con respecto a los microcosmos IPK.

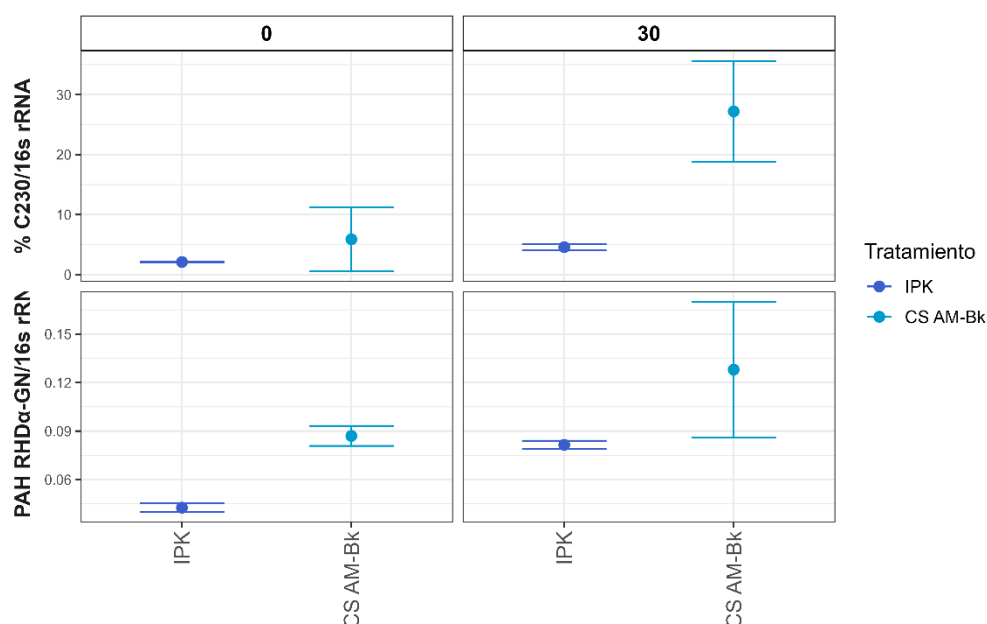


Figura VI.3: Relación porcentual entre el número de copias del gen específico (gen C230 o gen PAH RDH α -GN) y el número de copias del gen 16S rARN para los microcosmos inoculados y los controles. Se grafican los promedios de duplicados con sus respectivas desviaciones estándar.

VI.1.3 Cuantificación de PAH presentes en IPK durante la estrategia combinada de bioaumentación y bioestimulación mediada por un surfactante

A partir de los resultados observados en la sección anterior, donde los microcosmos inoculados no mostraron degradación de PAH, se aplicó una estrategia combinada de bioaumentación con bioestimulación mediada por la adición del surfactante Tritón X-100 con el objetivo de evaluar el efecto de la biodisponibilidad sobre la eficiencia de degradación del inoculante. A partir del suelo IPK se prepararon microcosmos, los cuales fueron inoculados con 5×10^7 UFC de CS AM-Bk por g de suelo seco, y fueron adicionalmente suplementados con una dosis sub-CMC de Triton-X-100 ($11 \text{ mg.g de suelo seco}^{-1}$) ($IPK^{\text{Triton-CS AM-Bk}}$). Como control se prepararon microcosmos con suelo IPK suplementado con Triton-X100 sin inocular (IPK^{Triton}) (Cecotti et al.,2018).

Estos microcosmos fueron incubados durante 58 días, y se tomaron muestras al tiempo inicial, 15, 30 y 58 días de incubación.

En la figura VI.4 se muestra la concentración de los PAH detectados durante la incubación. En los microcosmos control IPK^{Triton} se observó un descenso significativo ($p < 0.05$) en la concentración de pireno a los 30 días. Esta tendencia se mantuvo hasta los 58 días, cuando el pireno alcanzó una concentración final de $169 \pm 6 \text{ mg.Kg}^{-1}$ de suelo seco, lo que representó una degradación del 25%. A los 58 días también se observó un descenso

significativo en la concentración de fluoranteno y criseno, lo cual representó una degradación del 23% y un 13% respectivamente.

En los microcosmos inoculados IPK^{Triton}-CS AM-Bk no se observaron diferencias significativas entre las concentraciones iniciales de los PAH y las detectadas a lo largo del período de incubación.

Al comparar las concentraciones remanentes de los PAH detectados entre los microcosmos inoculados y los microcosmos control, no se observaron diferencias significativas en los distintos tiempos de muestreo analizados.

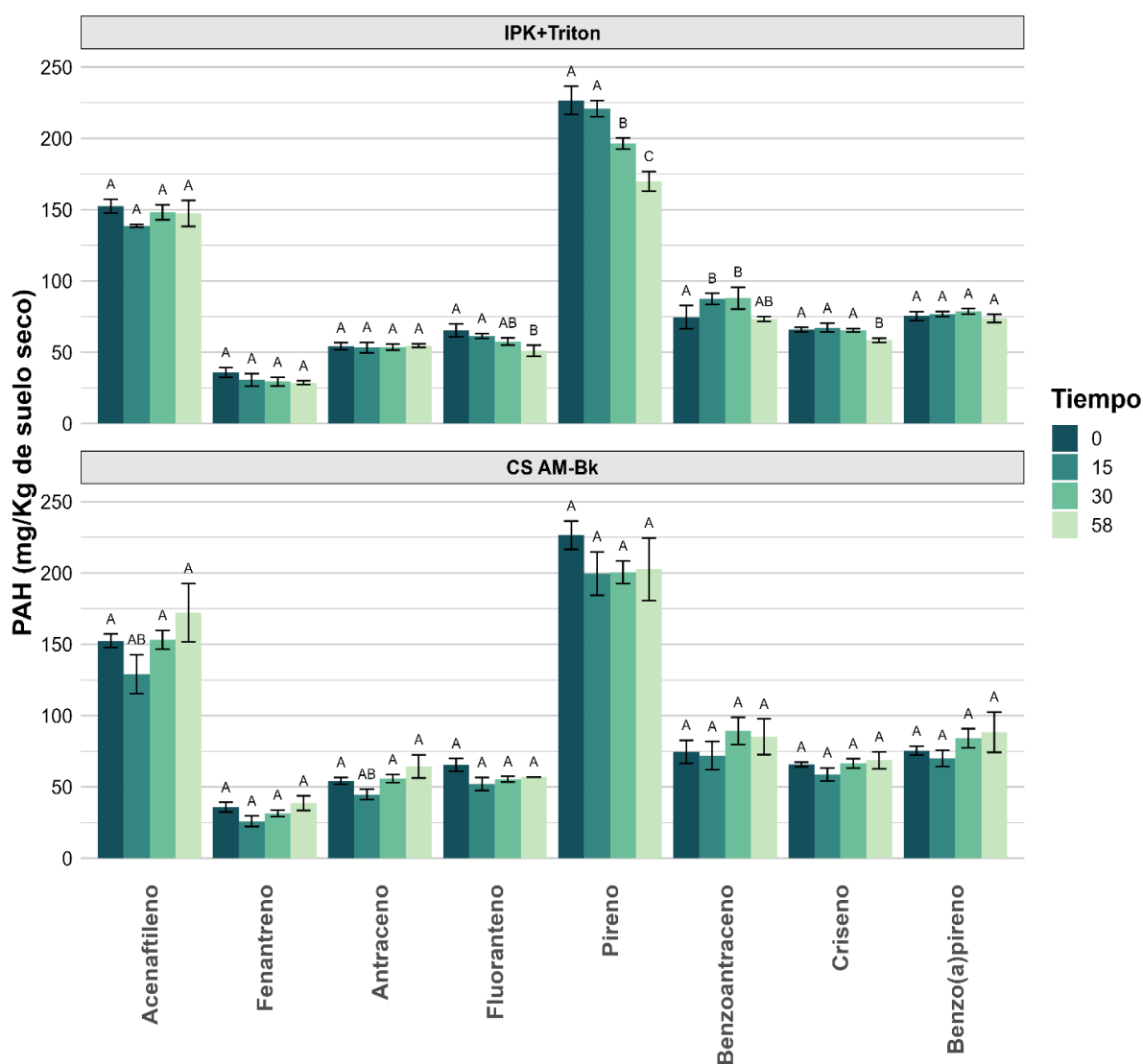


Figura VI.4 Concentración de los diferentes PAH detectados expresada como mg/Kg de suelo seco en los distintos tiempos de muestreo en el suelo crónicamente contaminado con Triton X-100 (IPK+Triton). Se muestran los promedios de triplicados independientes con sus respectivos desvíos estándar

VI.2 Estudio de las interacciones tróficas entre el inoculante y la comunidad nativa de los suelos mediante SIP-DNA

Con el objetivo de estudiar las interacciones tróficas que se establecen entre un inoculante y la comunidad nativa en suelos con distinta historia de contaminación, se estudió el destino de cocultivo AM-Bk, tanto en la comunidad bacteriana como en la de protistas y hongos, mediante la técnica de SIP-DNA. Estos ensayos fueron realizados en el laboratorio de Ecología de las Interacciones Microbianas del Centro Helmholtz para la investigación ambiental (UFZ, Leipzig, Alemania), bajo la dirección del Prof. Dr. Antonis Chatzinotas y en colaboración con la Dra. Stephanie Jurburg.

Para ello se marcaron las células de las cepas *Sphingobium* sp. AM y *Burkholderia* sp. Bk con C-13, cultivándolas en MML suplementado con glucosa marcada con C-13 como única fuente de carbono y energía. Estas células marcadas fueron inoculadas en microcosmos construidos a partir del suelo Pereyra con el agregado de la mezcla de PAH (fluoreno, fenantreno, antraceno y pireno) y el suelo crónicamente contaminado IPK. Los microcosmos fueron incubados durante 30 días, tomándose muestras a los 0, 7, 15 y 30 días de incubación. Como control se utilizó un microcosmos inoculado con las cepas AM y Bk sin marcar, crecidas en glucosa (C-12) como única fuente de carbono y energía. Cada microcosmo fue realizado por triplicado.

Posteriormente se extrajo el ADN de cada muestra, el cual fue ultracentrifugado en CsCl a fin de generar un gradiente de densidad para la separación de las fracciones pesadas y livianas tanto para las muestras marcadas con C-13 como el control C-12. Para cada muestra se colectaron un total de 12 fracciones, resultando en un total de 492 fracciones, las cuales fueron precipitadas (PEG-glucógeno), resuspendidas y se cuantificó la concentración de ADN. La figura VI.5 muestra los perfiles de la concentración de ADN en relación con la densidad luego del proceso de ultracentrifugación. A partir de estos perfiles se decidió hacer un pool entre las fracciones cuyas densidades estaban entre 1,72-1,735 g.ml⁻¹ (fracción pesada) y 1,70-1,715 g.ml⁻¹ (fracción liviana) (FiguraVI.4). Estos pools se realizaron para cada uno de los triplicados. Debido a que las muestras del día 30 de incubación en el suelo IPK no mostraron un patrón de fraccionamiento claro se excluyeron del análisis posterior. De esta manera se obtuvieron un total de 82 pools (41 livianos y 41 pesados).

A partir de los pools de las fracciones pesadas y livianas para los microcosmos inoculados con ¹³C AM-Bk, así como de los microcosmos control (inoculados con ¹²C AM-Bk), se secuenció la región hipervariable V3-V4 (341F-806R) del gen 16S rARN de bacterias para un total de 80 muestras y la región hipervariable V8-V9 (1422F-1797) del gen 18S rARN de eucariotas para un total de 78 muestras (se excluyeron aquellas muestras que no amplificaron en PCR). Las secuencias fueron analizadas en la interfaz R utilizando el paquete *dada2*. La figura VI.5 muestra el análisis de la cobertura de las muestras mediante las curvas de rarefacción, observándose que la profundidad de secuenciación fue suficiente para cubrir la mayor parte de la diversidad, tanto para el gen 16S rARN (FiguraVI.6A) como para el gen 18S rARN (FiguraVI.6B).

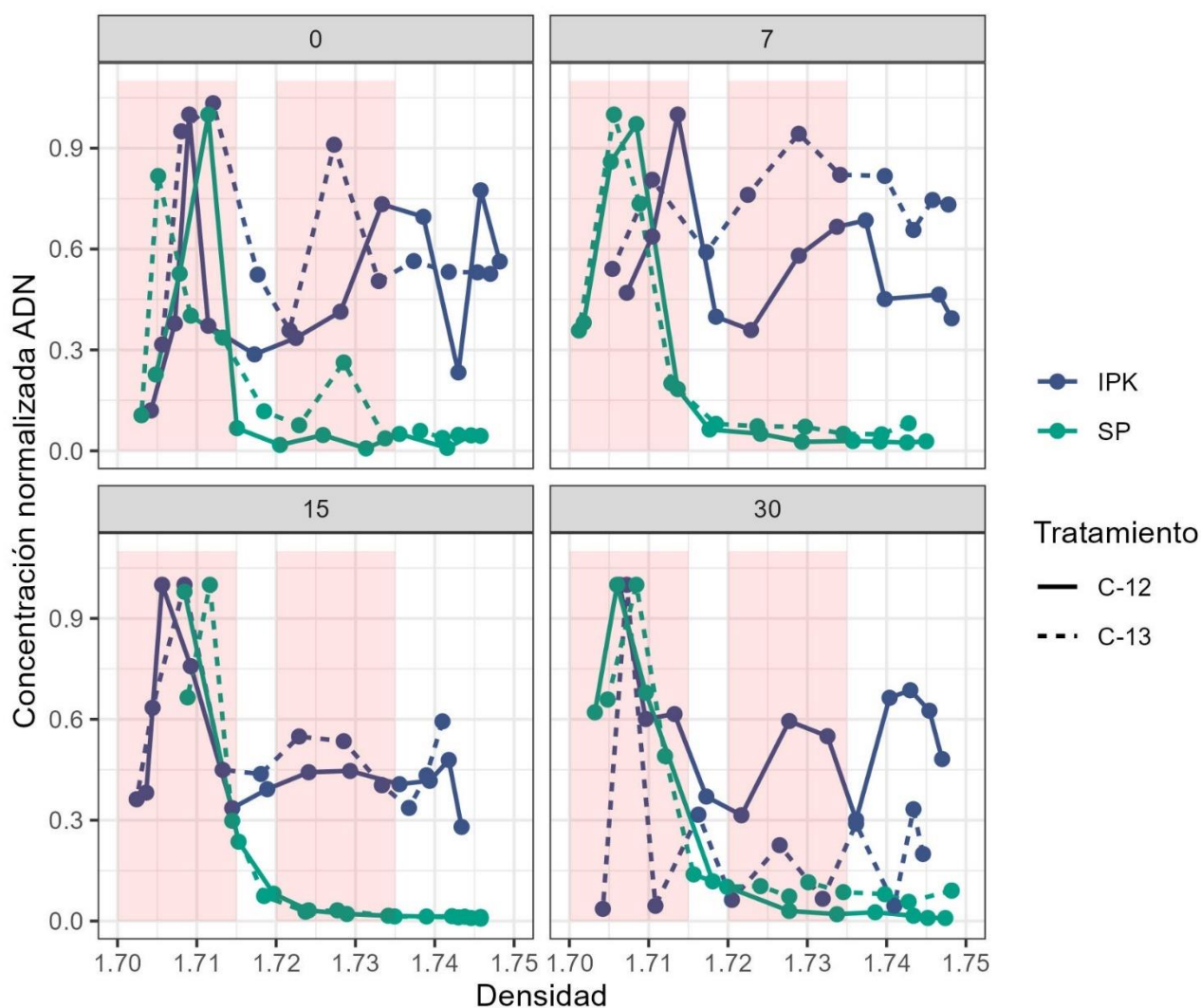


Figura VI.5: Fraccionamiento de las muestras luego de la centrifugación en gradiente de CsCl. Se expresan el promedio de los triplicados de las concentraciones normalizadas para cada una de las densidades analizadas para los suelos SP e IPK. Las áreas sombreadas representan las densidades utilizadas para generar los pools de las fracciones pesadas y livianas.

VI.2.1 Factor de Enriquecimiento (EF)

Para determinar aquellos géneros que mostraron enriquecimiento en la fracción pesada, se realizó una modificación al factor de enriquecimiento (EF) propuesto por Kramer *et al.* (2016):

$$EF_{Kramer} = \frac{pesada^{C13}}{liviana^{C13}} - \frac{pesada^{C12}}{liviana^{C12}}$$

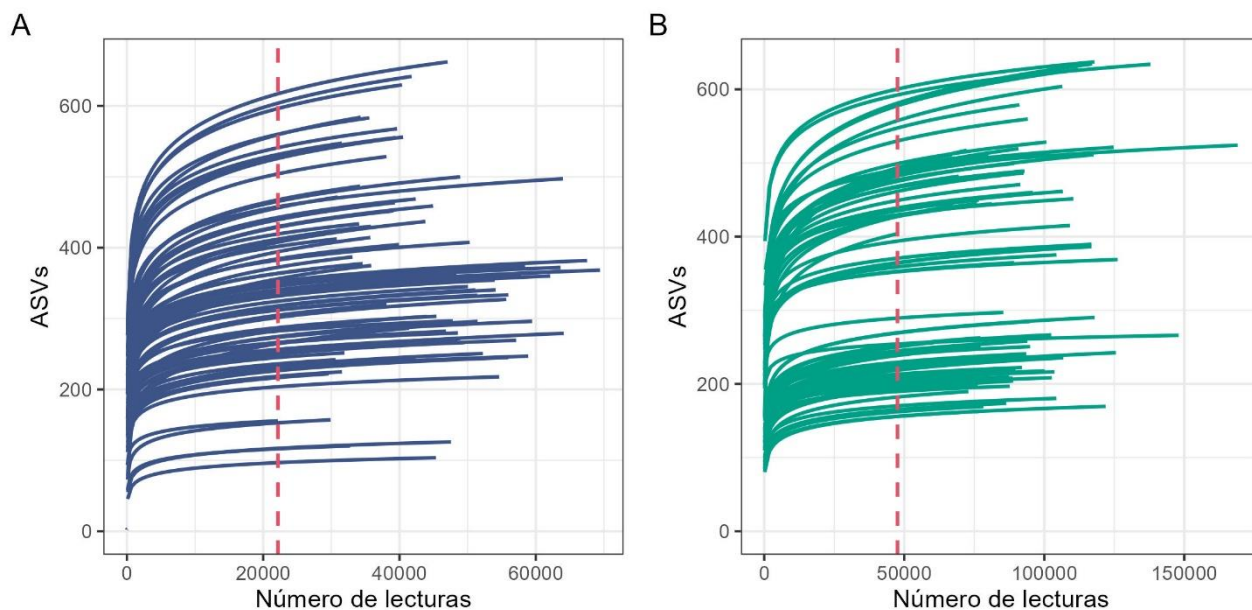


Figura VI.6: Curvas de rarefacción para los pools de las fracciones livianas y pesadas de cada microcosmo para el gen 16S rARN (A) y 18S rARN (B), donde se muestra el número de ASVs observados en relación con la profundidad de secuenciación. La línea roja punteada indica el número de secuencias utilizado como punto de corte para la rarefacción de las muestras.

La modificación propuesta en esta tesis define el cálculo del EF como la diferencia entre las abundancias relativas de los distintos géneros en la fracción pesada de los microcosmos^{C13} marcados en relación con la abundancia relativa de dicho género en ambas fracciones en los microcosmos^{C13} y las abundancias relativas de los distintos géneros en la fracción pesada de los microcosmos^{C12} no marcados en relación con la abundancia relativa de dicho género en ambas fracciones en los microcosmos^{C12}.

$$EF = \frac{\text{pesada}^{13C}}{\text{pesada}^{13C} + \text{liviana}^{13C}} - \frac{\text{pesada}^{12C}}{\text{pesada}^{12C} + \text{liviana}^{12C}}$$

Donde **pesada^{13C}** y **liviana^{13C}** representan las abundancias relativas de los géneros en la fracción pesada y liviana de tratamiento inoculado con las cepas AM y Bk marcadas con C¹³, mientras que **pesada^{12C}** y **liviana^{12C}** representan las abundancias relativas de los géneros en el control inoculado con las cepas AM y Bk C¹². Se analizaron los géneros cuya abundancia relativa fue mayor al 0.5% y cuya prevalencia fue mayor al 5% en los microcosmos analizados en al menos un tiempo de incubación.

De esta manera, el índice representa la diferencia de la proporción de la abundancia relativa en la fracción pesada con respecto al total de las fracciones analizadas entre los tratamientos, solucionando el problema de un resultado no definido del índice propuesto por Kramer cuando la abundancia relativa en la fracción liviana

era 0. Además, restringe la escala del índice a valores entre -1 y 1, mientras que el índice propuesto por Kramer podía ir desde $-\infty$ a $+\infty$.

A fin de preservar la variabilidad de los resultados obtenida a partir de los microcosmos la diferencia entre tratamiento C¹³ y C¹² se realizó mediante la combinatoria (*bootstrapping*) de las proporciones para cada triplicado. Se consideraron como enriquecidos aquellos géneros que mostraron valores positivos de EF.

Valores de EF>0 implican cierto grado de enriquecimiento, por lo cual establecimos un umbral de EF> 0,015 (es decir, un aumento del 1,5% en la abundancia relativa de ese género en relación con los C¹² microcosmos) para definir el enriquecimiento de los géneros.

VI.2.2 Estudio de los géneros bacterianos enriquecidos a lo largo del tiempo mediante secuenciación masiva del gen 16S rARN en el suelo SP

A fin de establecer los géneros capaces de incorporar la biomasa marcada proveniente del inóculo en el suelo SP, se identificaron aquellos géneros enriquecidos en la fracción pesada. La figura VI.7 muestra aquellos géneros que incorporaron la marca en al menos un tiempo de incubación.

Al tiempo inicial de incubación (día 0), únicamente los géneros *Sphingobium* y *Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia* mostraron enriquecimiento en C13 en la fracción pesada, siendo los géneros más abundantes, cuya suma representó más del 80% de la abundancia relativa total de los géneros.

A los 7 días de incubación, se observó enriquecimiento en C13 de los géneros *Sphingobium* y *Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia*, siendo los géneros mayoritarios (21% y 53% de la abundancia relativa respectivamente), pero también se observó enriquecimiento de los géneros *Bacillus* (0,2%, orden Bacillales) y *Gemmatimonas* (0,15%, orden Gemmatimonales).

A los 15 días de incubación, entre los géneros enriquecidos en C13 se encontraron no solo los géneros *Sphingobium* (22%) y *Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia* (45%), sino también se observó enriquecimiento del género *Lysobacter* (orden Xanthomonadales), *ADurb.Bin063-1* (orden Pedosphaerales) y miembros de la familia Chitinophagaceae (orden Chitinophagales).

Los mayores cambios se observaron a los 30 días de incubación, con un total de 20 géneros enriquecidos. Además, los géneros *Sphingobium* y *Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia*, si bien siguieron mostrando enriquecimiento en la fracción pesada, se observó una disminución marcada tanto de sus abundancias relativas como del EF, alcanzando valores del 5 % para *Sphingobium* y de 9% *Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia*. Entre los géneros más abundantes enriquecidos a los 30 días de incubación se encontraron los géneros *Sphingomonas* (orden Sphingomonadales) y *Candidatus Udeobacter* (orden Chthoniobacterales), alcanzando abundancias relativas del 20% y del 9%, respectivamente. También varios miembros del orden Rizobiales mostraron enriquecimiento a los 30 días de incubación, entre los cuales se encontraron los géneros

Bradirhizobium, miembros de la familia Methyloligellaceae y miembros de la familia Xanthobacteraceae. Los otros géneros enriquecidos fueron *Lysobacter* y *Rhodanobacter* (orden Xanthomonadales), *Candidatus Solibacter* (orden Solibacterales), *Mycobacterium* (orden Corynebacteriales), *Acidothermus* (orden Frankiales), *Gemmatimonas* y miembros de la familia Gemmatimonadaceae (orden Gemmatimonadales).

También se observó enriquecimiento de miembros de los órdenes Rokubacteriales, Galleliales, Acidobacteriales y de las clases Holophagae y Acidobacteriae (subgrupo 7 y subgrupo 2 respectivamente), y del filo Chloroflexi (TK10) los cuales no pudieron ser clasificados a nivel de género.

VI.2.3 Estudio de los grupos eucariotas enriquecidos a lo largo del tiempo mediante secuenciación masiva del gen 18S rARN en el suelo SP

A fin de evaluar la incorporación de biomasa marcada proveniente del inoculante por parte de los eucariotas, ya sea por predación directa por protistas bacterívoros o de manera indirecta por actividad de exoenzimas de hongos, se estudiaron aquellos géneros eucariotas en los cuales se observó enriquecimiento en la marca de C-13 mediante secuenciación del gen 18S rARN, determinado por el EF, en al menos uno de los tiempos muestreados. Los resultados se muestran en la figura VI.7.

Si bien se observó que al tiempo inicial algunos géneros que mostraron valores de EF positivos, se descartaron del análisis aquellos géneros en donde no se observó una variación del EF a lo largo del tiempo o que el valor inicial del EF no mostró un aumento a lo largo del tiempo.

A los 7 días de incubación se observó el enriquecimiento del género *Allas* (orden Thaumomnadida), miembros no cultivables de la familia Cercomonadidae (orden Cercomonadales) y de la clase Thecofilosea, pertenecientes al filo Cercozoa. También se observó enriquecido el género *Sorodiplophrys* (orden Thraustochytrida, filo Bigyra) y *Telaepolella* (orden Gracilipodida, filo Amebozoa). Entre los grupos de hongos enriquecidos se encontró el género *Hygrocybe* (orden Agaricales), *Malassezia* (orden Malasseziales), el género *LKM 11* (orden Rozellales) y el género *Rhizopodium* (orden Rhizopodiales). También se observó el enriquecimiento de metazoos, como los representantes de la familia Adinetidae (orden Bdelloidea, filo Rotífera).

