



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTOR EN BIOLOGÍA

“ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE BIODEGRADACIÓN
DE HIDROCARBUROS EN LOS SEDIMENTOS MARINOS
DE LA COSTA PATAGÓNICA”

MAGALÍ S. MARCOS

BAHÍA BLANCA

ARGENTINA

2012

Prefacio

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Biología, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia durante el período comprendido entre el 21 de Agosto de 2007 y el 14 de Septiembre de 2012, bajo la dirección de la Dra. Hebe M. Dionisi, Investigadora Independiente de CONICET, Centro Nacional Patagónico (CENPAT – CONICET), Puerto Madryn, Chubut.

Magalí S. Marcos



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el/....../.... , mereciendo la calificación de (.....).

A mis padres, a mis hermanas y a Seba.

“Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado.

Un esfuerzo total es una victoria completa.”

Mahatma Gandhi

Agradecimientos

La realización de esta Tesis no hubiera sido posible si no hubiera contado con la ayuda y contención de muchas personas que confiaron en mí y me acompañaron a lo largo de este proceso. Quisiera agradecerles a mis padres por haberme estimulado a seguir estudiando, por la confianza que depositaron en mí y por cada cariñoso llamado que me hizo sentir que las distancias eran más cortas de lo que parecía. A mis hermanas y amigas Naty y Edith, por estar presentes en cada etapa de este proceso y por ser para mí un ejemplo a seguir; y al dulce Juanchi porque con su sonrisa fue capaz de llenarme de ternura tanto en los momentos gratos así como en los más difíciles. Le agradezco de corazón a Seba Torres por su afecto, por divertirme con su gran sentido del humor, porque estuvo siempre dispuesto a escucharme y a aconsejarme, y por transitar con paciencia junto a mí la escritura de esta Tesis.

A mi directora, Hebe Dionisi, le agradezco por todos los conocimientos que me transmitió, por facilitarme los recursos necesarios para realizar esta Tesis y por la lectura y corrección del manuscrito. A Mariana Lozada, por las enseñanzas que me transmitió a lo largo de estos años. A ellas y a Lili Guibert y Clau Loviso por los cientos de horas de trabajo y mates compartidos. Agradezco sinceramente a todos mis compañeros del CENPAT, en especial quisiera destacar la gran ayuda de los integrantes del Laboratorio de Oceanografía y Contaminación de Aguas por permitirme utilizar sus equipos e instalaciones, por recolectar las muestras de Bahía Ushuaia y por su ayuda desinteresada en la realización de algunas técnicas de laboratorio. Entre ellos quisiera distinguir la gran colaboración de Marta Commendatore y Mónica Gil. Una mención especial merecen Miriam Solís, Oscar Frumento, Ricky Amoroso y Gaby Williams por brindarme información sobre los sitios de muestreo, José Luis Esteves, Horacio Ocariz, Luis Bala, Luciana Musmeci y Mónica Primost por la ayuda en la recolección de muestras, Marina Nievas por facilitarme el ADN del biorreactor y Walter Di Marzio por la medición de los HAPs en las muestras de sedimentos. Quisiera agradecer a Jorge Dignani por la asistencia y reparación de equipos del laboratorio y al Servicio Centralizado de Computación del CENPAT, principalmente a Fernando Jaguar, por su gran ayuda en solucionar inconvenientes de nuestras computadoras. A Ale Gatto, le agradezco por sus críticos comentarios acerca de la ecología de comunidades. A Pat Schloss le agradezco por despertar en mí el interés por la ecología microbiana y por su gran ayuda con el programa bioinformático mothur. Quisiera también agradecerle a Kurt Hanselmann por sus

enseñanzas, sus reconocimientos y sus consejos al momento de tomar decisiones en mi carrera académica. Agradezco a los jurados que evaluarán esta Tesis y a la Dra. María Amelia Cubitto, quien fue mi supervisora local en el Departamento de biología, bioquímica y farmacia (UNS).

Durante mi estadía en Puerto Madryn tuve la gran oportunidad de conocer a nuevos amigos y de reencontrarme con viejos amigos que conocí gracias a la biología. No tengo palabras para agradecer a Chechu Villanueva, por darme la confianza suficiente para poder hablar con total transparencia, a Norita Lisnizer y a Ale Gatto, por todos los valiosísimos consejos que me dieron, a Gabi Pintos, mi compañera en la búsqueda del *aiki*, a Lili Guibert y Clau Loviso por el gran compañerismo que me brindaron y a Jime Corio Tesei, Juanpi Pisoni, Agus Gómez Laich, Sole Leonardi, Lau Brandizi, Magda Trivellini, Gastón Trobbiani y Lukas Gómez Ríos por cada momento compartido. Muchas gracias!! Ustedes también son un pedacito de esta Tesis. Les agradezco enormemente a mis amigos de Bahía, quienes han estado presentes siempre a través de un llamado o un mail, principalmente a: Tele López Abbate, Fer Martínez, Wop País, Galle Rodríguez y Celi Zabaloy. No quisiera olvidarme de mencionar los mates de pasillo de Javi Klaich y Luis Bala, que hicieron que la etapa de trabajo en el laboratorio fuera muy divertida.

Por último, quisiera agradecer al CONICET por otorgarme las becas doctorales que permitieron financiar mis estudios, al CENPAT por brindarme el lugar de trabajo en donde desarrollé todas mis actividades, y al CONICET, la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica del MINCYT, la Secretaría de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva de Chubut, la Fundación Antorchas, a PADI Foundation y al Global Environmental Facility (GEF) por el financiamiento de los insumos y equipos que utilicé durante los ensayos de laboratorio.

Resumen

Los hidrocarburos constituyen una de las principales amenazas para el ecosistema costero de la Patagonia. A pesar de ello, aún existe un gran desconocimiento sobre cuáles son los microorganismos que poseen el potencial para degradar hidrocarburos en este ambiente. Esta Tesis fue desarrollada con el objetivo de incrementar nuestros conocimientos sobre las poblaciones bacterianas ecológicamente relevantes para la biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) en sedimentos costeros con un alto grado de exposición a la contaminación con estos compuestos. Para ello, se empleó un enfoque multidisciplinario que involucró la determinación de variables fisicoquímicas y ambientales de los sitios de estudio, como así también la aplicación de distintas herramientas moleculares independientes del cultivo de microorganismos, la mayoría de ellas diseñadas para este estudio.

La estructura y diversidad de las comunidades bacterianas que habitan los sedimentos intermareales contaminados con hidrocarburos de las zonas norte-centro y sur de Patagonia fue analizada en profundidad por medio de la pirosecuenciación de fragmentos del gen ARNr 16S bacterianos amplificados a partir de ADN purificado de los sedimentos. Este análisis nos permitió además estimar la diversidad y abundancia relativa de las poblaciones bacterianas de estos ambientes que podrían presentar el potencial para degradar hidrocarburos. Por otro lado, los genes que codifican enzimas dioxigenasas de HAPs, las cuales participan en el primer paso de la degradación aeróbica de estos compuestos, fueron utilizados como marcadores funcionales. La abundancia relativa de siete variantes de estos genes en sedimentos de las zonas norte-centro y sur de Patagonia se cuantificó por PCR cuantitativa (qPCR), lo cual nos permitió evaluar la relevancia ecológica de las poblaciones que llevan estos genes y su distribución biogeográfica. Los genes de oxigenasas B, C y D, variantes recientemente identificadas en sedimentos de Bahía Ushuaia, se encontraron en altas abundancias a lo largo de seis años de muestreo en los sedimentos subantárticos, sugiriendo que las bacterias que portan estos genes probablemente presenten un rol clave en la biodegradación de HAPs en este ambiente marino. Además, los genes *phnA1*, identificados en *Cycloclasticus* spp., se detectaron en nueve de las once muestras analizadas pertenecientes a dos regiones biogeográficas, y su abundancia se vio positivamente correlacionada con la concentración de fenantreno, HAPs de tres anillos y HAPs de bajo peso molecular. Estos resultados sugirieron que bacterias del género *Cycloclasticus* podrían presentar un rol importante en la

biodegradación de HAPs de bajo peso molecular en sedimentos de la costa Patagónica. Finalmente, se detectaron 14 variantes novedosas de genes de oxigenasas en los sedimentos de Bahía Ushuaia, utilizando cebadores diseñados en base a secuencias de genes de dioxigenasas de bacterias Gram-positivas.

Los resultados obtenidos en esta Tesis muestran la existencia de una diversidad de poblaciones bacterianas con capacidad para degradar HAPs en sedimentos de la costa Patagónica, en particular en sedimentos Subantárticos, y sugieren la existencia de genes de dioxigenasas aún no identificados. Se observaron importantes diferencias en las abundancias de dichas poblaciones microbianas, tanto en el tiempo como en el espacio.

Abstract

Hydrocarbons constitute one of the main threats to the coastal ecosystem of Patagonia. In spite of this, there is still great uncertainty about which local microorganisms have the potential to degrade hydrocarbons. The goal of this Thesis was to increase our knowledge about the bacterial populations that are ecologically relevant to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) biodegradation in coastal sediments that are highly exposed to hydrocarbon contamination. To reach this goal, a multidisciplinary approach involving the assessment of physicochemical and environmental variables from the study sites was used. In addition, different culture-independent molecular tools were applied, most of which were designed in this study.

On the one hand, the structure and diversity of the bacterial communities that inhabit hydrocarbon-contaminated intertidal sediments from North-central and South Patagonia were analyzed in depth by pyrosequencing bacterial 16S rRNA gene fragments. These fragments were previously amplified from DNA which was purified from sediment samples. In addition, this analysis allowed us to estimate the diversity and relative abundance of bacterial populations in these environments that are capable of degrading hydrocarbons. On the other hand, the genes encoding PAH-dioxygenase enzymes, which are involved in the first step of the aerobic degradation of these compounds, were used as functional markers. The relative abundance of seven variants of these genes in sediments from North-central and South Patagonia was quantified in this Thesis by quantitative PCR (qPCR). This allowed us to analyze the ecological relevance of populations carrying these genes and their biogeographical distribution. Oxygenase gene variants B, C and D, recently identified in sediments from Ushuaia Bay, were highly abundant during a six-year time span in these subantarctic sediments. This suggests that bacteria carrying these genes could play a key role in PAH biodegradation in this marine environment. Additionally, *phnA1* genes identified in *Cycloclasticus* spp. were detected in nine out of eleven samples from two biogeographic regions. Their abundance was found to be positively correlated with the concentration of phenanthrene, three-ring PAHs and low molecular weight PAHs. These results suggest that *Cycloclasticus* spp. could play an important role in low molecular weight-PAH biodegradation in coastal sediments from Patagonia. Finally, 14 novel oxygenase gene

variants were detected in coastal sediments from Ushuaia Bay, using a primer set designed targeting dioxygenase gene sequences from Gram-positive bacteria.

The results obtained in this Thesis show that coastal sediments from Patagonia, particularly from subantarctic sediments, hold a great diversity of bacterial populations capable of degrading PAHs, and suggest the existence of hitherto unidentified dioxygenase genes. Differences in time and space were observed in the abundances of these microbial populations.

Índice de Contenidos

Prefacio.....	i
Agradecimientos.....	iii
Resumen	v
Abstract	vii
Índice de Contenidos	ix
Índice de Figuras	xvi
Índice de Tablas.....	xx
Símbolos y Abreviaturas	xxii
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
1.1. La contaminación con hidrocarburos en los ambientes marinos.....	1
1.1.1. Fuentes de hidrocarburos en el medio ambiente marino	1
1.1.2. Composición del petróleo crudo	2
1.1.3. Los combustibles refinados del petróleo	3
1.1.4. Efectos de la contaminación con petróleo sobre el ecosistema marino	4
1.1.5. Sensibilidad de los ambientes costeros	5
1.1.6. Riesgo de contaminación con hidrocarburos en la costa Patagónica.....	7
1.1.7. Biorremediación de compuestos contaminantes.....	9
1.2. Biodegradación aeróbica de HAPs	11
1.2.1. ¿Qué son los HAPs?	11
1.2.2. Rutas degradativas de HAPs.....	12
1.2.3. Clasificación de los sistemas enzimáticos RHOs	13
1.3. Ecología de comunidades microbianas.....	15

1.3.1. Definición de comunidades microbianas	15
1.3.2. Propiedades de las comunidades.....	15
1.3.2.1. La riqueza de especies	15
1.3.2.2. La diversidad.....	17
1.3.2.3. La estructura	17
1.3.2.4. La función	18
1.3.3. Ecología y biorremediación	18
1.4. Herramientas de estudio de las comunidades microbianas.....	20
1.4.1. Técnicas dependientes e independientes del cultivo.....	20
1.4.2. Herramientas para el estudio de las propiedades estructurales de la comunidad	21
1.4.2.1. El gen ARN ribosomal.....	21
1.4.2.2. El método de pirosecuenciación	23
1.4.3. Herramientas para estudiar las propiedades funcionales de la comunidad.....	26
1.4.3.1.Los marcadores funcionales en ecología	26
1.4.3.2.Las bibliotecas de productos de amplificación	26
1.4.3.3.La PCR cuantitativa	28
1.5. Las poblaciones degradadoras de HAPs en sedimentos intermareales de la Patagonia	33
1.6. Objetivos.....	35
CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
2.1. Obtención de muestras de sedimentos intermareales	37
2.2. Análisis físicos, químicos y ambientales de los sedimentos	37
2.2.1. Posición geográfica precisa.....	38
2.2.2. Temperatura, pH y potencial de óxido reducción.....	38
2.2.3. Granulometría	38
2.2.4. Porcentaje de materia orgánica	38
2.2.5. Concentración de amonio total	39

2.2.6.	Concentración de hidrocarburos alifáticos.....	39
2.2.6.1.	Extracción y fraccionamiento de los hidrocarburos	39
2.2.6.2.	Determinación de hidrocarburos alifáticos por cromatografía gaseosa de alta resolución	40
2.2.7.	Concentración de HAPs.....	41
2.3.	Extracción de ADN	42
2.3.1.	Extracción de ADN metagenómico de muestras de sedimento	42
2.3.2.	Extracción de ADN plasmídico	42
2.3.2.1.	Método de extracción manual.....	42
2.3.2.2.	Método de extracción comercial.....	44
2.4.	Electroforesis en geles de agarosa	44
2.5.	Cuantificación de ADN	44
2.5.1.	Ensayo de cuantificación de ADN utilizando el colorante EvaGreen	44
2.5.2.	Ensayo de cuantificación de ADN utilizando el colorante Hoechst 33258.....	45
2.6.	Análisis de la estructura de la comunidad microbiana	45
2.6.1.	Amplificación y pirosecuenciación de la región V4 del gen ARNr 16S	45
2.6.2.	Análisis de las secuencias obtenidas por pirosecuenciación	47
2.6.2.1.	Análisis de calidad de las secuencias obtenidas	47
2.6.2.2.	Alineamiento y agrupamiento en OTUs de las secuencias.....	48
2.6.2.3.	Asignación taxonómica de los OTUs	48
2.6.2.4.	Diversidad alfa.....	49
2.6.2.5.	Diversidad beta	52
2.7.	Análisis de la abundancia de genes de dioxigenasas de HAPs en sedimentos.....	52
2.7.1.	Diseño de cebadores para los ensayos de qPCR.....	52
2.7.2.	Preparación de estándares para los ensayos de qPCR	54
2.7.3.	Optimización de los ensayos de qPCR	56

2.7.3.1. Optimización de ensayos utilizando una mezcla preparada en el laboratorio ..	56
2.7.3.2. Optimización de ensayos utilizando la mezcla comercial	58
2.7.4. Determinación de la especificidad de los fragmentos de genes amplificados	58
2.7.5. Determinación de la concentración óptima de templado y análisis de su efecto inhibitorio sobre las reacciones de qPCR	59
2.7.6. Análisis del ADN de muestras ambientales por qPCR.....	60
2.8. Identificación de genes de dioxigenasas de bacterias Gram-positivas en sedimentos intermareales	61
2.8.1. Diseño de cebadores	61
2.8.2. Amplificación de fragmentos de genes de dioxigenasas de bacterias Gram- positivas	62
2.8.3. Clonado de los productos de amplificación	62
2.8.4. Análisis filogenético de las secuencias	63
2.8.5. Análisis de diversidad de las bibliotecas	64
2.9. Análisis estadísticos y de ordenamiento	64
2.9.1. Análisis de comparación de medias	64
2.9.1.1. Análisis paramétricos.....	64
2.9.1.2. Análisis no paramétricos.....	65
2.9.2. Análisis no paramétricos de correlaciones.....	65
2.9.3. Análisis de ordenamiento multivariado y asociación entre variables biológicas y ambientales	65
2.9.3.1. Relación entre la estructura de las comunidades bacterianas obtenida por pirosecuenciación y la concentración de hidrocarburos en muestras de sedimentos.....	65
2.9.3.2. Relación entre la abundancia de genes de dioxigenasas medida por qPCR y las variables ambientales	66
2.10. Números de acceso a GenBank	67

CAPÍTULO 3. ESTRUCTURA Y DIVERSIDAD DE LAS COMUNIDADES BACTERIANAS DE SEDIMENTOS INTERMAREALES DE LA PATAGONIA.....	68
3.1. Introducción.....	68
3.2. Resultados.....	70
3.2.1. Sitios de estudio.....	70
3.2.1.1. Playa Fracasso.....	72
3.2.1.2. Caleta Córdova.....	74
3.2.1.3. Bahía Ushuaia.....	75
3.2.2. Muestreo y representatividad de los sedimentos.....	77
3.2.3. Concentración de HAPs en sedimentos intermareales de Patagonia.....	78
3.2.4. Purificación y cuantificación del ADN metagenómico de los sedimentos.....	80
3.2.5. Descripción de las comunidades bacterianas que habitan sedimentos intermareales de la Patagonia.....	83
3.2.5.1. Metadatos.....	84
3.2.5.2. Calidad del ADN metagenómico purificado de los sedimentos.....	92
3.2.5.3. Estructura de comunidades bacterianas en los sedimentos intermareales de Patagonia.....	94
3.2.5.4. Similitud en la estructura de las comunidades bacterianas de los sedimentos.....	96
3.2.5.5. Diversidad bacteriana en los sedimentos intermareales de Patagonia.....	99
3.2.6. Poblaciones bacterianas asociadas a la biodegradación de hidrocarburos en los sedimentos intermareales.....	101
3.3. Discusión.....	103
CAPÍTULO 4. DISEÑO Y OPTIMIZACIÓN DE ENSAYOS DE qPCR PARA LA CUANTIFICACIÓN DE GENES DE DIOXIGENASAS DE HAPs.....	111
4.1. Introducción.....	111
4.2. Resultados.....	113
4.2.1. Diseño de los cebadores y validación de los ensayos.....	113

4.2.2. Optimización de los ensayos de qPCR	117
4.2.2.1. Mezcla de amplificación combinada en el laboratorio	117
4.2.2.2. Mezcla de amplificación comercial	124
4.2.2.3. Comparación del funcionamiento de los ensayos optimizados para la utilización de la mezcla preparada en el laboratorio y de la mezcla comercial	126
4.2.3. Especificidad de los fragmentos amplificados.....	127
4.2.4. Optimización de las concentraciones de ADN templado	130
4.2.5. Evaluación de los parámetros de las curvas de estándares	131
4.3. Discusión	133
 CAPÍTULO 5. DIVERSIDAD, ABUNDANCIA Y DISTRIBUCIÓN BIOGEOGRÁFICA DE POBLACIONES BACTERIANAS DEGRADADORAS DE HAPs EN SEDIMENTOS INTERMAREALES DE PATAGONIA	
5.1. Introducción.....	140
5.2. Resultados.....	142
5.2.1. Abundancia del gen ARNr 16S en los sedimentos intermareales	142
5.2.2. Genes de dioxigenasas de HAPs en sedimentos intermareales del sur de Patagonia.....	144
5.2.2.1. Diversidad y abundancia de las variantes de genes de dioxigenasas.....	144
5.2.2.2. Relación entre la abundancia de genes de dioxigenasas de HAPs y las variables físico-químicas y ambientales.....	148
5.2.3. Abundancia de genes de dioxigenasas en sedimentos intermareales de la región norte-centro de la Patagonia	151
5.2.4. Importancia ecológica de bacterias conteniendo genes <i>phnA1</i> en las dos regiones biogeográficas estudiadas	152
5.3. Discusión	152

CAPÍTULO 6. DIVERSIDAD DE GENES DE DIOXIGENASAS ASOCIADOS A BACTERIAS GRAM-POSITIVAS DEGRADADORAS DE HAPs EN SEDIMENTOS INTERMAREALES DEL SUR DE PATAGONIA	161
6.1. Introducción.....	161
6.2. Resultados.....	163
6.2.1. Diseño y validación de cebadores para detectar genes de dioxigenasas de bacterias Gram-positivas.....	163
6.2.2. Construcción de bibliotecas de productos de amplificación.....	168
6.2.3. Análisis de las bibliotecas de productos de amplificación	170
6.2.3.1. Análisis de la función de las secuencias deducidas de aminoácidos	170
6.2.3.2. Diversidad de las bibliotecas de productos de amplificación	171
6.2.4. Análisis filogenético y clasificación de los fragmentos de genes de dioxigenasas	173
6.3. Discusión	182
CAPÍTULO 7. DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES	188
7.1. Discusión general.....	188
7.2. Conclusiones.....	195
Referencias Bibliográficas.....	197