A los 15 días de incubación se observó un aumento del número de géneros enriquecidos. Dentro de los protistas del superfilo Rhizaria, entre los géneros enriquecidos del filo Cercozoa se encontraron *Allas*, *Cercomonas*, *Eocercomonas*, *Kraken*, así como miembros de la clase Thecofilosea. Dentro del filo Amebozoa se encontraron miembros del orden Varipodida (géneros *Filamoeba*), miembros no cultivables del orden Gracilipodida, y *Telaepolella*. Dentro del filo Ciliophora se encontró enriquecido únicamente un miembro de la subclase Hypotrichia. Por último, dentro del filo Apicomplexa, se encontraron enriquecidos miembros de la familia Eiimeridae y miembros de la orden Eugregarinorida (D3P05A02).

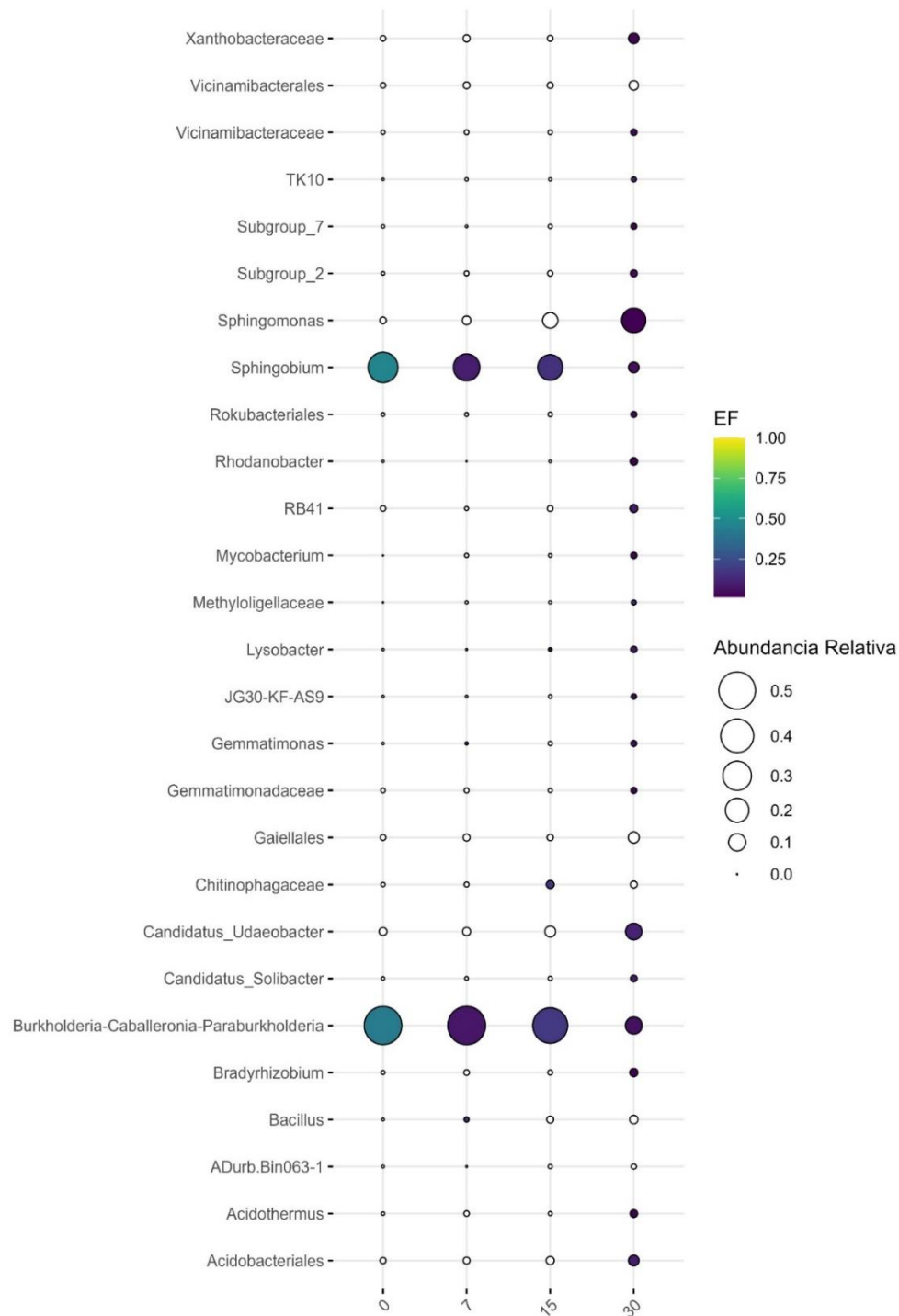


Figura VI.7: Géneros bacterianos enriquecidos en C-13 de acuerdo con el EF en los microcosmos inoculados con CS AM-Bk a los 0, 7, 15 y 30 días de incubación. Se muestra aquellos géneros cuya abundancia relativa fue mayor al 0.5% y que mostraron enriquecimiento en al menos un tiempo de incubación. La escala de colores muestra el promedio del EF para cada género y el tamaño de la esfera indica el promedio de las abundancias relativas, considerando a la unidad como el total de la comunidad.

Con respecto a los hongos enriquecidos se observó la presencia de género *Malassezia* (orden Malasseziales), el género *LKM 11* (orden Rozellales) y el género *Mortierella* (orden Mortierellales). También se observó el enriquecimiento de metazoos, como los representantes de la familia Adinetidae (orden Bdelloidea, filo Rotífera) y de un miembro del orden Tylenchida (filo Nematoda). Al final del período de incubación (día 30), permanecieron enriquecidos la mayoría de los géneros de protistas que se encontraron enriquecidos a los 15 días. Sin embargo, nuevos géneros mostraron enriquecimiento, como *Nuclearia* (filo Choanozoa, orden Nucleariida), *Polymyxa* y *Sorosphaerula* (filo Cercozoa, orden Plasmodiophorida), y *Acanthamoeba* (filo Amebozoa, orden Centramoebida). Dentro de los hongos que mostraron enriquecimiento a los 30 días de incubación, se encontraron los géneros *Archaeorhizomyces* (división Ascomycota, orden Archaeorhizomycetales), el género *Hygrocybe* (división Basidiomycota, orden Agaricales), y el género *Rhizophydium* (división Chytridiomycota, orden Rhizophydiales).

VI.2.4 Estudio de los géneros bacterianos enriquecidos a lo largo del tiempo mediante secuenciación masiva del gen 16S rARN en el suelo IPK

La figura VI.9 muestra aquellos géneros bacterianos donde se observó un enriquecimiento en la fracción pesada en base a la secuenciación del gen 16S rARN, determinada por un valor positivo de EF, y las abundancias relativas de dichos géneros en la fracción pesada de los microcosmos inoculados con las cepas marcadas con C-13.

Al tiempo inicial de incubación se observó enriquecimiento de los géneros *Sphingobium* (orden Sphingomonadales) y del género *Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia* (orden Burkholderiales), siendo estos dos géneros los géneros mayoritarios, alcanzando un 70% de la abundancia relativa total entre los dos géneros. También se observó enriquecimiento de los géneros *Edaphobaculum* (orden Chitinophagales) y *Promicromonospora* (orden Micrococcales) al tiempo inicial, sin embargo, sus abundancias relativas no alcanzaron a representar el 0.1%.

A los 7 días de incubación los únicos géneros enriquecidos en la fracción pesada fueron los géneros *Sphingobium* y *Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia*. Al final de período de incubación se observó que, si bien estos géneros mostraron enriquecimiento en la fracción pesada, su abundancia relativa disminuyó marcadamente con respecto a tiempo inicial.

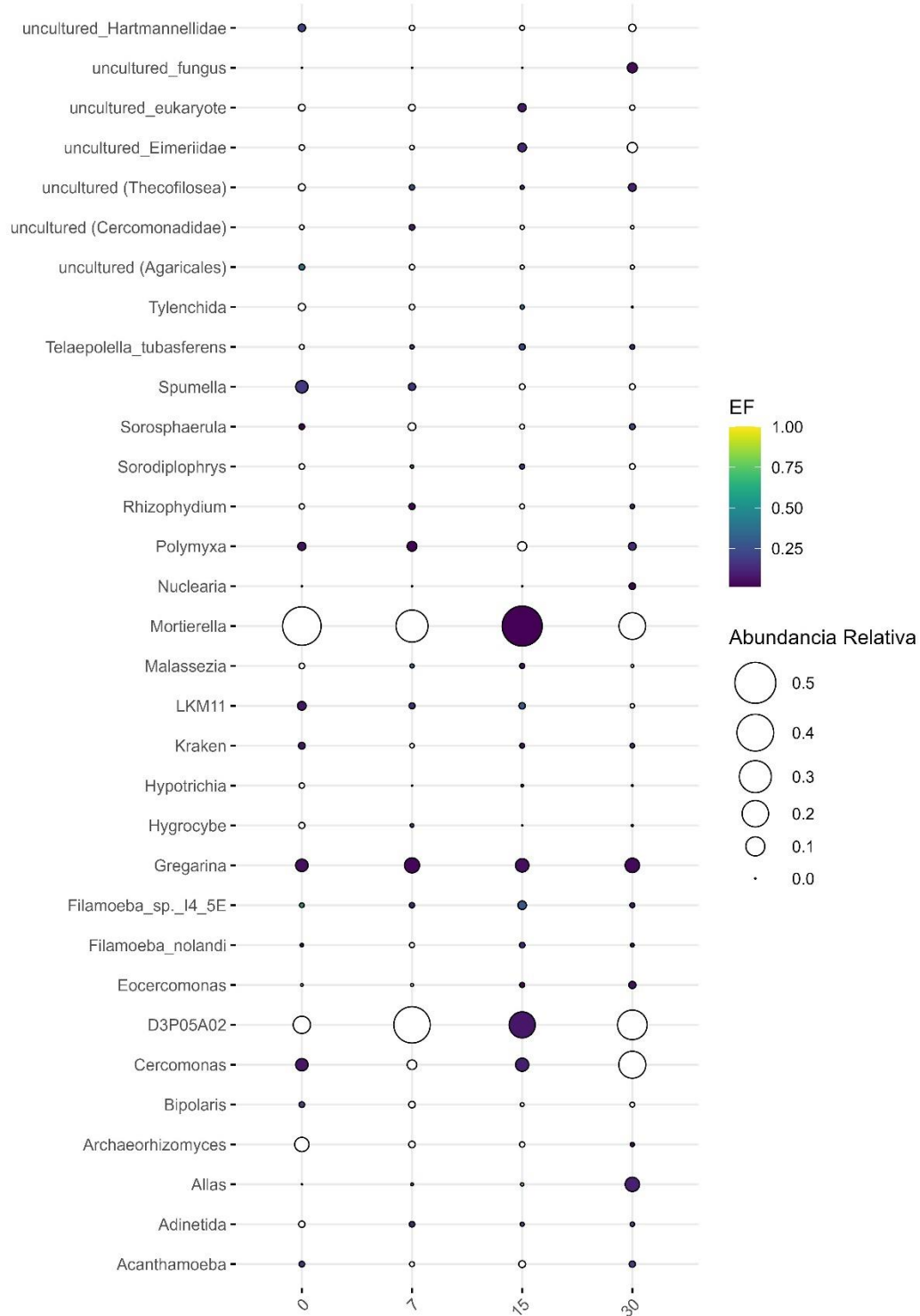


Figura VI.8: Géneros eucariotas enriquecidos en C-13 de acuerdo con el EF en los microcosmos inoculados con CS AM-Bk a los 0, 7, 15 y 30 días de incubación. Se muestra aquellos géneros cuya abundancia relativa fue mayor al 0.5% y que mostraron enriquecimiento en al menos un tiempo de incubación. La escala de colores muestra el promedio del EF para cada género y el tamaño de la esfera indica el promedio de las abundancias relativas, considerando a la unidad como el total de la comunidad.

A los 15 días en el género *Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia* alcanzó valores de abundancia relativa cercanos al 5%, mientras que el género *Sphingobium* mostró valores de abundancia relativas del orden del 15%. A los 15 días también se observó el enriquecimiento en la fracción pesada de una Gammaproteobacteria (WN-HWB-116) y el género 67-14 del orden Solirubrobacterales, cuyas abundancias relativas alcanzaron valores cercanos al 10% y el 1% respectivamente.

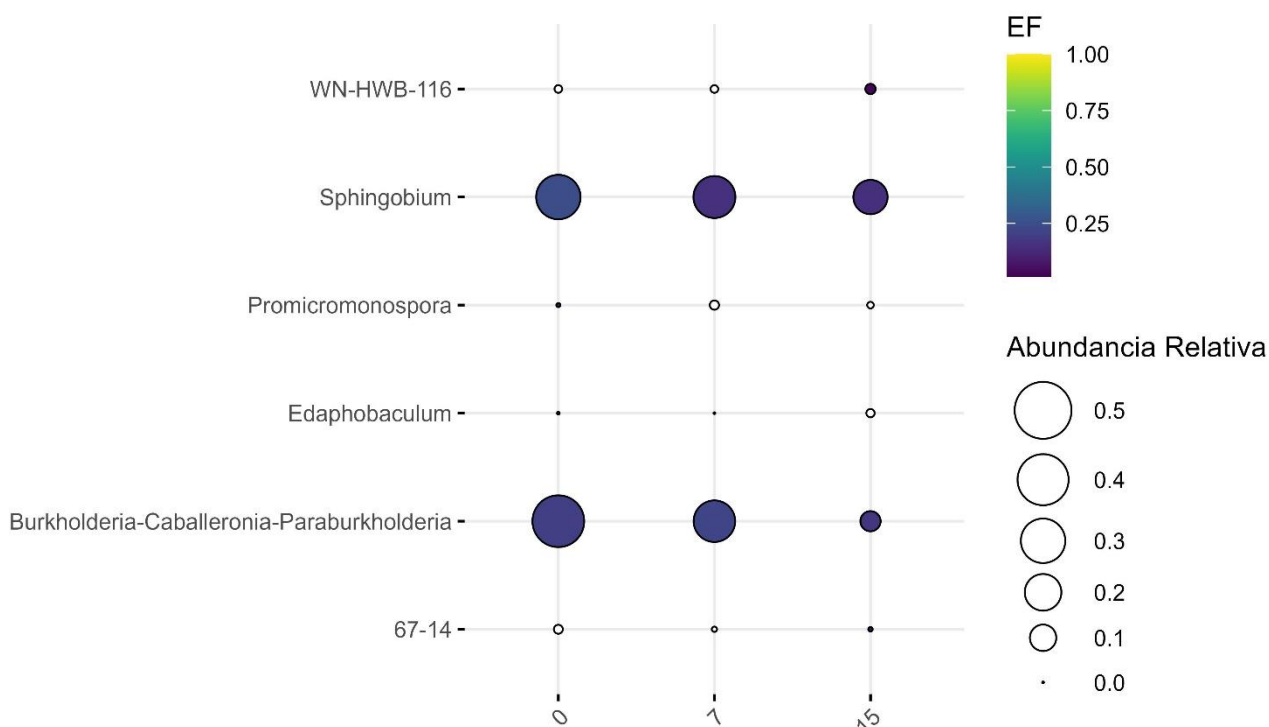


Figura VI.9: Géneros bacterianos enriquecidos en C-13 de acuerdo con el EF en los microcosmos inoculados con CS AM-Bk a los 0, 7 y 15 días de incubación. Se muestra aquellos géneros cuya abundancia relativa fue mayor al 0.5% y que mostraron enriquecimiento en al menos un tiempo de incubación. La escala de colores muestra el promedio del EF para cada género y el tamaño de la esfera indica el promedio de las abundancias relativas, considerando a la unidad como el total de la comunidad.

VI.2.5 Estudio de los grupos eucariotas enriquecidos a lo largo del tiempo mediante secuenciación masiva del gen 18S rARN en el suelo IPK

Se realizó la secuenciación del 18S rARN de las fracciones pesadas y livianas de los microcosmos inoculados con las cepas AM y Bk marcadas con C-13 y el respectivo control C-12, con el fin de estudiar las relaciones tróficas que se establecen entre el inoculante y la comunidad de eucariotas. La figura VI.10 muestra aquellos

géneros eucariotas que mostraron enriquecimiento en la fracción pesada, y sus respectivas abundancias relativas en la fracción pesada de los microcosmos inoculados con cepas marcadas con C-13.

A los 7 días de incubación se observó el enriquecimiento de varios géneros *Hyperamoeba*, *Stemonitis* y *Filamoeba* que pertenecen al filo Amebozoa. Entre los miembros de filo Ciliophora, se observó enriquecido el género *Colpoda*. Entre los miembros del filo Ocrophyta se encontró el género *Spumella* y *Chlamydomyxa* y de la división Chlorophyta el género *Lobochlamys*. No se observó enriquecimiento de ningún grupo de hongos a los 7 días de incubación.

A los 15 días de incubación se observa un cambio en los grupos de protistas enriquecidos. Del filo Amebozoa, solo los géneros *Hyperamoeba* y *Balamuthia* mostraron enriquecimiento a los 15 días de incubación. Con respecto al filo Rhizaria, el género *Cercomonas* mostró enriquecimiento en la fracción pesada. El género *Colpoda*, perteneciente al filo Ciliophora, y el género *Gregarina*, filo Apicomplexa, mostraron incorporación de la marca a los 15 días de incubación.

Con respecto a los géneros de hongos, se observó un enriquecimiento de los hongos del género *Penicillium* (división Ascomycota, orden Eurotiales) y el género *Cunninghamella* (división Mucoromycota, orden Mucorales) a los 15 días de incubación en el suelo crónicamente contaminado.

VI.2.6 Análisis comparativo de las comunidades enriquecidas y del comportamiento del inoculante en los suelos IPK y SP

Con el objetivo de identificar patrones comunes entre las comunidades bacterianas enriquecidas de los suelos SP e IPK, se estudiaron las variaciones en la similitud a lo largo del tiempo de las mismas. La figura VI.11A muestra el comportamiento del índice de Bray-Curtis para la comparación entre las comunidades bacterianas enriquecidas en ambos suelos. A lo largo del tiempo se observó un aumento de la divergencia entre las comunidades enriquecidas reflejado en el aumento de este índice.

Se realizó el mismo análisis para la comunidad de eucariotas. En este caso no se observó ningún patrón a lo largo del tiempo, donde este índice mantuvo valores cercanos a 1 (Figura VI.11B).

Con el objetivo de comparar el comportamiento del inoculante entre los suelos SP e IPK se estimó la supervivencia de los géneros inoculados *Sphingobium* y *Burkholderia* para cada intervalo de tiempo analizado en la fracción pesada para los microcosmos ¹³C AM-Bk (Figura VI.12). Como aproximación de esta medida, se utilizó el número de *reads* correspondientes a partir de las muestras rarefaccionadas. Se determinó la supervivencia como la proporción del número de *reads* para cada género en un tiempo en comparación al número de estas *reads* en el tiempo de muestreo anterior.

Para el género *Sphingobium* no se observaron diferencias significativas entre los suelos durante los primeros días de incubación. No obstante, a los 15 días de incubación en el suelo SP se observó un 87% de supervivencia

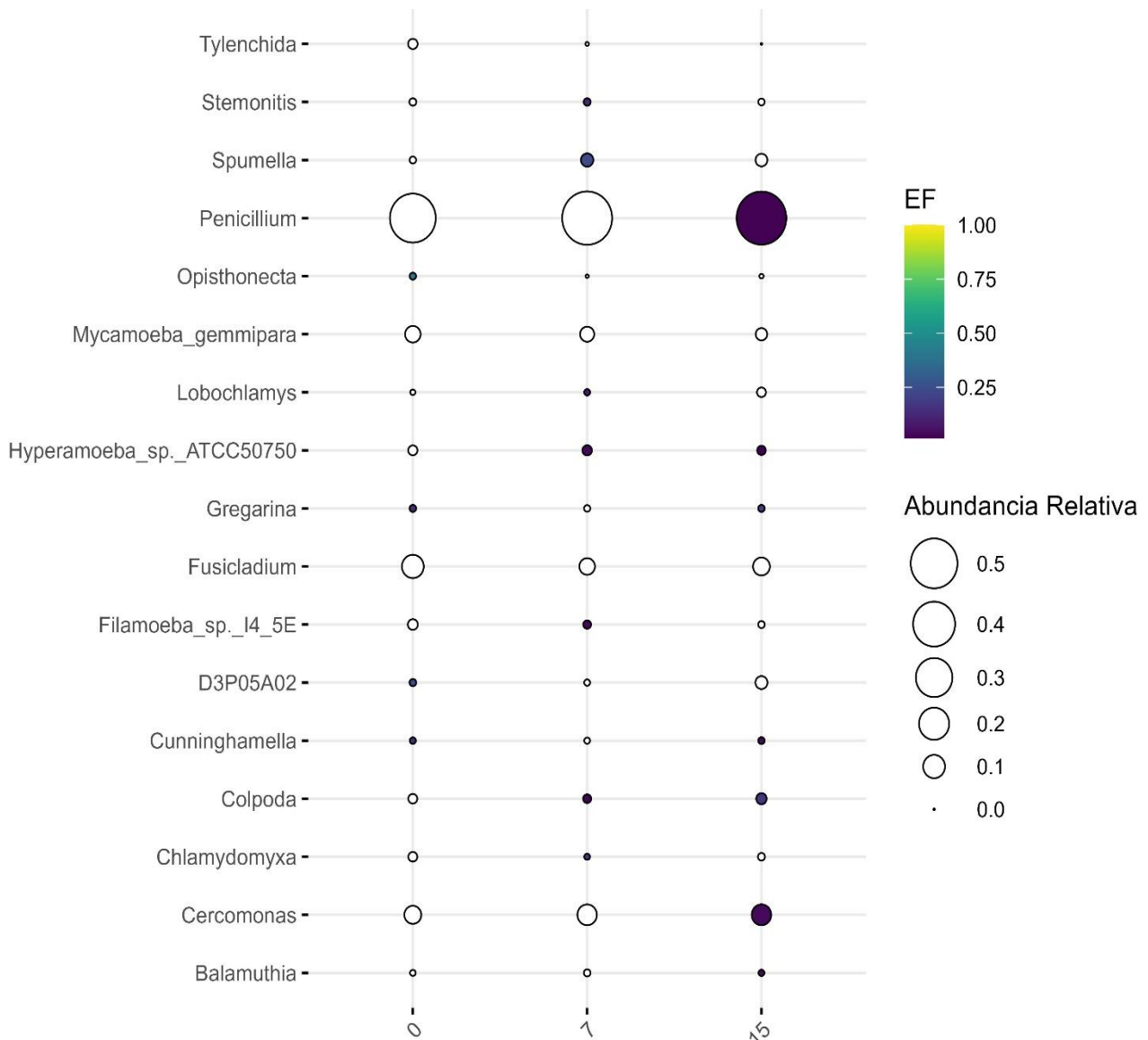


Figura VI.10: Géneros eucariotas enriquecidos en C-13 de acuerdo con el EF en los microcosmos inoculados con CS AM-Bk a los 0, 7, 15 días de incubación. Se muestra aquellos géneros cuya abundancia relativa fue mayor al 0.5% y que mostraron enriquecimiento en al menos un tiempo de incubación. La escala de colores muestra el promedio del EF para cada género y el tamaño de la esfera indica el promedio de las abundancias relativas, considerando a la unidad como el total de la comunidad.

mientras que en IPK este valor fue cercano al 64% (Figura VI.11). A los 30 días de incubación en el suelo SP se observó una supervivencia del 14%.

Para el género *Burkholderia* ya a los 7 días de incubación se observó una menor supervivencia para el suelo IPK del 62%, mientras que en el suelo SP no se observaron cambios con respecto al tiempo inicial (Figura VI.12B). A los 15 días esta diferencia fue más pronunciada, donde la supervivencia del género alcanzó valores cercanos al 20% para IPK mientras que en SP se observó una supervivencia del 83%. Recién a los 30 días de incubación, el género *Burkholderia* mostró una reducción de la supervivencia en el suelo SP, alcanzando valores del 20%.

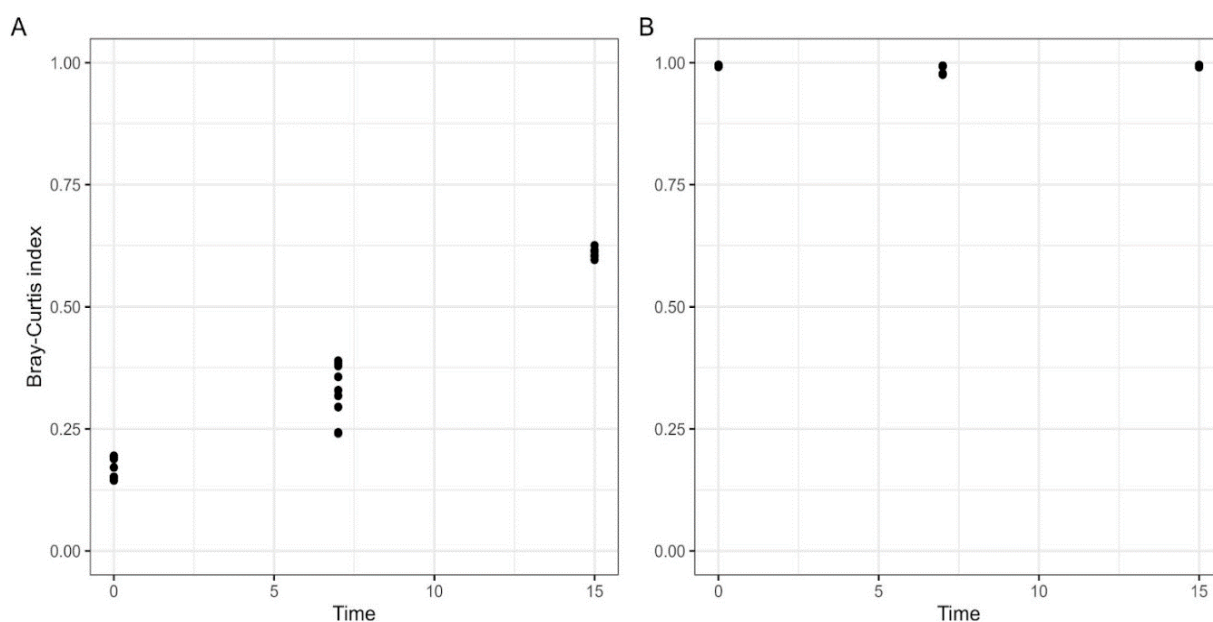


Figura VI.11: Índice de Bray-Curtis calculado para la comparación de las comunidades bacterianas (A) o eucariotas (B) enriquecidas de los suelos IPK y SP a lo largo del tiempo. Cada punto representa la comparación de cada triplicado de la fracción pesada del tratamiento inoculado con ^{13}C CS AM-Bk del suelo SP con respecto al suelo IPK.

En la figura VI.13 se muestra un detalle del comportamiento de las abundancias relativas de los géneros *Sphingobium* y *Burkholderia* en las fracciones pesadas y livianas de los microcosmos inoculados con ^{13}C CS AM-Bk para los suelos con contaminación aguda, SP (Figura VI.13A), y contaminación crónica, IPK (Figura VI.13B). El comportamiento de las abundancias relativas de estos géneros en la fracción pesada se comentó en las secciones VI.2.2 y VI.2.4 de este capítulo, por lo que en esta sección nos centraremos en el comportamiento de dichos géneros en la fracción liviana.

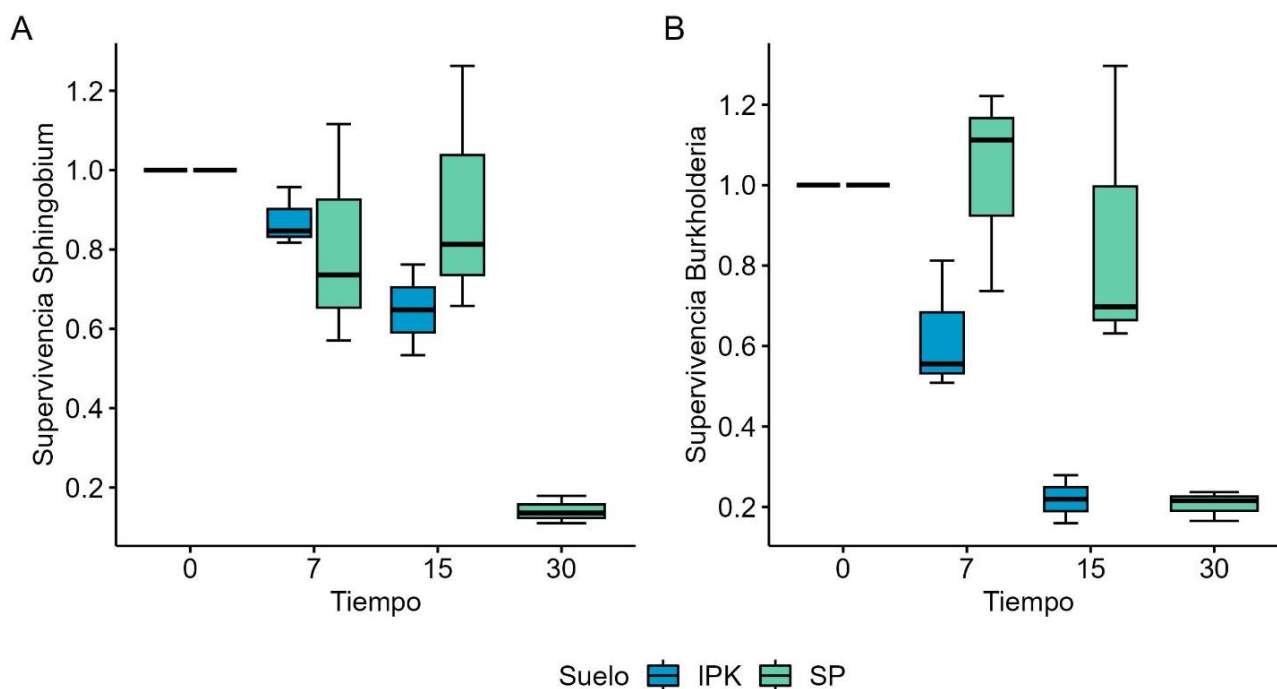


Figura VI.12: Estimación de la supervivencia para el género *Sphingobium* (A) y el género *Burkholderia* (B) en la fracción pesada del tratamiento C^{13} CS AM-Bk en los suelos SP e IPK calculada como la proporción de *reads* de cada género entre dos intervalos de tiempo sucesivos

Para el caso de los microcosmos con suelo SP, se observó un aumento en las abundancias relativas de ambos géneros en la fracción liviana a los 7 días, alcanzando abundancias relativas 36% y 17% para los géneros *Burkholderia* y *Sphingobium*, respectivamente, en comparación a los valores iniciales (3% para *Burkholderia* y 1,6% para *Sphingobium*). A los 15 días, estos géneros mantuvieron valores de abundancias relativas en la fracción liviana del 21% (*Burkholderia*) y 14% (*Sphingobium*), observándose una reducción marcada a los 30 días de incubación donde se alcanzaron valores similares a los iniciales (8% *Burkholderia* y 2% para *Sphingobium*).

En los microcosmos con suelos IPK, para el género *Sphingobium* la abundancia relativa en la fracción liviana se mantuvo en valores cercanos al 10% a lo largo de los tiempos muestreados, mientras que en el género *Burkholderia* se observó un descenso desde valores iniciales del 18% a valores del 2% a los 15 días de incubación.

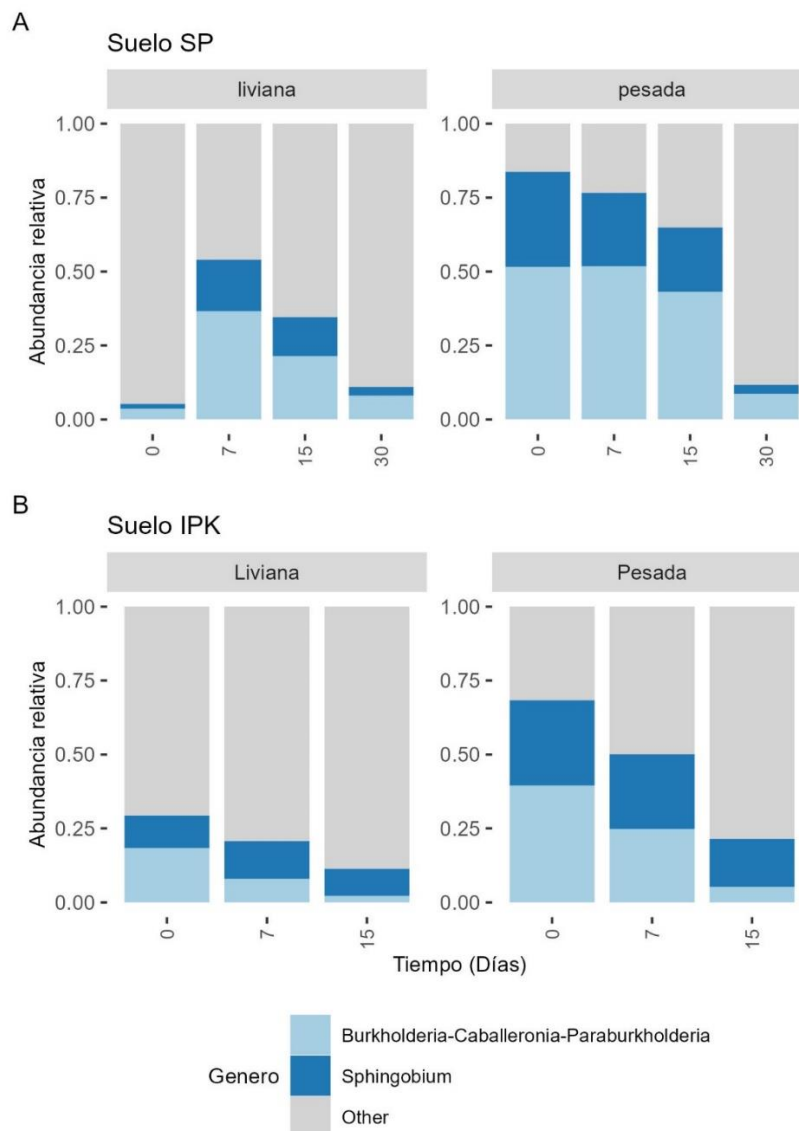


Figura VI.13: Abundancias relativas de los géneros *Sphingobium* y *Burkholderia* en las fracciones livianas y pesadas en los microcosmos inoculados con ^{13}C CS AM-Bk en los suelos SP (A) e IPK (B) a los distintos tiempos de muestreos. Se muestran los valores promedios de los triplicados para cada tiempo de muestreo.

VI.3 Discusión

El éxito de un proceso de bioaumentación está íntimamente vinculado a la capacidad del inoculante de superar las barreras abióticas y bióticas que limitan su establecimiento. Debido a la naturaleza hidrofóbica de los PAH, a medida que transcurre el tiempo de exposición del suelo a estos contaminantes la asociación suelo-contaminante se vuelve más intensa, disminuyendo la fracción que puede ser utilizada por la comunidad microbiana (fracción biodisponible) (Barnier 2014; Koshlaf & Ball 2017). Como consecuencia, la

biodisponibilidad de los PAH en suelos con contaminación crónica puede ser extremadamente baja resultando en una baja degradación (Haleyur et al.,2019).

En este capítulo se estudió la eficiencia de degradación del CS AM-Bk en un suelo crónicamente contaminado. La inoculación con CS AM-Bk en el suelo IPK no mostró degradación de los PAH presentes en el período de incubación analizado (Figura VI.1), a pesar de que la inoculación si generó un aumento inicial de la proporción del gen RHD α -GN (Figura VI.3). En un trabajo de Festa et al.,(2016b) donde se inoculó a la cepa AM en un suelo crónicamente contaminado tampoco se observó un aumento en la degradación de los PAH presentes durante 63 días de incubación, a pesar de observarse el establecimiento de la cepa.

Haleyur et al.,(2019) estudiaron los efectos de la aplicación de estrategias de bioestimulación y bioaumentación sobre suelos con contaminación crónica, utilizando tanto inoculantes monoespecíficos degradadores de PAH como un consorcio conformado por la combinación de los mismos individuos. En ese estudio se observó un aumento de la degradación de los PAH como resultado de la bioestimulación de la comunidad nativa mediante el control de la aireación temperatura y humedad del suelo, donde los sistemas inoculados no mostraron un incremento adicional de la degradación, sin lograr el establecimiento de los microorganismos inoculados en la comunidad. Nuestros resultados también mostraron la falta del establecimiento del inoculante en el suelo crónico (Figura VI.10 y VI.12) sin embargo, en nuestro caso la bioestimulación por incubación no fue suficiente para favorecer la capacidad degradadora de la comunidad (Figura VI.1).

Debido a que los procesos de secuestro y adsorción a la matriz del suelo en eventos de contaminación crónica limitan el acceso de los microorganismos a los PAH (Barnier et al.,2014; Kuppasamy et al.,2017), la bioestimulación mediada por surfactantes se propone como una estrategia adecuada para aumentar la biodisponibilidad en este tipo de suelos (Bautista et al.,2009; Singelton et al.,2016; Ceccotti et al.,2018). Previamente en nuestro laboratorio, Cecotti et al., (2018) estudiaron el efecto de la bioestimulación mediada por el agregado del surfactante no iónico Tritón X-100 sobre el suelo IPK utilizando una dosis a la concentración crítica micelar (CMC) y dosis a concentración sub-CMC. En este trabajo se observó una disminución de la tensión superficial, así como un aumento de la degradación de PAH en los dos tratamientos. Sin embargo, en los tratamientos con dosis sub-CMC se observó un aumento en la degradación significativa en comparación con el tratamiento con dosis CMC. Estos autores propusieron que ese efecto negativo en la degradación de PAH en el tratamiento con dosis CMC sería consecuencia de la selección de organismos degradadores del surfactante en la comunidad nativa (Cecotti et al.,2018). Por este motivo, en esta tesis se utilizó la dosis sub-CMC propuesta en el trabajo de Cecotti et al.,(2018) y se evaluó adicionalmente, el efecto combinado de la bioestimulación mediada por el surfactante Triton X-100 y el bioaumentación utilizando el CS AM-Bk. En concordancia con lo observado en ese trabajo, el agregado del surfactante tuvo un efecto estimulador de la degradación de pireno, fluoranteno y criseno sobre el suelo IPK, alcanzando un 25%, 24% y 15% de degradación, respectivamente, a los 58 días de incubación (Figura VI.4). Sin embargo, en los microcosmos

inoculados con CS AM-Bk no se observó degradación de ninguno de los PAH presentes en IPK. La inoculación puede tener efectos en la comunidad, incluso cuando la sobrevivencia del inoculo es baja, como consecuencia de la liberación de nutrientes de la biomasa muerta del inoculante (Mawarda et al.,2020). De esta manera, el efecto inhibitorio en la degradación observada en los microcosmos donde se aplicó la estrategia combinada podría ser el resultado del consumo del inoculante como fuente de carbono fácilmente asimilable, limitando de esta manera la degradación de los PAH.

Debido a que el aumento de la biodisponibilidad inducida por el agregado del Triton X-100 en el suelo IPK no fue suficiente para estimular la degradación de los PAH presentes en este suelo, en este capítulo se estudió el impacto de los factores bióticos en la eficiencia del bioaumentación. Con este objetivo se comparó el impacto de la transferencia de carbono y la predación de un mismo consorcio, CS AM-Bk en los suelos con contaminación aguda (SP) y crónica (IPK). En estos suelos el mismo inoculante mostró distinta eficiencia en la degradación de PAH, donde mostró la eliminación completa de los PAH suplementados en SP (Figura V.1), mientras que en IPK, CS AM-Bk no fue capaz de aumentar la degradación de los PAH detectados (Figura VI.1 y VI.4).

Uno de los mayores desafíos para los inoculantes es mantener densidades poblacionales altas luego de su introducción, lo cual es explicado generalmente por competencia por los recursos y antagonismo con la comunidad bacteriana nativa (Mawarda et al.,2022). Sin embargo, otros mecanismos como la actividad de los protistas, bacterias bacterívoras y bacteriófagos pueden tener un efecto importante en la regulación de las densidades poblacionales bacterianas (Zhang & Lueders 2017; Mawarda et al.,2022); ya que la predación por protistas representa uno de los factores bióticos que mayor mortalidad ejercen sobre la comunidad bacteriana, pudiendo limitar la eficiencia del bioaumentación (Bouchez et al.,2000; El Fantroussi & Agathos, 2005). Sumado a esto, varios géneros de bacterias han sido identificados como predadoras (bacterívoras) teniendo un rol activo en la trama trófica del suelo (Petters et al.,2021). No obstante, existen pocos estudios que analicen la importancia de estas interacciones tróficas sobre el destino del inoculante (Mawarda et al.,2022).

Stable Isotope Probing (SIP) DNA es una herramienta que permite estudiar el flujo de carbono en relación con un sustrato marcado e identificar las poblaciones implicadas en él. La mayoría de los trabajos relacionados a suelos contaminados que emplean esta metodología, focalizan su análisis en la identificación de las comunidades involucradas en la degradación del contaminante marcado (Teng et al., 2022). Solo existen dos trabajos, desarrollados en suelos agrícolas no contaminados, en los cuales se suplementa un inoculante marcado, previamente crecido en ¹³C glucosa, y se sigue el destino de este a lo largo de los distintos niveles tróficos (Lueders et al.,2006; Zhang & Lueders 2017). Este trabajo de tesis es el primer trabajo en emplear este enfoque para estudiar el destino de un inoculante (CS AM-Bk) en procesos de bioaumentación en suelos con distinta historia de contaminación y distinta eficiencia de degradación.

A lo largo del período de incubación se observó la incorporación de la marca tanto en las poblaciones bacterianas como eucariotas en ambos suelos, demostrando la transferencia de carbono desde el inoculante

hacia las comunidades microbianas, tanto bacterianas como eucariotas, mediadas por las interacciones tróficas (Figura VI.7, VI.8, VI.9 y VI.10)

Al analizar el comportamiento de los géneros inoculados *Sphingobium* y *Burkholderia*, tanto en SP como en IPK, se observó una predominancia entre los géneros bacterianos enriquecidos a lo largo del periodo analizado, observándose un descenso de las abundancias relativas en la fracción pesada a lo largo del tiempo (Figura VI.7 y VI.9). Para el género *Sphingobium* la tasa de supervivencia a los 7 días no mostró variaciones entre los dos suelos, mientras que a los 15 días se observó una menor supervivencia en IPK (64%) con respecto a SP (87%). En el suelo SP se observó un descenso marcado de este género recién a los 30 días (14%) (Figura VI.12A). Para el género *Burkholderia* estas diferencias en la tasa de supervivencia fueron más marcadas en los distintos suelos analizados. Durante los primeros 15 días de incubación en SP la tasa de supervivencia de la cepa se mantuvo constante durante los primeros 15 días y luego se observó una reducción de sobrevivientes entre los 15 y 30 días de incubación, alcanzando un 20%. Por el contrario, en el suelo crónico se observó un descenso marcado de la tasa de supervivencia del género *Burkholderia* ya a los 7 días de incubación (62%), y a los 15 días en IPK mostró una proporción superviviente (21%) similar a la alcanzada en el suelo SP a los 30 días (Figura VI.12). De esta manera se observó no solo una respuesta diferencial entre los distintos suelos, donde la supervivencia de la cepa Bk se vio fuertemente limitada en el suelo crónicamente contaminado, sino que también se observó una selectividad en la predación de las cepas inoculadas, particularmente en el suelo IPK, donde la presión de predación tuvo un efecto más marcado en la cepa Bk que sobre AM. La predación por los protistas es un proceso selectivo que tiene un impacto en el ensamblaje de la comunidad bacteriana (Hunninghaus et al.,2017; Geisen et al.,2018). Las propiedades bacterianas, como el tamaño, la forma y la composición de la pared celular, intervienen en la selección de presas bacterianas específicas por parte de los protozoos (Lara et al.,2007). Existe una preferencia hacia la predación de bacterias Gram negativas frente a Gram positivas, debido a la menor digestibilidad de estas últimas como consecuencia de estructuras presentes en la envoltura celular (Jousset et al.,2012; Thakur & Geisen 2019). Zhang y Lueders (2017) compararon el efecto de la predación utilizando biomasa marcada de la *Pseudomonas putida* (Gram-) y *Arthrobacter globiformis* (Gram+) mediante SIP DNA, y observaron mayor resistencia a la predación por parte de *A. globiformis*. La presencia de esfingolípidos en *Sphingomonas* podría explicar esta mayor resistencia a la predación, ya que le otorgan mayor estabilidad a la envoltura celular (Heaver et al.,2018).

Otra diferencia observada en el comportamiento del inoculante a lo largo del tiempo se relaciona con las variaciones del factor de enriquecimiento (EF). En el suelo IPK para ambos géneros presentes en el inoculante se observó que el valor de EF no sufrió variaciones a lo largo del período analizado y la abundancia. En el suelo SP se observó que ambos géneros experimentaron un descenso marcado del valor del EF manteniendo sus abundancias relativas y supervivencia constantes. Esto implicaría que en SP, los géneros *Sphingobium* y *Burkholderia* fueron capaces de crecer y de esta manera la marca se diluyó, lo cual está corroborado por el

aumento de estos géneros en la fracción liviana (Figura VI.13). El crecimiento en SP estaría soportado por la degradación del fenantreno, ya que, como se demostró en el capítulo IV (Figura IV.6 y IV.8) fue el único PAH que sustentó el crecimiento en el cocultivo. En IPK las abundancias relativas en la fracción liviana se mantuvieron constantes lo cual es indicativo de la falta de crecimiento. Si bien en ambos suelos se observó una rápida respuesta de los protistas, evidenciado por la incorporación de la biomasa marcada en géneros como *Spumella*, *Allas*, *Filamoeba*, etc. ya a los 7 días (Figura VI.8 y VI.10), en el suelo SP la supervivencia del inoculante estaría dada por un balance neto positivo entre el crecimiento y la predación. A su vez, la disminución en la sobrevivencia del inoculante hacia los 30 días de incubación en SP estaría vinculada a la eliminación total del fenantreno que ocurrió a los 15 días (Figura V.1), ya que al no tener un recurso que soporte el crecimiento, la presión de predación limitaría la sobrevivencia del inoculante. En el suelo IPK, como el inoculante no fue capaz de crecer, el impacto de la predación llevó a un descenso rápido en la supervivencia del inoculante (Figura VI.12). De esta manera, la predación tuvo un efecto importante en la supervivencia de CS AM-Bk en el suelo crónicamente contaminado, lo que pudo haber limitado la eficiencia del proceso de bioaumentación. Bouchez et al., (2000) previamente documentaron el fracaso de un proceso de bioaumentación en reactores para el tratamiento de aguas residuales mediante el agregado de la bacteria desnitrificante *Microvirgula aerodesnitrificans* como consecuencia de la predación por protistas. En ese trabajo se hicieron dos inoculaciones de *M. aerodesnitrificans* donde la reducción de las densidades poblacionales se correlacionó con un aumento en el número de protistas presentes en los sistemas bioaumentados y al mismo tiempo se observó una reducción en el proceso de nitrificación con respecto al sistema no bioaumentado (Bouchez et al.,2000). Debido a que las densidades de los protistas dependen de las densidades de sus presas, cualquier microorganismo introducido en un proceso de bioaumentación puede actuar como un potencial recurso para la comunidad bacterívora nativa, volviéndose activa y afectando de esta manera la supervivencia del inoculante y, consecuentemente, la eficiencia del proceso de bioaumentación.

Con respecto a los géneros bacterianos nativos enriquecidos, se observó que a los tiempos intermedios un número reducido de géneros fueron capaces de incorporar la biomasa marcada de incubación en ambos suelos (7 y 15 días). En SP, a los 7 días, solo los géneros *Bacillus* y *Gemmatimonas* mostraron enriquecimiento en C-13. Miembros del filo Gemmatimonadota también se enriquecieron en C-13 luego de 8 días de incubación en ensayos donde se inoculó *Pseudomonas putida* marcada (Zhang & Lueders 2017), constituyendo un grupo ampliamente distribuido en suelos y correlacionado con la descomposición de materia orgánica (Li et al.,2017; Mujakić et al.,2022). A los 15 días, se observó enriquecimiento de los géneros *Lysobacter* y un género no clasificado de la familia Chitinophagaceae. *Lysobacter* es reconocido entre los microdepredadores bacterianos, por la secreción de enzimas hidrolíticas como mecanismo de predación (Jurkevitch & Davidov 2006; Petters et al.,2021). Este género también mostró incorporación de biomasa marcada en estudios de inoculación con células C-13 marcadas de *E. coli* y *P. putida* (Lueders et al.,2006; Zhang & Lueders 2017). Recién a los 30 días

de incubación, en SP se observó un incremento marcado en el número de géneros enriquecidos, entre los cuales se destacaron *Sphingomonas* y *Candidatus Udaeobacter*. Willms et al, (2020) propone que este último género es capaz de incorporar los nutrientes liberados por la lisis celular.

En el suelo IPK solo dos géneros mostraron enriquecimiento a los 15 días de incubación, el género 67-14 del orden Solirubrobacterales y el género *WN-HWB-116* de la clase Gammaproteobacteria (Figura VI.9). Miembros del orden Solirubrobacterales se encuentran en suelos pobres y perturbados (Gowsami et al.,2023; Whitton et al.,2023) pudiendo estar involucrados en procesos de degradación de PAH (Pagé et al.,2015).

Además de estudiar el flujo de carbono en las comunidades bacterianas, también se estudió el efecto de la incorporación de la marca por parte de la comunidad de eucariotas (protistas, hongos, pequeños eumetazos) (Figura VI.10). Los protistas cumplen un rol clave sobre la mortalidad de los inoculantes, así como también en los ciclos de la materia. Los suelos contienen un gran reservorio de protistas en estado latente, los cuales, bajo condiciones favorables, se vuelven activos, y cuya densidad está íntimamente vinculada con el aumento de la densidad de la presa (Geisen et al.,2018). De esta manera, durante la inoculación, la introducción de microorganismos que pueden actuar como potenciales presas puede tener un efecto estimulante sobre los predadores residentes en el suelo. Además, la actividad de los protistas produce la liberación de nutrientes (en particular fuentes de nitrógeno), volviéndolos disponibles para todos los organismos, incluyendo microorganismos y plantas (Geisen et al., 2018). De esta manera los protistas predadores constituyen un componente clave del “*microbial loop*” de la remineralización del carbono y los nutrientes (Charholm 1985; Mawarda et al.,2022).

A diferencia de lo que ocurrió con los géneros bacterianos, a los 7 días de incubación en ambos suelos se observó un número alto de eucariotas enriquecidos, entre los cuales se encuentran tanto géneros de protistas (organismos eucariotas generalmente unicelulares) como géneros fúngicos en ambos suelos (Figura VI.8 y VI.10). En el suelo SP se destacó la predominancia del grupo de rizarios del filo Cercozoa y de distintos géneros fúngicos. En particular, este filo de protistas se encuentra entre los grupos bacterívoros predominantes en suelos (Fiore-Donno et al., 2019; Petters et al., 2021). Si bien este grupo fue el que mayor número de representantes enriquecidos mostró, con el transcurso del tiempo otros grupos como Amoebozoa o Ciliophora incorporaron la biomasa marcada, lo que indicaría que miembros del filo Cercozoa tendrían una respuesta rápida en la búsqueda de la presa. Esto podría estar vinculado a su estrategia de locomoción, ya que los grupos que mostraron enriquecimiento dentro de este filo son formas flageladas. En el suelo IPK por su parte, se observó una predominancia de miembros del grupo Amoebozoa y Stramenopiles, así como distintos grupos fúngicos. A los 15 días se observó también el enriquecimiento de géneros pertenecientes a los grupos de Rhizaria y Ciliophora. Lara et al., (2007) también observaron una predominancia de grupos ameboides en suelos contaminados con PAH mientras que en el suelo control (no contaminado) se observó una predominancia de grupos flagelados relacionados a los Cercomonadida. Esta predominancia de grupos

ameboides en suelos contaminados estaría vinculada a su mayor resistencia a la contaminación por PAH (Windig et al.,2019; Wu et al.,2022).