Índice de Figuras

Figura 1.1. Atlas de sensibilidad ambiental de dos sitios de la costa Argentina con distintos niveles de sensibilidad	6
Figura 1.2. Cuencas petrolíferas productivas de Argentina	8
Figura 1.3. Estructura química de los 16 HAPs prioritarios según la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (U.S. EPA)	12
Figura 1.4. Paso inicial en la degradación aeróbica de HAPs, catalizada por el sistema enzimático multicomponente RHO (Figura modificada de [Ferraro et al., 2005]).....	13
Figura 1.5. Gen del ARNr 16S de <i>Escherichia coli</i> . Se identifican en la figura las regiones hipervariables del gen (V1 a V9)	23
Figura 1.6. El método de pirosecuenciación	25
Figura 1.7. Detección de fluorescencia en un sistema de PCR en tiempo real por el método de SYBR Green I	30
Figura 1.8. Curvas de desnaturalización	31
Figura 1.9. PCR en tiempo real de diluciones de estándares conteniendo un gen de interés.....	32
Figura 1.10. Relaciones filogenéticas entre secuencias deducidas de aminoácidos de variantes de genes de dioxigenasas de compuestos aromáticos identificados en Patagonia y secuencias relacionadas obtenidas de la base de datos de GenBank	34
Figura 3.1. Sitios de muestreo Playa Fracasso (PF), Caleta Córdova (CC) y Bahía Ushuaia (OR).....	71
Figura 3.2. Concentración de HAPs en muestras de sedimentos intermareales	79
Figura 3.3. Extracción de ADN metagenómico	82
Figura 3.4. Granulometría de las muestras de sedimentos intermareales de Chubut.....	87

Figura 3.5. Porcentaje de materia orgánica y concentración de NH ₄ ⁺ en sedimentos intermareales de Chubut	87
Figura 3.6. Perfiles cromatográficos de las muestras de sedimentos.....	91
Figura 3.7. Curvas de desnaturalización del ensayo de qPCR de genes ARNr 16S bacterianos en las muestras de sedimento	93
Figura 3.8. Estructura de las comunidades bacterianas de las muestras de sedimentos intermareales al nivel taxonómico de phylum.....	95
Figura 3.9. Estructura de las comunidades bacterianas de las muestras de sedimentos intermareales al nivel taxonómico de clase (se muestran sólo las clases de abundancia superior al 2%)	96
Figura 3.10. Similitud en la estructura de las comunidades bacterianas de sedimentos intermareales.....	98
Figura 3.11. Curvas de rarefacción de especies observadas, calculado a partir de OTUs definidos al 97% de identidad de secuencias.....	101
Figura 3.12. Abundancia relativa de familias bacterianas que comprenden organismos degradadores de hidrocarburos en los sedimentos intermareales.....	103
Figura 4.1. Secuencia consenso utilizada para diseñar los cebadores que permitieran cuantificar los genes de dioxigenasas de la variante C.....	114
Figura 4.2. Optimización de la temperatura de alineado de los cebadores del ensayo C	118
Figura 4.3. Curva de desnaturalización del ensayo C, donde se señala el pico de desnaturalización de las estructuras oligoméricas de cebadores	119
Figura 4.4. Optimización de la marca de enzima Taq polimerasa y su buffer de reacción en el ensayo de cuantificación de los genes A	120
Figura 4.5. Optimización de la concentración del ion magnesio para el ensayo de cuantificación de los genes C	121
Figura 4.6. Optimización de las concentraciones de cebadores del ensayo C.....	122
Figura 4.7. Optimización de la concentración de EvaGreen.....	123
Figura 4.8. Optimización de la concentración de enzima polimerasa para el ensayo de cuantificación del gen ARNr 16S de Bacteria.....	124

Figura 4.9. Optimización de la temperatura de alineado de los cebadores del ensayo de cuantificación de los genes C utilizando la mezcla de amplificación comercial	125
Figura 4.10. Comparación del funcionamiento del ensayo de cuantificación de los genes C al utilizar las dos mezclas de amplificación.....	127
Figura 4.11. Curvas de desnaturalización del ensayo diseñado para cuantificar los genes C.....	128
Figura 4.12. Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos amplificados con los cebadores <i>Cgroupf/Cgroupr</i>	129
Figura 4.13. Inhibición de la amplificación en ADN purificado de las muestras de sedimentos	131
Figura 4.14. Curvas de estándares de cuatro ensayos para cuantificar el gen ARNr 16S y curva universal obtenida a partir de las cuatro anteriores	132
Figura 5.1. Abundancia del gen ARNr 16S de Bacteria en sedimentos intermareales.....	144
Figura 5.2. Abundancia relativa de genes de dioxigenasas en sedimentos intermareales del sur (A), y norte-centro (B) de Patagonia (promedio de copias del gen/ μ g de ADN purificado de los sedimentos \pm DS).....	146
Figura 5.3. Potencial degradativo de los sedimentos intermareales de Bahía Ushuaia, estimado por medio de la suma de las abundancias relativas de todos los genes de dioxigenasas cuantificados en este estudio.....	148
Figura 5.4. Similitud entre muestras de sedimentos del sitio OR, basadas en la abundancia de las distintas variantes de genes de dioxigenasas (luego de transformar los datos calculando su raíz cuadrada).....	149
Figura 6.1. Alineamiento de secuencias de genes de dioxigenasas obtenidas de la base de datos de GenBank para el diseño de los cebadores NMR331f/NMR1134r.....	166
Figura 6.2. Fragmento del alineamiento de secuencias de genes de dioxigenasas utilizadas para el diseño de los cebadores RHO5f (A) y RHO1308r (B).....	167

Figura 6.3. Análisis de los patrones de restricción de secuencias de la biblioteca NMR-OR05 generados por digestión con la enzima <i>Hae</i> III (Promega, Madison, WI, Estados Unidos).....	169
Figura 6.4. Dendrograma mostrando las relaciones filogenéticas entre las secuencias deducidas de aminoácidos de las bibliotecas NMR-OR05 y NMR-OR07 y secuencias de enzimas dioxigenasas publicadas en la base de datos de GenBank	174
Figura 6.5. Alineamiento de secuencias mostrando el indel localizado en la posición 321 (de acuerdo a la enzima NidA, de <i>Mycobacterium vanbaalenii</i> PYR-1 [AAF75991])	177
Figura 6.6. Dendrograma resultante del alineamiento del fragmento correspondiente al indel localizado en la posición 321 (numeración de la enzima NidA de <i>Mycobacterium vanbaalenii</i> PYR-1 [AAF75991])	178
Figura 6.7. Alineamiento de secuencias de dioxigenasas mostrando el indel ubicado en la posición 146 (numeración correspondiente a la dioxigenasa BphA, de <i>Burkholderia xenovorans</i> LB400 [AAB63425])	179
Figura 7.1. Gráfico integrador de los principales resultados obtenidos en muestras de sedimentos de la zona norte-centro y sur de Patagonia	194

Índice de Tablas

Tabla 1.1. Productos refinados del petróleo (en orden decreciente de volatilidad).....	3
Tabla 1.2. Composición de algunos combustibles derivados del petróleo	4
Tabla 2.1. Cebadores utilizados para amplificar la región variable V4 del gen ARNr 16S... 46	
Tabla 2.2. Sitios de Internet utilizados para realizar el diseño de los ensayos de qPCR a partir de las secuencias obtenidas de las bibliotecas de productos de amplificación y genes relacionados depositados en las bases de datos.....	54
Tabla 2.3. Clones elegidos como estándares para los ensayos de qPCR.....	55
Tabla 2.4. Condiciones evaluadas durante la optimización del programa de amplificación de los ensayos de qPCR utilizando la mezcla combinada en el laboratorio.....	57
Tabla 3.1. Sitios y fechas de muestreo de sedimentos intermareales	72
Tabla 3.2. Concentración de ADN metagenómico purificado de las muestras de sedimentos intermareales de Patagonia	83
Tabla 3.3. Metadatos de las muestras de sedimentos medidos <i>in situ</i> durante el muestreo	85
Tabla 3.4. Concentración de hidrocarburos alifáticos (expresadas en µg/g PSS) e índices de biodegradación en las muestras de sedimentos intermareales.....	90
Tabla 3.5. Cuantificación del gen de ARNr 16S a partir de dos concentraciones de ADN metagenómico de cada muestra, a fin de evaluar la presencia de inhibición de la amplificación	93
Tabla 3.6. Diversidad bacteriana en muestras de sedimentos intermareales.....	100
Tabla 4.1. Cebadores diseñados para cuantificar genes de dioxigenasas de compuestos aromáticos y utilizados para cuantificar el gen de ARNr 16S de Bacteria en sedimentos intermareales de Patagonia	115
Tabla 4.2. Condiciones óptimas determinadas para los ensayos de qPCR.....	126

Tabla 5.1. Porcentaje que representan los genes de dioxigenasas relativos al gen ARNr 16S bacteriano	147
Tabla 5.2. Combinaciones de las variables ambientales (elegidas de a k variables por vez) que presentan la correlación más alta con la diversidad y abundancia de genes de dioxigenasas en sedimentos subantárticos (según el análisis BIO-ENV realizado con el programa PRIMER v6 [Clarke y Ainsworth, 1993]).....	150
Tabla 6.1. Cebadores diseñados para identificar genes de dioxigenasas de HAPs asociados a bacterias Gram-positivas presentes en los sedimentos marinos de Patagonia.....	165
Tabla 6.2. Comparación de las secuencias de las bibliotecas NMR-OR05 y NMR-OR07 con cuatro bases de datos: NCBI, COG, KEGG y GO	172
Tabla 6.3. Análisis de la diversidad de las bibliotecas de productos de amplificación NMR-OR05 y NMR-OR07	173
Tabla 6.4. Clasificación de las secuencias deducidas de aminoácidos de las variantes de genes detectados en los sedimentos subantárticos.....	181

Símbolos y Abreviaturas

°C	Grados centígrados
ADN	Ácido desoxirribonucleico
APM	alto peso molecular
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr	ARN ribosomal
ART	Alifáticos resueltos totales
AT	Hidrocarburos alifáticos totales
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BPM	bajo peso molecular
c-	Centi (10^{-2})
COG	<i>Clusters of orthologous groups</i>
Ct	<i>Cycle threshold</i> (ciclo umbral)
Da	Dalton
DGGE	<i>Denaturing gradients gel electrophoresis</i>
DMSO	Dimetil sulfóxido
dNTP	Deoxinucleótido trifosfato
DS	Desvío estándar
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
Fi	Fitano
g	Gramos
× g	Fuerza centrífuga
GC	Guanina y Citocina
GO	<i>The gene ontology</i>
h	Hora
HAPs	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
IUB/IUPAC	<i>International Union of Biochemistry/International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
kb	Kilopares de bases
kcal	Kilocalorías
KEGG	<i>Kyoto encyclopedia of genes and genomes</i>

k-	Kilo (10^3)
Km	Kanamicina
l	Litro
λ	Bacteriófago lambda
LB	Luria-Bertani
m	Metros
m-	Mili (10^{-3})
M	Molar
MCNR	Mezcla compleja no resuelta
MDS	<i>Multidimensional Scaling</i> (análisis de ordenamiento multivariado)
μ -	Micro (10^{-6})
min	Minutos
n-	Nano (10^{-9})
N	Normal
NCBI	<i>National Center for Biotechnological Information</i>
nt	Nucleótido
OTUs	<i>Operational Taxonomic Units</i> (unidades taxonómicas operativas)
pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (reacción en cadena de la polimerasa)
qPCR	PCR cuantitativa
Pr	Pristano
PSS	Peso seco de sedimentos
p/v	Peso en volumen
RDP	<i>Ribosomal Database Project</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RHO	<i>Ring-hydroxylating oxygenase</i> (oxigenasa de la hidroxilación del anillo aromático)
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos
SDS	Dodecilsulfato de sodio
STE	Solución de sodio/Tris/EDTA
TBE	Buffer de Tris/borato/EDTA
TE	Buffer de Tris/EDTA

T-RFLP	<i>Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
Tris	Tris-(hidroxietil)-aminometano
U	Unidades
ups	unidades prácticas de salinidad
v/v	Volumen en volumen

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1. LA CONTAMINACIÓN CON HIDROCARBUROS EN LOS AMBIENTES MARINOS

1.1.1. Fuentes de hidrocarburos en el medio ambiente marino

Se estima que aproximadamente 1,3 millones de toneladas de petróleo ingresan anualmente al medio ambiente marino, tanto a partir de filtraciones de origen natural (47%) como a partir de fuentes antropogénicas (53%) [Kvenvolden y Cooper, 2003; National Research Council of the National Academies, 2003]. Las filtraciones naturales ocurren cuando el petróleo crudo emana desde los estratos geológicos y contamina la columna de agua, mientras que las fuentes de origen antropogénico se encuentran principalmente asociadas a las actividades de extracción (3%), transporte (12%) y consumo (37%) de petróleo, y pueden ser tanto de petróleo crudo como de combustibles refinados [National Research Council of the National Academies, 2003]. Afortunadamente, los derrames importantes de petróleo crudo representan un porcentaje bajo del total de estos contaminantes que ingresan al océano (aproximadamente menos del 5%). Sin embargo, estos derrames se concentran en incidentes puntuales que liberan grandes volúmenes de petróleo, pudiendo ocasionar graves consecuencias para el ecosistema marino [Ornitz y Champ, 2002].

En los ambientes marino-costeros las principales fuentes de hidrocarburos incluyen a los vertidos urbanos e industriales, a las deposiciones atmosféricas y a los derrames o fugas que

se producen durante el transporte o la producción de combustibles fósiles [Latimer y Zheng, 2003]. Los sedimentos constituyen los principales reservorios de los hidrocarburos vertidos en el medio ambiente marino, dado que estos compuestos se adsorben a partículas de materia orgánica e inorgánica en suspensión por sus características fisicoquímicas [Nikolaou *et al.*, 2009; Harris *et al.*, 2011]. Desde allí, estos contaminantes pueden incorporarse a la red trófica o pueden ser fuente de contaminación de la columna de agua o de la atmósfera [Sabin *et al.*, 2010; Harris *et al.*, 2011].

1.1.2. Composición del petróleo crudo

El petróleo crudo es una mezcla compleja de compuestos orgánicos, en su mayoría hidrocarburos, cuya composición varía en función de la formación geológica de la región en donde se encuentra [Fingas, 2011a]. Los hidrocarburos más abundantes del petróleo son los **alifáticos**, que en promedio representan el 58% de la mezcla. Estos compuestos, también denominados saturados, pueden estar presentes en forma de cadenas lineales (denominados parafinas), ramificadas o formando estructuras cíclicas (cicloalcanos o naftenos) [Prince y Atlas, 2005]. Los hidrocarburos **aromáticos**, que constituyen en promedio el 28% del petróleo crudo, son los que siguen en abundancia y se caracterizan por presentar al menos un anillo bencénico. Existen compuestos monoaromáticos, como por ejemplo los compuestos volátiles BTEX (acrónimo de benceno, tolueno, etilbenceno y xileno) y los compuestos poliaromáticos, también denominados **hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs)**. Aproximadamente el 14% de las moléculas que constituyen el petróleo crudo son compuestos polares, que contienen átomos de nitrógeno, oxígeno y/o azufre [Prince y Atlas, 2005]. Los compuestos polares más pequeños son conocidos como **resinas**, y los de mayor peso molecular son denominados **asfaltenos** [National Research Council of the National Academies, 2003]. Finalmente, las olefinas o **insaturados** incluyen a los hidrocarburos alifáticos que presentan dobles enlaces (alquenos). Se encuentran raramente presentes en el petróleo crudo, aunque pueden ser moléculas muy abundantes en los productos refinados, como por ejemplo la gasolina [National Research Council of the National Academies, 2003; Prince y Atlas, 2005].

1.1.3. Los combustibles refinados del petróleo

La mayor parte del petróleo crudo es sometido a un proceso de refinado para obtener productos que puedan ser utilizados como combustibles, lubricantes o para ser usados en la industria petroquímica [Favenec y Pigeire, 2001]. Uno de los procesos llevados a cabo durante el refinado es la destilación fraccionada del petróleo crudo, en la cual los distintos componentes del petróleo se separan en fracciones utilizando sus distintos puntos de ebullición. Los principales productos que se pueden obtener por destilación del petróleo crudo se detallan en la Tabla 1.1 [Krishnamurthy *et al.*, 2007]. La proporción de los distintos hidrocarburos (saturados, aromáticos, resinas, asfaltenos, olefinas) también varía en los distintos derivados, y algunos ejemplos de ello se muestran en la Tabla 1.2.

Tabla 1.1. Productos refinados del petróleo (en orden decreciente de volatilidad)

Producto	Composición ^a	Uso
Gas natural	C ₁ – C ₄	Combustible doméstico e industrial
Éter de petróleo	C ₅ – C ₇	Solvente
Gasolina	C ₅ – C ₉	Combustible para autos
Nafta	C ₉ – C ₁₀	Solvente de pinturas, combustible para autos
Kerosene	C ₁₀ – C ₁₆	Combustible de aviones, estufas, gas de laboratorio
Diesel	C ₁₅ – C ₁₈	Combustible para autos, camiones y colectivos
Fuel oil	C ₁₇ – C ₃₀	Combustible para barcos e industrias
Lubricantes	C ₁₇ – C ₂₀	Lubricantes
Parafinas	C ₂₀ – C ₂₈	Fabricación de velas, betún
Asfalto	≥ C ₃₀	Construcción de rutas

^aLa composición de cada fracción se indica como la cantidad aproximada de átomos de carbono que contiene la mezcla. Tabla modificada de [Krishnamurthy *et al.*, 2007]

Tabla 1.2. Composición de algunos combustibles derivados del petróleo

Compuesto	Porcentaje			
	Gasolina	Diesel	FOI	Bunker C
Saturados	50 - 60	65 - 95	25 - 35	20 - 30
Aromáticos	25 - 40	5 - 25	40 - 60	30 - 50
Resinas		0 - 2	10 - 15	15 - 20
Asfaltenos			5 - 10	5 - 20
Olefinas	5 - 10	0 - 10		

FOI: Fuel oil intermedio, una mezcla fuel oil pesado con un bajo porcentaje de gasoil, utilizado como combustible en buques. Bunker C: un tipo de fuel oil muy viscoso utilizado como combustible en barcos. Datos obtenidos de [Fingas, 2011a]

1.1.4. Efectos de la contaminación con petróleo sobre el ecosistema marino

Los efectos de los hidrocarburos del petróleo sobre el medio ambiente marino pueden ser de tipo agudo o crónico. La **toxicidad aguda** es el resultado de la exposición a una alta concentración de los compuestos tóxicos durante un breve período, como por ejemplo la que ocurriría ante una situación de derrame [Philp *et al.*, 2005]. Los organismos con mayor riesgo de sufrir las consecuencias de una toxicidad aguda son las aves y los mamíferos marinos, quienes están frecuentemente en contacto con la superficie del mar, en donde se encuentran flotando los hidrocarburos [Peterson *et al.*, 2003]. Las plumas de las aves y el pelaje de los mamíferos empetroados ocasionan la pérdida de la capacidad de aislamiento, y la muerte puede ocurrir por hipotermia, asfixia, ahogo o ingestión de los hidrocarburos [Peterson *et al.*, 2003]. Por otra parte, las algas y los invertebrados bentónicos son los más afectados en aquellos casos en los cuales el petróleo impacta en las costas, los cuales pueden sufrir mortalidad masiva.

La **toxicidad crónica**, en cambio, ocurre como consecuencia de una exposición a bajas dosis de los contaminantes durante períodos prolongados. Sus efectos incluyen el retraso de la madurez sexual, la pérdida de la capacidad reproductiva, o el desarrollo de enfermedades como cáncer, disrupciones endócrinas, malformaciones y anomalías en el desarrollo de los individuos [Peterson *et al.*, 2003]. Además, pueden observarse efectos indirectos, como

por ejemplo la acumulación de los contaminantes a través de la cadena trófica o la pérdida de hábitats [Philp *et al.*, 2005]. En términos generales, los efectos tóxicos que se observen tanto a corto como a largo plazo dependerán no sólo de la concentración de los hidrocarburos, sino también de su composición y de los procesos de intemperización que hayan ocurrido luego del derrame [National Research Council of the National Academies, 2003].

1.1.5. Sensibilidad de los ambientes costeros

Distintos factores determinan el comportamiento de los hidrocarburos y el tipo de impacto que éstos tendrán en el ambiente costero, en función de: el tipo de costa, el grado de exposición a las olas y la energía de la marea, las condiciones ambientales, la cantidad y el tipo de los hidrocarburos derramados, la productividad biológica y sensibilidad ambiental, y la facilidad con que la costa puede ser limpiada sin causar mayores daños [Hayes *et al.*, 1992; O'Sullivan y Jacques, 2001]. El conocimiento de estos factores permite determinar cuáles son los ambientes costeros que serían afectados más seriamente ante una situación de derrame (que por lo tanto deberían recibir protección en forma prioritaria) y diseñar planes de contingencia apropiados para cada sitio [Gundlach y Hayes, 1978]. Parte de esta información suele estar recopilada en mapas o atlas de sensibilidad ambiental, los cuales constituyen una herramienta muy útil para el manejo exitoso y la protección de los recursos costeros (Figura 1.1, [Tortell, 1992]).