Al comparar el comportamiento de las comunidades de bacterias y protistas capaces de incorporar la biomasa marcada, se observó por parte de los protistas un impacto más destacado y rápido en la predación del inóculo marcado ya a los 7 días de incubación, en comparación con las comunidades bacterianas donde recién al final del período de incubación se observó un aumento en el número de géneros enriquecidos, para la mayoría de los cuales no se describe en bibliografía un comportamiento depredador. Si bien existen trabajos que muestran que las comunidades de mixobacterias y otros grupos bacterianos bacterívoros podrían tener un alto impacto en las tramas tróficas del suelo, debido a la abundancia de estos microorganismos encontradas en los suelos en comparación a la de los protistas (Petters et al.,2021), en este trabajo de tesis solo pudimos observar un género bacterívoro enriquecido, *Lysobacter* (Figura VI.8). Para el resto de los géneros bacterianos enriquecidos a lo largo del período de incubación no existen registros bibliográficos que describan un comportamiento bacterívoro activo. Esto explicaría la respuesta de la comunidad bacteriana enriquecida en nuestros microcosmos, donde el enriquecimiento en biomasa marcada en la mayoría de los géneros bacterianos ocurrió tardíamente (Figura VI.7), lo cual podría estar vinculado principalmente a la incorporación de restos celulares y nutrientes derivados de la lisis celular durante la predación por protistas.

En este capítulo se analizó el efecto de la inoculación del consorcio degradador CS AM-Bk en un suelo crónicamente contaminado con PAH. Este consorcio no fue capaz de aumentar la degradación de los PAH presentes, ni siquiera en combinación con una estrategia de bioestimulación mediada por un surfactante. El empleo de la técnica **SIP-DNA** permitió corroborar la transferencia del carbono desde el inoculante hacia los distintos niveles tróficos en suelos con distinta historia de contaminación, remarcando el comportamiento de los **protistas** como micropredadores predominantes en la incorporación de la biomasa derivada del inoculante. De esta manera, pudimos observar que la predación es un fenómeno clave que modula la inoculación, donde uno de los factores determinantes de la sobrevivencia del inoculante es el balance neto entre **crecimiento** y **predación**, teniendo un rol crítico en la supervivencia y establecimiento del inoculante.

Capítulo VII

Conclusiones

VII. Conclusiones Generales

En este trabajo se diseñó un cocultivo, llamado CS AM-Bk que demostró una eficiencia de degradación de fenantreno superior a la de los monocultivos de sus cepas constituyentes.

La aplicación de técnicas moleculares **RT-qPCR y metaproteómica** permitió profundizar el rol de cada cepa en la degradación de fenantreno, así como el estudio de las interacciones entre las capas AM y Bk en el cocultivo. Se demostró la subexpresión de enzimas vinculadas a la degradación de PAH en ambas cepas y se evidenció una menor respuesta al estrés celular por ambas cepas en el cocultivo durante la degradación de fenantreno.

Mediante estudios fisiológicos, técnicas microbiológicas clásicas y técnicas moleculares, se demostró que las cepas en el cocultivo cooperan durante la degradación de fenantreno y que el principal mecanismo por el cual esto podría suceder es la **división del trabajo** mediante "**cross-feeding**", en la cual la cepa AM realizaría el ataque inicial y la cepa Bk actuaría en la vía baja de degradación del PAH. Esto reduce la carga metabólica sobre cada cepa, a la vez que disminuye el estrés celular soportado por ellas permitiendo el establecimiento de relaciones **sinérgicas**.

La eficiencia de degradación de PAHs esta influenciada por la presencia de otros PAHs, sin embargo, el resultado neto sobre el proceso es dependiente de la mezcla analizada. En todas las combinaciones de PAH analizadas, el desempeño del cocultivo AM-Bk fue superior al de los monocultivos, demostrando mayor **robustez** que éstos. En algunos casos, hubo un aumento en la degradación de ambos PAH (ej: antraceno, dibenzotiofeno), probablemente debido a efectos de **cometabolismo**, en otros casos, el resultado de la mezcla tuvo un efecto negativo en la eficiencia de degradación (ej: fluoreno), probablemente debido a la acumulación de metabolitos intermediarios.

En el suelo contaminados con PAH en forma **aguda**, el bioaumento con consorcios degradadores de PAH fue eficiente en la remoción de los contaminantes, observándose una aceleración en su tasa de degradación en comparación con el control (SP+PAH). El análisis por secuenciación permitió estudiar el impacto de la inoculación sobre la comunidad nativa, demostrando que el inoculante no solo fue capaz de establecerse temporalmente, sino que también estimuló a miembros degradadores de esa comunidad. Además, los inoculantes incrementaron la capacidad degradadora de la comunidad nativa, incrementando las funciones catabólicas (lo que fue observado por qPCR y PICRUSt2), donde las cepas AM y Bk tuvieron un rol predominante. Este trabajo de tesis es **pionero** en el empleo de la metodología **AMCOM-BC** para el análisis de abundancias diferenciales, aportando una estadística válida que contempla la naturaleza composicional de los datos de secuenciación.

En los microcosmos bioaumentados con los consorcios CS AM-Bk, CS-1 y CS-4 se observó una disminución del inoculante al final del periodo de incubación, lo que implica un **bajo impacto** en la estructura de la comunidad al final del proceso. Este efecto sería principalmente consecuencia de la eliminación del contaminante, ya que, al desaparecer la ventaja adaptativa frente a la comunidad nativa, esta última desplazaría al inoculante. Esta característica resulta clave para la aplicación de consorcios degradadores en ambientes con contaminación aguda, ya que el inoculante permitiría la remoción rápida de los contaminantes sin tener un efecto permanente en la comunidad nativa.

La aplicación del bioaumento con CS AM-Bk en un suelo **crónicamente contaminado** no resultó efectiva en la degradación de los contaminantes presentes. Además, la estrategia combinada de bioestimulación mediada por el surfactante Triton X-100 y el bioaumento con CS AM-Bk produjo un efecto negativo en la degradación en comparación con el suelo bioestimulado con surfactante sin inocular. De esta manera demostramos que, la **biodisponibilidad no es el factor limitante** en la efectividad del bioaumento en el suelo crónicamente contaminado IPK.

Este es el **primer trabajo** donde se utilizó el seguimiento de un inoculante marcado mediante la técnica de **SIP-DNA** en suelos con distinta historia de contaminación y distinta eficiencia de degradación. Se corroboró la transferencia del carbono desde ^{C13}AM-Bk hacia los distintos niveles tróficos en el suelo. Si bien los géneros enriquecidos en las comunidades de los dos suelos fueron distintos, en ambos **los protistas** tuvieron un rol predominante en la predación de los inoculantes, mientras que los géneros bacterianos la incorporación de la biomasa marcada estaría vinculada a los nutrientes y debris celular liberados durante la predación por los protistas.

Durante la inoculación se introduce un recurso que potencialmente puede ser utilizado por los predadores presentes en la comunidad nativa. En este trabajo de tesis observamos que, si bien las comunidades bacterívoras respondieron tempranamente en ambos suelos luego de la introducción de CS AM-Bk, la supervivencia del inoculante depende del balance neto entre la **predación** y el **crecimiento**. De esta manera, se remarca la importancia del estudio de las interacciones tróficas en los procesos de bioaumento, ya que se cuenta con un escaso registro bibliográfico, a pesar de ser un factor limitante clave en la eficiencia de los procesos de biorremediación.

VII.2 Perspectivas

Las nuevas hipótesis generadas por este trabajo se pondrán a prueba mediante:

Se estudiarán, mediante métodos metaproteómicos, interacciones entre AM y Bk durante la degradación de las mezclas de hidrocarburos aromáticos estudiadas en esta tesis, para conocer su rol en el ataque a los distintos PAH. Adicionalmente, se realizará el análisis por GC-MS de los metabolitos intermedios observados en los cromatogramas

Se estudiarán los cambios en la estructura y función de la comunidad microbiana del suelo IPK producidos por efecto de la inoculación y análisis de interacciones mediante redes ecológicas moleculares para inferir si existen interacciones negativas que puedan relacionarse con la efectividad del proceso de degradación.

Se ampliará el estudio de las interacciones bacterianas en los suelos a distintos niveles tróficos con foco en los bacteriófagos, quienes constituyen una causa importante de mortalidad bacteriana y pueden influir en la efectividad de los inoculantes, la estructura del microbioma y la transferencia horizontal de genes.

Se realizarán estudios de la efectividad de la inoculación del cocultivo AM-Bk en suelo contaminado en forma aguda con PAH con a mayor escala (eg. biopilas o parcelas en campo).

Capítulo VIII

Bibliografía



VIII. Bibliografía

- Abdel-Shafy, H. I., & Mansour, M. S. M. (2016). A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. In *Egyptian Journal of Petroleum* (Vol. 25, Issue 1, pp. 107–123). Egyptian Petroleum Research Institute. <https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2015.03.011>
- Adl, S. M., & Coleman, D. C. (2005). Dynamics of soil protozoa using a direct count method. *Biology and Fertility of Soils*, 42(2), 168–171. <https://doi.org/10.1007/s00374-005-0009-x>
- Adl, S. M., Habura, A., & Eglit, Y. (2014). Amplification primers of SSU rDNA for soil protists. In *Soil Biology and Biochemistry* (Vol. 69, pp. 328–342). <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.10.024>
- Almiron, M., Link, A. J., Furlong, D., & Kolter, R. (1992). A novel DNA-binding protein with regulatory and protective roles in starved *Escherichia coli*. *Genes and Development*, 6(12 B), 2646–2654. <https://doi.org/10.1101/gad.6.12b.2646>
- Altered active pyrene degraders in biosurfactant-assisted bioaugmentation as revealed by RNA stable isotope probing. (2022). *Environmental Pollution*, 313. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120192>
- Aßhauer, K. P., Wemheuer, B., Daniel, R., & Meinicke, P. (2015). Tax4Fun: Predicting functional profiles from metagenomic 16S rRNA data. *Bioinformatics*, 31(17), 2882–2884. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv287>
- Bacosa, H. P., Suto, K., & Inoue, C. (2012). Bacterial community dynamics during the preferential degradation of aromatic hydrocarbons by a microbial consortium. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 74, 109–115. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.04.022>
- Barnier, C., Ouvrard, S., Robin, C., & Morel, J. L. (2014). Desorption kinetics of PAHs from aged industrial soils for availability assessment. *Science of the Total Environment*, 470–471, 639–645. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.10.032>
- Bautista, F. L., Sanz, R., Molina, C. M., González, N., & Sánchez, D. (2009). Effect of different non-ionic surfactants on the biodegradation of PAHs by diverse aerobic bacteria. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 63(7), 913–922. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2009.06.013>
- Behera, I. D., Nayak, M., Mishra, A., Meikap, B. C., & Sen, R. (2022). Strategic implementation of integrated bioaugmentation and biostimulation for efficient mitigation of petroleum hydrocarbon pollutants from terrestrial and aquatic environment. *Marine Pollution Bulletin*, 177. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2022.113492>
- Bernstein, H. C., & Carlson, R. P. (2012). Microbial consortia engineering for cellular factories: In vitro to in silico systems. In *Computational and Structural Biotechnology Journal* (Vol. 3, Issue 4, p. e201210017). Research Network of Computational and Structural Biotechnology. <https://doi.org/10.5936/csbj.201210017>
- Bernstein, H. C., Paulson, S. D., & Carlson, R. P. (2012). Synthetic *Escherichia coli* consortia engineered for syntrophy demonstrate enhanced biomass productivity. *Journal of Biotechnology*, 157(1), 159–166. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.10.001>

- Bertrand, J.-C., Lebaron, P. C., Lebaron, P., Matheron, R., Normand, P., & Sime-Ngando, T. (2015). Environmental Microbiology: Fundamentals and Applications. In *Environmental Microbiology: Fundamentals and Applications*. https://doi.org/10.1007/978-94-017-9118-2_16
- Bhatt, P., Bhatt, K., Sharma, A., Zhang, W., Mishra, S., & Chen, S. (2021). Biotechnological basis of microbial consortia for the removal of pesticides from the environment. In *Critical Reviews in Biotechnology* (Vol. 41, Issue 3, pp. 317–338). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/07388551.2020.1853032>
- Biswas, R., & Sarkar, A. (2018). ‘Omics’ Tools in Soil Microbiology: The State of the Art. In *Advances in Soil Microbiology: Recent Trends and Future Prospects* (pp. 35–64). https://doi.org/10.1007/978-981-10-6178-3_3
- Bouchez, M., Blanchet, D., & Vandecasteele, J.-P. (1995). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by pure strains and by defined strain associations: inhibition phenomena and cometabolism. In *Appl Microbiol Biotechnol* (Vol. 43). <https://doi.org/10.1007/BF00170638>
- Bouchez, T., Patureau, D., Dabert, P., Juretschko, S., Doré, J., Delgenès, P., Moletta, R., & Wagner, M. (2000). Ecological study of a bioaugmentation failure. *Environmental Microbiology*, 2(2), 179–190. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2000.00091.x>
- Brenner, K., You, L., & Arnold, F. H. (2008). Engineering microbial consortia: a new frontier in synthetic biology. In *Trends in Biotechnology* (Vol. 26, Issue 9, pp. 483–489). <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.05.004>
- Brewer, T. E., Handley, K. M., Carini, P., Gilbert, J. A., & Fierer, N. (2016). Genome reduction in an abundant and ubiquitous soil bacterium “Candidatus Udaeobacter copiosus.” *Nature Microbiology*, 2. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.198>
- Brzeszcz, J., Kapusta, P., Steliga, T., & Turkiewicz, A. (2020). Hydrocarbon removal by two differently developed microbial inoculants and comparing their actions with biostimulation treatment. *Molecules*, 25(3). <https://doi.org/10.3390/molecules25030661>
- Brzeszcz, J., Steliga, T., Kapusta, P., Turkiewicz, A., & Kaszycki, P. (2016). r-strategist versus K-strategist for the application in bioremediation of hydrocarbon-contaminated soils. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 106, 41–52. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.10.001>
- Carney, M. W., Erwin, K., Hardman, R., Yuen, B., Volz, D. C., Hinton, D. E., & Kullman, S. W. (2008). Differential developmental toxicity of naphthoic acid isomers in medaka (*Oryzias latipes*) embryos. *Marine Pollution Bulletin*, 57(6–12), 255–266. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2008.02.036>
- Cayetano, R. D. A., Park, J., Kim, G. B., Jung, J. H., & Kim, S. H. (2021). Enhanced anaerobic digestion of waste-activated sludge via bioaugmentation strategy—Phylogenetic investigation of communities by reconstruction of unobserved states (PICRUSt2) analysis through hydrolytic enzymes and possible linkage to system performance. *Bioresource Technology*, 332. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125014>
- Cébron, A., Borreca, A., Beguiristain, T., Biache, C., & Faure, P. (2022). Taxonomic and functional trait-based approaches suggest that aerobic and anaerobic soil microorganisms allow the natural attenuation of oil from natural seeps. *Scientific Reports*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-10850-4>

- Cébron, A., Norini, M., Beguiristain, T., & Leyval, C. (2008). *Real-Time PCR quantification of PAH-ring hydroxylating dioxygenase (PAH-RHD α) genes from Gram positive and Gram negative bacteria in soil and sediment samples*. 73, 148–159. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.01.009>
- Cecotti, M., Coppotelli, B. M., Mora, V. C., Viera, M., & Morelli, I. S. (2018). Efficiency of surfactant-enhanced bioremediation of aged polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil: Link with bioavailability and the dynamics of the bacterial community. *Science of the Total Environment*, 634, 224–234. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.303>
- Chandran, H., Meena, M., & Sharma, K. (2020). Microbial Biodiversity and Bioremediation Assessment Through Omics Approaches. *Frontiers in Environmental Chemistry*, 1. <https://doi.org/10.3389/fenvc.2020.570326>
- Chatzinotas, A., Schellenberger, S., Glaser, K., & Kolb, S. (2013). Assimilation of cellulose-derived carbon by microeukaryotes in oxic and anoxic slurries of an aerated soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(18), 5777–5781. <https://doi.org/10.1128/AEM.01598-13>
- Chaudhary, D. K., Bajagain, R., Jeong, S. W., & Kim, J. (2021). Effect of consortium bioaugmentation and biostimulation on remediation efficiency and bacterial diversity of diesel-contaminated aged soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 37(3). <https://doi.org/10.1007/s11274-021-02999-3>
- Chaudhary, D. K., & Kim, J. (2019). New insights into bioremediation strategies for oil-contaminated soil in cold environments. In *International Biodeterioration and Biodegradation* (Vol. 142, pp. 58–72). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2019.05.001>
- Chauhan, A., Fazlurrahman, ., Oakeshott, J. G., Rakesh, ., & Jain, K. (2008). Bacterial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: strategies for bioremediation. In *Indian J. Microbiol* (Vol. 48). <https://doi.org/10.1007/s12088-008-0010-9>
- Che, S., & Men, Y. (2019). Synthetic microbial consortia for biosynthesis and biodegradation: promises and challenges. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 46(9–10), 1343–1358. <https://doi.org/10.1007/s10295-019-02211-4>
- Chignell, J. F., Park, S., Lacerda, C. M. R., Long, S. K. De, & Reardon, K. F. (2017). Label-Free Proteomics of a Defined , Binary Co-culture Reveals Diversity of Competitive Responses Between Members of a Model Soil Microbial System. *Microbial Ecology*, 75, 701–719. <https://doi.org/10.1007/s00248-017-1072-1>
- Clarholm, M. (1981). Protozoan Grazing of Bacteria in Soil-Impact and Importance. *Microbial Ecology*, 7, 343–350. <https://doi.org/10.1007/BF02341429>
- Clarholm, M. (1985). Interaction of bacteria, protozoa and plants leading to mineralization of soil nitrogen. *Soil Biology and Biochemistry*, 17(2), 181–187. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(85\)90113-0](https://doi.org/10.1016/0038-0717(85)90113-0)
- Crampon, M., Bodilis, J., & Portet-Koltalo, F. (2018). Linking initial soil bacterial diversity and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) degradation potential. *Journal of Hazardous Materials*, 359, 500–509. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.07.088>
- Cycoń, M., Mroziak, A., & Piotrowska-Seget, Z. (2017). Bioaugmentation as a strategy for the remediation of pesticide-polluted soil: A review. In *Chemosphere* (Vol. 172, pp. 52–71). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.129>

- Dalton, H., & Stirling, D. I. (1982). Co-metabolism. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 297(1088), 481–496. <https://doi.org/10.1098/rstb.1982.0056>
- Dhar, K., Subashchandrabose, S. R., Venkateswarlu, K., Krishnan, K., & Megharaj, M. (2020). Anaerobic Microbial Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: A Comprehensive Review. In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* (Vol. 251, pp. 25–108). Springer New York LLC. https://doi.org/10.1007/398_2019_29
- Ding, G. C., Heuer, H., & Smalla, K. (2012). Dynamics of bacterial communities in two unpolluted soils after spiking with phenanthrene: Soil type specific and common responders. *Frontiers in Microbiology*, 3(AUG). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00290>
- Dolinšek, J., Goldschmidt, F., & Johnson, D. R. (2016). Synthetic microbial ecology and the dynamic interplay between microbial genotypes. In *FEMS Microbiology Reviews* (Vol. 40, Issue 6, pp. 961–979). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuw024>
- Dong, Z. L., Wang, B. S., & Li, J. (2020). Effects of Petroleum Hydrocarbon Contamination on Soil Bacterial Diversity in the Permafrost Region of the Qinghai-Tibetan Plateau. In *Soil and Sediment Contamination* (Vol. 29, Issue 3, pp. 322–339). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/15320383.2019.1710109>
- Douglas, G. M., Maffei, V. J., Zaneveld, J. R., Yurgel, S. N., Brown, J. R., Taylor, C. M., Huttenhower, C., & Langille, M. G. I. (2020). PICRUSt2 for prediction of metagenome functions. In *Nature Biotechnology* (Vol. 38, Issue 6, pp. 669–673). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0550-z>
- D'Souza, G., Shitut, S., Preussger, D., Yousif, G., Waschina, S., & Kost, C. (2018). Ecology and evolution of metabolic cross-feeding interactions in bacteria. In *Natural Product Reports* (Vol. 35, Issue 5, pp. 455–488). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/c8np00009c>
- El Fantroussi, S., & Agathos, S. N. (2005). Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? In *Current Opinion in Microbiology* (Vol. 8, Issue 3, pp. 268–275). <https://doi.org/10.1016/j.mib.2005.04.011>
- Fazzini, R. A. B., Preto, M. J., Quintas, A. C. P., Bielecka, A., Timmis, K. N., & Martins, V. A. P. (2010). Consortia modulation of the stress response: proteomic analysis of single strain versus. *Environmental Microbiology*, 12, 2436–2449. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02217.x>
- Ferraro, A., Massini, G., Miritana, V. M., Panico, A., Pontoni, L., Race, M., Rosa, S., Signorini, A., Fabbicino, M., & Pirozzi, F. (2021). Bioaugmentation strategy to enhance polycyclic aromatic hydrocarbons anaerobic biodegradation in contaminated soils. *Chemosphere*, 275. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130091>
- Festa, S., Coppotelli, B. M., Madueño, L., Loviso, C. L., Macchi, M., Neme Tauil, R. M., Valacco, M. P., & Morelli, I. S. (2017). Assigning ecological roles to the populations belonging to a phenanthrene-degrading bacterial consortium using omic approaches. *PLoS ONE*, 12(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184505>
- Festa, S., Coppotelli, B. M., & Morelli, I. S. (2013). Bacterial diversity and functional interactions between bacterial strains from a phenanthrene-degrading consortium obtained from a chronically contaminated-soil. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 85, 42–51. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.06.006>

- Festa, S., Coppotelli, B. M., & Morelli, I. S. (2016). Comparative bioaugmentation with a consortium and a single strain in a phenanthrene-contaminated soil: Impact on the bacterial community and biodegradation. *Applied Soil Ecology*, *98*, 8–19. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.08.025>
- Festa, S., Macchi, M., Cortés, F., Morelli, I. S., & Coppotelli, B. M. (2016). Monitoring the impact of bioaugmentation with a PAH-degrading strain on different soil microbiomes using pyrosequencing. *FEMS Microbiology Ecology*, *92*(8). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw125>
- Fioravanti, A., Clantin, B., Dewitte, F., Lens, Z., Verger, A., Biondi, E. G., & Villeret, V. (2012). Structural insights into ChpT, an essential dimeric histidine phosphotransferase regulating the cell cycle in *Caulobacter crescentus*. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, *68*(9), 1025–1029. <https://doi.org/10.1107/S1744309112033064>
- Fiore-Donno, A. M., Richter-Heitmann, T., Degrune, F., Dumack, K., Regan, K. M., Marhan, S., Boeddinghaus, R. S., Rillig, M. C., Friedrich, M. W., Kandeler, E., & Bonkowski, M. (2019). Functional traits and spatio-temporal structure of a major group of soil protists (rhizaria: Cercozoa) in a temperate grassland. *Frontiers in Microbiology*, *10*(JUN). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01332>
- Gan, S., Lau, E. V., & Ng, H. K. (2009). Remediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). In *Journal of Hazardous Materials* (Vol. 172, Issues 2–3, pp. 532–549). <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.07.118>
- Gao, C. H., Cao, H., Cai, P., & Sørensen, S. J. (2021). The initial inoculation ratio regulates bacterial coculture interactions and metabolic capacity. *ISME Journal*, *15*(1), 29–40. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-00751-7>
- Gao, D., Zhao, H., Wang, L., Li, Y., Tang, T., Bai, Y., & Liang, H. (2022). Current and emerging trends in bioaugmentation of organic contaminated soils: A review. In *Journal of Environmental Management* (Vol. 320). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.115799>
- Gao, Z., Karlsson, I., Geisen, S., Kowalchuk, G., & Jousset, A. (2019). Protists: Puppet Masters of the Rhizosphere Microbiome. In *Trends in Plant Science* (Vol. 24, Issue 2, pp. 165–176). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.10.011>
- Geisen, S., Bandow, C., Römbke, J., & Bonkowski, M. (2014). Soil water availability strongly alters the community composition of soil protists. *Pedobiologia*, *57*(4–6), 205–213. <https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2014.10.001>
- Geisen, S., Mitchell, E. A. D., Adl, S., Bonkowski, M., Dunthorn, M., Ekelund, F., Fernández, L. D., Jousset, A., Krashevskaya, V., Singer, D., Spiegel, F. W., Walochnik, J., & Lara, E. (2018). Soil protists: A fertile frontier in soil biology research. In *FEMS Microbiology Reviews* (Vol. 42, Issue 3, pp. 293–323). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy006>
- Geisen, S., Tveit, A. T., Clark, I. M., Richter, A., Svenning, M. M., Bonkowski, M., & Urich, T. (2015). Metatranscriptomic census of active protists in soils. *ISME Journal*, *9*(10), 2178–2190. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.30>
- Ghazali, F. M., Rahman, R. N. Z. A., Salleh, A. B., & Basri, M. (2004). Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. *International Biodeterioration and Biodegradation*, *54*(1), 61–67. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2004.02.002>