El tipo de costa afectada es una variable de suma importancia, debido a que las características de la costa determinan su sensibilidad a la contaminación [O'Sullivan y Jacques, 2001]. Las costas rocosas expuestas constituyen los ambientes menos vulnerables, dado que la presencia de un oleaje de alta energía remueve rápidamente el petróleo depositado sobre las rocas, favorece su dispersión en el mar y por lo tanto aumenta su velocidad de biodegradación [Gundlach y Hayes, 1978; Hayes *et al.*, 1992; O'Sullivan y Jacques, 2001]. En general, estos sitios no requieren de tareas adicionales de limpieza porque la persistencia de los hidrocarburos en la costa suele ser breve [Gundlach y Hayes, 1978]. Por otra parte, las marismas, los manglares y los arrecifes de corales representan los ambientes más vulnerables ante un evento de contaminación [Gundlach y Hayes, 1978; Hayes *et al.*, 1992; O'Sullivan y Jacques, 2001]. En zonas de marismas y manglares, por ejemplo, el petróleo se adsorbe a las partículas que se encuentran en suspensión en la columna de agua, a los tallos y raíces de la vegetación y a los sedimentos, y la baja energía de las costas dificulta su remoción

[O'Sullivan y Jacques, 2001]. Entre las costas rocosas y los arrecifes de corales existe una amplia variedad de costas con distintos grados de sensibilidad ante un evento de contaminación.

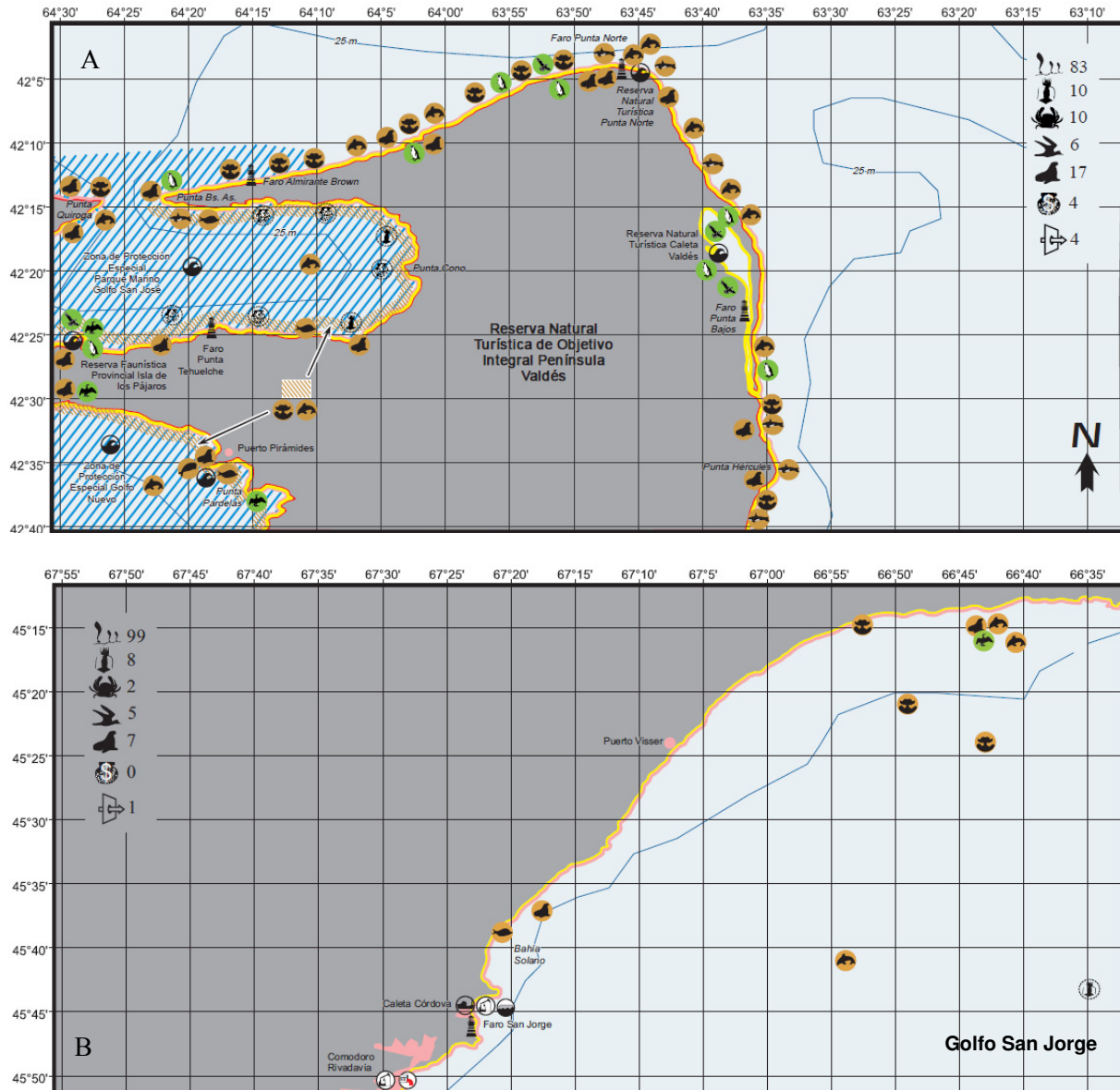



Figura 1.1. Atlas de sensibilidad ambiental de dos sitios de la costa Argentina con distintos niveles de sensibilidad. A: Área Natural Protegida Península Valdés, B: Área del Golfo San Jorge. Figuras modificadas, obtenidas de <http://atlas.ambiente.gov.ar>. La principal diferencia entre ambas regiones es la presencia de reservas o zonas de protección especial en la zona de Península Valdés (identificadas en la Figura A con líneas diagonales azules), y su ausencia en la zona de Caleta Córdova. Desde el punto de vista biológico, el Golfo San José es, junto al Golfo Nuevo, una de las áreas más importantes de reproducción de la ballena franca austral (especie vulnerable y declarada

Monumento Natural Nacional), del elefante marino del sur y de muchos otros mamíferos marinos. El Golfo San José es además, un área de alimentación de al menos tres especies de delfines, y sitio de alimentación y descanso de aves playeras migratorias. Además, en Península Valdés se registra un mayor número de especies de bivalvos y gasterópodos explotados comercialmente, indicados en las Figuras con el símbolo . Los principales factores de riesgo ecológico en Península Valdés son la ganadería ovina y el turismo, y en Caleta Córdova las actividades petroleras (<http://atlas.ambiente.gov.ar>)

1.1.6. Riesgo de contaminación con hidrocarburos en la costa Patagónica

En la Patagonia Argentina, el transporte de petróleo crudo desde las zonas de explotación en las cuencas del Golfo San Jorge y Austral hasta las zonas de procesamiento y refinerías, ubicadas en la provincia de Buenos Aires, se realiza exclusivamente por mar (Figura 1.2, [Nievas y Esteves, 2007]). Asimismo, parte del combustible refinado que se produce en las zonas de procesamiento retorna por vía marítima. Dicho transporte genera riesgos de contaminación por hidrocarburos en el mar Patagónico, ya sea como consecuencia de maniobras operacionales o a causa de accidentes [Foro para la conservación del mar Patagónico y áreas de influencia, 2008]. En efecto, las zonas de la costa patagónica con mayores niveles de contaminación por hidrocarburos se localizan en cercanía de las estaciones de carga y descarga de hidrocarburos [Commendatore y Esteves, 2007]. Sin embargo, también es posible que la contaminación llegue a afectar regiones alejadas, como consecuencia de su transporte por efecto de los vientos y las corrientes marinas, llegando incluso a impactar costas con mayor sensibilidad ambiental [Fundación Patagonia Natural, 1999; Commendatore *et al.*, 2000; Commendatore *et al.*, 2012].

En este sentido, con el propósito de proteger este ecosistema altamente productivo y que alberga una gran diversidad biológica, desde hace algunos años se han promulgado leyes nacionales de protección del medio ambiente marino acordes a la normativa internacional, así como también se han ratificado los convenios internacionales más importantes orientados a prevenir la contaminación del mar con hidrocarburos [Nievas y Esteves, 2007]. Entre otras acciones, Prefectura Naval Argentina estableció nuevas rutas marítimas más alejadas de la costa para los buques que transportan hidrocarburos, designó zonas de protección especial en el litoral argentino por su importancia ecológica o socioeconómica en donde se prohíbe la descarga de hidrocarburos y otros desechos, y reglamentó la documentación que deben portar los buques para certificar que cumplen con las normas de seguridad reglamentarias (Ordenanzas Marítimas N° 13/98, 12/98 y 1/86, respectivamente). Finalmente, se

implementaron también mejoras en las operaciones de carga y descarga, como por ejemplo: en la Cuenca del Golfo San Jorge se renovaron boyas, mangueras, tuberías, sistemas de amarre y se instalaron sistemas de telemetría para el control y seguridad de las operaciones [Nievas y Esteves, 2007]. Todas estas medidas fueron efectuadas a fin de prevenir la contaminación costera y proteger los recursos de este valioso ecosistema marino de los efectos adversos de los hidrocarburos.

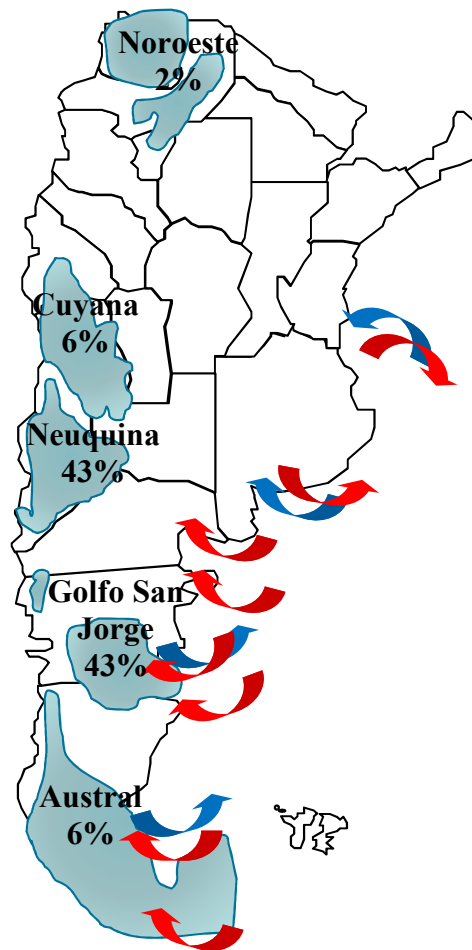


Figura 1.2. Cuencas petrolíferas productivas de Argentina. Los porcentajes corresponden a la cantidad de petróleo producido en cada cuenca. Las flechas indican los puntos de carga y descarga de petróleo crudo (flechas azules) y combustibles refinados (flechas rojas). El mapa fue obtenido del Centro de Estudios de la Actividad Regulatoria Energética (CEARE, <http://www.ceare.org/>) y modificado en base a información obtenida de [Nievas y Esteves, 2007]

1.1.7. Biorremediación de compuestos contaminantes

Algunos microorganismos tienen el potencial de utilizar contaminantes orgánicos como fuentes de carbono y energía, siendo capaces de degradarlos completamente o de transformarlos en compuestos menos tóxicos o más volátiles [Philp *et al.*, 2005]. Sin embargo, a veces los microorganismos pueden transformar a los contaminantes en compuestos aún más tóxicos [Philp *et al.*, 2005]. Además, no todos los compuestos son biodegradables, ya sea porque no se presentan en el ambiente condiciones favorables para su biodegradación, o bien porque se trata de compuestos sintéticos cuyas estructuras moleculares no son reconocidas por las enzimas existentes [Philp *et al.*, 2005]. A pesar de estas limitaciones, la gran versatilidad metabólica que presentan las comunidades microbianas puede ser aprovechada para la remediación ambiental. La **biorremediación**, definida como la explotación de actividades biológicas para detoxificar o remover contaminantes, es considerada una alternativa económica y de bajo impacto ambiental para la recuperación de sitios contaminados [Philp *et al.*, 2005]. Este proceso puede ser llevado a cabo en el mismo sitio contaminado cuando los contaminantes están presentes en forma difusa y en bajas concentraciones (**biorremediación *in situ***) o, por el contrario, el material contaminado puede ser relocalizado para su tratamiento (**biorremediación *ex situ***) [de Lorenzo, 2008].

Los estudios microbiológicos que se realizan en el sitio contaminado permiten evaluar el potencial que presentan los microorganismos presentes en el sitio para la biodegradación de las sustancias contaminantes, y de esta manera identificar la mejor estrategia de biorremediación para el mismo. Si el sitio contiene microorganismos capaces de degradar a las sustancias contaminantes, y los mismos se encuentran en alta abundancia y en forma activa, la alternativa elegida es habitualmente la **atenuación natural monitoreada** [Lebrón *et al.*, 2011]. La atenuación natural es definida como la combinación de todos los procesos naturales (biológicos, químicos y físicos) que actúan sin la intervención humana reduciendo la masa, toxicidad, movilidad, volumen o concentración de los contaminantes [Alvarez y Illman, 2006]. Sin embargo, el mecanismo más importante de este proceso suele ser la biodegradación [Singh *et al.*, 2004; Lebrón *et al.*, 2011]. La estrategia de atenuación natural monitoreada, si bien depende del proceso de atenuación natural, no significa ausencia de acción. Por el contrario, el sitio impactado es extensamente monitoreado con el fin de corroborar que el proceso efectivamente esté ocurriendo [Alvarez y Illman, 2006; Perelo, 2010]. La atenuación natural monitoreada es una técnica no invasiva y relativamente

económica, pero su principal limitación es que puede llegar a ser un proceso muy lento, principalmente cuando las condiciones ambientales no son las adecuadas [Perelo, 2010]. En esos casos resulta imprescindible utilizar estrategias que permitan acelerar el proceso natural, de manera de alcanzar la remediación del sitio en un tiempo aceptable, y así evitar riesgos sobre la salud de la población y la calidad ambiental.

Cuando las poblaciones microbianas degradadoras se encuentran presentes, pero en bajas abundancias o éstas presentan un bajo nivel de actividad, las mismas pueden ser estimuladas por medio de la modificación de algunas de las características fisico-químicas del ambiente que estén limitando el proceso degradativo, por ejemplo, por medio del agregado de nutrientes o de aceptores de electrones (**bioestimulación**). Cuando las poblaciones microbianas requeridas no se encuentran presentes, es necesario agregar microorganismos exógenos que presenten la capacidad de degradar los contaminantes en el sitio a remediar (**bioaumentación**) [Alvarez y Illman, 2006]. En el caso de los hidrocarburos, dado que microorganismos marinos han estado expuestos a los hidrocarburos a lo largo de su evolución, la presencia de poblaciones microbianas capaces de degradar estos compuestos es ubicua y la implementación de protocolos de bioaumentación resulta normalmente innecesaria. Además, la bioaumentación a menudo representa un desafío importante cuando es aplicada *in situ*, dado que los microorganismos que son incorporados al ambiente deben ser capaces de adaptarse a las condiciones ambientales y competir con los microorganismos autóctonos. Debido a esto, muchas veces no logran establecerse en la comunidad en forma exitosa y su efecto sobre la biodegradación de los contaminantes es breve [da Silva y Alvarez, 2010].

En el caso particular de un derrame de petróleo crudo en el medio ambiente marino, se desarrollan inmediatamente planes de contingencia que tienen como objetivo remediar lo más rápidamente posible aquellos sitios afectados, los cuales consisten en utilizar distintos métodos físicos o químicos para contener el derrame y remover la mayor cantidad posible del contaminante [Fingas, 2011b; Fingas, 2011c]. Estas estrategias sólo pueden remover un bajo porcentaje del petróleo derramado, y los hidrocarburos remanentes pueden ser altamente persistentes en el medio ambiente marino y por lo tanto se vuelve necesaria la utilización de estrategias de biorremediación [Prince y Atlas, 2005]. Si bien en varios países como por ejemplo Estados Unidos, Canadá o Gran Bretaña estas estrategias son consideradas dentro de las políticas de acción ante un derrame, en nuestro país aún no han sido utilizadas para la

remediación de ambientes costeros del mar Argentino contaminados con hidrocarburos [Prefectura Naval Argentina, 2007].

1.2. BIODEGRADACIÓN AERÓBICA DE HAPs

1.2.1. ¿Qué son los HAPs?

Los HAPs son compuestos orgánicos hidrofóbicos, con dos o más anillos bencénicos fusionados en arreglos lineales, angulares, o agrupados (Figura 1.3, [Habe y Omori, 2003]). Estos compuestos se encuentran ampliamente distribuidos en el ambiente, y están naturalmente presentes en combustibles fósiles como el petróleo, aunque también pueden formarse durante la combustión incompleta de la materia orgánica [Bamforth y Singleton, 2005]. Los HAPs pueden llegar al medio ambiente por derrames de petróleo o de combustibles refinados, o por procesos industriales [Bamforth y Singleton, 2005]. Representan compuestos de alta peligrosidad para el ambiente y la salud humana, dado que por su baja solubilidad y lenta velocidad de biodegradación son altamente persistentes en el ambiente. Además, muchos de estos compuestos pueden ser tóxicos, mutagénicos, carcinogénicos y/o teratogénicos [Samanta *et al.*, 2002; Wilkes y Schwarzbauer, 2010]. En base a los efectos perjudiciales que estos compuestos pueden causar sobre la salud humana, la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (U.S. EPA) nombró a 16 HAPs como contaminantes prioritarios para su remediación (Figura 1.3).

De acuerdo a la cantidad de anillos que presentan, los HAPs pueden clasificarse en HAPs de bajo peso molecular (hasta tres anillos bencénicos) o de alto peso molecular (más de tres anillos). Las propiedades fisicoquímicas de estos compuestos varían de acuerdo al número de anillos que contiene su molécula: su estabilidad química aumenta mientras que su solubilidad en agua y volatilidad disminuye al incrementar su peso molecular [Seo *et al.*, 2009]. Los HAPs de bajo peso molecular tienden a degradarse más rápidamente, mientras que los de alto peso molecular tienden a ser más persistentes y a permanecer más tiempo asociados a los sedimentos [Cerniglia, 1992].

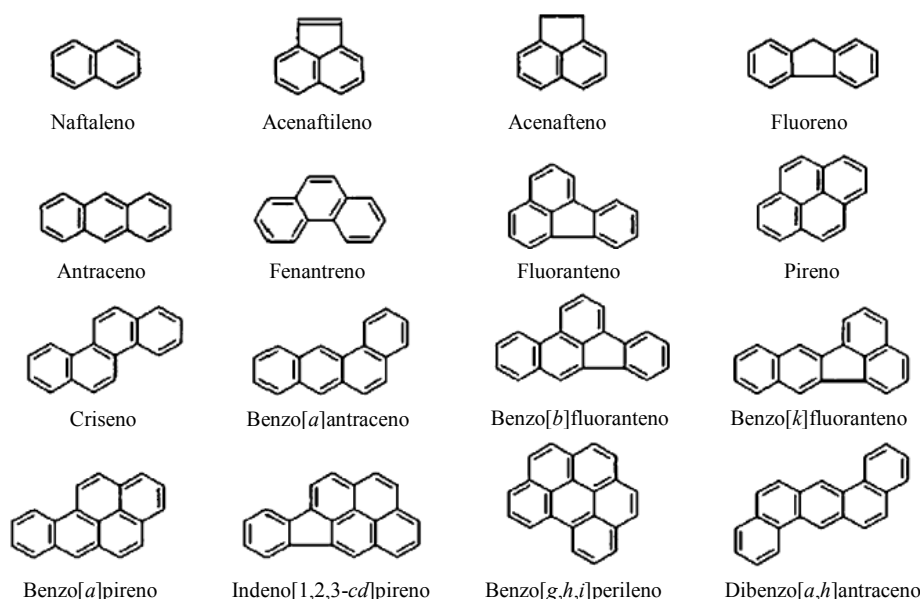


Figura 1.3. Estructura química de los 16 HAPs prioritarios según la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (U.S. EPA). Figura modificada de [Anyakora *et al.*, 2005]

1.2.2. Rutas degradativas de HAPs

Los microorganismos han evolucionado una gran diversidad de estrategias para degradar los hidrocarburos aromáticos y utilizarlos como fuentes de carbono y energía [Pérez-Pantoja *et al.*, 2010]. Fundamentalmente, la ruta catabólica de los hidrocarburos aromáticos involucra dos etapas clave: (i) la activación del anillo bencénico termodinámicamente estable que forma parte de los compuestos aromáticos y (ii) su posterior ruptura [Pérez-Pantoja *et al.*, 2010]. Estas dos etapas resultan en la formación de compuestos intermediarios (como el catecol o el protocatecuato), que luego son convertidos en intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbónicos [Peng *et al.*, 2008].

La degradación aeróbica de los hidrocarburos aromáticos generalmente comienza con la introducción de dos átomos de oxígeno en un anillo bencénico, siendo esta reacción catalizada por un sistema enzimático multicomponente que ha sido denominado RHO por su nombre en inglés “*ring-hydroxylating oxygenase*” (oxigenasa de la hidroxilación del anillo aromático, Figura 1.4, [Parales y Resnick, 2004]). Algunos miembros de esta superfamilia de enzimas, sin embargo, catalizan reacciones de monooxigenación [Pérez-Pantoja *et al.*, 2010], y es por ello que en los próximos capítulos nos referiremos sólo a las enzimas dioxigenasas

degradadoras de HAPs, a fin de diferenciarlas de las enzimas monooxigenasas. El sistema enzimático RHO está compuesto por dos o tres componentes que transfieren electrones desde el NAD(P)H hasta una molécula de O₂: una reductasa, una ferredoxina (la cual no siempre está presente) y una oxigenasa, que constituye el componente catalítico del sistema enzimático [Ferraro *et al.*, 2005]. La oxigenasa puede ser un homo- (α_n) o un hetero-oligómero ($\alpha_n\beta_n$) [Kweon *et al.*, 2008], siendo la subunidad mayor (α) la que contiene el sitio activo y confiere la especificidad de sustrato a la reacción. En cambio, la subunidad menor (β) aparentemente cumple principalmente un rol estructural [Kauppi *et al.*, 1998; Parales y Resnick, 2004].

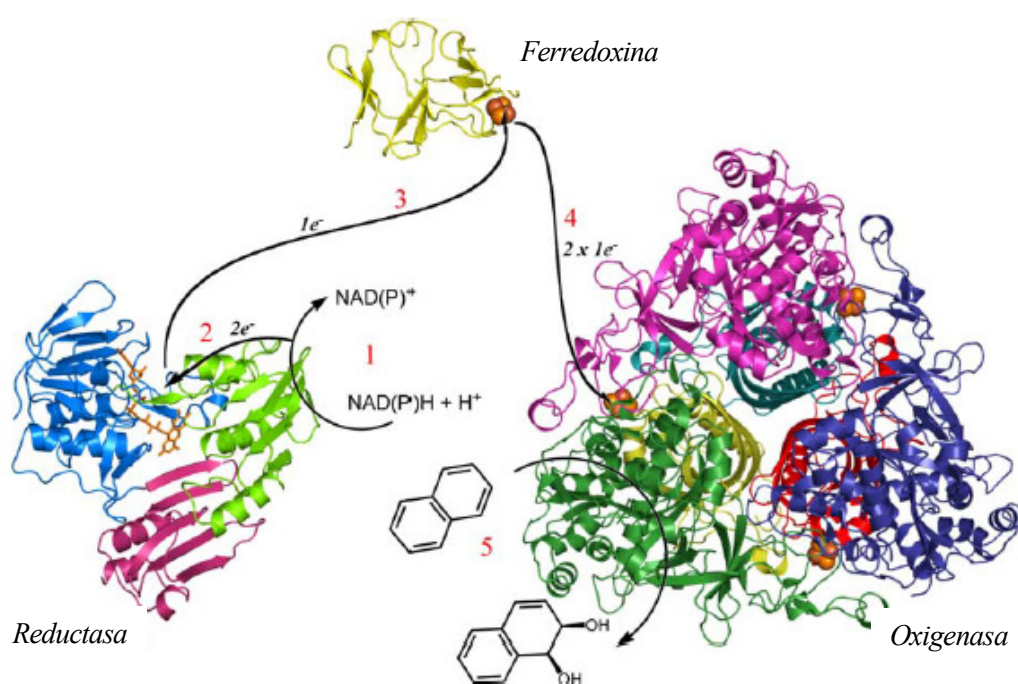


Figura 1.4. Paso inicial en la degradación aeróbica de HAPs, catalizada por el sistema enzimático multicomponente RHO (Figura modificada de [Ferraro *et al.*, 2005])

1.2.3. Clasificación de los sistemas enzimáticos RHOs

El primer sistema de clasificación de RHOs fue propuesto a comienzos de los años '90 por Batie y colaboradores [Batie *et al.*, 1991]. Este sistema clasificaba a estas enzimas en tres clases (Clases I a III) de acuerdo a los componentes de la cadena transportadora de electrones presente en los diez sistemas enzimáticos que se conocían hasta ese momento [Parales y

Resnick, 2006]. Pocos años después, Werlen y colaboradores [Werlen *et al.*, 1996] observaron que los complejos enzimáticos RHO y enzimas dehidrogenasas (las cuales participan en el segundo paso de la vía degradativa de HAPs) agrupaban en cuatro familias (toluato/benzoato, naftaleno, bifenilo y benceno/tolueno), en base a la homología de sus secuencias de aminoácidos, a la cantidad de componentes del sistema RHO, y al ordenamiento de los genes. La desventaja de ambos sistemas es que fueron basados en la información de muy pocas enzimas, y aquellas oxigenasas identificadas con posterioridad muchas veces no se ajustaban a ninguna de las clases o familias propuestas [Parales y Resnick, 2006; Kweon *et al.*, 2008].

Nam y colaboradores [Nam *et al.*, 2001] propusieron un nuevo sistema de clasificación basado en el grado de homología que existe entre las secuencias de aminoácidos de las subunidades α de la oxigenasa terminal de los sistemas RHOs. Este sistema identifica cuatro grupos de oxigenasas (denominados Grupo I a IV) y no tiene en cuenta la información que proporcionan los otros componentes de estos sistemas enzimáticos. Los autores proponen utilizar este sistema de clasificación junto al de Batie, ya que ambos sistemas se complementan, brindando tanto un enfoque filogenético (proporcionado por el sistema de clasificación de Nam) como bioquímico (proporcionado por el sistema de Batie) [Nam *et al.*, 2001]. Su principal ventaja es que permite clasificar muchas más oxigenasas que los sistemas de clasificación previamente propuestos.

Recientemente, se ha propuesto un nuevo sistema de clasificación de RHOs que tiene en cuenta la información que proporcionan tanto las enzimas oxigenasas como la cadena transportadora de electrones. El sistema propuesto por Kweon y colaboradores [Kweon *et al.*, 2008] clasifica a los sistemas RHOs en cinco tipos (denominados Tipo I a V) en base a los valores de distancia entre las secuencias de aminoácidos de los distintos componentes y a las relaciones entre los distintos componentes de cada RHO. Este esquema de clasificación presenta la ventaja de que permite clasificar enzimas aún cuando no se cuente con la información completa de todos sus componentes. Además, es un sistema dinámico, que se adapta a la creciente información sobre enzimas RHOs disponibles en las bases de datos, y por lo tanto es posible que secuencias que no pueden ser aún clasificadas puedan ser clasificadas en el futuro [Kweon *et al.*, 2008].

1.3. ECOLOGÍA DE COMUNIDADES MICROBIANAS

1.3.1. Definición de comunidades microbianas

Una comunidad microbiana es un ensamble de microorganismos de múltiples especies que conviven en un mismo tiempo y espacio e interactúan entre sí [Konopka, 2009]. Existen comunidades relativamente simples, como por ejemplo las que habitan biorreactores dominados por unas pocas especies, y comunidades muy complejas, como las que habitan suelos, sedimentos o la rizósfera de las plantas [Raes y Bork, 2008]. Las comunidades presentan propiedades emergentes que son inherentes a este nivel de organización, y que no pueden ser observadas cuando se estudian los individuos en forma aislada [Begon *et al.*, 2006]. Dado que las comunidades son sistemas complejos integrados por muchas especies que pueden presentar distintas interacciones, la mejor forma de compararlas es describiendo algunas de estas propiedades [Morin, 2011].

1.3.2. Propiedades de las comunidades

Las propiedades de las comunidades microbianas pueden dividirse en dos categorías: estructurales y funcionales [Little *et al.*, 2008]. Las propiedades estructurales (por ejemplo: la riqueza o la diversidad de especies) describen cómo está constituida la comunidad y las mismas varían en los distintos ambientes. Las propiedades funcionales definen el comportamiento de la comunidad, por ejemplo: cómo las comunidades procesan sustratos, interactúan con el medio ambiente o responden a perturbaciones [Little *et al.*, 2008]. Se describen a continuación algunas propiedades de las comunidades, aquellas que son de mayor relevancia para esta Tesis.

1.3.2.1. La riqueza de especies

La riqueza de especies es el número total de especies presentes en una comunidad [Krebs, 1999]. En términos prácticos, la riqueza de especies es muy difícil de determinar, en parte debido a que es difícil decidir cuándo se ha buscado lo suficiente como para asegurarse de que se han encontrado todas las especies de un ambiente [Morin, 2011]. Una forma de evaluar si el esfuerzo de muestreo fue adecuado consiste en realizar curvas de acumulación de especies,

también denominadas curvas colectoras, en las cuales se grafica el número de especies acumuladas en función del tamaño o esfuerzo de muestreo [Magurran, 2004]. La unidad de cuantificación del esfuerzo de muestreo dependerá del tipo de estudio realizado, y puede ser por ejemplo el número de individuos colectados, la superficie o volumen de la muestra, o la cantidad de secuencias de ADN analizadas. El número de especies tiende a aumentar con el esfuerzo de muestreo hasta que, al superar determinada intensidad del muestreo, las curvas colectoras se vuelven asintóticas. En este punto es razonable concluir que la profundidad de muestreo es adecuada, y por lo tanto se puede estimar la riqueza de especies de un ambiente [Morin, 2011]. Debido a que la riqueza de especies varía en función del esfuerzo de muestreo, no sería apropiado comparar dos comunidades que han sido estudiadas con distinta intensidad, principalmente si en dichos estudios el muestreo fue subóptimo (o en otras palabras, las curvas colectoras no lograron alcanzar una asíntota). En estos casos es necesario comparar la riqueza de las comunidades utilizando para todas ellas el menor esfuerzo de muestreo alcanzado. Esto se puede lograr mediante la construcción de curvas de rarefacción, que son similares a las curvas de acumulación de especies, con la diferencia de que en este caso las especies se van agregando en forma aleatoria y luego se grafica la curva promedio obtenida al repetir este proceso, por ejemplo, 100 veces [Magurran, 2004].

La riqueza de los microorganismos en el ambiente es tan grande que en general no puede ser determinada con una alta certeza, ya que se necesitan realizar muestreos muy intensivos para obtener curvas colectoras que alcancen una asíntota. Por ello, se debe recurrir a estimadores de la riqueza [Hong *et al.*, 2006], tales como los índices *Chao1* [Chao, 1984] o ACE (por *abundance-based coverage estimator*, [Chao y Lee, 1992; Chazdon *et al.*, 1998]). Estos índices estiman la riqueza microbiana utilizando la información de la frecuencia de los OTUs (*operational taxonomic units*, por unidades taxonómicas operativas) menos abundantes en una muestra [Hill *et al.*, 2003], en donde los OTUs son grupos establecidos en base a distancia genética entre secuencias [Schloss y Handelsman, 2005]. El índice *Chao1* estima riqueza utilizando la información de OTUs integrados por sólo una (*singletons*) o dos (*doubletons*) secuencias, mientras que el índice ACE utiliza la información de los OTUs integrados por una a diez secuencias [Hill *et al.*, 2003].

1.3.2.2. La diversidad

La diversidad biológica es la variedad y abundancia de especies en la unidad de estudio [Magurran, 2004]. De esta definición se desprende que la diversidad tiene dos componentes, a saber: la riqueza de especies (definida en detalle en la sección anterior) y la equitatividad, (*evenness*, también denominada equitabilidad o uniformidad) o abundancia relativa de cada una de estas especies [Magurran, 2004]. La equitatividad es baja cuando la comunidad contiene pocas especies dominantes y una gran mayoría de especies en baja abundancia, mientras que será máxima cuando todas las especies se encuentren igualmente distribuidas [Krebs, 1999]. Se ha descrito una variedad de índices para calcular la diversidad en una muestra, algunos de ellos son medidas paramétricas basadas en modelos estadísticos de distribución de especies, mientras que otros son índices no paramétricos. A este último grupo pertenecen, entre otros, los índices de diversidad de Shannon [Shannon y Weaver, 1949] y de Simpson [Simpson, 1949].

El concepto de diversidad descrito hasta el momento corresponde a la diversidad en un determinado hábitat, también denominada diversidad α [Morin, 2011]. Sin embargo, al comparar dos comunidades probablemente se observe que la composición de especies y sus abundancias relativas difieren, y a esta diferencia en diversidad entre los dos ambientes, la cual constituye un grado de diversidad adicional, se la denomina diversidad β [Morin, 2011]. De igual manera, el concepto puede ser aplicado a cambios temporales en la diversidad de una misma comunidad [Magurran, 2004]. El índice de diversidad de Bray-Curtis [Bray y Curtis, 1957] constituye un método apropiado para calcular la similitud entre dos comunidades, ya que tiene en cuenta tanto la composición de especies como sus abundancias relativas [Bloom, 1981]. Existen también medidas de diversidad a escala regional (diversidad γ), entre distintas regiones (diversidad δ) y dentro de una misma provincia biogeográfica (diversidad ϵ) [Magurran, 2004].

1.3.2.3. La estructura

No sólo la abundancia sino también la identidad de las especies son atributos importantes a tener en cuenta al momento de describir una comunidad [Morin, 2011]. Se denomina composición de una comunidad a la lista de todos los miembros que la constituyen, mientras que cuando hablamos de su estructura nos referimos a los organismos que la componen y sus

abundancias relativas [Little *et al.*, 2008]. Las especies que forman parte de una comunidad interactúan de distintas maneras, de modo que ellas mismas determinan, al menos en parte, la estructura del ensamble [Jaksic y Marone, 2007]. La estructura de la comunidad es un atributo que es de mayor utilidad cuando es utilizado con fines comparativos, por ejemplo, para analizar los cambios que se producen en función del tiempo o del espacio [Little *et al.*, 2008]. Esta información nos puede ayudar a entender cuáles son los factores (internos y externos) que controlan a las comunidades [Fuhrman, 2009].

1.3.2.4. La función

Las propiedades funcionales de una comunidad definen el comportamiento de la misma, es decir, cómo la comunidad procesa los sustratos, interacciona con el medio ambiente y responde a perturbaciones como por ejemplo una invasión [Little *et al.*, 2008]. Un grupo funcional es un conjunto de especies de la comunidad que están comprometidas en un mismo proceso ecológico [Morin, 2011]. Por supuesto, una especie puede pertenecer a distintos grupos funcionales de acuerdo al proceso en particular que se esté estudiando [Jaksic y Marone, 2007]. Debido a que dentro de la comunidad existen especies que son redundantes, la función de la comunidad puede mantenerse constante aún cuando algunas especies hayan sido reemplazadas por otras [Fernández *et al.*, 1999; Jaksic y Marone, 2007]. Más aún, una alta redundancia en las funciones ecológicas permitirá que cambios en las condiciones ambientales no alteren los servicios ofrecidos por el ecosistema [Konopka, 2009].

1.3.3. Ecología y biorremediación

En la biorremediación *in situ* de sustancias contaminantes, comunidades microbianas muy diversas se encuentran expuestas a una mezcla de compuestos contaminantes en un entorno físico-químico variable en el espacio y en el tiempo. En estos ecosistemas, la degradación de cada uno de estos compuestos es frecuentemente llevada a cabo por múltiples poblaciones microbianas que compiten por los mismos sustratos, por lo que existe un cierto nivel de redundancia funcional [Vilchez-Vargas *et al.*, 2010]. Además, un número de procesos ajenos a las capacidades catabólicas de comunidad influyen sobre la velocidad de biodegradación de los compuestos contaminantes. Ejemplos de procesos que limitan la capacidad degradativa de la comunidad microbiana incluyen bajas biodisponibilidades de los

compuestos contaminantes, o interacciones negativas entre los miembros de la comunidad, como por ejemplo la predación por otros microorganismos o la lisis por virus [de Lorenzo, 2008]. Como consecuencia de la gran complejidad que caracteriza a la biorremediación, para estudiar el proceso degradativo se requiere del uso de herramientas de estudio que sean capaces de capturar dicha complejidad [de Lorenzo, 2008; Chakraborty *et al.*, 2012].

La biorremediación se incluye dentro de la disciplina de la biotecnología ambiental, cuyo objetivo principal es la sustentabilidad de los recursos claves para el ser humano, tales como el agua o el suelo, a través del manejo de las comunidades microbianas [Dionisi *et al.*, 2012]. Para lograr este objetivo, se requiere de una comprensión profunda del funcionamiento de dichas comunidades, y la ecología microbiana aporta tanto conceptos como herramientas para su estudio [McMahon *et al.*, 2007]. Es por ello que la asociación de la biotecnología ambiental con disciplinas tales como la ecología microbiana y la biología molecular resulta altamente beneficiosa para lograr el objetivo de manejar en forma efectiva a las comunidades microbianas [Rittmann *et al.*, 2006; McMahon *et al.*, 2007]. En el caso concreto de la biorremediación, se conoce muy poco sobre los mecanismos ecológicos y moleculares que regulan la biodegradación de compuestos contaminantes. De igual manera, se desconoce cuáles son las poblaciones microbianas que son claves para este proceso y cómo éstas difieren en los distintos ambientes. Sin embargo, esta información es esencial para el diseño de estrategias de remediación ambiental basadas en una comprensión mecanística del proceso. Hasta el momento, las estrategias de biorremediación se han basado a menudo en datos empíricos, en donde las comunidades microbianas son consideradas como una “caja negra” [Chakraborty *et al.*, 2012]. Como consecuencia, la biorremediación resulta a menudo poco predecible, lo cual ha demorado su adopción por parte de las agencias de implementación. La falta de predictibilidad también tiene como consecuencia la toma de decisiones conservativas a fin de garantizar su éxito, con un uso excesivo de recursos [Prosser *et al.*, 2007].

Al fin de lograr un profundo conocimiento mecanístico del funcionamiento del ecosistema microbiano de un sitio contaminado, se requiere de distintos niveles o dimensiones de información. El primer paso consiste en obtener la “lista de partes” de la comunidad, comprendida por la estructura, el potencial genético y la función de la comunidad microbiana [Rittmann *et al.*, 2006; Raes y Bork, 2008]. En un segundo nivel, se requiere del estudio de la “conectividad entre las partes”, es decir cómo interaccionan los distintos miembros de la comunidad microbiana (competencia entre individuos, predación, inhibición, parasitismo,

etc.), qué materiales intercambian, cuál es su organización espacial, y cuáles son las interacciones entre los miembros de la comunidad microbiana y el ambiente. Un tercer y cuarto nivel de la información estará constituido por cómo ocurren dichas complejas interacciones en el contexto del tiempo y del espacio. Si bien aún existen grandes desafíos metodológicos para lograr obtener esta profundidad de análisis, todos estos niveles de información resultan necesarios para alcanzar el objetivo final, que es el modelado descriptivo y predictivo del ecosistema microbiano completo y en consecuencia, la posibilidad de investigar *in silico* las propiedades del ecosistema [Raes y Bork, 2008]. Esta perspectiva integrada de estudio de las comunidades microbianas, la cual intenta comprender el conjunto de procesos moleculares e interacciones que contribuyen al funcionamiento del ecosistema, es denominada biología ecosistémica o biología de ecosistemas [Raes y Bork, 2008]. La perspectiva aportada por la biología ecosistémica, como así también las herramientas que ésta genera, resultan ideales para el estudio de la biodegradación de sustancias contaminantes [de Lorenzo, 2008; Vilchez-Vargas *et al.*, 2010; Chakraborty *et al.*, 2012]. El modelado de las comunidades microbianas de sitios contaminados aportará a la biorremediación el necesario poder predictivo, esencial para el manejo efectivo de las comunidades microbianas de sitios contaminados.

1.4. HERRAMIENTAS DE ESTUDIO DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS

1.4.1. Técnicas dependientes e independientes del cultivo

Mientras que las técnicas dependientes del cultivo de microorganismos son muy útiles para estudiar las capacidades metabólicas de las cepas en forma aislada, su aplicación al estudio de las comunidades microbianas es limitada [Cardenas y Tiedje, 2008]. La mayoría de los microorganismos aún no han podido ser cultivados en el laboratorio, en parte debido a que las condiciones de los medios de cultivo difieren mucho de las características de su entorno natural [Zengler *et al.*, 2002; Abed, 2009]. Además, aquellos microorganismos que logran crecer bajo las condiciones artificiales de los medios de cultivo, muchas veces no constituyen los miembros más abundantes de la comunidad [Malik *et al.*, 2008]. Por lo tanto, los métodos dependientes del cultivo no representan adecuadamente la verdadera estructura de una comunidad. Las metodologías que no dependen del cultivo de microorganismos, si bien no se

encuentran libres de dificultades metodológicas y desvíos, presentan varias ventajas con respecto a las técnicas dependientes del cultivo [Abed, 2009]. En primer lugar, permiten estudiar, además de a los microorganismos capaces de crecer en cultivo, a la gran proporción de microorganismos no cultivables pero que podría estar desarrollando importantes funciones en la comunidad. Asimismo, permiten caracterizar grupos bacterianos específicos y estudiar su abundancia sin las limitaciones impuestas por las condiciones requeridas para su crecimiento. Por ejemplo, estos métodos son utilizados para estudiar la diversidad de genes que aportan información filogenética o funcional, estimar la abundancia de determinadas poblaciones microbianas o monitorear la expresión de genes específicos dentro de la comunidad. Por lo tanto, los métodos independientes del cultivo son muy utilizados para estudiar las propiedades estructurales y funcionales de las comunidades microbianas, y para caracterizar a las poblaciones microbianas involucradas en determinados procesos metabólicos. Si bien presentan desvíos, los métodos moleculares independientes del cultivo de microorganismos son muy útiles en estudios de ecología microbiana, siempre que dichas limitaciones sean tenidas en cuenta al momento de analizar los resultados obtenidos a partir de dichas metodologías [Forney *et al.*, 2004].