- Ghosal, D., Ghosh, S., Dutta, T. K., & Ahn, Y. (2016). Current state of knowledge in microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): A review. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 7, Issue AUG). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01369>
- Gilmore, S. P., Lankiewicz, T. S., Wilken, S. E., Brown, J. L., Sexton, J. A., Henske, J. K., Theodorou, M. K., Valentine, D. L., & O'Malley, M. A. (2019). Top-Down Enrichment Guides in Formation of Synthetic Microbial Consortia for Biomass Degradation [Research-article]. *ACS Synthetic Biology*, 8(9), 2174–2185. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.9b00271>
- Giri, S., Waschina, S., Kaleta, C., & Kost, C. (2019). Defining Division of Labor in Microbial Communities. In *Journal of Molecular Biology* (Vol. 431, Issue 23, pp. 4712–4731). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.06.023>
- Goldford, J. E., Lu, N., Bajić, D., Estrela, S., Tikhonov, M., Sanchez-Gorostiaga, A., Segrè, D., Mehta, P., & Sanchez, A. (2018). Emergent simplicity in microbial community assembly. *Science*, 469–474. <https://doi.org/10.1126/science.aat1168>
- González-Cabaleiro, R., Ofițeru, I. D., Lema, J. M., & Rodríguez, J. (2015). Microbial catabolic activities are naturally selected by metabolic energy harvest rate. *ISME Journal*, 9(12), 2630–2641. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.69>
- Goswami, A., Adkins-Jablonsky, S. J., Barreto Filho, M. M., Shilling, M. D., Dawson, A., Heiser, S., O'Connor, A., Walker, M., Roberts, Q., & Morris, J. J. (2023). Heavy Metal Pollution Impacts Soil Bacterial Community Structure and Antimicrobial Resistance at the Birmingham 35th Avenue Superfund Site. *Microbiology Spectrum*, 11(2). <https://doi.org/10.1128/spectrum.02426-22>
- Gottschlich, L., Geiser, P., Bortfeld-Miller, M., Field, C. M., & Vorholt, J. A. (2019). Complex general stress response regulation in *Sphingomonas melonis* Fr1 revealed by transcriptional analyses. *Scientific Reports*, 9(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45788-7>
- Gran-Scheuch, A., Ramos-Zuñiga, J., Fuentes, E., Bravo, D., & Pérez-Donoso, J. M. (2020). Effect of co-contamination by pahs and heavy metals on bacterial communities of diesel contaminated soils of south shetland islands, antarctica. *Microorganisms*, 8(11), 1–17. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111749>
- Großkopf, T., & Soyer, O. S. (2014). Synthetic microbial communities. In *Current Opinion in Microbiology* (Vol. 18, Issue 1, pp. 72–77). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.02.002>
- Guo, G., Tian, F., Ding, K., Wang, L., Liu, T., & Yang, F. (2017). Effect of a bacterial consortium on the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and bacterial community composition in Chinese soils. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 123, 56–62. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.04.022>
- Haleyur, N., Shahsavari, E., Jain, S. S., Koshlaf, E., Ravindran, V. B., Morrison, P. D., Osborn, A. M., & Ball, A. S. (2019). Influence of bioaugmentation and biostimulation on PAH degradation in aged contaminated soils: Response and dynamics of the bacterial community. *Journal of Environmental Management*, 238, 49–58. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.02.115>
- Haritash, A. K., & Kaushik, C. P. (2009). Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. In *Journal of Hazardous Materials* (Vol. 169, Issues 1–3, pp. 1–15). <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.03.137>

- Harms, G., Layton, A. C., Dionisi, H. M., Gregory, I. R., Garrett, V. M., Hawkins, S. A., Robinson, K. G., & Sayler, G. S. (2003). Real-time PCR quantification of nitrifying bacteria in a municipal wastewater treatment plant. *Environmental Science and Technology*, *37*(2), 343–351. <https://doi.org/10.1021/es0257164>
- Heaver, S. L., Johnson, E. L., & Ley, R. E. (2018). Sphingolipids in host–microbial interactions. In *Current Opinion in Microbiology* (Vol. 43, pp. 92–99). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.12.011>
- Horemans, B., Breugelmans, P., Saeys, W., & Springael, D. (2017). Soil-Bacterium Compatibility Model as a Decision-Making Tool for Soil Bioremediation. *Environmental Science and Technology*, *51*(3), 1605–1615. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b04956>
- Huang, X., Tian, Y., Luo, Y. R., Liu, H. J., Zheng, W., & Zheng, T. L. (2008). Modified sublimation to isolate phenanthrene-degrading bacteria of the genera *Sphingomonas* and *Burkholderia* from Xiamen oil port. *Marine Pollution Bulletin*, *57*(6–12), 538–543. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2007.12.013>
- Hungate, B. A., Mau, R. L., Schwartz, E., Gregory Caporaso, J., Dijkstra, P., van Gestel, N., Koch, B. J., Liu, C. M., McHugh, T. A., Marks, J. C., Morrissey, E. M., & Price, L. B. (2015). Quantitative microbial ecology through stable isotope probing. *Applied and Environmental Microbiology*, *81*(21), 7570–7581. <https://doi.org/10.1128/AEM.02280-15>
- Hünninghaus, M., Koller, R., Kramer, S., Marhan, S., Kandeler, E., & Bonkowski, M. (2017). Changes in bacterial community composition and soil respiration indicate rapid successions of protist grazers during mineralization of maize crop residues. *Pedobiologia*, *62*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2017.03.002>
- Ibrahim, M., Raajaraam, L., & Raman, K. (2021). Modelling microbial communities: Harnessing consortia for biotechnological applications. In *Computational and Structural Biotechnology Journal* (Vol. 19, pp. 3892–3907). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.06.048>
- Imam, A., Kumar Suman, S., Kanaujia, P. K., & Ray, A. (2022). Biological machinery for polycyclic aromatic hydrocarbons degradation: A review. In *Bioresource Technology* (Vol. 343). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126121>
- Innemanová, P., Filipová, A., Michalíková, K., Wimmerová, L., & Cajthaml, T. (2018). Bioaugmentation of PAH-contaminated soils: A novel procedure for introduction of bacterial degraders into contaminated soil. *Ecological Engineering*, *118*, 93–96. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2018.04.014>
- Jansson, J. K., Neufeld, J. D., Moran, M. A., & Gilbert, J. A. (2012). Omics for understanding microbial functional dynamics. In *Environmental Microbiology* (Vol. 14, Issue 1, pp. 1–3). <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02518.x>
- Jousset, A. (2012). Ecological and evolutive implications of bacterial defences against predators. *Environmental Microbiology*, *14*(8), 1830–1843. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02627.x>
- Katsuyama, C., Nakaoka, S., Takeuchi, Y., Tago, K., Hayatsu, M., & Kato, K. (2009). Complementary cooperation between two syntrophic bacteria in pesticide degradation. *Journal of Theoretical Biology*, *256*(4), 644–654. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2008.10.024>
- Khan, N., Maezato, Y., McClure, R. S., Brislawn, C. J., Mobberley, J. M., Isern, N., Chrisler, W. B., Markillie, L. M., Barney, B. M., Song, H. S., Nelson, W. C., & Bernstein, H. C. (2018). Phenotypic responses to

- interspecies competition and commensalism in a naturally-derived microbial co-culture. *Scientific Reports*, 8(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18630-1>
- Khara, P., Roy, M., Chakraborty, J., Ghosal, D., & Dutta, T. K. (2014). Functional characterization of diverse ring-hydroxylating oxygenases and induction of complex aromatic catabolic gene clusters in *Sphingobium* sp. PNB. *FEBS Open Bio*, 4, 290–300. <https://doi.org/10.1016/j.fob.2014.03.001>
- Kim, J., Hwangbo, M., Shih, C.-H., & Chu, K.-H. (2023). Advances and perspectives of using stable isotope probing (SIP)-based technologies in contaminant biodegradation. *Water Research X*, 20, 100187. <https://doi.org/10.1016/j.wroa.2023.100187>
- 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>
- Kramer, S., Dibbern, D., Moll, J., Huenninghaus, M., Koller, R., Krueger, D., Marhan, S., Urich, T., Wubet, T., Bonkowski, M., Buscot, F., Lueders, T., & Kandeler, E. (2016). Resource partitioning between bacteria, fungi, and protists in the detritosphere of an agricultural soil. *Frontiers in Microbiology*, 7(SEP). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01524>
- Kumari, S., Regar, R. K., & Manickam, N. (2018). Improved polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in a crude oil by individual and a consortium of bacteria. *Bioresource Technology*, 254, 174–179. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.075>
- Kuppusamy, S., Thavamani, P., Venkateswarlu, K., Lee, Y. B., Naidu, R., & Megharaj, M. (2017). Remediation approaches for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contaminated soils: Technological constraints, emerging trends and future directions. In *Chemosphere* (Vol. 168, pp. 944–968). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.10.115>
- Langille, M. G. I., Zaneveld, J., Caporaso, J. G., McDonald, D., Knights, D., Reyes, J. A., Clemente, J. C., Burkepille, D. E., Vega Thurber, R. L., Knight, R., Beiko, R. G., & Huttenhower, C. (2013). Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nature Biotechnology*, 31(9), 814–821. <https://doi.org/10.1038/nbt.2676>
- Laothamteep, N., Kawano, H., Vejarano, F., Suzuki-Minakuchi, C., Shintani, M., Nojiri, H., & Pinyakong, O. (2021). Effects of environmental factors and coexisting substrates on PAH degradation and transcriptomic responses of the defined bacterial consortium OPK. *Environmental Pollution*, 277. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116769>
- Lara, E., Berney, C., Ekelund, F., Harms, H., & Chatzinotas, A. (2007). Molecular comparison of cultivable protozoa from a pristine and a polycyclic aromatic hydrocarbon polluted site. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(1), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2006.06.017>
- Li, C. M., Wu, H. Z., Wang, Y. X., Zhu, S., & Wei, C. H. (2020). Enhancement of phenol biodegradation: Metabolic division of labor in co-culture of *Stenotrophomonas* sp. N5 and *Advenella* sp. B9. *Journal of Hazardous Materials*, 400. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123214>
- Li, F., Chen, L., Zhang, J., Yin, J., & Huang, S. (2017). Bacterial community structure after long-term organic and inorganic fertilization reveals important associations between soil nutrients and specific taxa involved in nutrient transformations. *Frontiers in Microbiology*, 8(FEB). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00187>

- Li, J., Luo, C., Zhang, D., Song, M., Cai, X., Jiang, L., & Zhang, G. (2018). *Autochthonous Bioaugmentation-Modified Bacterial Diversity of Phenanthrene Degraders in PAH-Contaminated Wastewater as Revealed by DNA-Stable Isotope Probing*. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b05646>
- Li, Q., Li, J., Jiang, L., Sun, Y., Luo, C., & Zhang, G. (2021). Diversity and structure of phenanthrene degrading bacterial communities associated with fungal bioremediation in petroleum contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*, 403. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123895>
- Li, S., Hu, S., Shi, S., Ren, L., Yan, W., & Zhao, H. (2019). Microbial diversity and metaproteomic analysis of activated sludge responses to naphthalene and anthracene exposure. *RSC Advances*, 9(40), 22841–22852. <https://doi.org/10.1039/c9ra04674g>
- Lillis, L., Clipson, N., & Doyle, E. (2010). Quantification of catechol dioxygenase gene expression in soil during degradation of 2,4-dichlorophenol. *FEMS Microbiology Ecology*, 73(2), 363–369. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00906.x>
- Lin, H., & Peddada, S. Das. (2020). Analysis of compositions of microbiomes with bias correction. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17041-7>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lu, C., Hong, Y., Liu, J., Gao, Y., Ma, Z., Yang, B., Ling, W., & Waigi, M. G. (2019). A PAH-degrading bacterial community enriched with contaminated agricultural soil and its utility for microbial bioremediation. *Environmental Pollution*, 251, 773–782. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.05.044>
- Lu, X. Y., Zhang, T., & Fang, H. H. P. (2011). Bacteria-mediated PAH degradation in soil and sediment. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 89, Issue 5, pp. 1357–1371). <https://doi.org/10.1007/s00253-010-3072-7>
- Lueders, T., Kindler, R., Miltner, A., Friedrich, M. W., & Kaestner, M. (2006). *Identification of Bacterial Micropredators Distinctively Active in a Soil Microbial Food Web*. 72(8), 5342–5348. <https://doi.org/10.1128/AEM.00400-06>
- Macchi, M. (2018). *Desarrollo de consorcios bacterianos con alta eficiencia de degradación de PAH para su aplicación a la recuperación de suelos crónicamente contaminados*. <https://doi.org/10.35537/10915/66553>
- Macchi, M., Festa, S., Nieto, E., Irazoqui, J. M., Vega-Vela, N., Junca Howard, Valacco, M. P., Amadio, A. F., Morelli, I. S., & Coppotelli, B. M. (2021). Design and evaluation of synthetic bacterial consortia for optimized phenanthrene degradation through the integration of genomics and shotgun proteomics. *Biotechnology Reports*, 29. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00588>
- Macchi, M., Martinez, M., Tauil, R. M. N., Valacco, M. P., Morelli, I. S., & Coppotelli, B. M. (2018). Insights into the genome and proteome of *Sphingomonas paucimobilis* strain 20006FA involved in the regulation of polycyclic aromatic hydrocarbon degradation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 34(1), 1–14. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2391-6>
- Madrid, F., Rubio-Bellido, M., Villaverde, J., Peña, A., & Morillo, E. (2019). Natural and assisted dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons in a long-term co-contaminated soil with creosote and potentially toxic

elements. *Science of the Total Environment*, 660, 705–714. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.12.376>

- Mai, Z., Wang, L., Li, Q., Sun, Y., & Zhang, S. (2021). Biodegradation and metabolic pathway of phenanthrene by a newly isolated bacterium *Gordonia* sp. SCSIO19801. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 585, 42–47. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.10.069>
- Mallon, C. A., Le Roux, X., Van Doorn, G. S., Dini-Andreote, F., Poly, F., & Salles, J. F. (2018). The impact of failure: Unsuccessful bacterial invasions steer the soil microbial community away from the invader's niche. *ISME Journal*, 12(3), 728–741. <https://doi.org/10.1038/s41396-017-0003-y>
- Mallon, C. A., Van Elsas, J. D., & Salles, J. F. (2015). Microbial invasions: The process, patterns, and mechanisms. In *Trends in Microbiology* (Vol. 23, Issue 11, pp. 719–729). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.07.013>
- Martin, F., Torelli, S., Le Paslier, D., Barbance, A., Martin-Laurent, F., Bru, D., Geremia, R., Blake, G., & Jouanneau, Y. (2012). Betaproteobacteria dominance and diversity shifts in the bacterial community of a PAH-contaminated soil exposed to phenanthrene. *Environmental Pollution*, 162, 345–353. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.11.032>
- Massot, F., Bernard, N., Alvarez, L. M. M., Martorell, M. M., Mac Cormack, W. P., & Ruberto, L. A. M. (2022). Microbial associations for bioremediation. What does “microbial consortia” mean? In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 106, Issue 7, pp. 2283–2297). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-11864-8>
- Mawarda, P. C., Le Roux, X., Acosta, M. U., van Elsas, J. D., & Salles, J. F. (2022). The impact of protozoa addition on the survivability of *Bacillus* inoculants and soil microbiome dynamics. *ISME Communications*, 2(1). <https://doi.org/10.1038/s43705-022-00166-9>
- Mawarda, P. C., Le Roux, X., Dirk van Elsas, J., & Salles, J. F. (2020). Deliberate introduction of invisible invaders: A critical appraisal of the impact of microbial inoculants on soil microbial communities. In *Soil Biology and Biochemistry* (Vol. 148). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2020.107874>
- McCarty, N. S., & Ledesma-Amaro, R. (2019). Synthetic Biology Tools to Engineer Microbial Communities for Biotechnology. In *Trends in Biotechnology* (Vol. 37, Issue 2, pp. 181–197). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.11.002>
- Mistry, A. N., Kachenchart, B., Pinyakong, O., Assavalapsakul, W., Jitraphai, S. M., Somwangthanaroj, A., & Luepromchai, E. (2023). Bioaugmentation with a defined bacterial consortium: A key to degrade high molecular weight polylactic acid during traditional composting. *Bioresource Technology*, 367. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.128237>
- Molina, L., & Segura, A. (2021). Biochemical and metabolic plant responses toward polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals present in atmospheric pollution. In *Plants* (Vol. 10, Issue 11). MDPI. <https://doi.org/10.3390/plants10112305>
- Morelli, I. S., Del Panno, M. T., De Antoni, G. L., & Pinceira, M. T. (2005). Laboratory study on the bioremediation of petrochemical sludge-contaminated soil. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 55(4), 271–278. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2005.03.001>

- Mujakić, I., Piwosz, K., & Koblížek, M. (2022). Phylum Gemmatimonadota and Its Role in the Environment. In *Microorganisms* (Vol. 10, Issue 1). MDPI. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10010151>
- Naduvilpurakkal, S. B., Menacherry, S. P. M., Nair, S. R., Nguyen, T. P., Nair, P. G., Aravind, U. K., & Aravindakumar, C. T. (2022). Exploring the oxidation chemistry of hydroxy naphthoic acid: An experimental and theoretical study. *Journal of Physical Organic Chemistry*, 35(12). <https://doi.org/10.1002/poc.4416>
- Nearing, J. T., Douglas, G. M., Hayes, M. G., MacDonald, J., Desai, D. K., Allward, N., Jones, C. M. A., Wright, R. J., Dhanani, A. S., Comeau, A. M., & Langille, M. G. I. (2022). Microbiome differential abundance methods produce different results across 38 datasets. *Nature Communications*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28034-z>
- Neufeld, J. D., Dumont, M. G., Vohra, J., & Murrell, J. C. (2007). Methodological considerations for the use of stable isotope probing in microbial ecology. *Microbial Ecology*, 53(3), 435–442. <https://doi.org/10.1007/s00248-006-9125-x>
- Neufeld, J. D., Vohra, J., Dumont, M. G., Lueders, T., Manefield, M., Friedrich, M. W., & Murrell, C. J. (2007). DNA stable-isotope probing. *Nature Protocols*, 2(4), 860–866. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.109>
- Nwankwegu, A. S., Zhang, L., Xie, D., Onwosi, C. O., Muhammad, W. I., Odoh, C. K., Sam, K., & Idenyi, J. N. (2022). Bioaugmentation as a green technology for hydrocarbon pollution remediation. Problems and prospects. In *Journal of Environmental Management* (Vol. 304). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.114313>
- Nzila, A. (2013). Update on the cometabolism of organic pollutants by bacteria. In *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)* (Vol. 178, pp. 474–482). <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.03.042>
- Nzila, A. (2018). Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons under anaerobic conditions: Overview of studies, proposed pathways and future perspectives. In *Environmental Pollution* (Vol. 239, pp. 788–802). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.04.074>
- Ortiz-Estrada, Á. M., Gollas-Galván, T., Martínez-Córdova, L. R., & Martínez-Porchas, M. (2019). Predictive functional profiles using metagenomic 16S rRNA data: a novel approach to understanding the microbial ecology of aquaculture systems. In *Reviews in Aquaculture* (Vol. 11, Issue 1, pp. 234–245). Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1111/raq.12237>
- Pagé, A. P., Yergeau, É., & Greer, C. W. (2015). *Salix purpurea* stimulates the expression of specific bacterial xenobiotic degradation genes in a soil contaminated with hydrocarbons. *PLoS ONE*, 10(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132062>
- Pascual-García, A., Bonhoeffer, S., & Bell, T. (2020). Metabolically cohesive microbial consortia and ecosystem functioning. In *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* (Vol. 375, Issue 1798). Royal Society Publishing. <https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0245>
- Patel, A. B., Shaikh, S., Jain, K. R., Desai, C., & Madamwar, D. (2020). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Sources, Toxicity, and Remediation Approaches. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.562813>

- Peng, R. H., Xiong, A. S., Xue, Y., Fu, X. Y., Gao, F., Zhao, W., Tian, Y. S., & Yao, Q. H. (2008). Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. In *FEMS Microbiology Reviews* (Vol. 32, Issue 6, pp. 927–955). <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00127.x>
- Pérez-Cobas, A. E., Gomez-Valero, L., & Buchrieser, C. (2020). Metagenomic approaches in microbial ecology: An update on whole-genome and marker gene sequencing analyses. *Microbial Genomics*, *6*(8), 1–22. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000409>
- Pérez-Pantoja, D., Donoso, R., Agulló, L., Córdova, M., Seeger, M., Pieper, D. H., & González, B. (2012). Genomic analysis of the potential for aromatic compounds biodegradation in Burkholderiales. *Environmental Microbiology*, *14*(5), 1091–1117. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02613.x>
- Petters, S., Groß, V., Söllinger, A., Pichler, M., Reinhard, A., Bengtsson, M. M., & Urich, T. (2021). The soil microbial food web revisited: Predatory myxobacteria as keystone taxa? *ISME Journal*, *15*(9), 2665–2675. <https://doi.org/10.1038/s41396-021-00958-2>
- Piskonen, R., Nyssönen, M., Rajamäki, T., & Itävaara, M. (2005). Monitoring of accelerated naphthalene-biodegradation in a bioaugmented soil slurry. *Biodegradation*, *16*(2), 127–134. <https://doi.org/10.1007/s10532-004-4893-9>
- Ponomarova, O., & Patil, K. R. (2015). Metabolic interactions in microbial communities: Untangling the Gordian knot. In *Current Opinion in Microbiology* (Vol. 27, pp. 37–44). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.06.014>
- Premnath, N., Mohanrasu, K., Guru Raj Rao, R., Dinesh, G. H., Prakash, G. S., Ananthi, V., Ponnuchamy, K., Muthusamy, G., & Arun, A. (2021). A crucial review on polycyclic aromatic Hydrocarbons - Environmental occurrence and strategies for microbial degradation. *Chemosphere*, *280*. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130608>
- Qian, X., Chen, L., Sui, Y., Chen, C., Zhang, W., Zhou, J., Dong, W., Jiang, M., Xin, F., & Ochsenreither, K. (2020). Biotechnological potential and applications of microbial consortia. In *Biotechnology Advances* (Vol. 40). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107500>
- Rafieenia, R., Atkinson, E., & Ledesma-Amaro, R. (2022). Division of labor for substrate utilization in natural and synthetic microbial communities. In *Current Opinion in Biotechnology* (Vol. 75). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2022.102706>
- Rajpara, R. K., Dudhagara, D. R., Bhatt, J. K., Gosai, H. B., & Dave, B. P. (2017). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) at the Gulf of Kutch, Gujarat, India: Occurrence, source apportionment, and toxicity of PAHs as an emerging issue. *Marine Pollution Bulletin*, *119*(2), 231–238. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.04.039>
- Ravindra, K., Sokhi, R., & Van Grieken, R. (2008). Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: Source attribution, emission factors and regulation. In *Atmospheric Environment* (Vol. 42, Issue 13, pp. 2895–2921). <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2007.12.010>
- Reasoner, D. J., & Geldreich, E. E. (1985). A New Medium for the Enumeration and Subculture of Bacteria from Potable Water Downloaded from. In *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* (Vol. 49, Issue 1). <http://aem.asm.org/>

- Redfern, L. K., Gardner, C. M., Hodzic, E., Ferguson, P. L., Hsu-Kim, H., & Gunsch, C. K. (2019). A new framework for approaching precision bioremediation of PAH contaminated soils. *Journal of Hazardous Materials*, 378. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.120859>
- Roell, G. W., Zha, J., Carr, R. R., Koffas, M. A., Fong, S. S., & Tang, Y. J. (2019). Engineering microbial consortia by division of labor. In *Microbial Cell Factories* (Vol. 18, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1083-3>
- Rosenzweig, R. F., Sharp, R. R., Treves, D. S., & Adams, J. (1994). *Microbial Evolution in a Simple Unstructured Environment: Genetic Differentiation in Escherichia coli*. <https://academic.oup.com/genetics/article/137/4/903/6012596>
- Sakshi, & Haritash, A. K. (2020). A comprehensive review of metabolic and genomic aspects of PAH-degradation. In *Archives of Microbiology* (Vol. 202, Issue 8, pp. 2033–2058). Springer. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-01929-5>
- Sakshi, Singh, S. K., & Haritash, A. K. (2019). Polycyclic aromatic hydrocarbons: soil pollution and remediation. In *International Journal of Environmental Science and Technology* (Vol. 16, Issue 10, pp. 6489–6512). Center for Environmental and Energy Research and Studies. <https://doi.org/10.1007/s13762-019-02414-3>
- Saleem, M., Fetzer, I., Harms, H., & Chatzinotas, A. (2013). Diversity of protists and bacteria determines predation performance and stability. *ISME Journal*, 7(10), 1912–1921. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.95>
- Santos, P. M., Benndorf, D., & Sá-Correia, I. (2004). Insights into *Pseudomonas putida* KT2440 response to phenol-induced stress by quantitative proteomics. *Proteomics*, 4(9), 2640–2652. <https://doi.org/10.1002/pmic.200300793>
- Schramm, F. D., Schroeder, K., & Jonas, K. (2019). Protein aggregation in bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 44(1), 54–72. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuz026>
- Schwartz, E., & Scow, K. M. (2001). Repeated inoculation as a strategy for the remediation of low concentrations of phenanthrene in soil. *Biodegradation*, 12, 201–207. <https://doi.org/10.1023/a:1013136524377>
- Sei, K., Asano, K.-I., Tateishi, N., Mori, K., & Fujita, M. (1999). Design of PCR Primers and Gene Probes for the General Detection of Bacterial Populations Capable of Degrading Aromatic Compounds via Catechol Cleavage Pathways. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 88(5), 542–550. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(00\)87673-2](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(00)87673-2)
- Shankar, S., Kansrajh, C., Dinesh, M. G., Satyan, R. S., Kiruthika, S., & Tharanipriya, A. (2014). Application of indigenous microbial consortia in bioremediation of oil-contaminated soils. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 11(2), 367–376. <https://doi.org/10.1007/s13762-013-0366-1>
- Siggins, A., Gunnigle, E., & Abram, F. (2012). Exploring mixed microbial community functioning: Recent advances in metaproteomics. *FEMS Microbiology Ecology*, 80(2), 265–280. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01284.x>