1.4.2. Herramientas para el estudio de las propiedades estructurales de la comunidad

1.4.2.1. El gen ARN ribosomal

El ARN ribosomal (ARNr) tiene una función clave para el funcionamiento de la célula, y es por ello que esta molécula se encuentra presente y altamente conservada en todos los organismos [Rosselló-Mora y Amann, 2001]. Los genes que codifican a esta molécula presentan la particularidad de que prácticamente no sufren eventos de transferencia horizontal, convirtiéndolos en herramientas muy útiles para ser utilizados en estudios de las relaciones evolutivas entre procariotas [Rosselló-Mora y Amann, 2001; Santos Pontes *et al.*, 2007]. Los procariotas tienen tres tipos de moléculas de ARNr, que se clasifican por su velocidad de sedimentación en 5S, 16S y 23S. Los primeros estudios de comunidades microbianas que se realizaron utilizando este marcador filogenético se basaron en los genes del ARNr 5S [Stahl *et al.*, 1984; Stahl *et al.*, 1985]. Posteriormente, estos genes fueron reemplazados por los del ARNr 16S, debido a que esta molécula es de mayor longitud (el gen

de ARNr 16S tiene aproximadamente 1.500 pb y el gen de ARNr 5S 120 pb), y por lo tanto, resulta más informativa [Abed, 2009]. En la actualidad, la molécula de ARNr 16S es el marcador filogenético más frecuentemente utilizado en estudios de comunidades bacterianas.

Si bien se han desarrollado numerosas metodologías para el estudio de las comunidades bacterianas utilizando este biomarcador, desde hace algunos años ha cobrado popularidad el uso de tecnologías de secuenciación de segunda generación para su análisis. Esto es debido a que permiten estudiar a la estructura de las comunidades microbianas en un nivel de detalle nunca antes logrado. El gen ARNr 16S contiene nueve regiones cuyas secuencias presentan una mayor variabilidad entre los distintos microorganismos (Figura 1.5, [Chakravorty *et al.*, 2007]). Estas regiones hipervariables se encuentran flanqueadas por fragmentos altamente conservados, los que son utilizados para diseñar cebadores universales que permiten amplificar estas regiones. Esencialmente, la información obtenida al aplicar esta metodología no difiere de la que se obtiene al construir las bibliotecas de genes ARNr 16S tradicionales. Sin embargo, al utilizar tecnologías de secuenciación de segunda generación el número de secuencias que pueden ser obtenidas por muestra supera en órdenes de magnitud a la cantidad de información que generalmente se obtiene mediante el método tradicional de análisis de clones de una biblioteca de productos de amplificación, secuenciados individualmente. Por lo tanto, estas tecnologías modernas permiten lograr muestreos mucho más profundos de las comunidades microbianas [Engelbrekton *et al.*, 2010]. Además, otra ventaja de la secuenciación en gran escala con respecto a las bibliotecas de productos de amplificación es que la primera evita el paso de clonado en un vector y los desvíos generados por este paso metodológico [Mardis, 2008a]. Por otra parte, las bibliotecas de genes ARNr 16S cuentan con la ventaja de que permiten el análisis de fragmentos de mayor longitud que los que se obtienen por los métodos modernos de secuenciación. Sin embargo, el tamaño de estos fragmentos ha aumentado considerablemente su longitud en los últimos años [Tamaki *et al.*, 2011; Rajendhran y Gunasekaran, 2011]. De hecho, las secuencias obtenidas por estas metodologías resultan lo suficientemente informativas como para permitir su asignación taxonómica en la mayoría de los casos [Cardenas y Tiedje, 2008].

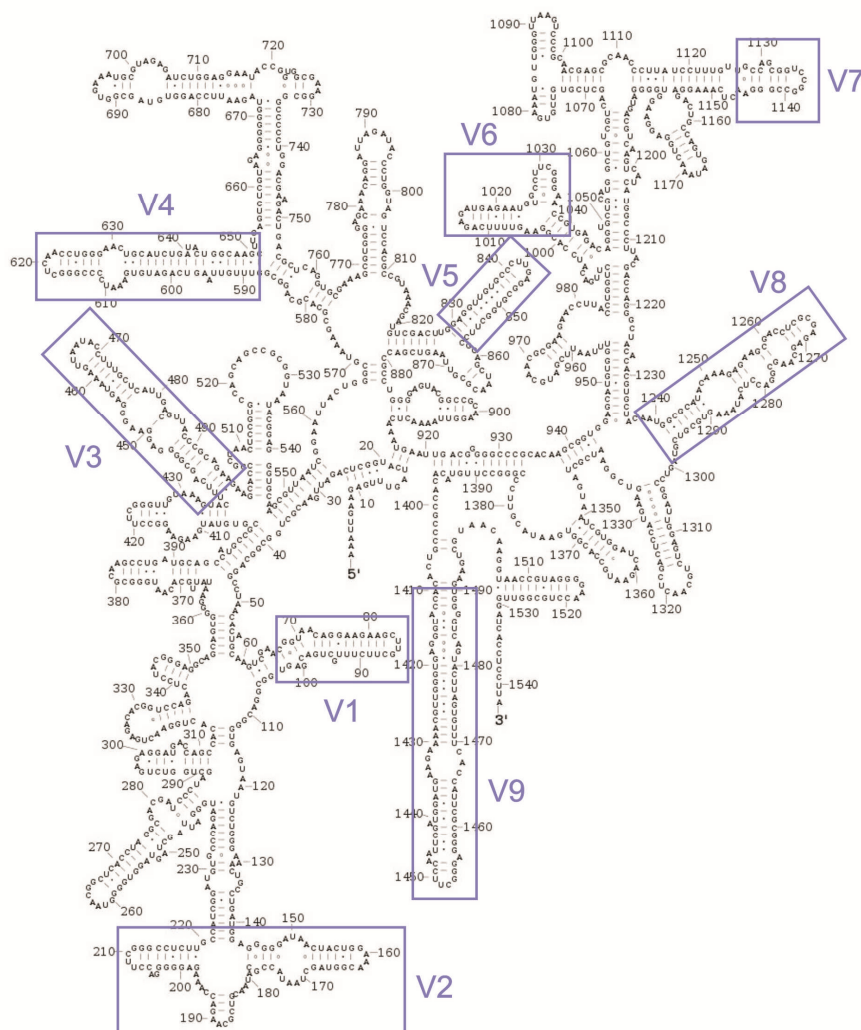


Figura 1.5. Gen del ARNr 16S de *Escherichia coli*. Se identifican en la figura las regiones hipervariables del gen (V1 a V9)

1.4.2.2. El método de pirosecuenciación

Las tecnologías de secuenciación de segunda generación son un conjunto de herramientas que permiten la secuenciación de ácidos nucleicos en gran escala y en forma simultánea, razón por la cual a menudo se las denomina técnicas de secuenciación masiva y paralela. Estas tecnologías son capaces de generar una gran cantidad de información en muy corto tiempo (desde varios cientos de miles hasta millones de lecturas por corrida), y el costo por base es muy inferior al de la secuenciación de tipo Sanger [Mardis, 2008b; Ansorge, 2009]. Una de estas metodologías es la pirosecuenciación, herramienta que ha sido aplicada a la

secuenciación de genomas bacterianos *de novo*, al estudio de micro ARNs, a proyectos de paleobiología y a estudios metagenómicos, entre otros [Rothberg y Leamon, 2008]. El método de pirosecuenciación consiste en la detección del pirofosfato liberado durante la síntesis de los fragmentos de ADN, y por ello a esta metodología se la denomina también “secuenciación mediante síntesis” [Ronaghi, 2001]. En una primera etapa, el ADN templado que se desea secuenciar es fragmentado, los fragmentos de ADN son ligados a adaptadores y las hebras de ADN son separadas (Figura 1.6.A, [Ansorge, 2009]). Los adaptadores permiten la unión de las moléculas de ADN de simple hebra a esferas de agarosa que actúan de soporte, bajo condiciones que favorecen la unión de una única hebra de ADN a cada esfera [Metzker, 2010]. El agregado de aceite a la solución de ADN y su posterior agitación permiten que se forme una emulsión, en la cual las gotas de agua constituyen micro-reactores que contienen en forma aislada a los complejos esfera-ADN y a los reactivos necesarios para una amplificación por PCR (Figura 1.6.B, [Mardis, 2008b; Siqueira *et al.*, 2012]). Dentro de estos micro-reactores se produce una PCR en emulsión, en la cual cada uno de los fragmentos de ADN es amplificado sobre la superficie de la esfera de agarosa [Mardis, 2008b]. Esta etapa de amplificación es necesaria para incrementar la intensidad de la señal luminosa que se producirá durante la secuenciación por síntesis, a fin de que dicha señal pueda ser detectada por el equipo [Ansorge, 2009].

Al finalizar la amplificación por PCR, la emulsión es destruida y las esferas conteniendo las múltiples copias de un mismo ADN en simple hebra son transferidas a una placa que contiene cientos de miles de celdas, de modo tal que cada celdilla contendrá una única esfera con ADN (Figura 1.6.C, [Siqueira *et al.*, 2012]). Estas celdas son luego adicionadas de micro-esferas que contienen las enzimas que catalizarán las siguientes etapas de la pirosecuenciación. Finalmente, las celdas son provistas de nucleótidos, los cuales se agregan en forma secuencial y cíclica (Figura 1.6.D). La incorporación de una base al ADN templado libera un grupo pirofosfato, que luego de una serie de reacciones químicas culmina con la conversión de luciferina a oxiluciferina, generando una señal luminosa que es captada por una cámara acoplada al secuenciador [Siqueira *et al.*, 2012]. A medida que este ciclo se repite, la hebra de ADN complementaria se extiende y el instrumento registra la secuencia de nucleótidos que se van incorporando en cada celda.

A diferencia de los proyectos que son orientados al estudio de los genomas de todos los microorganismos presentes en una comunidad (metagenómica), la aplicación de la

pirosecuenciación al estudio de la estructura de una comunidad está basada en la secuenciación de un único gen (el gen ARNr 16S), el cual debe ser amplificado a partir del ADN metagenómico en una etapa previa a su secuenciación [Petrosino *et al.*, 2009]. Debido a esto, este análisis está sujeto a los desvíos asociados a la PCR multitemplado, y es por ello que la selección de los cebadores así como de las condiciones de amplificación influyen en los resultados que se obtendrán sobre las abundancias relativas de las secuencias del gen blanco del estudio [Schloss *et al.*, 2011]. A fin de minimizar los desvíos asociados a la etapa de amplificación es necesario tener en cuenta algunas consideraciones metodológicas, tales como la utilización de pocos ciclos de amplificación y la selección de cebadores que permitan lograr la representatividad de todos los microorganismos de la comunidad.

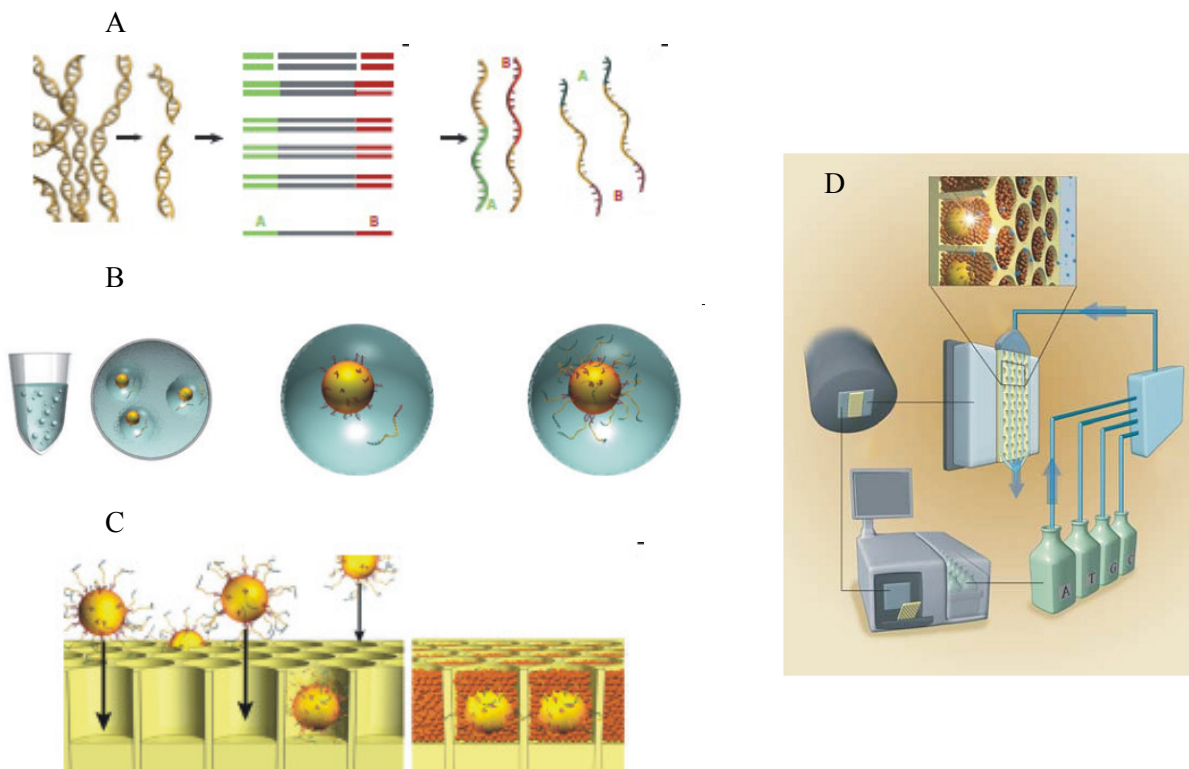


Figura 1.6. El método de pirosecuenciación. A: preparación del ADN, B: PCR en emulsión, C: placa con celdas en donde se produce la secuenciación, D: adición de nucleótidos en forma secuencial a la placa de secuenciación. Figura modificada de [Margulies *et al.*, 2005] y [Mardis, 2008b]

1.4.3. Herramientas para estudiar las propiedades funcionales de la comunidad

1.4.3.1. Los marcadores funcionales en ecología

Teniendo en cuenta la alta probabilidad de transferencia horizontal de genes entre bacterias [de la Cruz y Davies, 2000], los marcadores filogenéticos como los indicados en el punto anterior resultan poco informativos sobre las capacidades funcionales de una comunidad microbiana. El uso de genes que codifican enzimas claves para los procesos metabólicos de interés como blanco de los análisis moleculares es el método más utilizado para estudiar a las propiedades funcionales de una comunidad microbiana [Lau y Liu, 2007; Junca y Pieper, 2010]. Estos métodos están basados en la amplificación de fragmentos de estos genes a partir de ácidos nucleicos purificados de la comunidad, utilizando cebadores diseñados en base a regiones conservadas presentes en estos genes [Galvão *et al.*, 2005]. Los genes que aportan información acerca de un rasgo funcional de la comunidad microbiana son denominados genes o marcadores funcionales [Lueders y Friedrich, 2003]. Los microorganismos que contienen a estos marcadores funcionales pueden o no estar filogenéticamente relacionados. El subconjunto de la comunidad constituido por especies que utilizan recursos similares de un modo similar, sin importar a qué grupo taxonómico pertenezcan, se define gremio [Morin, 2011]. Independientemente de las especies que contienen estos marcadores, es probable que estos microorganismos compartan rutas metabólicas y que los genes que codifican las enzimas de estas rutas degradativas presenten un origen filogenético común [Burke *et al.*, 2011]. Los marcadores funcionales permiten, por ejemplo, estudiar la presencia o diversidad de determinados genes funcionales, estimar su abundancia o evaluar su expresión [Wilmes y Bond, 2006; Junca y Pieper, 2010]. En el caso de la biodegradación de HAPs, el marcador funcional más utilizado es el gen que codifica a la subunidad α del componente oxigenasa de los sistemas enzimáticos RHO, dado que dicha subunidad contiene el dominio catalítico y confiere a la misma la especificidad del sustrato [Gibson y Parales, 2000].

1.4.3.2. Las bibliotecas de productos de amplificación

Las bibliotecas de productos de amplificación son a menudo utilizadas para estudiar la diversidad de un determinado marcador funcional en una comunidad microbiana [Abed,

2009]. Al amplificar dicho marcador a partir de ácidos nucleicos de una muestra ambiental, el producto de amplificación generalmente consiste en una mezcla de distintas variantes de este gen, y por lo tanto las mismas deben ser separadas para poder estudiar cada una de ellas individualmente [Abed, 2009]. Esto se logra insertando cada fragmento de ADN amplificado en un vector (generalmente un plásmido) que luego es transferido a una célula bacteriana viva (proceso que se denomina transformación) para su replicación. La secuenciación de los clones que contienen los distintos fragmentos de ADN amplificados permite estudiar filogenéticamente dichas secuencias, y conocer la diversidad de genes presentes en el ambiente asociados a una función en particular [Abed, 2009].

Una de las limitaciones de esta metodología es que no permite hacer inferencias sobre las abundancias relativas de las distintas variantes del gen presentes en la muestra ambiental. Esto se debe a los desvíos que se encuentran asociados a reacciones de amplificación multitemplado, los cuales afectan a las frecuencias relativas de las distintas variantes del gen blanco [Suzuki y Giovannoni, 1996]. Las reacciones de PCR multitemplado son aquellas en las que se amplifica una mezcla de genes homólogos utilizando un único par de cebadores diseñados en base a regiones conservadas presentes en dichos genes. Esto ocurre, por ejemplo, durante la amplificación de un marcador funcional a partir de ADN metagenómico de una muestra ambiental. En esta clase de reacciones, ciertos templados pueden amplificar preferencialmente con respecto a otros. Esto puede ocurrir principalmente a causa de: (i) diferencias en la energía de unión de los cebadores a los distintos templados [Suzuki y Giovannoni, 1996; Ishii y Fukui, 2001; Kanagawa, 2003]; (ii) diferencias en el contenido GC de los templados (templados con alto contenido GC se disocian con menor eficiencia que templados con bajo porcentaje GC, por lo tanto estos últimos se encuentran más disponibles para hibridizar con los cebadores y aumentan su abundancia relativa) [Reysenbach *et al.*, 1992]; (iii) efectos de rehibridización (en ciclos avanzados de la reacción, los templados más abundantes se encuentran en alta concentración e hibridizan entre sí quedando poco disponibles para asociarse a los cebadores. Como consiguiente, los cebadores se asocian con mayor eficiencia a los templados menos concentrados e incrementan su abundancia relativa [Mathieu-Daudé *et al.*, 1996; Suzuki y Giovannoni, 1996; Kurata *et al.*, 2004]); (iv) no todas las moléculas son igualmente accesibles a la hibridización de los cebadores [Wintzingerode *et al.*, 1997]; y (v) debido a fluctuaciones estocásticas en la asociación de los cebadores a distintos templados (o en las interacciones que se producen entre otros reactivos) a causa de

bajas concentraciones de ADN templado [Polz y Cavanaugh, 1998]. Por otra parte, existen desvíos asociados a la etapa de clonado, ya que algunos sistemas de clonado pueden ligar ciertos productos de amplificación con mayor preferencia que otros, y la presencia de ciertos insertos pueden resultar letales para la cepa transformada [Palatinszky *et al.*, 2011]. A causa de estos desvíos, las bibliotecas de productos de amplificación no constituyen una herramienta cuantitativa para analizar la frecuencia relativa de las variantes de un gen en la comunidad.

1.4.3.3. La PCR cuantitativa

La PCR cuantitativa (qPCR) es una técnica que surge como una modificación a la PCR tradicional para poder estimar la abundancia inicial de un gen en el ADN templado. Para ello, el termociclador está acoplado a un sistema de detección de fluorescencia que permite visualizar el progreso de la amplificación mientras esta ocurre. La detección de la fluorescencia se produce en cada ciclo de amplificación, lo cual permite registrar la formación de los productos en “tiempo real”, y por ello a estos equipos se los denominan PCR en tiempo real [Smith y Osborn, 2009]. Debido al método de detección utilizado, esta metodología es más sensible y reproducible que la PCR convencional [Zhang y Fang, 2006].

Unos de los métodos de detección de fluorescencia más comúnmente utilizados son los colorantes que se unen a ADN de doble hebra, como por ejemplo SYBR Green I [Bustin y Nolan, 2004a]. El colorante SYBR Green I se une a cualquier ADN de doble hebra intercalándose entre pares de bases adyacentes, y en este estado emite una señal de fluorescencia cuando es excitado con un haz de luz (Figura 1.7, [Smith y Osborn, 2009]). Debido a que la cantidad de fragmentos de ADN de doble hebra aumenta al transcurrir los ciclos de amplificación, se incrementa también la señal de fluorescencia [Zhang y Fang, 2006; Smith y Osborn, 2009]. Estos ensayos son más económicos y más sencillos de diseñar e implementar, con respecto a otros tipos de ensayos de qPCR, por ejemplo aquellos que utilizan sondas TaqMan. Sin embargo, presentan la desventaja de que pueden unirse a cualquier ADN de doble hebra, independientemente de su secuencia. Es por ello que, en presencia de amplificación inespecífica, la abundancia de la secuencia blanco del ensayo será sobreestimada. Además, los resultados se ven afectados por la presencia de dímeros de cebadores, los cuales también están formados por ADN de doble hebra. Por ello, en los ensayos que utilizan SYBR Green I u otros colorantes similares, como por ejemplo EvaGreen, es necesario confirmar la especificidad del fragmento amplificado. Estos colorantes permiten

realizar curvas de desnaturalización al finalizar la etapa de amplificación, por medio del registro de la fluorescencia emitida en cada reacción individual a lo largo de un gradiente de temperaturas (generalmente en el rango de 50 a 95°C) [Bustin y Nolan, 2004a]. El punto en el cual el ADN se disocia a cadenas de simple hebra se registra como una caída abrupta de la intensidad de fluorescencia (Figura 1.8.A). Es frecuente convertir estas curvas en picos de desnaturalización, graficando el cambio de fluorescencia con la temperatura ($-dI/dT$) en función de la temperatura (Figura 1.8.B). Los productos de amplificación de distinto tamaño o con distinta secuencia de nucleótidos se evidencian como distintos picos, lo que permite identificar la presencia de productos de amplificación inespecíficos o dímeros de cebadores [Bustin y Nolan, 2004a].

En los ensayos de qPCR, la fluorescencia registrada luego de cada ciclo de amplificación es utilizada para construir curvas de amplificación, en las cuales la intensidad de la fluorescencia se grafica en función del ciclo de amplificación (Figura 1.9.A). Las curvas de amplificación también suelen graficarse como el logaritmo de la intensidad de fluorescencia en función del ciclo de amplificación (Figura 1.9.B). Las curvas de amplificación pueden subdividirse en una fase de retraso (fase *lag*, según su nomenclatura en inglés), durante la cual la fluorescencia se encuentra por debajo del nivel de detección del equipo, una fase de amplificación exponencial, y una fase de meseta o *plateau* en la cual el ADN ya no se duplica a una tasa exponencial debido a que algún reactivo se ha vuelto limitante, o por la acumulación de pirofosfato [Ginzinger, 2002; Bustin, 2004]. La fase exponencial es utilizada para cuantificar el gen blanco en una muestra, ya que únicamente en esta etapa la cantidad de producto amplificado es directamente proporcional a la abundancia inicial del gen en la muestra [Bustin, 2004]. Para ello, se fija un valor umbral de fluorescencia (o *threshold*) que permita comparar todas las muestras (Figura 1.9.A). La cantidad de ciclos de amplificación que requiere una muestra de ADN para alcanzar ese umbral de fluorescencia se denomina Ct, por “*cycle threshold*” o ciclo umbral [Heid *et al.*, 1996]. Cuando la abundancia del gen blanco en una muestra es mayor, se requerirán menos ciclos de amplificación para alcanzar el umbral de fluorescencia, y por lo tanto el Ct será menor.

El número de copias del gen en la muestra se determina por comparación con una serie de estándares externos de concentración conocida [Ginzinger, 2002]. Para ello, es necesario generar curvas de estándares, que se obtienen mediante la amplificación de diluciones seriadas de estándares que contienen el gen blanco del ensayo. Luego, se grafican los valores

de Ct de cada una de las diluciones del estándar en función del logaritmo de la concentración inicial del gen en cada reacción (Figura 1.9.C, [Smith y Osborn, 2009]). Finalmente, se ajusta una regresión lineal a este gráfico, y se calcula la ecuación de la regresión. Conociendo los valores de Ct de las muestras ambientales, podemos utilizar la ecuación de la regresión para calcular el número inicial de copias del gen en dichas muestras.

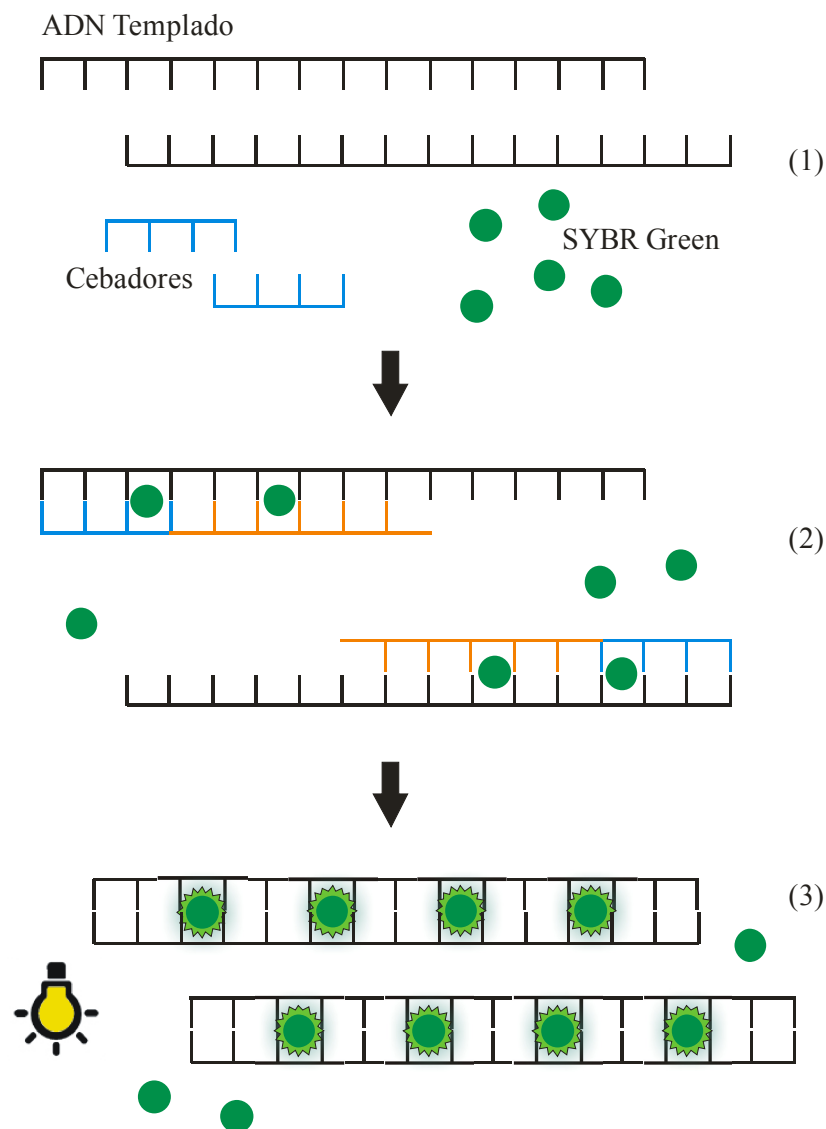


Figura 1.7. Detección de fluorescencia en un sistema de PCR en tiempo real por el método de SYBR Green I. (1) Desnaturalización del ADN: las moléculas de SYBR Green I están libres en la reacción y por lo tanto su fluorescencia es baja. (2) Alineado de los cebadores y extensión: a medida que se extiende la cadena de ADN, las moléculas de SYBR Green I comienzan a unirse a la doble hebra. (3) Lectura de fluorescencia: antes de que comience el nuevo ciclo de amplificación se registra la fluorescencia que las moléculas de SYBR Green I unidas al ADN de doble hebra emiten tras ser irradiadas por un haz de luz

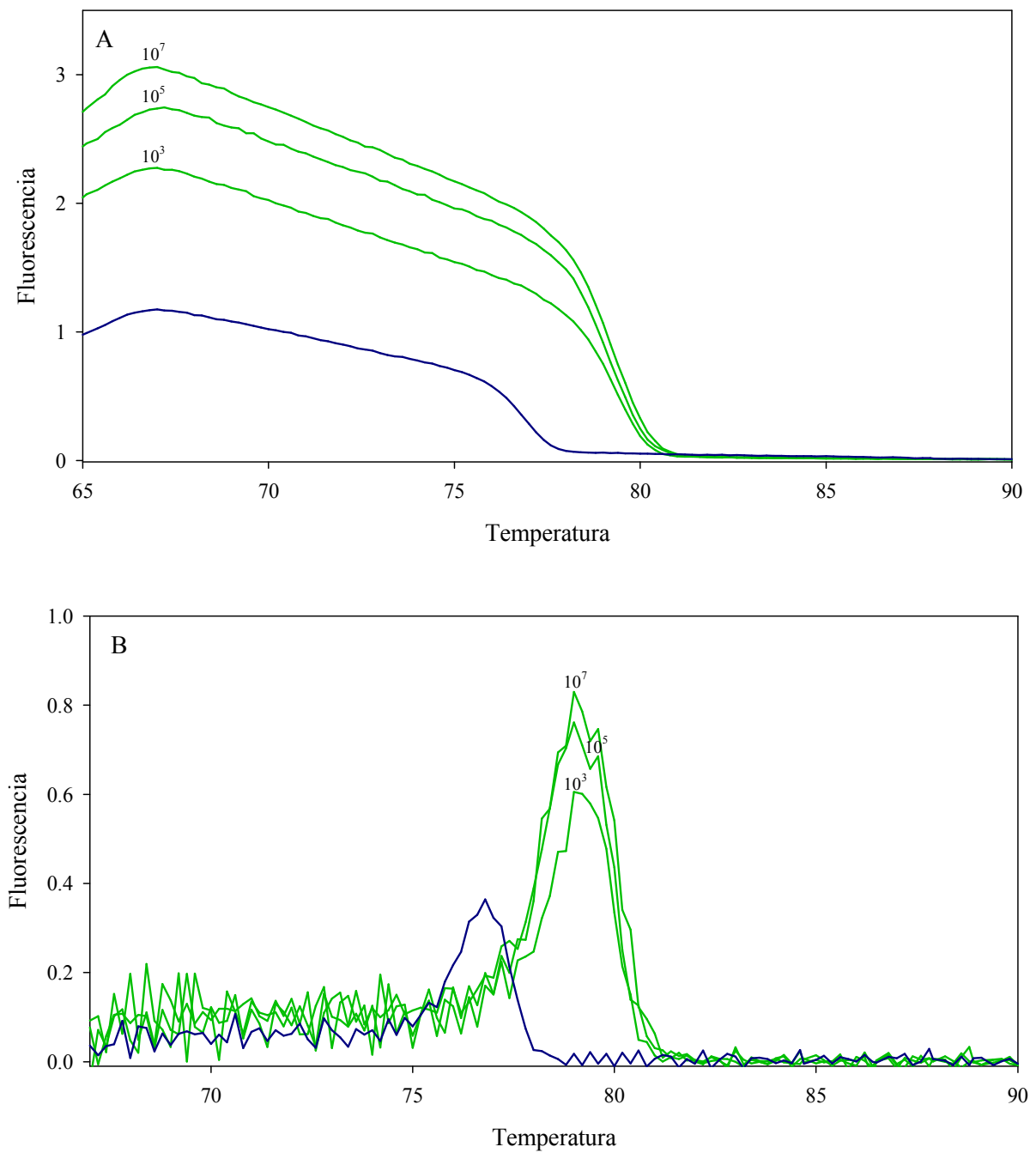


Figura 1.8. Curvas de desnaturalización. Las curvas en verde corresponden a estándares conteniendo el gen de interés (arriba de cada curva se indica el número de copias del gen/reacción), la curva en azul corresponde a un fragmento de ADN inespecífico amplificado a partir de una muestra ambiental. A. Curvas generadas a partir de valores de la intensidad de la fluorescencia. B. Curvas del cambio de fluorescencia con la temperatura ($-dI/dT$) en función de la temperatura

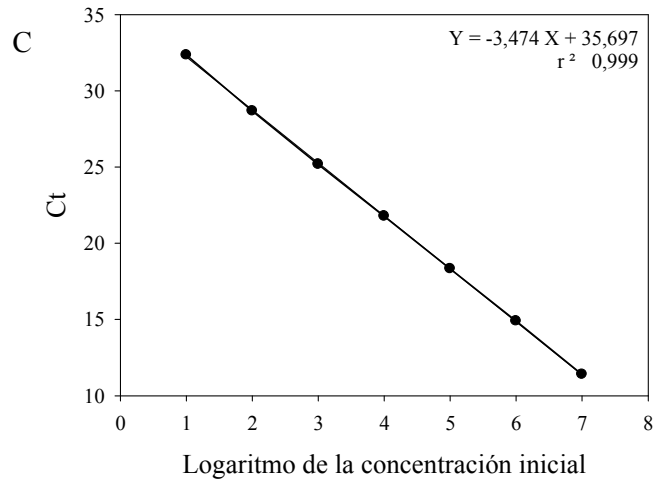
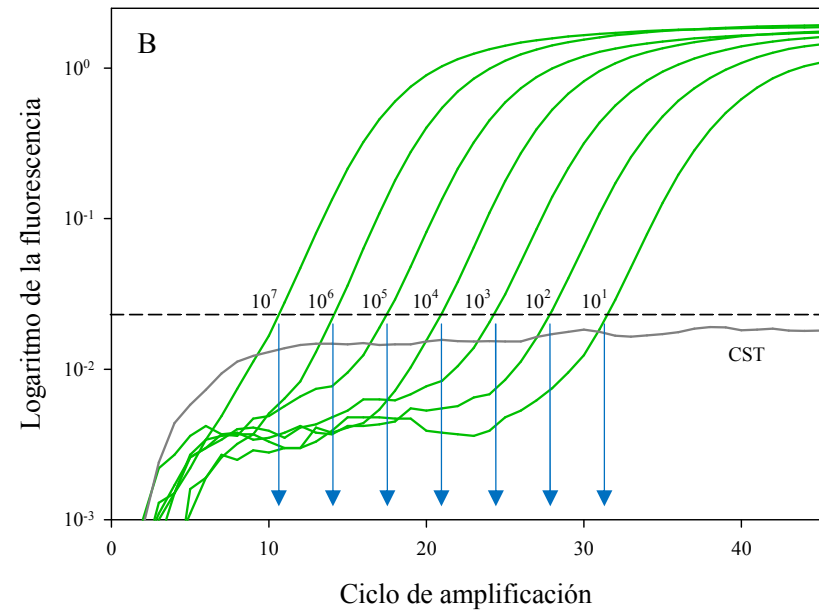
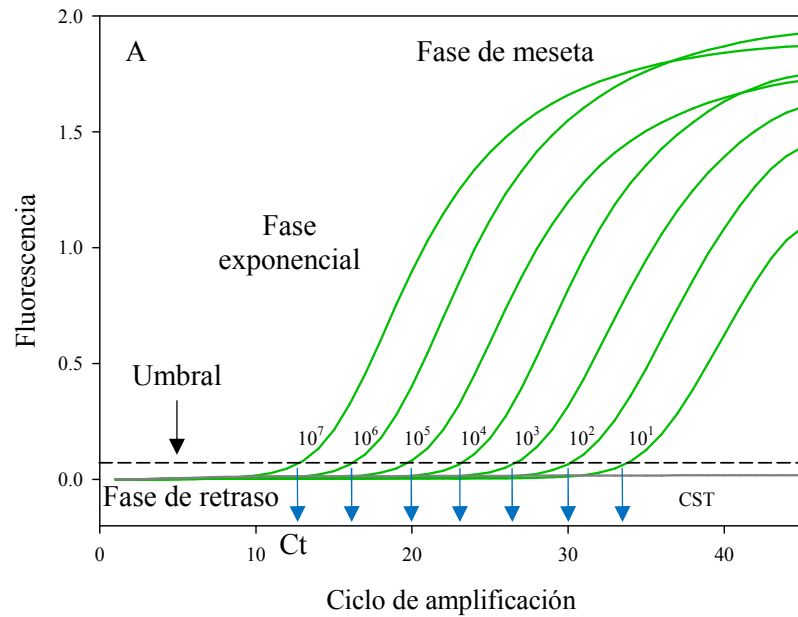


Figura 1.9. PCR en tiempo real de diluciones de estándares conteniendo un gen de interés. Las curvas en verde corresponden a los estándares, y a la izquierda de cada curva se indica el número de copias del gen al inicio de la reacción. La curva en gris corresponde al control sin el agregado de ADN templado (CST). A: curva de intensidad de la fluorescencia en función del ciclo de amplificación. Se indican en la Figura las tres etapas de la reacción (fase de retraso, exponencial y meseta). Línea punteada: umbral de fluorescencia o *threshold*. Las flechas azules indican el Ct o ciclo en el que cada reacción alcanzó la fluorescencia umbral. B: curva del logaritmo de la intensidad de fluorescencia en función del ciclo de amplificación. C: regresión simple entre el Ct de cada estándar amplificado y el logaritmo de la abundancia inicial del gen blanco en la reacción.

1.5. LAS POBLACIONES DEGRADADORAS DE HAPs EN SEDIMENTOS INTERMAREALES DE LA PATAGONIA

Previamente al comienzo de esta Tesis, en nuestro laboratorio se caracterizaron las poblaciones degradadoras de HAPs que habitan los sedimentos intermareales de Patagonia utilizando un método funcional independiente del cultivo de microorganismos [Lozada *et al.*, 2008]. Los autores de este estudio construyeron bibliotecas de productos de amplificación utilizando dos pares de cebadores. El primer par fue diseñado para detectar genes de dioxigenasas de HAPs identificados en la bacteria marina *Cycloclasticus* spp. (cebadores Cyc372F/Cyc854R, [Lozada *et al.*, 2008]). El segundo par de cebadores, en cambio, fue diseñado en base a secuencias de genes de dioxigenasas identificados en bacterias aisladas a partir de ambientes terrestres pertenecientes a las clases Betaproteobacteria y Gammaproteobacteria (cebadores Ac114F/Ac596R, [Wilson *et al.*, 1999]). La incorporación de seis degeneraciones en estos cebadores con el fin de considerar la diversidad de estas secuencias, sumado a la baja temperatura de alineado utilizada en las reacciones de amplificación permitieron la detección de siete variantes de genes de dioxigenasas en los sedimentos intermareales, cinco de las cuales (que los autores denominaron: A a E) presentaban bajas identidades con genes previamente descritos (58 a 68% de identidad al nivel de aminoácidos, Figura 1.10, [Lozada *et al.*, 2008]). Las otras dos variantes detectadas estaban cercanamente relacionadas con los genes *nahAc* (*Pseudomonas* spp.) y *phnAc* (*Alcaligenes faecalis* AFK2 y otras betaproteobacterias) [Lozada *et al.*, 2008].

En este estudio, las variantes A a E fueron detectadas únicamente en sedimentos de Bahía Ushuaia, a pesar de que se analizaron muestras obtenidas a lo largo de 12° de latitud de la costa Patagónica [Lozada *et al.*, 2008]. Además, el tipo y número de variantes detectadas y sus abundancias relativas variaron entre las distintas muestras analizadas [Lozada *et al.*, 2008; Dionisi *et al.*, 2011]. Estas muestras también presentaron diferencias en la concentración, tipo y número de HAPs detectados. Notablemente, se observó una correlación positiva entre la cantidad de variantes de genes detectados en las bibliotecas de productos de amplificación y el número de HAPs presentes en las muestras, sugiriendo que las variantes detectadas con estos cebadores podrían presentar preferencias por distintos sustratos [Lozada *et al.*, 2008; Dionisi *et al.*, 2011]. Algunas de las variantes presentaron una alta abundancia relativa dentro de las bibliotecas, en particular los genes arquetípicos *nahAc* y *phnAc*. Algunas variantes se identificaron en más de una biblioteca, e incluso algunas de ellas fueron encontradas en

muestras de un mismo sitio, obtenidas en distintos años. Estos resultados sugieren que poblaciones bacterianas conteniendo estos genes podrían ser miembros estables dentro de la comunidad microbiana del sedimento [Lozada *et al.*, 2008]. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, las frecuencias relativas observadas en las bibliotecas de productos de amplificación no permiten hacer inferencias sobre la importancia ecológica de las poblaciones que llevan estos genes [Kanagawa, 2003; Dionisi *et al.*, 2011].