- Singleton, D. R., Adrion, A. C., & Aitken, M. D. (2016). Surfactant-induced bacterial community changes correlated with increased polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in contaminated soil. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *100*(23), 10165–10177. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7867-z>
- Smith, N. W., Shorten, P. R., Altermann, E., Roy, N. C., & McNabb, W. C. (2019). The Classification and Evolution of Bacterial Cross-Feeding. *Frontiers in Ecology and Evolution*, *7*. <https://doi.org/10.3389/fevo.2019.00153>
- Song, M., Luo, C., Jiang, L., Zhang, D., Wang, Y., & Zhang, G. (2015). Identification of Benzo[a]pyrene-metabolizing bacteria in forest soils by using DNA-based stable-isotope probing. *Applied and Environmental Microbiology*, *81*(21), 7368–7376. <https://doi.org/10.1128/AEM.01983-15>
- Sperfeld, M., Diekert, G., & Studenik, S. (2018). Anaerobic aromatic compound degradation in *Sulfuritalea hydrogenivorans* sk43H. *FEMS Microbiology Ecology*, *95*(1). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy199>
- Stenuit, B., & Agathos, S. N. (2015). Deciphering microbial community robustness through synthetic ecology and molecular systems synecology. In *Current Opinion in Biotechnology* (Vol. 33, Issue 1, pp. 305–317). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.03.012>
- Stirling, D. ian, & Dalton, H. (1979). The fortuitous oxidation and cometabolism of various carbon compounds by whole-cell suspensions of *Methylococcus capsulatus* (Bath). *FEMS Microbiology Letters*, *5*(4), 315–318. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1979.tb03329.x>
- Stringfellow, W. T., & Aitken, M. D. (1995). Competitive Metabolism of Naphthalene, Methylnaphthalenes, and Fluorene by Phenanthrene-Degrading Pseudomonads. *Applied and Environmental Microbiology*, *61*(1), 357–362. <https://doi.org/10.1128/aem.61.1.357-362.1995>
- Teng, T., Liang, J., & Wu, Z. (2021). Identification of pyrene degraders via DNA-SIP in oilfield soil during natural attenuation, bioaugmentation and biostimulation. *Science of the Total Environment*, *800*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149485>
- Teng, T., Liang, J., Zhu, J., Jin, P., & Zhang, D. (2022). Altered active pyrene degraders in biosurfactant-assisted bioaugmentation as revealed by RNA stable isotope probing. *Environmental Pollution*, *313*. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120192>
- Thakur, M. P., & Geisen, S. (2019). Trophic Regulations of the Soil Microbiome. In *Trends in Microbiology* (Vol. 27, Issue 9, pp. 771–780). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.04.008>
- Thomas, F., Corre, E., & Cébron, A. (2019). Stable isotope probing and metagenomics highlight the effect of plants on uncultured phenanthrene-degrading bacterial consortium in polluted soil. *ISME Journal*, *13*(7), 1814–1830. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0394-z>
- Treves, D. S., Manning, S., & Adams, J. (1998). Repeated Evolution of an Acetate-Crossfeeding Polymorphism in Long-Term Populations of *Escherichia coli*. *Mol. Biol. Evol*, *15*(7), 789–797. <https://academic.oup.com/mbe/article/15/7/789/1074867>
- Tyagi, M., da Fonseca, M. M. R., & de Carvalho, C. C. C. R. (2011). Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. In *Biodegradation* (Vol. 22, Issue 2, pp. 231–241). <https://doi.org/10.1007/s10532-010-9394-4>
- Van Herwijnen, R., Wattiau, P., Bastiaens, L., Daal, L., Jonker, Lucas., Springael, Dirk., Govers, H. A. J., & Parsons, J. R. (2003). Elucidation of the metabolic pathway of fluorene and cometabolic pathways of

- phenanthrene, fluoranthene, anthracene and dibenzothiophene by *Sphingomonas* sp. LB126. *Research in Microbiology*, 154(3), 199–206. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(03\)00039-1](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(03)00039-1)
- Van Herwijnen, René., Van De Sande, B. F., Van Der Wielen, F. W. M., Springael, D., Govers, H. A. J., & Parsons, J. R. (2003). Influence of phenanthrene and fluoranthene on the degradation of fluorene and glucose by *Sphingomonas* sp. strain LB126 in chemostat cultures. *FEMS Microbiology Ecology*, 46(1), 105–111. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(03\)00202-2](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(03)00202-2)
- Vandecraen, J., Chandler, M., Aertsen, A., & Van Houdt, R. (2017). The impact of insertion sequences on bacterial genome plasticity and adaptability. *Critical Reviews in Microbiology*, 43(6), 709–730. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2017.1303661>
- Vecchioli, G. I., Del Panno, M. T., & Paineira, M. T. (1990). Use of Selected Autochthonous Soil Bacteria to Enhance Degradation of Hydrocarbons in Soil. *Environmental Pollution*, 67, 249–258. [https://doi.org/10.1016/0269-7491\(90\)90190-N](https://doi.org/10.1016/0269-7491(90)90190-N)
- Vigil-Stenman, T., Ininbergs, K., Bergman, B., & Ekman, M. (2017). High abundance and expression of transposases in bacteria from the Baltic Sea. *ISME Journal*, 11(11), 2611–2623. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.114>
- Vilanova, C., & Porcar, M. (2016). Are multi-omics enough? In *Nature Microbiology* (Vol. 1, Issue 8). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.101>
- Wanapaisan, P., Laothamteep, N., & Vejarano, F. (2018). Synergistic degradation of pyrene by five culturable bacteria in a mangrove sediment-derived bacterial consortium. *Journal of Hazardous Materials*, 342, 561–570. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.08.062>
- Wang, B., Teng, Y., Xu, Y., Chen, W., Ren, W., Li, Y., Christie, P., & Luo, Y. (2018). Effect of mixed soil microbiomes on pyrene removal and the response of the soil microorganisms. *Science of the Total Environment*, 640–641, 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.290>
- Wang, J., & Yao, H. (2021). Applications of DNA/RNA-stable isotope probing (SIP) in environmental microbiology. In *Methods in Microbiology* (Vol. 48, pp. 227–267). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.mim.2020.11.004>
- West, S. A., & Cooper, G. A. (2016). Division of labour in microorganisms: An evolutionary perspective. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 14, Issue 11, pp. 716–723). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.111>
- Whitton, M. M., Ren, X., Yu, S. J., Irving, A. D., Trotter, T., Bajagai, Y. S., & Stanley, D. (2023). Humate application alters microbiota–mineral interactions and assists in pasture dieback recovery. *Heliyon*, 9(2). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e13327>
- Wilhelm, R. C., Amsili, J. P., Kurtz, K. S. M., van Es, H. M., & Buckley, D. H. (2023). Ecological insights into soil health according to the genomic traits and environment-wide associations of bacteria in agricultural soils. *ISME Communications*, 3(1). <https://doi.org/10.1038/s43705-022-00209-1>
- Willms, I. M., Rudolph, A. Y., Göschel, I., Bolz, S. H., Schneider, D., Penone, C., Poehlein, A., Schöning, I., & Nacke, H. (2020). Globally Abundant “*Candidatus Udaeobacter*” Benefits from Release of Antibiotics in Soil and Potentially Performs Trace Gas Scavenging. <https://doi.org/10.1128/mSphere>

- Willsey, G. G., & Wargo, M. J. (2015). Extracellular lipase and protease production from a model drinking water bacterial community is functionally robust to absence of individual members. *PLoS ONE*, *10*(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143617>
- Winding, A., Modrzyński, J. J., Christensen, J. H., Brandt, K. K., & Mayer, P. (2019). Soil bacteria and protists show different sensitivity to polycyclic aromatic hydrocarbons at controlled chemical activity. *FEMS Microbiology Letters*, *366*(17). <https://doi.org/10.1093/femsle/fnz214>
- Wolf, D. C., Cryder, Z., & Gan, J. (2019). Soil bacterial community dynamics following surfactant addition and bioaugmentation in pyrene-contaminated soils. *Chemosphere*, *231*, 93–102. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.05.145>
- Wolf, D. C., & Gan, J. (2018). Influence of rhamnolipid biosurfactant and Brij-35 synthetic surfactant on 14C-Pyrene mineralization in soil. *Environmental Pollution*, *243*, 1846–1853. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.10.031>
- Wu, C., Chao, Y., Shu, L., & Qiu, R. (2022). Interactions between soil protists and pollutants: An unsolved puzzle. In *Journal of Hazardous Materials* (Vol. 429). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.128297>
- Xu, C., & Yu, H. (2021). Insights into constructing a stable and efficient microbial consortium. In *Chinese Journal of Chemical Engineering* (Vol. 30, pp. 112–120). Materials China. <https://doi.org/10.1016/j.cjche.2020.12.012>
- Xu, P. (2021). Dynamics of microbial competition, commensalism, and cooperation and its implications for coculture and microbiome engineering. *Biotechnology and Bioengineering*, *118*(1), 199–209. <https://doi.org/10.1002/bit.27562>
- Yang, Z. N., Liu, Z. S., Wang, K. H., Liang, Z. L., Abdugheni, R., Huang, Y., Wang, R. H., Ma, H. L., Wang, X. K., Yang, M. L., Zhang, B. G., Li, D. F., Jiang, C. Y., Corvini, P. F. X., & Liu, S. J. (2022). Soil microbiomes divergently respond to heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons in contaminated industrial sites. *Environmental Science and Ecotechnology*, *10*. <https://doi.org/10.1016/j.ese.2022.100169>
- Yuan, K., Xie, X., Wang, X., Lin, L., Yang, L., Luan, T., & Chen, B. (2018). Transcriptional response of *Mycobacterium* sp. strain A1-PYR to multiple polycyclic aromatic hydrocarbon contaminations. *Environmental Pollution*, *243*, 824–832. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.09.001>
- Zhang, H., & Wang, X. (2016). Modular co-culture engineering, a new approach for metabolic engineering. *Metabolic Engineering*, *37*, 114–121. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2016.05.007>
- Zhang, L., & Lueders, T. (2017). Micropredator niche differentiation between bulk soil and rhizosphere of an agricultural soil depends on bacterial prey. *FEMS Microbiology Ecology*, *93*(9). <https://doi.org/10.1093/femsec/fix103>
- Zhang, L., Wang, X., Jiao, Y., Chen, X., Zhou, L., Guo, K., Ge, F., & Wu, J. (2013). Biodegradation of 4-chloronitrobenzene by biochemical cooperation between *Sphingomonas* sp. strain CNB3 and *Burkholderia* sp. strain CAN6 isolated from activated sludge. *Chemosphere*, *91*(9), 1243–1249. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.115>
- Zhang, T., & Zhang, H. (2022). Microbial Consortia Are Needed to Degrade Soil Pollutants. *Microorganisms*, *10*(2), 261. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020261>

- Zhou, H., Zhang, S., Xie, J., Wei, H., Hu, Z., & Wang, H. (2020). Pyrene biodegradation and its potential pathway involving Roseobacter clade bacteria. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 150. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2020.104961>
- Zhou, N., Guo, H., Liu, Q., Zhang, Z., Sun, J., & Wang, H. (2022). Bioaugmentation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-contaminated soil with the nitrate-reducing bacterium PheN7 under anaerobic condition. *Journal of Hazardous Materials*, 439. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.129643>
- Ziesack, M., Gibson, T., Oliver, J. K. W., Shumaker, A. M., Hsu, B. B., Riglar, D. T., Giessen, T. W., Dibenedetto, N. V, Bry, L., Way, J. C., Silver, P. A., & Gerber, G. K. (2019). Engineered Interspecies Amino Acid Cross-Feeding Increases Population Evenness in a Synthetic Bacterial Consortium. *MSystems*, 4, 1–15. <https://doi.org/10.1128/msystems.00352-1>

Anexos



Anexo I

Figura AI.1: Cromatograma de monocultivos de AM crecidos en MML suplementado con la mezcla fluoreno+fenantreno a los 15 días de incubación, donde se observa la aparición de picos (indicados por las flechas negras) que no corresponden a los compuestos adicionados.

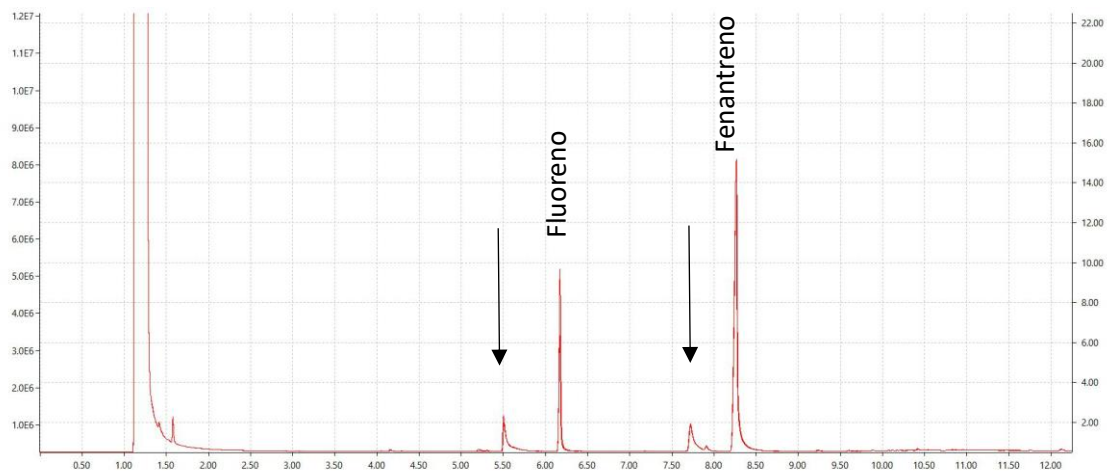


Figura A1.2: Nivel de expresión de genes claves regulados durante la degradación de fenantreno en el monocultivo de Bk incluyendo los valores de expresión a las 24 horas de incubación. Los valores son expresados como las veces que cambia la expresión, y representan los promedio \pm STD de triplicados independientes y tres réplicas de medida e indican el cambio en los niveles de mRNA de los genes estudiados en comparación con las condiciones de control (valor de 1)

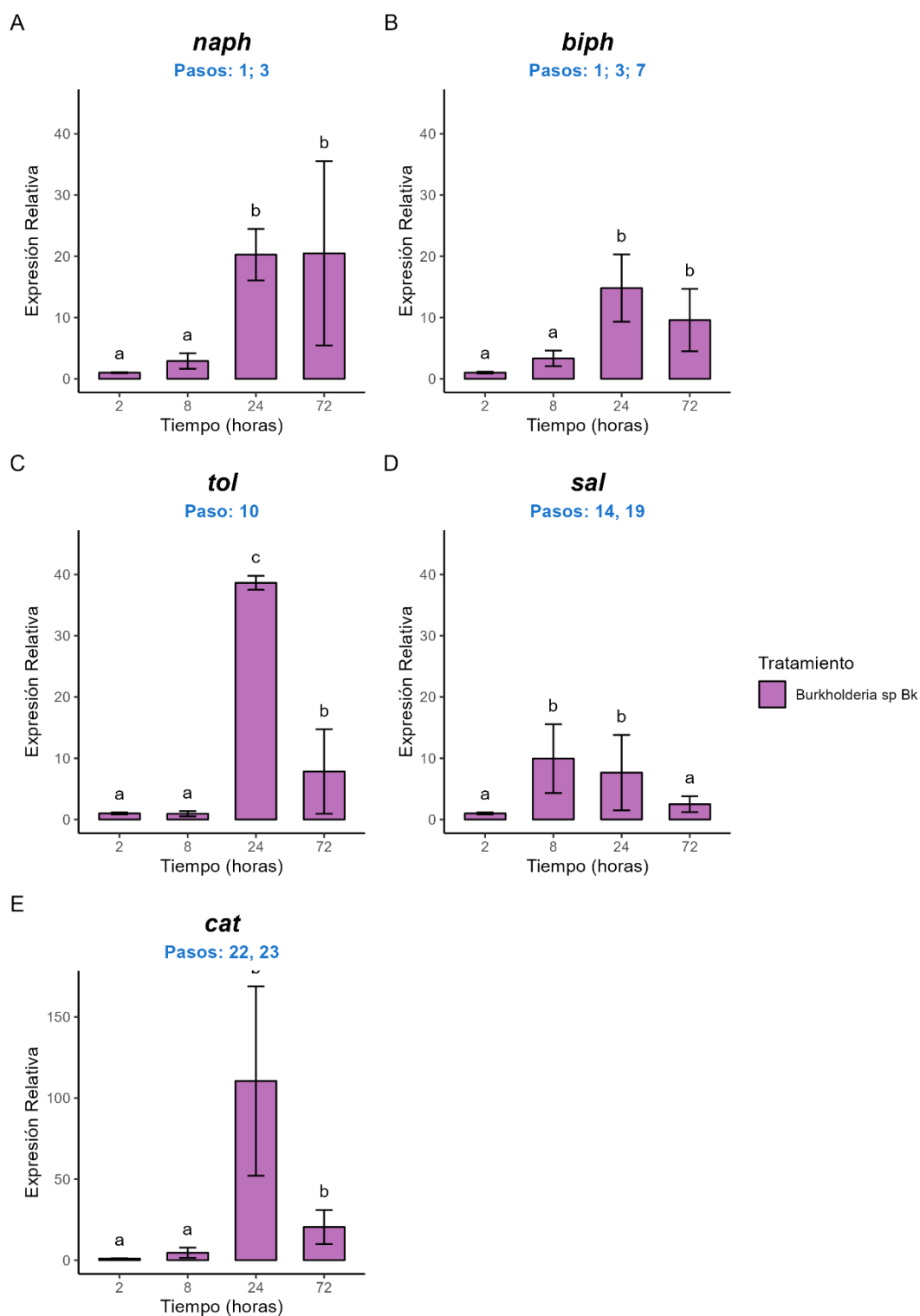


Figura AI.3: Porcentaje remanente de antraceno (A, C y E) y fenantreno (B, D y F) cuando se los suplementa como UFCE y en la mezcla, en los cultivos de las cepas AM, Bk y el cocultivo AM-Bk durante 15 días de incubación. Se muestran los valores promedio de los triplicados con sus respectivos desvíos estándar.

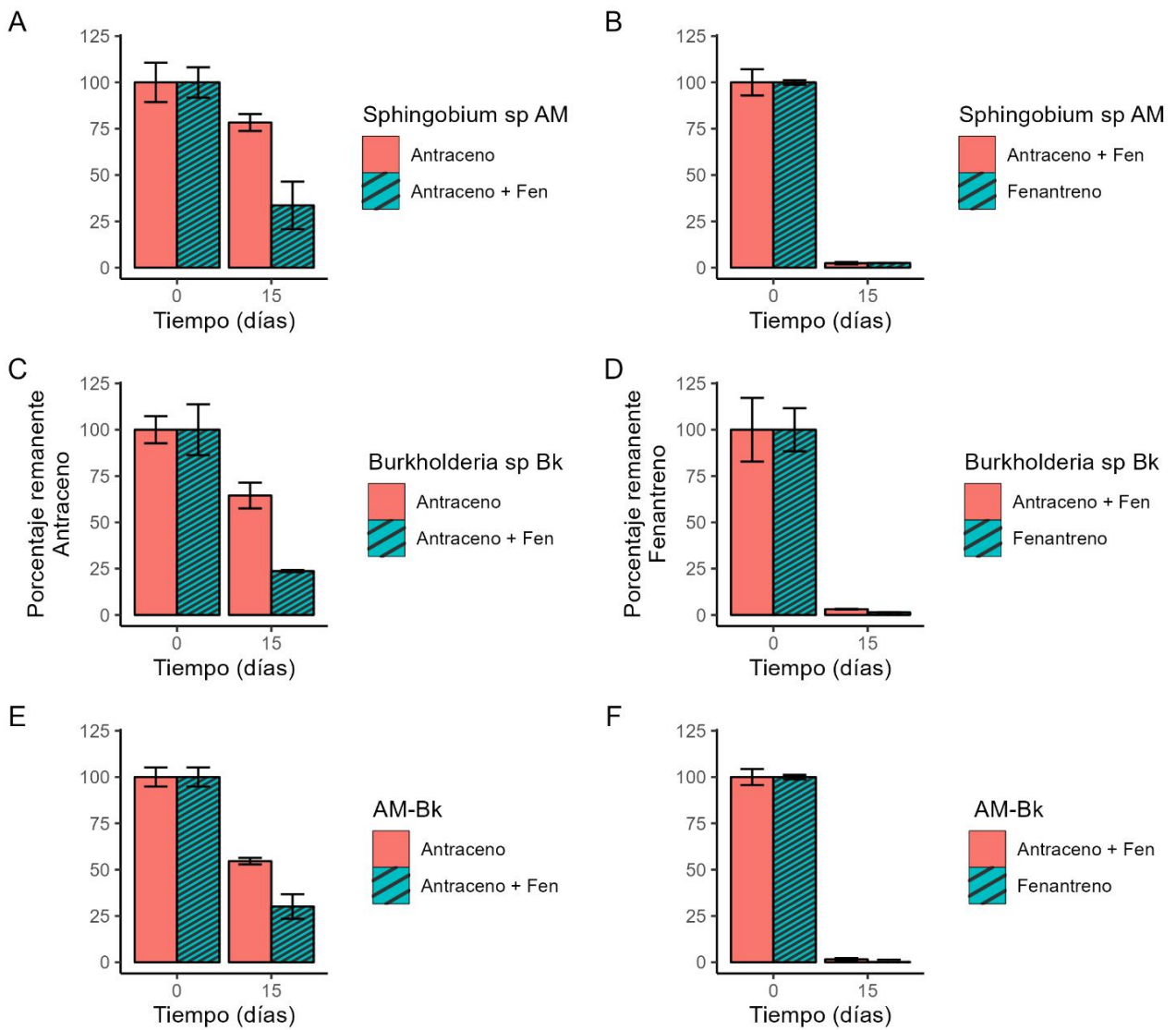


Figura AI.4: Recuento diferencial en placas de R2A delCs AM-Bk en MML suplementado con 100 mg/l de antraceno (líneas continuas) y mezcla de 100 mg/l de antraceno y 200 mg/l de fenantreno (línea punteada) durante 15 días de incubación. Se grafican los valores promedio y los desvíos estándar de los duplicados biológicos.

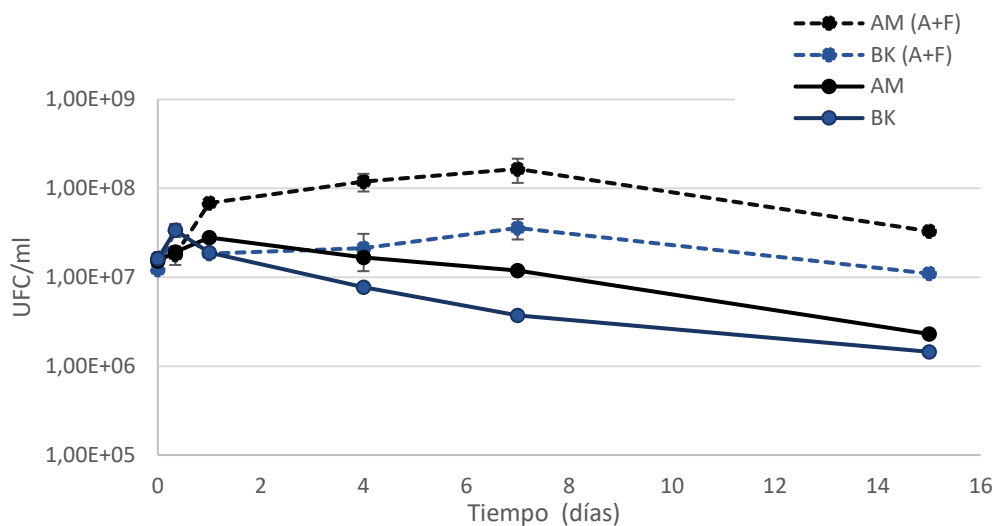


Figura AI.5: Porcentaje remanente de pireno (A) y fenantreno (B) cuando se los suplementa cuando se los suplementa como en la mezcla, en los cultivos de las cepas AM y el cocultivo AM-Bk durante 15 días de incubación. Se muestran los valores promedio de los triplicados con sus respectivos desvíos estándar.

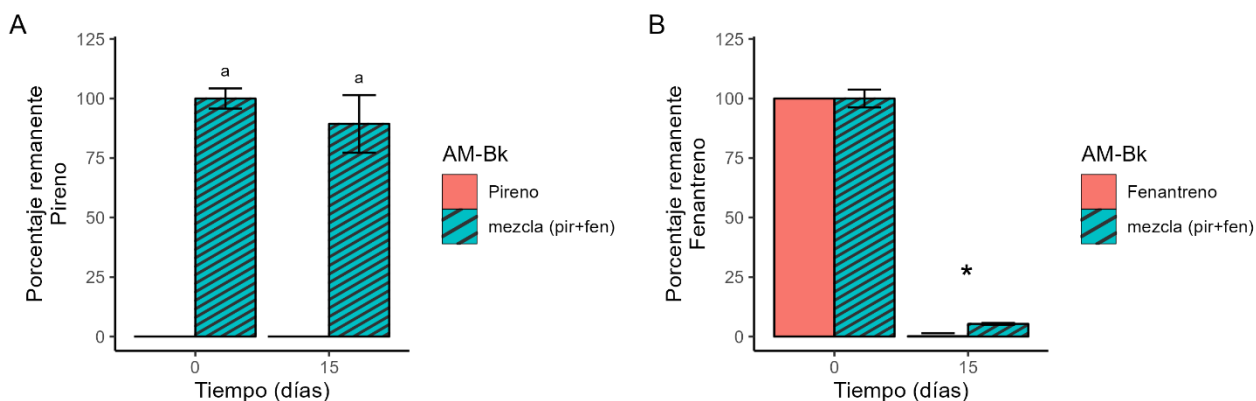


Figura AI.6: Recuento diferencial en placas de R2A del Cs AM-Bk en MML suplementado con 100 mg/l de pireno (líneas continuas) y mezcla de 100 mg/l de pireno y 200 mg/l de fenantreno durante 15 días (líneas punteadas) de incubación. Se grafican los valores promedio y los desvíos estándar de las 2 réplicas biológicas.