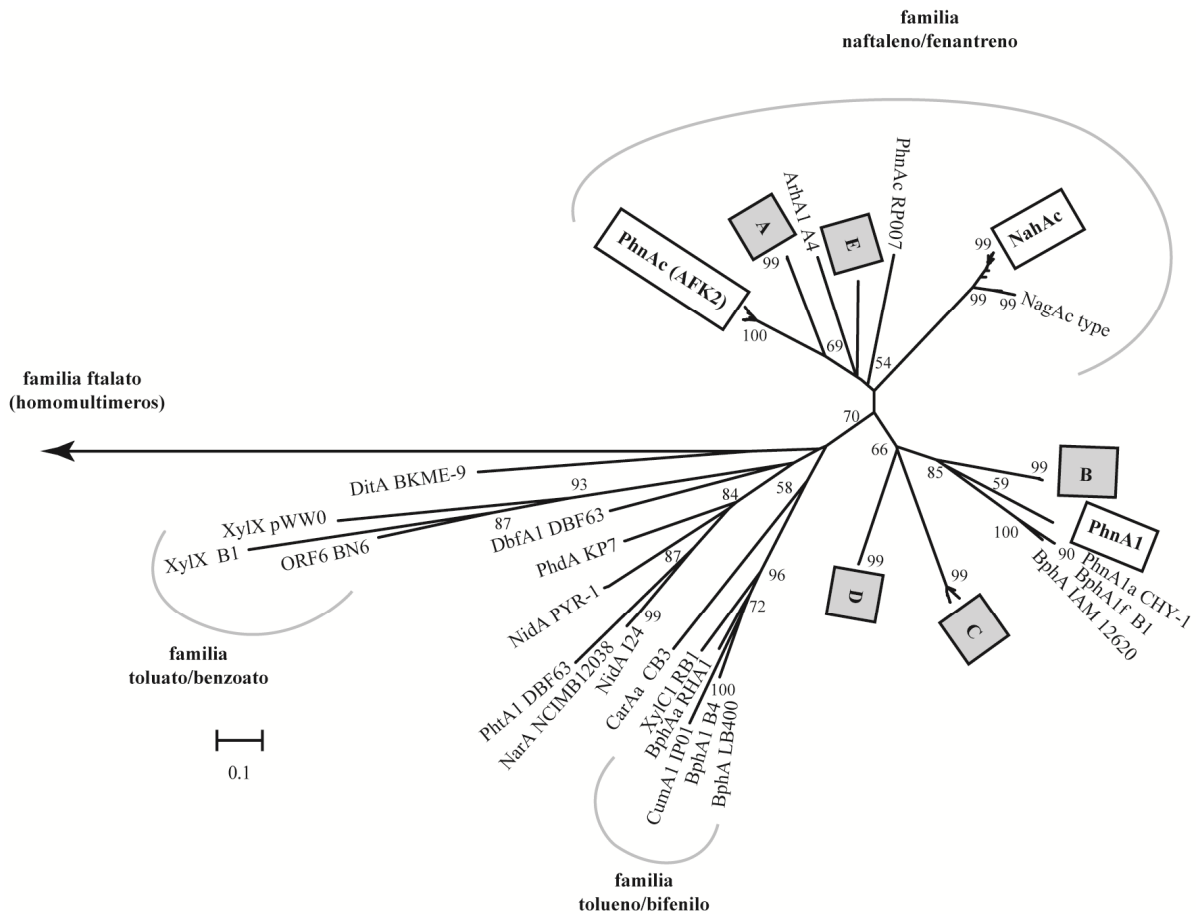


Figura 1.10. Relaciones filogenéticas entre secuencias deducidas de aminoácidos de variantes de genes de dioxigenasas de compuestos aromáticos identificados en Patagonia y secuencias relacionadas obtenidas de la base de datos de GenBank. Figura modificada de [Lozada *et al.*, 2008]

Por otra parte, los cebadores Cyc372F/Cyc854R permitieron detectar en la mayoría de los sedimentos analizados de Patagonia la presencia de genes *phnA1*, con altos valores de identidad con aquellos identificados en *Cycloclasticus* spp. [Lozada *et al.*, 2008]. Esta bacteria marina se especializa en la biodegradación de HAPs y presenta una distribución

biogeográfica ampliamente distribuida en el medio ambiente marino [Staley, 2010], por lo que no resulta sorprendente su presencia en los sedimentos marinos de Patagonia. Sin embargo, existen pocos indicios sobre la relevancia ecológica de este género en la región Patagónica [Lozada *et al.*, 2008; Dionisi *et al.*, 2011].

1.6. OBJETIVOS

El conocimiento de los mecanismos que controlan el crecimiento y la actividad de las poblaciones bacterianas capaces de degradar hidrocarburos resulta fundamental para el desarrollo de estrategias de biorremediación eficientes y confiables, que puedan ser utilizadas tanto en casos de contaminación crónica como de derrames accidentales de magnitud. El conocimiento de cuáles son las poblaciones microbianas claves para este proceso es el primer paso para lograr dicha comprensión. Esta información es además indispensable para el desarrollo de herramientas moleculares rápidas y precisas para el monitoreo de la capacidad degradativa de las comunidades microbianas de los ambientes contaminados. Dichas herramientas permitirán una rápida caracterización de los sitios impactados por un derrame, aportando información esencial para la toma de decisiones sobre la estrategia más adecuada en cada sitio impactado, minimizando el tiempo y el costo asociados con la biorremediación [Lebrón *et al.*, 2011]. Además, estas herramientas contribuirán en el monitoreo del proceso, por ejemplo determinando rápidamente si la estrategia seleccionada tuvo el efecto deseado sobre la abundancia o la actividad de las poblaciones degradadoras [Lebrón *et al.*, 2011].

Dada la importancia de los procesos degradativos naturales sobre la calidad ambiental de los ambientes costeros de la Patagonia, en el Laboratorio de Microbiología Ambiental del CENPAT nos planteamos la necesidad de estudiar en profundidad a las comunidades microbianas de los ambientes contaminados con hidrocarburos de la costa Patagónica, y en particular a las poblaciones bacterianas que participan en la biodegradación de HAPs. Se seleccionaron a las poblaciones degradadoras de HAPs debido a su persistencia en el medio ambiente y a su peligrosidad tanto para la salud humana como de los organismos acuáticos, por lo que constituyen contaminantes prioritarios para su biorremediación. Esta información será de gran importancia para el diseño de protocolos de biorremediación y herramientas de monitoreo de la capacidad degradativa específicas para los ambientes costeros de la Patagonia. En base a estas necesidades, el **objetivo general** de esta Tesis fue:

Incrementar nuestros conocimientos sobre las poblaciones bacterianas ecológicamente relevantes para la biodegradación de HAPs en sedimentos contaminados con hidrocarburos de la costa Patagónica.

Para lograr este objetivo general, se plantearon los siguientes **objetivos específicos**:

1. Estudiar las concentraciones de hidrocarburos, en particular HAPs, en sedimentos intermareales con un alto grado de exposición a contaminación con hidrocarburos de sitios seleccionados en dos regiones biogeográficas de la costa Patagónica
2. Explorar la estructura y estimar la diversidad de comunidades bacterianas que habitan los sedimentos intermareales de estas dos regiones, como una primera aproximación al conocimiento de las comunidades que habitan los ambientes intermareales contaminados con hidrocarburos de la Patagonia
3. Diseñar y optimizar herramientas moleculares que permitan cuantificar las variantes de genes de dioxigenasas de HAPs detectadas previamente en sedimentos intermareales de la Patagonia
4. Utilizando estas herramientas, estudiar la abundancia, diversidad y distribución biogeográfica a nivel regional de estas variantes de genes de dioxigenasas
5. Identificar variantes de genes de dioxigenasas de compuestos aromáticos relacionadas con bacterias Gram-positivas presentes en ambientes costeros de Patagonia crónicamente contaminados con hidrocarburos

Capítulo 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE SEDIMENTOS INTERMAREALES

Para la obtención de muestras de sedimentos intermareales se utilizaron tubos de acrílico de 4,4 cm de diámetro interno y 25 cm de largo, con el fin de mantener la estratificación del sedimento. En todos los casos sólo se conservó la capa más superficial del sedimento (0 a 3 cm). Las muestras fueron obtenidas durante la marea baja partir de 7 - 10 puntos elegidos al azar a lo largo de la línea de marea, separados por aproximadamente 1 m de distancia. Estos sedimentos fueron combinados para obtener una muestra compuesta. Las muestras fueron mantenidas a 4°C durante su traslado al laboratorio, y una vez en el mismo fueron homogeneizadas completamente y separadas en alícuotas, las cuales fueron almacenadas a -20°C para los análisis químicos o a -80°C para los análisis moleculares [Lozada *et al.*, 2008]. Los nombres asignados a las muestras consisten en el nombre abreviado del sitio y los dos últimos dígitos del año de muestreo. La lista de las muestras analizadas en este estudio, junto con información sobre la localización de las mismas se detalla en la Tabla 3.1. La localización de los sitios de muestreo más relevantes para esta Tesis se muestra en la Figura 3.1.

2.2. ANÁLISIS FÍSICOS, QUÍMICOS Y AMBIENTALES DE LOS SEDIMENTOS

Los siguientes parámetros físico-químicos y ambientales fueron determinados en las muestras de sedimentos: posición geográfica precisa, temperatura, pH, potencial de óxido-reducción, granulometría, materia orgánica, concentración de amonio, y concentración de

hidrocarburos alifáticos y HAPs. A continuación se detalla brevemente el procedimiento para la obtención de estos datos.

2.2.1. Posición geográfica precisa

Las coordenadas de latitud y longitud fueron registradas utilizando un equipo GPS eTrex Legend (Garmin, Olathe, KS, Estados Unidos).

2.2.2. Temperatura, pH y potencial de óxido reducción

Estos datos se registraron *in situ* durante el muestreo, utilizando un equipo portátil SG8 SevenGo pro™ (Mettler-Toledo, Columbus, OH, Estados Unidos). Para cada uno de los parámetros se tomaron diez valores en el sitio de muestreo, que luego fueron promediados y se calculó el desvío estándar de las mediciones.

2.2.3. Granulometría

La granulometría de las muestras de sedimentos intermareales se determinó por tamizado en seco, con tamices de 2 mm y 63 μm [Commendatore y Esteves, 2004]. Se separó la fracción correspondiente a grava (tamaño de partículas > 2 mm), arena (entre 2 mm y 63 μm) y partículas finas (tamaño < 63 μm), y se calculó el porcentaje que representaban los distintos tamaños de granos con respecto a la muestra total analizada. Las muestras se analizaron por triplicado.

2.2.4. Porcentaje de materia orgánica

El peso seco de los sedimentos se obtuvo secando volúmenes conocidos de sedimento húmedo a 105°C hasta alcanzar un peso constante. Luego, el sedimento seco se calcinó en una mufla a 450°C durante 4 h y se registró el peso calcinado de los sedimentos [Commendatore y Esteves, 2004]. Las muestras de sedimentos se analizaron por triplicado, y el porcentaje de materia orgánica se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Materia Orgánica} = [(\text{peso seco} - \text{peso calcinado}) / \text{peso seco}] \times 100$$

2.2.5. Concentración de amonio total

La concentración de amonio extractable o total en las muestras se determinó por triplicado, de la siguiente manera: 20 g de sedimento húmedo se mezclaron con 20 ml de KCl 2N, se agitaron durante 20 min y posteriormente se centrifugaron ($21.000 \times g$) durante 20 min a 4°C [Kemp *et al.*, 1990]. Luego se determinó el amonio extraído en el sobrenadante de acuerdo a la técnica de Strickland y Parsons [Strickland y Parsons, 1972], utilizando KCl 2N como blanco. Brevemente, 25 ml del sobrenadante o blanco se combinaron con 1 ml de solución de fenol (fenol en etanol, 10% p/v) y 1 ml de solución de nitroprusiato de sodio 0,5% p/v, agitando luego del agregado de cada solución. Luego se agregaron 2,5 ml de solución oxidante (reactivo alcalino¹ en hipoclorito de sodio, dilución 4:1), se agitó y se cubrió el frasco con papel de aluminio para evitar contaminación con amonio atmosférico [Strickland y Parsons, 1972]. Los frascos se dejaron incubar a temperatura ambiente y protegidos de la luz durante 1 h, y luego se determinó la absorbancia a 640 nm en un espectrofotómetro HP 8452A. Los valores de absorbancia se compararon con una curva de calibrado preparada a partir de una solución de amonio con una concentración de 1,5 μg de átomos de nitrógeno/ml. Para preparar la solución de amonio, se disolvieron 0,1 g de sulfato de amonio en 1.000 ml de agua destilada, y se agregó 1 ml de cloroformo. Luego se realizaron diluciones de la solución de amonio cubriendo el rango de 0,75 a 3 μg de átomos de nitrógeno/l y se graficó la absorbancia en función de la concentración de amonio. Esta curva de calibrado permitió calcular la concentración de NH_4^+ en la muestra, que fue expresada como nmoles/g PSS.

¹Para preparar el reactivo alcalino, se combinaron 20 g de citrato de sodio con 1 g de NaOH, llevándose a volumen de 100 ml con agua bidestilada.

2.2.6. Concentración de hidrocarburos alifáticos

2.2.6.1. Extracción y fraccionamiento de los hidrocarburos

Para la extracción y fraccionamiento de los hidrocarburos, 50 g de sedimento seco fueron digeridos con 100 ml de metanol y 3 g de KOH [Commendatore *et al.*, 2000]. La fracción no saponificable fue extraída dos veces con 25 ml de hexano, y posteriormente los extractos combinados se secaron con sulfato de sodio anhidro y se evaporaron a temperatura ambiente hasta un volumen de aproximadamente 2 ml. Este volumen fue reducido a 0,2 ml mediante un

flujo suave de gas N₂ a temperatura ambiente [Commendatore *et al.*, 2000]. El extracto final fue sembrado en columnas de cromatografía de alúmina totalmente activada para la limpieza y separación de los hidrocarburos. La fracción correspondiente a los hidrocarburos alifáticos se obtuvo por elución con hexano y fue medida por cromatografía gaseosa de alta resolución [Commendatore *et al.*, 2000].

2.2.6.2. Determinación de hidrocarburos alifáticos por cromatografía gaseosa de alta resolución

La fracción de hidrocarburos alifáticos obtenida anteriormente (sección 2.2.6.1) se inyectó en un cromatógrafo gaseoso Thermo Trace con autoanalizador TriPlus (Thermo Electron Corporation, Whaltman, MA, Estados Unidos), utilizando una columna capilar fase DB5 (J & W Scientific, Folsom, CA, Estados Unidos) de 30 m × 0,25 mm i.d. × 0,25 μm, detector de ionización de llama (FID) y sistema de inyección Split-splitless (1,2 min). Las muestras se analizaron en el modo splitless usando gas nitrógeno como fase móvil, a una velocidad de 1 ml/min [Commendatore y Esteves, 2004]. Las temperaturas del inyector y del detector FID fueron de 250 y 320°C, respectivamente. El programa de temperaturas del horno fue de 60°C durante 2 min, con una rampa de 8°C/min, hasta alcanzar una temperatura final de 300°C (20 min). Los hidrocarburos alifáticos resueltos se identificaron en base a los tiempos de retención de estándares externos y se cuantificaron usando los factores de respuesta de los compuestos individuales. Se efectuó un blanco para controlar la limpieza del procedimiento completo. Para cada muestra se midió: la concentración de *n*-alcanos individuales desde *n*-C10 hasta *n*-C35, la concentración de los isoprenoides pristano (Pr) y fitano (Fi), los *n*-alcanos resueltos totales (ART), la mezcla compleja no resuelta (MCNR), y la concentración de hidrocarburos alifáticos totales (AT) [Commendatore y Esteves, 2004]. La MCNR incluye cicloalcanos, alcanos ramificados y otros compuestos no resueltos por la columna capilar [Guibert *et al.*, 2012]. Los AT se calcularon como la suma de ART y la MCNR [Commendatore y Esteves, 2004]. Para cada muestra se calcularon los siguientes índices composicionales [Commendatore y Esteves, 2004]:

- a) *n*-C17/Pr y *n*-C18/Fi: indican el grado relativo de biodegradación de *n*-alcanos. Valores bajos de estos índices sugieren la presencia de petróleo degradado y valores altos sugieren poca degradación. Cuando las concentraciones de hidrocarburos son altas, estos índices también sugieren aportes recientes de hidrocarburos al ambiente.

- b) $\sum n\text{-alc}/\text{MCNR}$: este índice se utiliza para estimar el grado de degradación relativa de los hidrocarburos. Valores bajos indican la presencia de un proceso de degradación, mientras que valores altos sugieren nuevos aportes de petróleo fresco.
- c) $\sum \text{Par}/\sum \text{Impar}$: se calcula como la sumatoria de n -alcanos de cadena par sobre la sumatoria de n -alcanos de cadena impar y sugiere el origen de los hidrocarburos. Los hidrocarburos del petróleo en general no muestran predominancia de un tipo de alcano sobre el otro, mientras que los hidrocarburos de origen vegetal pueden ser 8 a 10 veces más ricos en alcanos impares que pares.
- d) $\sum n\text{-alc}/n\text{-C16}$: esta relación tiende a ser baja (< 15) en muestras contaminadas con petróleo, y toma valores más altos (> 50) para hidrocarburos de origen biológico.
- e) IPC, o índice de preferencia de carbono: se calcula como $2(\text{C27} + \text{C29})/\text{C26} + (2\text{C28}) + \text{C30}$ [Boehm y Requejo, 1986] y está asociado al origen de los hidrocarburos. Los hidrocarburos de origen petrogénico toman valores de este índice cercanos a 1, mientras que las plantas vasculares y sedimentos no contaminados tienen valores de este índice que varían entre 3 y 6.

2.2.7. Concentración de HAPs

La concentración de HAPs se determinó utilizando cromatografía gaseosa con detector de masa, siguiendo la metodología previamente descrita por US EPA 8100 [SW-846, 2007], Dean [Dean, 1998] y Sloan [Sloan *et al.*, 2005]. Las muestras de sedimentos fueron mezcladas con Na_2SO_4 anhidro y se extrajeron durante 12 h con diclorometano (CH_2Cl_2) utilizando un equipo Soxhlet. Los extractos se filtraron a través de filtros de $0,45 \mu\text{m}$ y se concentraron a presión reducida hasta alcanzar un volumen final de 1 ml. Se inyectaron $2 \mu\text{l}$ en un cromatógrafo gaseoso Shimadzu modelo 17A V 1.3 con detector de masas QP 5050A y una estación de trabajo Class 5000 (Shimadzu Corp., Kyoto, Japón) en modo SIM (monitoreo de iones seleccionados) con los iones característicos de los HAPs buscados. Se utilizó una columna PTE5-MS de $30 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm i.d. (diámetro interno)} \times 0,25 \mu\text{m}$ (Supelco-Bellafonte, PA, Estados Unidos). La identificación se realizó por comparación espectral. Se emplearon patrones certificados Supelco en una concentración de $0,01 \text{ mg/ml}$ de: Naftaleno, Acenaftileno, Acenafteno, Fluoreno, Fenantreno, Antraceno, Fluoranteno, Pireno, Benzo[*a*]antraceno, Criseno, Benzo[*b*]fluoranteno, Benzo[*k*]fluoranteno, Benzo[*a*]pireno, Dibenzoantraceno, Benzoperileno e Indenopireno.

2.3. EXTRACCIÓN DE ADN

2.3.1. Extracción de ADN metagenómico de muestras de sedimento

Las extracciones de ADN metagenómico se realizaron por duplicado a partir de 0,8 a 1 g de sedimentos (peso húmedo) utilizando el kit de purificación FastDNA para suelos (FastDNA[®] SPIN kit for soil, MP Biomedicals, Solon, OH, Estados Unidos). Se siguieron las instrucciones del fabricante, con las siguientes modificaciones: las muestras se homogeneizaron 3 veces durante 50 s con intervalos de 1 min en hielo utilizando un mini-beadbeater Biospec (Bartlesville, OK, Estados Unidos) a aproximadamente 5.000 rpm (máxima velocidad del equipo) y el ADN se eluyó en 150 µl de Tris-HCl 10 mM pH 8 preparado en agua destilada de calidad para biología molecular (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos). Las dos extracciones se combinaron y almacenaron a -80°C hasta su análisis.

2.3.2. Extracción de ADN plasmídico

2.3.2.1. Método de extracción manual

Soluciones y medios de cultivo utilizados [Sambrook y Russell, 2001]:

- **Medio de cultivo LB (Luria-Bertani)**

Se disolvieron en 1.000 ml de agua destilada: 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl. Se ajustó el pH a 7 y se esterilizó por autoclave.

- **Solución de STE**

10 mM Tris-Cl (pH 8), 0,1 M NaCl y 1 mM EDTA (pH 8). La solución preparada en agua destilada se esterilizó por autoclave y luego se almacenó a 4°C.

- **Solución de lisis alcalina I**

50 mM glucosa, 25 mM Tris-Cl (pH 8) y 10 mM EDTA (pH 8). La solución preparada en agua destilada se esterilizó por autoclave y se almacenó a 4°C.

- **Solución de lisis alcalina II**

Se preparó fresca el mismo día en que fue utilizada, diluyendo 0,2 N NaOH y 1% p/v SDS en agua destilada estéril.

- **Solución de lisis alcalina III**

Se preparó combinando 60 ml de acetato de potasio 5M con 11,5 ml de ácido acético glacial, y llevando a volumen final de 100 ml con agua destilada. La solución se almacenó a 4°C.

Procedimiento: Para la extracción de ADN plasmídico por el método de lisis alcalina [Sambrook y Russell, 2001], se inocularon 3 ml de medio LB conteniendo el antibiótico kanamicina (Km, 50 µg/ml) con una colonia aislada de *Escherichia coli* DH5- α conteniendo el plásmido de interés. Los cultivos se dejaron crecer a 37°C durante 12 a 16 h con agitación vigorosa (200 rpm) y luego se centrifugaron a máxima velocidad por 30 s. Las células recuperadas por centrifugación se resuspendieron en 500 µl de STE frío y se centrifugaron nuevamente para eliminar los restos de medio de cultivo. Para la lisis, las células se resuspendieron en 100 µl de solución de lisis alcalina I fría y se mezclaron vigorosamente utilizando un agitador. Luego, se agregaron 200 µl de solución de lisis alcalina II y se mezcló por inversión. Se agregaron a la suspensión bacteriana 150 µl de solución de lisis alcalina III fría, y luego de mezclar por inversión, se colocó el tubo en hielo durante 3 – 5 min. El lisado bacteriano se centrifugó a máxima velocidad (14.000 \times g) durante 5 min y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo. La precipitación de los ácidos nucleicos se logró agregando 2 volúmenes de etanol, mezclando vigorosamente con un vortex y dejando reposar los tubos a temperatura ambiente durante 2 min. Los tubos se mantuvieron a -20°C durante aproximadamente 2 h para optimizar la recuperación de los plásmidos. Los ácidos nucleicos precipitados se recolectaron centrifugando a máxima velocidad (14.000 \times g) durante 5 min, se eliminó el sobrenadante y se agregó 1 ml de etanol 70%, mezclando nuevamente por inversión. El ADN se recuperó centrifugando durante 2 min y eliminando el sobrenadante. Los tubos se dejaron abiertos durante unos minutos para permitir la evaporación de los restos de etanol, y los ácidos nucleicos finalmente se disolvieron en 50 µl de buffer (solución amortiguadora de pH) Tris-Cl pH 8 y se almacenaron a -20°C.