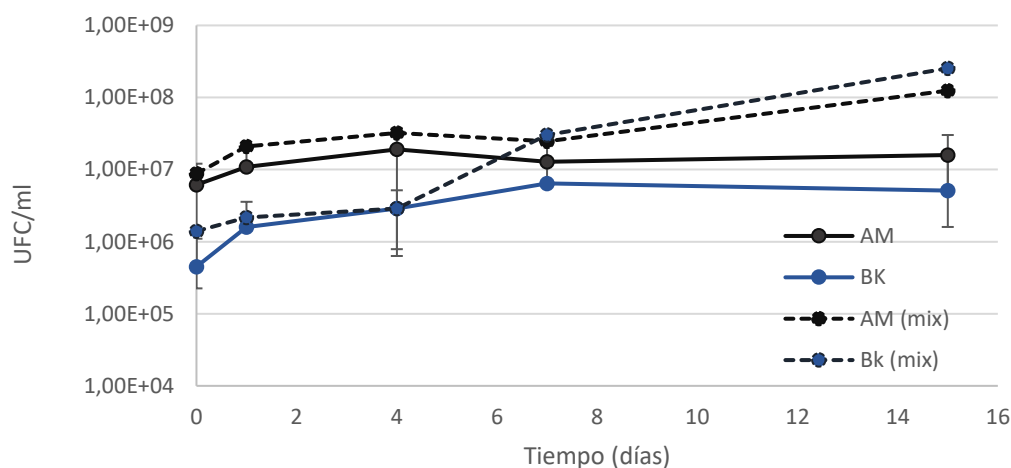


Tabla AI.1: Proteínas de la cepa *Sphingobium* sp AM diferencialmente expresadas en el cocultivo AM-Bk en comparación al monocultivo de la cepa AM durante degradación de fenantreno a las 72 horas de incubación. Se muestra el promedio del foldchange de los triplicados de cada sistema

<i>Sphingobium</i> sp. AM		
Protein Name	Accession number- NCBI	fold-change
Xenobiotic Biodegradation and Metabolism		
alkene reductase	KXU30967.1	1,37
benzene 1,2-dioxygenase	KXU30457.1	1,18
4-oxalocrotonate decarboxylase	KXU30445.1	1,88
2-hydroxy-6-oxo-6-phenylhexa-2,4-dienoate hydrolase	KXU30062.1	2,18
4-hydroxy-2-oxovalerate aldolase	KXU30446.1	1,12
anthranilate 1,2-dioxygenase	KXU30454.1	1,98
haloperoxidase	KXU30540.1	1,62
aldolase	KXU30430.1	1,55
oxidoreductase / 4-cresol dehydrogenase	KXU30469.1	1,89
Carbohydrate Metabolism		
malate dehydrogenase	KXU30729.1	1,36
aldehyde dehydrogenase	KXU30518.1	1,26
succinate--CoA ligase subunit alpha	KXU30728.1	2,11
phosphoglycerate kinase	KXU32515.1	2,18
Energy Metabolism		
FOF1 ATP synthase subunit gamma	KXU29630.1	1,47
ETC complex I subunit	KXU29743.1	1,63
Translation		
30S ribosomal protein S18	KXU32077.1	2,13

trigger factor	KXU30769.1	1,59
ribonuclease	KXU32371.1	-1,44
isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase	KXU32302.1	-1,30
Cellular Stress		
glutathione S-transferase	KXU30453.1	1,70
thiol:disulfide oxidoreductase	KXU32110.1	1,12
glutathione peroxidase	KXU32454.1	1,25
Phyllosphere-induced regulator PhyR	KXU32484.1	1,38
phage shock protein PspA	KXU32744.1	2,19
co-chaperone YbbN	KXU29975.1	1,46
copper resistance protein CopC	KXU31207.1	1,79
copper resistance protein CopC	KXU33463.1	2,20
exodeoxyribonuclease III	KXU31586.1	1,43
ATP-dependent chaperone ClpB	KXU32858.1	-1,19
Aminoacid Metabolism		
acetylglutamate kinase	KXU30278.1	1,14
acetolactate synthase small subunit	KXU32951.1	1,25
pyrroline-5-carboxylate reductase	KXU31786.1	1,80
trifunctional transcriptional regulator/proline dehydrogenase/L-glutamate gamma-semialdehyde dehydrogenase	KXU29470.1	-4,40
Transporters		
efflux transporter periplasmic adaptor subunit	KXU29878.1	2,40
efflux transporter periplasmic adaptor subunit	KXU30088.1	1,42
Metabolism of Cofactors and Vitamins		
pyridoxine 5'-phosphate synthase	KXU30295.1	1,18
NAD(P)H:quinone oxidoreductase	KXU32046.1	1,39
Iron Metabolism		
bacterioferritin	KXU30691.1	2,30
Cell Cycle		
histidine phosphotransferase	KXU30760.1	1,94
Unclassified		
oxidoreductase	KXU32266.1	2,08
hypothetical protein AXW74_01365	KXU33610.1	1,60
hypothetical protein AXW74_00325	KXU33768.1	1,15
hypothetical protein AXW74_22915	KXU29437.1	2,53
hypothetical protein AXW74_00530	KXU33808.1	-1,16

Tabla AI.2: Proteínas de la cepa AM cuya expresión fue observada en una sola condición (ya sea el cocultivo AM-Bk o el monocultivo de la cepa AM) durante degradación de fenantreno a las 72 horas de incubación.

Proteínas de AM observadas únicamente en los cultivos de CS AM-Bk		
Aminoacid Metabolism		
cysteine synthase [Sphingobium sp. AM]		KXU31626.1
Proteínas de AM observadas únicamente en los monocultivos de AM		
Transcription		
DEAD/DEAH box helicase [Sphingobium sp. AM]		KXU30904.1
Cellular stress		
peroxidase [Sphingobium sp. AM]		KXU31240.1
Fatty acid metabolism		
acetyl-CoA carboxylase carboxyltransferase subunit alpha [Sphingobium sp. AM]		KXU30696.1
Transporters		
ABC transporter ATP-binding protein [Sphingobium sp. AM]		KXU30162.1

Tabla AI.3: Proteínas de la cepa *Burkholderia* sp Bk diferencialmente expresadas en el cocultivo AM-Bk en comparación al monocultivo de la cepa Bk durante degradación de fenantreno a las 72 horas de incubación. Se muestra el promedio del foldchange de los triplicados de cada sistema.

<i>Burkholderia</i> sp. BK		
Protein Name	Accession number- NCBI	Fold change
<i>Xenobiotic Biodegradation and Metabolism</i>		
hydratase	OWJ56571.1	1,95
alpha/beta hydrolase	OWJ62986.1	1,64
NADP(H)-dependent aldo-keto reductase	OWJ60237.1	2,08
catechol 2,3-dioxygenase	OWJ56357.1	2,15
(2Fe-2S)-binding protein	OWJ56336.1	2,12
acetaldehyde dehydrogenase (acetylating)	OWJ61070.1	1,72
aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase subunit beta	OWJ56327.1	3,73
3-oxoadipyl-CoA thiolase	OWJ61198.1	1,20
aldolase	OWJ56339.1	3,76
2-keto-4-pentenoate hydratase	OWJ61072.1	5,33
4-oxalocrotonate decarboxylase	OWJ61071.1	5,14
aldehyde dehydrogenase	OWJ56323.1	4,01
hypothetical protein BWU74_31040	OWJ56335.1	4,31
biphenyl-2,3-diol 1,2-dioxygenase	OWJ56344.1	2,89
aldehyde dehydrogenase family protein	OWJ57697.1	-1,58
<i>Carbohydrate Metabolism</i>		
dihydroxyacetone kinase subunit DhAK	OWJ57141.1	2,06
phosphoglycerate mutase	OWJ63020.1	5,34
class II aldolase/adducin family protein	OWJ61961.1	1,67
fructose-bisphosphatase class I	OWJ59189.1	2,59
bifunctional D-altronate/D-mannonate dehydratase	OWJ61184.1	3,82
isocitrate dehydrogenase (NADP(+))	OWJ58913.1	2,48
acetate--CoA ligase	OWJ59802.1	-1,03
pyruvate oxidase	OWJ59284.1	-1,75
<i>Energy Metabolism</i>		
cytochrome c oxidase subunit II	OWJ63336.1	1,30
FOF1 ATP synthase subunit B	OWJ57555.1	2,13
<i>Carbohydrates Biosynthesis</i>		
alpha-1,4-glucan--maltose-1-phosphate maltosyltransferase	OWJ56795.1	-4,35
<i>Translation</i>		
preprotein translocase subunit YajC	OWJ63507.1	1,68
[cytidine(C)-cytidine(C)-adenosine (A)]-adding enzyme	OWJ56399.1	2,98
30S ribosomal protein S1	OWJ59246.1	1,24
50S ribosomal protein L16	OWJ56906.1	2,72
30S ribosomal protein S9	OWJ58484.1	2,50
50S ribosomal protein L15	OWJ56917.1	1,94
50S ribosomal protein L11	OWJ55972.1	1,12
50S ribosomal protein L1	OWJ55973.1	1,92
elongation factor G	OWJ56004.1	1,72
50S ribosomal protein L30	OWJ57040.1	3,32
aspartyl/glutamyl-tRNA amidotransferase subunit A	OWJ57736.1	1,19
50S ribosomal protein L33	OWJ59111.1	3,90

trigger factor	OWJ60122.1	2,28
H-NS histone	OWJ57795.1	6,00
ribonuclease E/G	OWJ62377.1	-1,01
DNA-directed RNA polymerase subunit beta	OWJ55976.1	-2,81
alanine--tRNA ligase	OWJ62463.1	-1,44
Cellular Stress		
transposase	OWJ56945.1	1,60
DNA starvation/stationary phase protection protein	OWJ63190.1	1,06
peroxiredoxin	OWJ61569.1	2,15
Fertility inhibition FinO-like protein	OWJ60700.1	1,21
polyisoprenoid-binding protein	OWJ61284.1	6,51
organic hydroperoxide resistance protein	OWJ56783.1	1,92
nucleotide exchange factor GrpE	OWJ63506.1	3,36
exodeoxyribonuclease III	OWJ58150.1	2,55
FMN-dependent NADH-azoreductase	OWJ57026.1	4,80
Nucleotid Metabolism		
NADP-dependent 3-hydroxy acid dehydrogenase	OWJ63145.1	1,89
Zn-dependent hydrolase	OWJ60603.1	-2,85
phosphoribosylformylglycinamide cyclo-ligase	OWJ63156.1	-1,06
Environmental Information Processing		
two-component system response regulator	OWJ57723.1	3,85
transcriptional regulator	OWJ62876.1	1,95
Aminoacid Metabolism		
RidA family protein	OWJ63256.1	1,36
succinylglutamate desuccinylase	OWJ61179.1	1,12
3-methylcrotonyl-CoA carboxylase	OWJ61903.1	1,98
3-keto-5-aminohexanoate cleavage protein	OWJ60369.1	3,56
NAD-dependent succinate-semialdehyde dehydrogenase	OWJ59895.1	2,81
3-(cis-5,6-dihydroxycyclohexa-1,3-dien-1-yl)propanoate dehydrogenase	OWJ56326.1	3,42
hypothetical protein BWU74_31035 (choline dehydrogenase)	OWJ56334.1	6,21
dihydrolipoyl dehydrogenase	OWJ60520.1	-1,28
acyl-CoA dehydrogenase	OWJ61976.1	-2,38
NAD-glutamate dehydrogenase	OWJ62164.1	-4,13
tryptophan synthase subunit beta	OWJ56811.1	1,28
histidinol dehydrogenase	OWJ56974.1	2,21
4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate reductase	OWJ58511.1	2,30
anthranilate synthase component I	OWJ57031.1	1,66
aspartate 4-decarboxylase	OWJ63125.1	1,21
methionine adenosyltransferase	OWJ57760.1	1,61
low-specificity L-threonine aldolase	OWJ58269.1	1,98
cystathionine beta-lyase	OWJ60154.1	2,46
succinyl-diaminopimelate desuccinylase	OWJ60752.1	3,18
dihydrodipicolinate synthase family protein	OWJ61754.1	3,97
dihydrodipicolinate synthase family protein	OWJ56330.1	3,50
acetolactate synthase small subunit	OWJ62559.1	-1,19
argininosuccinate synthase >> este nombre es mezcla de español e ingles?	OWJ58355.1	-1,16
Transporters		
ABC transporter substrate-binding protein	OWJ61663.1	2,12
metal ABC transporter substrate-binding protein	OWJ63323.1	1,86
sugar ABC transporter	OWJ62205.1	1,75
aminoacid ABC transporter	OWJ57892.1	2,56
metal ABC transporter substrate-binding protein	OWJ59258.1	2,45
carbohydrate ABC transporter substrate-binding protein	OWJ62924.1	1,14
sulfate transporter subunit	OWJ60229.1	2,19
ABC transporter substrate-binding protein	OWJ60343.1	1,79

thiosulfate transporter subunit	OWJ63418.1	1,11
branched-chain amino acid ABC transporter substrate-binding protein	OWJ61825.1	2,03
D-xylose ABC transporter substrate-binding protein	OWJ58976.1	2,77
amino acid ABC transporter substrate-binding protein	OWJ58492.1	-1,96
sugar ABC transporter substrate-binding protein	OWJ62209.1	-2,95
Metabolism of Cofactors and Vitamins		
molybdopterin adenylyltransferase	OWJ62346.1	3,83
methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase	OWJ61862.1	1,30
dihydropteroate synthase	OWJ62434.1	2,81
methenyltetrahydromethanopterin cyclohydrolase	OWJ61971.1	1,17
LPS Biosynthesis and Outer Membrane Stability		
3-deoxy-8-phosphooctulonate synthase	OWJ60498.1	1,54
UDP-3-O-(3-hydroxymyristoyl)glucosamine N-acyltransferase	OWJ60389.1	1,59
phosphomannomutase/phosphoglucomutase	OWJ63004.1	1,30
UDP-N-acetylglucosamine diphosphorylase/glucosamine-1-phosphate N-acetyltransferase	OWJ56404.1	1,06
NlpB/DapX lipoprotein domain protein /bamC	OWJ60590.1	2,26
outer membrane protein assembly factor BamB	OWJ60478.1	3,02
peptidoglycan-associated lipoprotein	OWJ63151.1	3,26
Peptidoglycan Biosynthesis		
UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase	OWJ57047.1	-2,40
Fatty acids metabolism		
oxidoreductase	OWJ60701.1	1,83
acetyl-CoA carboxylase carboxyl transferase subunit alpha	OWJ60449.1	1,62
beta-ketoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase II	OWJ62391.1	2,11
oxidoreductase	OWJ60321.1	2,33
NAD(P)-dependent oxidoreductase	OWJ56852.1	2,35
acyl-CoA dehydrogenase	OWJ63410.1	-2,85
Glyoxylate cycle		
bifunctional glyoxylate/hydroxypyruvate reductase B	OWJ56588.1	2,18
hydroxypyruvate isomerase	OWJ61196.1	2,29
Quorum sensing		
response regulator	OWJ57306.1	1,74
Virulence Factors		
polyketide cyclase	OWJ62224.1	3,66
Hcp1 family type VI secretion system effector	OWJ57950.1	3,36
polysaccharide deacetylase	OWJ56854.1	2,08
Iron Metabolism		
porphobilinogen synthase	OWJ56928.1	2,34
TonB-dependent siderophore receptor	OWJ59615.1	1,33
glutamate-1-semialdehyde-2,1-aminomutase	OWJ59169.1	2,87
ATP--cob(I)alamin adenosyltransferase	OWJ56324.1	4,87
Motility		
flagellar motor protein MotB	OWJ57956.1	4,39
flagellin	OWJ57514.1	-2,31
Cellular Cycle		
septum site-determining protein MinD	OWJ62907.1	-1,59
Unclassified		
LLM class flavin-dependent oxidoreductase	OWJ56342.1	3,30
2-aminoethylphosphonate aminotransferase	OWJ58158.1	2,61
cupin	OWJ57093.1	2,93
disulfide bond formation protein DsbA	OWJ63400.1	2,84
carbonic anhydrase	OWJ61947.1	2,97

Tabla AI.4: Proteínas de la cepa Bk cuya expresión fue observada en una sola condición (ya sea el cocultivo AM-Bk o el monocultivo de la cepa Bk) durante degradación de fenantreno a las 72 horas de incubación.

Proteínas de Bk observadas únicamente en CS AM-Bk	
Motility	
methyl-accepting chemotaxis protein [Burkholderia sp. Bk]	OWJ56685.1
Proteínas de Bk observadas únicamente en el monocultivo de Bk	
Xenobiotic metabolism	
catechol 1,2-dioxygenase [Burkholderia sp. Bk]	OWJ59967.1
(2Fe-2S)-binding protein [Burkholderia sp. Bk]	OWJ56343.1
1,6-dihydroxycyclohexa-2,4-diene-1-carboxylate dehydrogenase [Burkholderia sp. Bk]	OWJ59963.1
Carbohydrate Metabolism	
2-methylcitrate dehydratase [Burkholderia sp. Bk]	OWJ56714.1
Translation	
23S rRNA pseudouridylate synthase B [Burkholderia sp. Bk]	OWJ59750.1
50S ribosomal protein L31 [Burkholderia sp. Bk]	OWJ60184.1
peptidylprolyl isomerase [Burkholderia sp. Bk]	OWJ60461.1
LPS Biosynthesis and Outer Membrane Stability	
glycosyltransferase [Burkholderia sp. Bk]	OWJ60203.1
3-deoxy-manno-octulosonate cytidyltransferase [Burkholderia sp. Bk]	OWJ58348.1
Aminoacid Metabolism	
glutamate synthase [Burkholderia sp. Bk]	OWJ56947.1
cytosine deaminase [Burkholderia sp. Bk]	OWJ60529.1
hypothetical protein BWU74_02270 [Burkholderia sp. Bk]	OWJ63233.1
Cellular stress	
copper resistance protein CopC [Burkholderia sp. Bk]	OWJ57235.1
Unclassified	
oxidoreductase [Burkholderia sp. Bk]	OWJ62976.1

Anexos



Anexo II

Tabla AII.1: índice de cobertura de Good para las muestras analizadas de los microcosmos con suelo SP a los 0, 15 y 58 días de incubación.

Muestra	índice de Good
d:0 SP Ct A	1,00
d:0 SP Ct B	1,00
d:0 SP Ct C	1,00
d:15 SP Ct A	1,00
d:15 SP Ct B	1,00
d:15 SP Ct C	1,00
d:15 SP+PAH A	1,00
d:15 SP+PAH B	1,00
d:15 SP+PAH C	1,00
d:15 SP Cs AM-Bk A	1,00
d:15 SP Cs AM-Bk B	1,00
d:15 SP Cs AM-Bk C	1,00
d:15 SP Cs-1 A	1,00
d:15 SP Cs-1 B	1,00
d:15 SP Cs-1 C	1,00
d:15 SP Cs-4 A	1,00
d:15 SP Cs-4 B	1,00
d:15 SP Cs-4 C	1,00
d:58 SP Ct A	1,00
d:58 SP Ct B	1,00
d:58 SP Ct C	1,00
d:58 SP+PAH A	1,00
d:58 SP+PAH B	1,00
d:58 SP+PAH C	1,00
d:58 SP Cs AM-Bk A	1,00
d:58 SP Cs AM-Bk B	1,00
d:58 SP Cs AM-Bk C	1,00
d:58 SP Cs-1 A	1,00
d:58 SP Cs-1 B	1,00
d:58 SP Cs-1 C	1,00
d:58 SP Cs-4 A	1,00
d:58 SP Cs-4 B	1,00
d:58 SP Cs-4 C	1,00

Tabla AII.2: Abundancia relativa de los filos identificados para las muestras analizadas de los microcosmos con suelo SP a los 0, 15 y 58 días de incubación.

<https://docs.google.com/spreadsheets/d/15tagmFNMfJMMHSazCdZ1lpie1UUeJ8Hy/edit#gid=526592239>

Tabla AII.3: Abundancia relativa de los órdenes identificados para las muestras analizadas de los microcosmos con suelo SP a los 0, 15 y 58 días de incubación.

<https://docs.google.com/spreadsheets/d/1mp0j7vvhdedkC3fnoAD5pQOEpOTQepVi/edit#gid=2010698123>

Tabla AII.4: Abundancia relativa de los géneros identificados para las muestras analizadas de los microcosmos con suelo SP a los 0, 15 y 58 días de incubación.

<https://docs.google.com/spreadsheets/d/1rWfsg5Hbh3kYVL0DiUkBIApGPBP9hf-x/edit#gid=1521532374>

Tabla AII.5: Resultados obtenidos a partir de comparaciones múltiples por pares ANCOM-BC2 controlando el mdFDR. El resultado contiene: 1) log fold change, 2) errores estándar, 3) estadísticos de prueba, 4) p-valores, 5) p-valores ajustados, 6) indicadores de si el taxón es diferencialmente abundante (VERDADERO) o no (FALSO).

https://docs.google.com/spreadsheets/d/1yTXJ2N6MF5AX5_vHo74ANwWYeGGrbk9H/edit#gid=51434595

Tabla AII.6: valores de NSTI por muestras obtenidos a partir de la predicción de PICRUSt2

Muestra	NSTI
d:0 SP Ct A	0,25
d:0 SP Ct B	0,24
d:0 SP Ct C	0,13
d:15 SP Ct A	0,25
d:15 SP Ct B	0,25
d:15 SP Ct C	0,23
d:15 SP+PAH A	0,22
d:15 SP+PAH B	0,23
d:15 SP+PAH C	0,21
d:15 SP Cs AM-Bk A	0,21
d:15 SP Cs AM-Bk B	0,19
d:15 SP Cs AM-Bk C	0,21
d:15 SP Cs-1 A	0,19
d:15 SP Cs-1 B	0,17
d:15 SP Cs-1 C	0,17
d:15 SP Cs-4 A	0,18
d:15 SP Cs-4 B	0,20
d:15 SP Cs-4 C	0,21
d:58 SP Ct A	0,25
d:58 SP Ct B	0,25

d:58 SP Ct C	0,25
d:58 SP+PAH A	0,20
d:58 SP+PAH B	0,19
d:58 SP+PAH C	0,22
d:58 SP Cs AM-Bk A	0,20
d:58 SP Cs AM-Bk B	0,23
d:58 SP Cs AM-Bk C	0,24
d:58 SP Cs-1 A	0,22
d:58 SP Cs-1 B	0,22
d:58 SP Cs-1 C	0,22
d:58 SP Cs-4 A	0,23
d:58 SP Cs-4 B	0,18
d:58 SP Cs-4 C	0,22

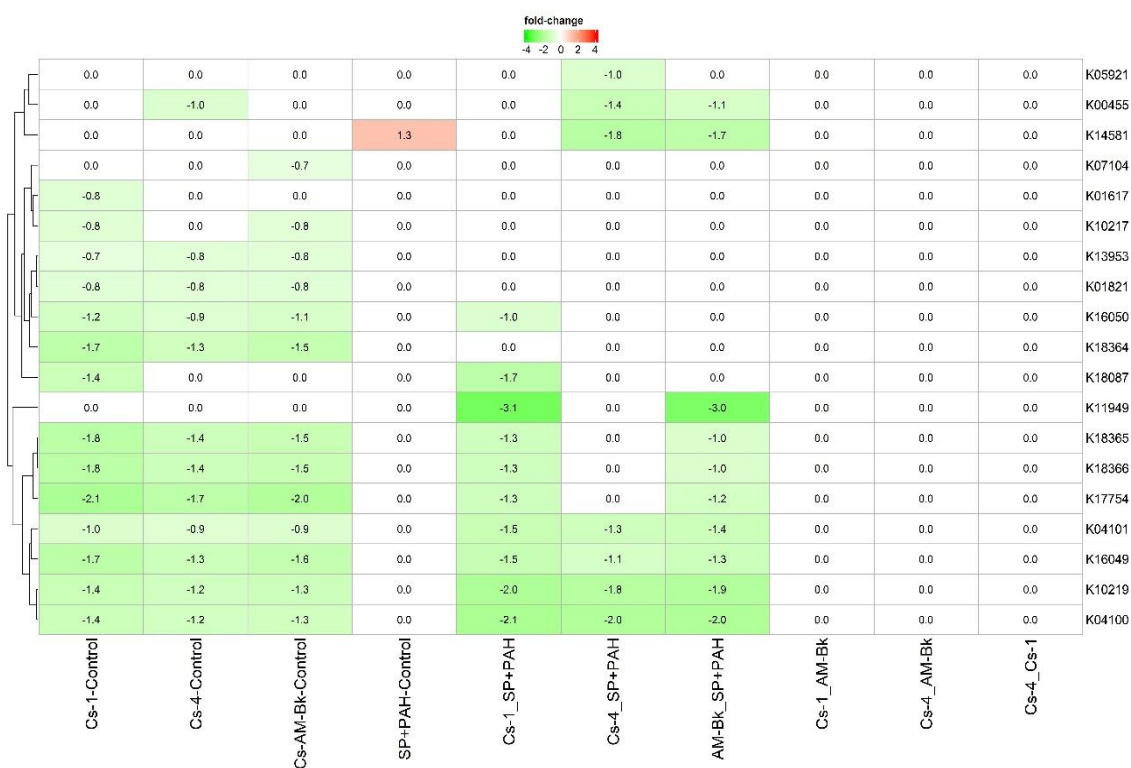
Tabla AII.7: KO predichos a partir de la diversidad taxonómica determinados por PICRUST2 y vinculados a la degradación de compuestos aromáticos, que mostraron diferencias significativas en la comparación de al menos 2 tratamientos a los 15 días de incubación.

KO	Gen	Nombre de la enzima
K00055		aryl-alcohol dehydrogenase [EC:1.1.1.90]
K00141	xylC	benzaldehyde dehydrogenase (NAD) [EC:1.2.1.28]
K00151	hpaE	5-carboxymethyl-2-hydroxymuconic-semialdehyde dehydrogenase [EC:1.2.1.60]
K00217		maleylacetate reductase [EC:1.3.1.32]
K00446	dmpB	catechol 2,3-dioxygenase [EC:1.13.11.2]
K00455	hpaD	3,4-dihydroxyphenylacetate 2,3-dioxygenase [EC:1.13.11.15]
K00480		salicylate hydroxylase [EC:1.14.13.1]
K00481	pobA	p-hydroxybenzoate 3-monooxygenase [EC:1.14.13.2]
K00483	hpaB	4-hydroxyphenylacetate 3-monooxygenase [EC:1.14.14.9]
K00484	hpaC	flavin reductase (NADH) [EC:1.5.1.36]
K00529	hcaD	3-phenylpropionate/trans-cinnamate dioxygenase ferredoxin reductase component [EC:1.18.1.3]
K04100	ligA	protocatechuate 4,5-dioxygenase, alpha chain [EC:1.13.11.8]
K04101	ligB	protocatechuate 4,5-dioxygenase, beta chain [EC:1.13.11.8]
K04102	pht5	4,5-dihydroxyphthalate decarboxylase [EC:4.1.1.55]
K01055	pcaD	3-oxoadipate enol-lactonase [EC:3.1.1.24]
K01617	dmpH	2-oxo-3-hexenedioate decarboxylase [EC:4.1.1.77]
K01666	mhpE	4-hydroxy 2-oxovalerate aldolase [EC:4.1.3.39]
K01826	hpaF	5-carboxymethyl-2-hydroxymuconate isomerase [EC:5.3.3.10]
K01856	catB	muconate cycloisomerase [EC:5.5.1.1]
K01857	pcaB	3-carboxy-cis,cis-muconate cycloisomerase [EC:5.5.1.2]
K02554	mhpD	2-keto-4-pentenoate hydratase [EC:4.2.1.80]
K03381	catA	catechol 1,2-dioxygenase [EC:1.13.11.1]
K03464	catC	muconolactone D-isomerase [EC:5.3.3.4]
K04073	mhpF	acetaldehyde dehydrogenase [EC:1.2.1.10]
K04109	hcrB	4-hydroxybenzoyl-CoA reductase subunit beta [EC:1.1.7.1]
K05549	benA-xylX	benzoate/toluato 1,2-dioxygenase subunit alpha [EC:1.14.12.10 1.14.12.-]

K05550	benB-xylY	benzoate/toluato 1,2-dioxygenase subunit beta [EC:1.14.12.10 1.14.12.-]
K05708	hcaE	3-phenylpropionate/trans-cinnamate dioxygenase subunit alpha [EC:1.14.12.19]
K05709	hcaF	3-phenylpropionate/trans-cinnamate dioxygenase subunit beta [EC:1.14.12.19]
K05711	hcaB	2,3-dihydroxy-2,3-dihydrophenylpropionate dehydrogenase [EC:1.3.1.87]
K05712	mhpA	3-(3-hydroxy-phenyl)propionate hydroxylase [EC:1.14.13.127]
K05713	mhpB	2,3-dihydroxyphenylpropionate 1,2-dioxygenase [EC:1.13.11.16]
K05714	mhpC	2-hydroxy-6-oxonona-2,4-dienedioate hidrolase [EC:3.7.1.14]
K05783	benD-xylL	dihydroxyciclohexadiene carboxylate dehydrogenase [EC:1.3.1.25 1.3.1.-]
K05784	benC-xylZ	benzoate/toluato 1,2-dioxygenase reductase component [EC:1.18.1.-]
K05921	hpaG	5-oxopent-3-ene-1,2,5-tricarboxylate decarboxylase / 2-hydroxyhepta-2,4-diene-1,7-dioate isomerase [EC:4.1.1.68 5.3.3.-]
K07535	badH	2-hidroxiciclohexanecarboxil-CoA dehydrogenase [EC:1.1.1.-]
K07536	badI	2-ketociclohexanecarboxil-CoA hidrolase [EC:3.1.2.-]
K07546	bbsH	(E)-benzylidenesuccinil-CoA hidratase [EC:4.2.1.180]
K10217	dmpC	aminomuconate-semialdehide/2-hidroxiomuconate-6-semialdehide dehydrogenase [EC:1.2.1.32 1.2.1.85]
K10219	ligC	2-hidroxi-4-carboximuconate semialdehide hemiacetal dehydrogenase [EC:1.1.1.312]
K10621	cmtC	2,3-dihidroxi-p-cumate/2,3-dihidroxiobenzoate 3,4-dioxygenase [EC:1.13.11.-1.13.11.14]
K10622	cmtD	HCOMODA/2-hidroxi-3-carboxi-muconic semialdehide decarboxylase [EC:4.1.1.-]
K10676	tfdB	2,4-diclorofenol 6-monooxygenase [EC:1.14.13.20]
K10701	apc	acetofenone carboxylase [EC:6.4.1.8]
K11949	phdJ	4-(2-carboxifenil)-2-oxobut-3-enoate aldolase [EC:4.1.2.34]
K14519	aldH	NADP-dependente aldehide dehydrogenase [EC:1.2.1.4]
K14578	nahAb	naphthalene 1,2-dioxygenase ferredoxin component
K14581	nahAa	naphthalene 1,2-dioxygenase ferredoxin reductase component [EC:1.18.1.7]
K14727	pcaL	3-oxoadipate enol-lactonase / 4-carboximuconolactone decarboxylase [EC:3.1.1.24 4.1.1.44]
K15752	carAc	carbazole 1,9a-dioxygenase ferredoxin component
K15760	tmoA	toluene monooxygenase system protein A [EC:1.14.13.236 1.14.13.-]
K15761	tmoB	toluene monooxygenase system protein B [EC:1.14.13.236 1.14.13.-]
K15762	tmoC	toluene monooxygenase system ferredoxin subunit
K15763	tmoD	toluene monooxygenase system protein D [EC:1.14.13.236 1.14.13.-]
K15764	tmoE	toluene monooxygenase system protein E [EC:1.14.13.236 1.14.13.-]
K15765	tmoF	toluene monooxygenase electron transfer component [EC:1.18.1.3]
K16049	hsaC	3,4-dihidroxi-9,10-secoandrosta-1,3,5(10)-triene-9,17-dione 4,5-dioxygenase [EC:1.13.11.25]
K16050	hsaD	4,5:9,10-diseco-3-hidroxi-5,9,17-trioxoandrosta-1(10),2-diene-4-oate hidrolase [EC:3.7.1.17]
K16242	dmpN	fenol/toluene 2-monooxygenase (NADH) P3/A3 [EC:1.14.13.244 1.14.13.243]
K16243	dmpL	fenol/toluene 2-monooxygenase (NADH) P1/A1 [EC:1.14.13.244 1.14.13.243]
K16244	dmpM	fenol/toluene 2-monooxygenase (NADH) P2/A2 [EC:1.14.13.244 1.14.13.243]
K16245	dmpO	fenol/toluene 2-monooxygenase (NADH) P4/A4 [EC:1.14.13.244 1.14.13.243]
K16246	dmpP	fenol/toluene 2-monooxygenase (NADH) P5/A5 [EC:1.14.13.244 1.14.13.243]
K16249	dmpK	fenol/toluene 2-monooxygenase (NADH) P0/A0
K17754	cpnA	ciclopentanol dehydrogenase [EC:1.1.1.163]
K18067	pht4	ftalato 4,5-cis-dihidrodiol dehydrogenase [EC:1.3.1.64]
K18068	pht3	ftalato 4,5-dioxygenase [EC:1.14.12.7]

K18069	pht2	phthalate 4,5-dioxygenase reductase component [EC:1.18.1.-]
K18087	bphAc	biphenyl 2,3-dioxygenase ferredoxin component
K18364	bphH	2-oxopent-4-enoate/cis-2-oxohex-4-enoate hydratase [EC:4.2.1.80 4.2.1.132]
K18365	bphI	4-hydroxy-2-oxovalerate/4-hydroxy-2-oxohexanoate aldolase [EC:4.1.3.39 4.1.3.43]
K18366	bphJ	acetaldehyde/propanal dehydrogenase [EC:1.2.1.10 1.2.1.87]

Figura AII.1: Heatmap donde se muestran los KO diferencialmente abundantes a los 58 días de incubación, obtenidos a partir del análisis de ANCOM-BC ($p < 0.05$, método de ajuste holm, comparaciones múltiples con test direccional con control mdFDR por método de holm). La intensidad del color refleja la magnitud del logaritmo del fold change (lfc). Cada columna indica el par comparado, donde en segundo lugar se indica la condición de referencia para la comparación



Anexo III

Tabla AIII.1: Abundancias relativas de los géneros bacterianos identificados en los microcosmos inoculados con ^{13}C AM-Bk y ^{12}C AM-Bk en el suelo SP durante 30 días de incubación.

https://docs.google.com/spreadsheets/d/1CjcdUYYG4uxzGRvCdvpySlvTKZkyJe3y/edit?usp=drive_web&oid=111017510757184152561&rtpof=true

Tabla AIII.2: Abundancias relativas de los géneros eucariotas identificados en los microcosmos inoculados con ^{13}C AM-Bk y ^{12}C AM-Bk en el suelo SP durante 30 días de incubación.

https://docs.google.com/spreadsheets/d/1WKTuSevc--tQjDFdq0wKx1HHHyL4HTJn/edit?usp=drive_web&oid=111017510757184152561&rtpof=true

Tabla AIII.3: Abundancias relativas de los géneros bacterianos identificados en los microcosmos inoculados con ^{13}C AM-Bk y ^{12}C AM-Bk en el suelo IPK durante 15 días de incubación.

https://docs.google.com/spreadsheets/d/1Q0mlrhKwcrK6shzpR3hIKJjQZdrKnJJ/edit?usp=drive_web&oid=111017510757184152561&rtpof=true

Tabla AIII.4: Abundancias relativas de los géneros eucariotas identificados en los microcosmos inoculados con ^{13}C AM-Bk y ^{12}C AM-Bk en el suelo IPK durante 15 días de incubación.

https://docs.google.com/spreadsheets/d/1wMxwWJOV6WglxuVRI5E_O7ldvwR6N-PW/edit#gid=1305127969

Tabla AIII.5: Valor promedio de EF para los géneros bacterianos enriquecidos en al menos un tiempo de muestreo en los microcosmos de suelo SP inoculados con CS AM-Bk.

Categoría Funcional					EF			
Phylum	Class	Order	Family	Genus	0	7	15	30
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	<i>Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia</i>	0,423	0,075	0,177	0,091
Methylomirabilota	Methylomirabilia	Rokubacteriales	Rokubacteriales	<i>Rokubacteriales</i>	-0,305	-0,223	-0,217	0,041
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Rhodanobacteraceae	<i>Rhodanobacter</i>	-0,660	-0,460	-0,492	0,087
Gemmatimonadota	Gemmatimonadetes	Gemmatimonadales	Gemmatimonadaceae	<i>Gemmatimonadaceae</i>	-0,287	-0,048	-0,174	0,002
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	<i>Lysobacter</i>	-0,562	-0,635	0,022	0,028
Acidobacteriota	Blastocatellia	Pyrinomonadales	Pyrinomonadaceae	<i>RB41</i>	-0,312	-0,387	-0,127	0,047
Actinobacteriota	Actinobacteria	Corynebacteriales	Mycobacteriaceae	<i>Mycobacterium</i>	-0,666	-0,053	-0,187	0,094
Gemmatimonadota	Gemmatimonadetes	Gemmatimonadales	Gemmatimonadaceae	<i>Gemmatimonas</i>	-0,280	0,146	-0,255	0,025
Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Chitinophagaceae	<i>Chitinophagaceae</i>	-0,592	-0,064	0,173	0,012
Acidobacteriota	Vicinamibacteria	Vicinamibacteriales	Vicinamibacteraceae	<i>Vicinamibacteraceae</i>	-0,239	-0,192	-0,188	0,025
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	-0,698	0,142	-0,002	-0,028
Acidobacteriota	Acidobacteriae	Solibacterales	Solibacteraceae	<i>Candidatus_Solibacter</i>	-0,462	-0,369	-0,220	0,033
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Methyloligellaceae	<i>Methyloligellaceae</i>	-0,569	-0,347	-0,276	0,109
Acidobacteriota	Vicinamibacteria	Vicinamibacteriales	Vicinamibacteriales	<i>Vicinamibacteriales</i>	-0,407	-0,227	-0,245	-0,078
Chloroflexi	Ktedonobacteria	Ktedonobacteriales	JG30-KF-AS9	<i>JG30-KF-AS9</i>	-0,177	-0,097	-0,196	0,027
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	<i>Sphingobium</i>	0,467	0,095	0,153	0,054
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Xanthobacteraceae	<i>Xanthobacteraceae</i>	-0,338	-0,232	-0,191	0,037
Acidobacteriota	Holophagae	Subgroup_7	Subgroup_7	<i>Subgroup_7</i>	-0,300	-0,373	-0,274	0,057
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Xanthobacteraceae	<i>Bradyrhizobium</i>	-0,301	-0,182	-0,172	0,023
Acidobacteriota	Acidobacteriae	Subgroup_2	Subgroup_2	<i>Subgroup_2</i>	-0,378	-0,144	-0,123	0,072
Verrucomicrobiota	Verrucomicrobiae	Chthoniobacteriales	Chthoniobacteraceae	<i>Candidatus_Udaeobacter</i>	-0,344	-0,195	-0,140	0,113
Chloroflexi	TK10	TK10	TK10	<i>TK10</i>	-0,469	-0,266	-0,441	0,058
Actinobacteriota	Thermoleophilia	Gaiellales	Gaiellales	<i>Gaiellales</i>	-0,361	-0,184	-0,247	0,032
Verrucomicrobiota	Verrucomicrobiae	Pedosphaerales	Pedosphaeraceae	<i>ADurb.Bin063-1</i>	-0,611	-0,715	0,012	0,022
Acidobacteriota	Acidobacteriae	Acidobacteriales	Acidobacteriales	<i>Acidobacteriales</i>	-0,363	-0,197	-0,130	0,018
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	<i>Sphingomonas</i>	-0,343	-0,133	-0,179	0,117
Actinobacteriota	Actinobacteria	Frankiales	Acidothermaceae	<i>Acidothermus</i>	-0,144	-0,158	-0,291	-0,046

Tabla AIII.6: Valor promedio de EF para los géneros eucariotas enriquecidos en al menos un tiempo de muestreo en los microcosmos de suelo SP inoculados con CS AM-Bk.

Categoría taxonómica					EF			
Phylum	Class	Order	Family	Genus	0	7	15	30
Amoebozoa	Discosea	Longamoebia	Centramoebida	<i>Acanthamoeba</i>	0,184	-0,283	-0,046	0,196
Opisthokonta	Holozoa	Metazoa_(Animalia)	Bdelloidea	<i>Adinetida</i>	-0,175	0,139	0,251	0,243
Eukaryota Kingdom	Rhizaria	Cercozoa	Thaumatomonadidae	<i>Allas</i>	-0,147	0,419	0,809	0,104
Opisthokonta	Nucleotmycea	Fungi	Archaeorhizomycetaceae	<i>Archaeorhizomyces</i>	-0,038	-0,009	-0,009	0,056
Opisthokonta	Nucleotmycea	Fungi	Pleosporaceae	<i>Bipolaris</i>	0,211	-0,034	-0,278	-0,095
Eukaryota Kingdom	Rhizaria	Cercozoa	Cercomonadidae	<i>Cercomonas</i>	0,074	-0,057	0,095	-0,069
Eukaryota Kingdom	Alveolata	Apicomplexa	Eugregarinorida	<i>D3P05A02</i>	-0,050	0,004	0,073	-0,055
Eukaryota Kingdom	Rhizaria	Cercozoa	Cercomonadidae	<i>Eocercomonas</i>	-0,167	-0,258	0,036	0,060
Amoebozoa	Gracilipodida	Filamoeba	Filamoeba_nolandii	<i>Filamoeba_nolandii</i>	0,042	-0,265	0,114	0,059
Amoebozoa	Gracilipodida	Filamoeba	Filamoeba_sp._I4_5E	<i>Filamoeba_sp._I4_5E</i>	0,555	0,129	0,286	0,085
Eukaryota Kingdom	Alveolata	Apicomplexa	Eugregarinorida	<i>Gregarina</i>	0,049	0,031	0,051	0,036
Opisthokonta	Nucleotmycea	Fungi	Hygrophoraceae	<i>Hygrocybe</i>	-0,169	0,191	-0,500	0,175
Eukaryota Kingdom	Alveolata	Ciliophora	Spirotrichea	<i>Hypotruchia</i>	-0,176	0,000	0,249	0,333
Eukaryota Kingdom	Rhizaria	Cercozoa	Incertae_Sedis	<i>Kraken</i>	0,076	-0,026	0,069	0,169
Opisthokonta	Nucleotmycea	Fungi	Cryptomycota	<i>LKM11</i>	0,073	0,163	0,303	-0,078
Opisthokonta	Nucleotmycea	Fungi	Malasseziaceae	<i>Malassezia</i>	-0,034	0,367	0,070	-0,119
Opisthokonta	Nucleotmycea	Fungi	Mortierellaceae	<i>Mortierella</i>	-0,016	-0,050	0,017	-0,031
Opisthokonta	Nucleotmycea	Nucleariidae_and_Fonticula_group	Nucleariidae	<i>Nuclearia</i>	0,000	0,000	0,000	0,032
Eukaryota Kingdom	Rhizaria	Cercozoa	Phytomyxea	<i>Polymyxa</i>	0,059	0,028	-0,046	0,134
Opisthokonta	Nucleotmycea	Fungi	Rhizophydiaceae	<i>Rhizophydium</i>	-0,106	0,035	-0,146	0,138
Eukaryota Kingdom	Rhizaria	Cercozoa	Phytomyxea	<i>Sorosphaerula</i>	0,026	-0,080	-0,071	0,252
Eukaryota Kingdom	Stramenopiles	Ochrophyta	Chromulinales	<i>Spumella</i>	0,176	0,171	-0,258	-0,048
Amoebozoa	Gracilipodida	Telaepoella	Telaepoella_tubasferens	<i>Telaepoella_tubasferens</i>	-0,368	0,258	0,237	0,124
Opisthokonta	Holozoa	Metazoa_(Animalia)	Chromadorea	<i>Tylenchida</i>	-0,018	-0,163	0,439	0,333
Opisthokonta	Nucleotmycea	Fungi	Agaricales	<i>uncultured</i>	0,417	-0,001	-0,167	-0,246

Anexo III

Eukaryota Kingdom	Rhizaria	Cercozoa	Cercomonadidae	<i>uncultured</i>	-0,603	0,095	-0,315	-0,301
Eukaryota Kingdom	Rhizaria	Cercozoa	Thecofilosea	<i>uncultured</i>	-0,186	0,274	0,156	0,112
Eukaryota Kingdom	Stramenopiles	Labyrinthulomycetes	Sorodiplophrys	<i>uncultured_Eimeriidae</i>	-0,013	0,003	0,125	-0,008
Amoebozoa	Gracilipodida	LEMD267	uncultured_eukaryote	<i>uncultured_eukaryote</i>	-0,197	-0,070	0,085	-0,060
Eukaryota Kingdom	Stramenopiles	Labyrinthulomycetes	Sorodiplophrys	<i>uncultured_eukaryote</i>	-0,139	0,402	0,181	-0,027
Opisthokonta	Aphelidea	uncultured	uncultured_fungus	<i>uncultured_fungus</i>	0,000	0,000	0,000	0,047
Amoebozoa	Tubulinea	Euamoebida	BOLA868	<i>uncultured_Hartmannellidae</i>	0,204	0,015	-0,053	-0,039

Tabla AIII.7: Valor promedio de EF para los géneros bacterianos enriquecidos en al menos un tiempo de muestreo en los microcosmos de suelo IPK inoculado con CS AM-Bk.

Categoría taxonómica					EF		
Phylum	Class	Order	Family	Genus	0	7	15
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	<i>Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia</i>	0,197	0,217	0,167
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	<i>Sphingobium</i>	0,244	0,151	0,149
Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Chitinophagaceae	<i>Edaphobaculum</i>	0,333	0,000	0,012
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	WN-HWB-116	WN-HWB-116	<i>WN-HWB-116</i>	-0,177	-0,144	0,031
Actinobacteriota	Thermoleophilia	Solirubrobacterales	67-14	<i>67-14</i>	-0,174	-0,271	0,051
Actinobacteriota	Actinobacteria	Micrococcales	Promicromonosporaceae	<i>Promicromonospora</i>	0,066	-0,140	-0,089

Tabla AIII.8: Valor promedio de EF para los géneros eucariotas enriquecidos en al menos un tiempo de muestreo en los microcosmos de suelo IPK inoculado con CS AM-Bk.

Categoría taxonómica					EF		
Phylum	Class	Order	Family	Genus	0	7	15
Eukaryota Kingdom	Alveolata	Apicomplexa	Eugregarinorida	<i>Gregarina</i>	0,136	-0,038	0,203
Opisthokonta	Holozoa	Metazoa_(Animalia)	Chromadorea	<i>Tylenchida</i>	0,014	-0,080	0,000
Eukaryota Kingdom	Alveolata	Ciliophora	Peritrichia	<i>Opisthnecta</i>	0,423	-0,360	-0,150
Eukaryota Kingdom	Stramenopiles	Ochrophyta	Incertae_Sedis	<i>Chlamydomyxa</i>	-0,035	0,176	0,001
Eukaryota Kingdom	Alveolata	Ciliophora	Colpodida	<i>Colpoda</i>	0,004	0,022	0,169
Eukaryota Kingdom	Stramenopiles	Ochrophyta	Chromulinales	<i>Spumella</i>	-0,227	0,241	-0,040
Amoebozoa	Myxogastria	Stemonitida	Stemonitidae	<i>Stemonitis</i>	0,009	0,121	-0,021
Amoebozoa	Myxogastria	Stemonitis	Hyperamoeba_sp._ATCC50750	<i>Hyperamoeba_sp._ATCC50750</i>	-0,077	0,037	0,018
Amoebozoa	Gracilipodida	Filamoeba	Filamoeba_sp._I4_5E	<i>Filamoeba_sp._I4_5E</i>	-0,046	0,037	-0,268
Opisthokonta	Nucleomycea	Fungi	Cunninghamellaceae	<i>Cunninghamella</i>	0,148	-0,049	0,039
Opisthokonta	Nucleomycea	Fungi	Aspergillaceae	<i>Penicillium</i>	0,013	0,008	0,018
Archaeplastida	Chloroplastida	Chlorophyta	Chlamydomonadales	<i>Lobochlamys</i>	-0,214	0,090	-0,088
Amoebozoa	Mycamoeba	Mycamoeba_gemmipara	Mycamoeba_gemmipara	<i>Mycamoeba_gemmipara</i>	0,015	-0,005	-0,129
Eukaryota Kingdom	Rhizaria	Cercozoa	Cercomonadidae	<i>Cercomonas</i>	0,004	-0,013	0,035
Eukaryota Kingdom	Alveolata	Apicomplexa	Eugregarinorida	<i>D3P05A02</i>	0,229	-0,024	-0,174
Amoebozoa	Discosea	Longamoebia	Centramoebida	<i>Balamuthia</i>	-0,006	-0,033	0,038
Opisthokonta	Nucleomycea	Fungi	Symportventuriaceae	<i>Fusicladium</i>	0,011	-0,025	-0,029

Categoria Funcional				
Phylum	Class	Order	Family	Genus
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia
Methylomirabilota	Methylomirabilia	Rokubacteriales	Rokubacteriales	Rokubacteriales
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Rhodanobacteraceae	Rhodanobacter
Gemmatimonadota	Gemmatimonadetes	Gemmatimonadales	Gemmatimonadaceae	Gemmatimonadaceae
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Lysobacter
Acidobacteriota	Blastocatellia	Pyrinomonadales	Pyrinomonadaceae	RB41
Actinobacteriota	Actinobacteria	Corynebacteriales	Mycobacteriaceae	Mycobacterium
Gemmatimonadota	Gemmatimonadetes	Gemmatimonadales	Gemmatimonadaceae	Gemmatimonas
Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Chitinophagaceae	Chitinophagaceae
Acidobacteriota	Vicinamibacteria	Vicinamibacterales	Vicinamibacteraceae	Vicinamibacteraceae
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus
Acidobacteriota	Acidobacteriae	Solibacterales	Solibacteraceae	Candidatus_Solibacter
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Methyloligellaceae	Methyloligellaceae
Acidobacteriota	Vicinamibacteria	Vicinamibacterales	Vicinamibacterales	Vicinamibacterales
Chloroflexi	Ktedonobacteria	Ktedonobacterales	JG30-KF-AS9	JG30-KF-AS9
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Sphingobium
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Xanthobacteraceae	Xanthobacteraceae
Acidobacteriota	Holophagae	Subgroup_7	Subgroup_7	Subgroup_7
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Xanthobacteraceae	Bradyrhizobium
Acidobacteriota	Acidobacteriae	Subgroup_2	Subgroup_2	Subgroup_2
Verrucomicrobiota	Verrucomicrobiae	Chthoniobacterales	Chthoniobacteraceae	Candidatus_Udaeobacter
Chloroflexi	TK10	TK10	TK10	TK10
Actinobacteriota	Thermoleophilia	Gaiellales	Gaiellales	Gaiellales
Verrucomicrobiota	Verrucomicrobiae	Pedosphaerales	Pedosphaeraceae	ADurb.Bin063-1
Acidobacteriota	Acidobacteriae	Acidobacteriales	Acidobacteriales	Acidobacteriales
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Sphingomonas
Actinobacteriota	Actinobacteria	Frankiales	Acidothermaceae	Acidothermus