2.3.2.2. Método de extracción comercial

Se realizó utilizando el kit QIAprep[®] Spin Miniprep Kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA, Estados Unidos) siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.4. ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

El ADN purificado de los sedimentos, los plásmidos purificados y los productos de PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa preparados en buffer TBE 0,5× [Sambrook y Russell, 2001]. El buffer TBE 5× se preparó combinando 54 g de base Tris, 27,5 g de ácido bórico y 20 ml de 0,5 M EDTA en 1.000 ml de agua destilada. Luego, este buffer se diluyó a una concentración 0,5× para obtener la solución de trabajo. Los geles de agarosa se prepararon combinando la cantidad adecuada de agarosa con el buffer TBE 0,5×, y calentando la solución en un microondas hasta su disolución. Para analizar el ADN purificado de los sedimentos se utilizaron concentraciones de agarosa de 0,8% p/v y para analizar los productos de PCR o plásmidos se utilizaron concentraciones en el rango de 1,2 a 1,5% p/v, dependiendo del tamaño de los fragmentos a separar. La solución de agarosa caliente se colocó en un molde y se dejó gelificar a temperatura ambiente, y luego, el gel de agarosa se colocó en una cuba de electroforesis y se cubrió con buffer TBE 0,5×. Las muestras de ADN se mezclaron con buffer para cargar el gel solución IV (0,25% azul de bromofenol y 40% (v/v) de sacarosa en agua, [Sambrook y Russell, 2001]) y se sembraron en los pocillos del gel de agarosa. Luego, se aplicó voltaje a las cubas de electroforesis para permitir la migración del ADN. Los geles se tiñeron en 0,5 µg/ml de bromuro de etidio y se visualizaron y obtuvieron imágenes en un documentador de geles Bio-Vision (Vilber Lourmat, Francia).

2.5. CUANTIFICACIÓN DE ADN

2.5.1. Ensayo de cuantificación de ADN utilizando el colorante EvaGreen

El ADN purificado a partir de los sedimentos fue cuantificado utilizando el colorante EvaGreen (Biotium, Hayward, CA, Estados Unidos) en un equipo de PCR en tiempo real Chromo4 (BioRad, Hercules, CA, Estados Unidos) [Wang *et al.*, 2006]. Se utilizó el ADN del fago λ (Promega, Madison, WI, Estados Unidos) como estándar. Para la cuantificación, se

preparó una mezcla de reactivos en un volumen final por reacción de 10 μ l, conteniendo: 2 \times EvaGreen y buffer TE pH 8 filtrado a través de filtros de 0,45 μ m. Luego se agregó a esta mezcla de cuantificación 10 μ l de una dilución 1:10 o 1:5 del ADN extraído de los sedimentos en el mismo buffer TE. Simultáneamente, se preparó una curva de calibrado realizando diluciones del ADN del fago λ en el rango de 0 a 2 ng/ μ l. Los tubos de qPCR conteniendo la mezcla de reactivos y la dilución de ADN se sellaron y se incubaron en oscuridad durante 2 a 5 min. Luego se realizaron las mediciones de fluorescencia utilizando el siguiente programa: un paso inicial de incubación durante 30 s a 95°C, un paso de 30 s a 65°C y finalmente una etapa de lectura de fluorescencia. Las curvas de calibrado se prepararon graficando la fluorescencia cuantificada para las diluciones del fago λ (previamente restado el valor de fluorescencia del blanco) en función de la masa de ADN. Estas curvas se utilizaron para calcular la concentración de ADN de las muestras incógnita. Las dos diluciones de cada muestra se cuantificaron por triplicado y se calculó el promedio de estos valores.

2.5.2. Ensayo de cuantificación de ADN utilizando el colorante Hoechst 33258

La cuantificación del ADN se realizó utilizando un fluorómetro Hoefer[®] DyNA Quant 200 (Hoefer Pharmacia Biotech, San Francisco, CA, Estados Unidos) y el colorante de unión al ADN Hoechst 33258 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, Estados Unidos), siguiendo el protocolo sugerido en el manual del equipo. Se utilizó como estándar ADN de timo de ternero, en una concentración de 100 μ g/ml.

2.6. ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA DE LA COMUNIDAD MICROBIANA

2.6.1. Amplificación y pirosecuenciación de la región V4 del gen ARNr 16S

La pirosecuenciación del fragmento V4 del gen ARNr 16S a partir de muestras de sedimentos se realizó en el Laboratorio de Genómica y Bioinformática del Instituto de Agrobiotecnología de Rosario (INDEAR, Rosario, Argentina). Los cebadores utilizados para la amplificación de esta región, obtenidos de la plataforma bioinformática para análisis de datos de pirosecuenciación del Ribosomal Database Project (RDP's pyrosequencing pipeline, <http://pyro.cme.msu.edu/index.jsp>), se indican en la Tabla 2.1. Los cebadores están

precedidos por un adaptador requerido para la secuenciación (subrayado) y por una secuencia de 10 nucleótidos denominada “MID” (por *multiple identifier*, o identificador múltiple) o “barcode” (en negrita se muestra un ejemplo), la cual permite identificar secuencias pertenecientes a distintas muestras ambientales que se hayan secuenciado simultáneamente.

Tabla 2.1. Cebadores utilizados para amplificar la región variable V4 del gen ARNr 16S

Cebador	Secuencia (5' – 3')
520F	<u>CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG</u> ACGAGTGCGT <u>A</u> Y TGGG Y dTAAAG n G
	<u>CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTACC</u> r GGG h TCTAATCC
802R	<u>CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTACC</u> CAGAGTATCTAATTC
	<u>CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCTAC</u> dsr GGT m TCTAATC
	<u>CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTAC</u> nv GGGTATCTAATCC

Las letras en rojo corresponden al código IUPAC para bases degeneradas

Se realizaron 4 reacciones de amplificación independientes para cada muestra, que fueron combinadas antes de su secuenciación. La mezcla de amplificación, con un volumen final de 25 µl, contenía los siguientes reactivos: 1× buffer de reacción FastStart High Fidelity (Roche Applied Science, Mannheim, Alemania), 0,4 µM de cada cebador (en el caso de los cebadores 802R, se utilizó 0,1 µM de cada uno de los cuatro cebadores indicados en la Tabla 2.1), 200 µM de dNTPs, 1,25 U de enzima polimerasa FastStart High Fidelity Blend (Roche Applied Science, Mannheim, Alemania) y 20 ng de ADN templado. Las condiciones de amplificación consistieron en un paso inicial de desnaturalización a 95°C durante 5 min, seguido de 30 ciclos de incubación a 95°C por 45 s, 57°C por 45 s y 72°C por 60 s, y un paso final de extensión durante 4 min a 72°C [Guibert et al., 2012]. Se incluyeron dos controles negativos de amplificación, los cuales contenían todos los reactivos de la mezcla de amplificación, con excepción del ADN templado. Luego de combinar los productos de amplificación generados a partir de cada muestra, los mismos fueron purificados usando el kit Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter Genomics, Danvers, MA, Estados Unidos). Posteriormente, el ADN

purificado fue cuantificado utilizando el kit Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA (Invitrogen Molecular Probes Inc., Carlsbad, CA, Estados Unidos).

Los productos de amplificación purificados de todas las muestras fueron combinados utilizando igual cantidad de moléculas de cada muestra, y luego los mismos se unieron a micro-esferas en condiciones que favorecieran la unión de un solo fragmento de ADN por esfera. El ADN contenido en las micro-esferas fue posteriormente amplificado mediante una PCR en emulsión: las hebras fueron desnaturalizadas y las micro-esferas conteniendo fragmentos de ADN de simple hebra fueron colocados en los pocillos de una placa PicoTiterPlate (454 Life Sciences, Roche Applied Science, Basel, Suiza) para ser pirosecuenciadas en un equipo GS FLX (454 Life Sciences, Roche Applied Science, Basel, Suiza) utilizando reactivos químicos Titanium.

2.6.2. Análisis de las secuencias obtenidas por pirosecuenciación

2.6.2.1. Análisis de calidad de las secuencias obtenidas

Para el análisis de las secuencias se utilizó el programa bioinformático mothur v.1.22.2 [Schloss *et al.*, 2009]. Como primer paso, a fin de reducir la tasa de secuencias con errores generados durante la secuenciación, se eliminaron todas aquellas secuencias que tuvieran al menos una base ambigua (N), homopolímeros superiores a 6 nt, más de una diferencia con los identificadores (*barcodes*) y más de dos errores con la secuencia de los cebadores [Schloss *et al.*, 2011]. Además, se calculó el promedio de la puntuación de calidad en fragmentos de 50 nt de las secuencias, y se cortaron las secuencias cuando estos valores de calidad disminuyeron por debajo de 25 [Schloss *et al.*, 2011]. De las secuencias que se conservaron, se eliminaron los fragmentos de correspondientes a los cebadores y a los *barcodes*. Finalmente, debido a que la tasa de evolución del gen de ARNr 16S no es uniforme a lo largo de toda su longitud, las secuencias se cortaron de manera que todas tuvieran la misma longitud: todas las secuencias comenzaban en el mismo sitio luego de la eliminación de los cebadores, mientras que el final de las secuencias se estableció en la posición en donde terminaban el 85% de las secuencias alineadas [Schloss, 2010; Schloss y Westcott, 2011].

2.6.2.2. Alineamiento y agrupamiento en OTUs de las secuencias

Las secuencias únicas que pasaron el control de calidad fueron alineadas de a pares utilizando como alineamiento templado la base de datos SILVA [Pruesse *et al.*, 2007]. Una vez alineadas, y como método de control adicional para disminuir la tasa de errores, las secuencias fueron pre-agrupadas de la siguiente manera: las secuencias únicas alineadas se ordenaron de acuerdo a su frecuencia, y la secuencia más abundante constituyó el primer grupo. Las secuencias subsiguientes en orden de abundancia fueron comparadas con la lista creciente de grupos, y si las mismas presentaban hasta dos diferencias con la secuencia dominante (99% identidad) eran incorporadas al mismo grupo, en caso contrario, constituían un grupo independiente ([Schloss *et al.*, 2011], adaptación del método de [Huse *et al.*, 2010]). En esta instancia se realizó nuevamente un paso de control de calidad de secuencias, que involucró la eliminación de quimeras con la herramienta Chimera Slayer [Haas *et al.*, 2011].

El método utilizado para agrupar las secuencias en OTUs fue el del “vecino promedio” (*average neighbor*), en el cual una secuencia es incorporada a un grupo preexistente si su porcentaje de identidad con todas las secuencias que integran el grupo es en promedio mayor o igual a un determinado umbral fijado por el usuario. Este método de agrupamiento fue propuesto como el más apropiado para reducir la formación de OTUs espúreos [Huse *et al.*, 2010]. El umbral de identidad utilizado en este estudio para agrupar las secuencias fue de 97%. A partir de esta información se construyó una tabla de OTUs, que consiste en una matriz con los nombres de los OTUs (y su asignación taxonómica) en las filas y los nombres de las muestras en las columnas. Esta tabla contiene información sobre la abundancia absoluta de cada OTU en cada muestra.

2.6.2.3. Asignación taxonómica de los OTUs

Secuencias representativas de cada OTU fueron comparadas con la base de datos curada manualmente del RDP [Wang *et al.*, 2007a] con el fin de identificarlas filogenéticamente. El valor de confianza establecido para cada asignación fue del 50%. Este valor representa un consenso mínimo que debe ser alcanzado para poder clasificar a una secuencia dentro de un determinado nivel taxonómico. Si no se alcanzó este valor, la secuencia fue asignada al nivel taxonómico inmediato superior que iguale o supere dicho valor consenso. Las secuencias clasificadas como organelas fueron eliminadas.

2.6.2.4. Diversidad alfa

Utilizando el programa bioinformático mothur v.1.22.2 [Schloss *et al.*, 2009], se calcularon las siguientes métricas de diversidad:

- a) OTUs observados (S_{obs}): es la cantidad de OTUs que se observan cuando se agrupan las secuencias de acuerdo a un determinado porcentaje de similitud, en este caso 97%.
- b) Índice de diversidad alfa de Simpson Inverso ($1/D$): constituye el recíproco del índice Simpson estimador de diversidad (D , también denominado índice de dominancia de Simpson) [Simpson, 1949], y puede tomar valores de entre 1 y S_{obs} . Para el cálculo del índice D , se utilizó la siguiente fórmula:

$$D = \sum_{i=1}^{S_{obs}} \left[\frac{n_i(n_i - 1)}{N(N - 1)} \right]$$

S_{obs} = número de OTUs observados

n_i = número de individuos en el OTU i

N = número total de individuos en la comunidad

El intervalo de confianza al 95% de este índice se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula [Grundmann *et al.*, 2001]:

$$var(D) = \frac{\sum_{i=1}^{S_{obs}} \left(\frac{n_i}{N}\right)^3 - \left(\sum_{i=1}^{S_{obs}} \left(\frac{n_i}{N}\right)^2\right)^2}{0,25 N}$$

$$IC_{95\%} = D \pm 1,96 \sqrt{var(D)}$$

- c) Índice de equitatividad de Simpson ($E_{1/D}$): la equitatividad es la abundancia relativa de cada especie en la comunidad [Magurran, 2004]. El índice $E_{1/D}$ tiene un rango que varía entre 0 y 1 y prácticamente no está influenciado por las especies raras de la comunidad [Krebs, 1999].

$$E_{1/D} = \frac{1/D}{S_{obs}}$$

1/D: índice de diversidad de Simpson inverso

S_{obs} = número de OTUs observados

- d) Índice *Chao1* estimador de riqueza de especies, corregido por desvíos (S_{chao1} , [Colwell, 2006]):

$$S_{chao1} = S_{obs} + \frac{n_1 (n_1 - 1)}{2 (n_2 + 1)}$$

S_{obs} = número de OTUs observados

n_1 = número de OTUs con una única secuencia

n_2 = número de OTUs con sólo dos secuencias

El intervalo de confianza al 95% del índice *Chao1* se calculó utilizando la siguiente fórmula [Colwell, 2006]:

$$var(\hat{S}_{chao1}) = \frac{n_1(n_1 - 1)}{2(n_2 + 1)} + \frac{n_1(2n_1 - 1)^2}{4(n_2 + 1)^2} + \frac{n_1^2 n_2 (n_1 - 1)^2}{4(n_2 + 1)^4}$$

$$Limite Inferior IC_{95\%} = S_{obs} + \frac{T}{K}$$

$$Limite Superior IC_{95\%} = S_{obs} + TK$$

n_1 = número de OTUs con una única secuencia

n_2 = número de OTUs con sólo dos secuencias

S_{obs} = número de OTUs observados

$T = Chao1 - S_{obs}$

$$K = \exp \left\{ 1,96 \left[\log \left(1 + \frac{\text{var}(\hat{S}_{Chao1})}{T^2} \right) \right]^{1/2} \right\}$$

El valor mínimo que puede tomar el índice *Chao1* es el número de OTUs observados (S_{obs}), situación que se presenta cuando todas las especies fueron observadas al menos dos veces [Magurran, 2004]. Debido a que este índice se ve influenciado por el esfuerzo de muestreo, antes de calcularlo se submuestreó aquellas muestras con mayor cantidad de secuencias, para posteriormente calcular el índice basado en igual cantidad de secuencias para todas las muestras (15.304, el número de secuencias obtenidas en OR08, la muestra con menor esfuerzo de muestreo).

- e) Índice de cobertura de Good (*C*): este índice proporciona información sobre la profundidad del esfuerzo de muestreo. Fue calculado utilizando la siguiente fórmula [Good, 1953]:

$$C = 1 - \frac{n_1}{N}$$

n_1 = número de OTUs que fueron observados una única vez

N = número total de individuos muestreados

Además, se estimó el número de secuencias adicionales que es necesario analizar de una muestra para observar un nuevo OTU, calculando: $1/(1 - C)$.

- f) Curvas de rarefacción de OTUs observados en función del esfuerzo de muestreo: fueron también obtenidas utilizando el programa mothur v.1.22.2 [Schloss *et al.*, 2009]. Las curvas de acumulación de especies, o curvas colectoras, se obtienen graficando el número de especies (OTUs) observados a distintos esfuerzos de muestreo [Magurran, 2004]. El resultado de repetir este proceso numerosas veces y promediar el número de OTUs obtenidos para cada esfuerzo de muestreo son las curvas de rarefacción. En este estudio, dichas curvas se calcularon basadas en 1.000 iteraciones.

2.6.2.5. Diversidad beta

La similitud en la estructura de las comunidades bacterianas (diversidad beta) entre muestras se calculó utilizando el índice de Bray-Curtis [Bray y Curtis, 1957]. Este índice resulta apropiado para reflejar la similitud real entre comunidades, ya que tiene en cuenta tanto el número de especies compartidas como sus abundancias relativas [Bloom, 1981]. El índice de Bray-Curtis ($D_{Bray-Curtis}$) se calculó utilizando el programa mothur v 1.22.2 [Schloss *et al.*, 2009] de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$D_{Bray-Curtis} = 1 - 2 \frac{\sum \min(S_{A,i}, S_{B,i})}{\sum S_{A,i} + \sum S_{B,i}}$$

$S_{A,i}$ = número de individuos del OTU i en la comunidad A

$S_{B,i}$ = número de individuos del OTU i en la comunidad B

La matriz de Bray-Curtis de similitud entre muestras fue utilizada en un análisis de agrupamiento, y los resultados se representaron en forma de dendrograma.

2.7. ANÁLISIS DE LA ABUNDANCIA DE GENES DE DIOXIGENASAS DE HAPs EN SEDIMENTOS

2.7.1. Diseño de cebadores para los ensayos de qPCR

Se diseñaron cebadores para cuantificar por qPCR ocho grupos de genes de dioxigenasas de HAPs previamente identificados en sedimentos intermareales de la Patagonia [Lozada *et al.*, 2008]: genes A, B, C, D, E, *phnA1* (característicos del género *Cycloclasticus* [Staley, 2010]), *phnAc* (característicos de *Alcaligenes faecalis* AFK2, número de acceso a GenBank: AB024945, y otras betaproteobacterias), y *nahAc* (característicos del género *Pseudomonas* [Jiménez *et al.*, 2010]). Para el diseño de los cebadores, se realizó en primer lugar un alineamiento de todas las secuencias de ADN pertenecientes a cada uno de los grupos disponibles hasta ese momento (julio de 2007), utilizando el programa ClustalX 2.0 [Thompson *et al.*, 1997]. A partir de este alineamiento se obtuvieron las secuencias consenso para cada grupo utilizando el programa GeneFisher [Giegerich *et al.*, 1996].

El diseño de los cebadores para los ensayos de qPCR fue realizado en forma manual, teniendo en cuenta las siguientes recomendaciones [Bustin y Nolan, 2004c]:

- El tamaño óptimo del fragmento a amplificar no debe superar las 150 pb. Cuanto más pequeño sea el producto de amplificación, mejor suele ser la eficiencia de amplificación.
- La longitud óptima de los cebadores debe ser de 15 a 25 nucleótidos.
- La temperatura de desnaturalización debería ser entre 55 y 60°C.
- Ambos cebadores deberían tener aproximadamente la misma temperatura de desnaturalización, no deben diferir en más de 1 o 2°C.
- El porcentaje de GC debería ser de aproximadamente el 50%, o bien asemejarse al porcentaje del fragmento amplificado.
- Se deben evitar secuencias complementarias, especialmente en el extremo 3'.
- Se deben evitar extremos 3' muy ricos en GC, no más de 2 C o G en los últimos 5 nucleótidos.
- Se deben evitar más de 3 nucleótidos idénticos consecutivos, especialmente Gs o Cs.
- Se debe evitar una T en el extremo 3'.
- El ΔG de los cebadores no debería superar el valor de -10 kcal/mol.
- Se deben evitar los oligonucleótidos que formen estructuras secundarias o dímeros.
- Se debe evaluar la especificidad de los fragmentos a amplificar utilizando la herramienta BLAST de la base de datos de GenBank. Los cebadores deben poder hibridar eficientemente con la secuencia de interés y no debería hibridar con otras secuencias presentes en el ADN templado.

En la Tabla 2.2 se detallan los sitios de Internet que se utilizaron para el diseño de cebadores de PCR en tiempo real, y en la Tabla 4.1, la secuencia elegida para cada par de cebadores.

Por otra parte, se eligieron los cebadores 16S-1055f/16S-1392r [Lane, 1991; Ferris et al., 1996] para cuantificar genes ARNr 16S bacterianos (Tabla 4.1). Todos los oligonucleótidos fueron sintetizados por la empresa Biosearch Technologies (Novato, CA, Estados Unidos). Se utilizó el método OPC (oligo purification cartridge, por cartuchos de purificación de oligos) para la purificación de los oligonucleótidos, el cual no sólo elimina los productos químicos utilizados para la síntesis, sino que además remueve los oligonucleótidos truncados que se generan durante la síntesis.

Tabla 2.2. Sitios de Internet utilizados para realizar el diseño de los ensayos de qPCR a partir de las secuencias obtenidas en las bibliotecas de productos de amplificación y genes relacionados depositados en las bases de datos

Sitio Web	Dirección electrónica
Oligonucleotide Properties Calculator	www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html
Tm calculator	http://arep.med.harvard.edu/kzhang/cgi-bin/myOligoTm.cgi
BLAST	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
BioEdit	http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html
GeneFisher	http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/bibi/Tools_Primer_Design.html
AutoDimer	www.cstl.nist.gov/div831/strbase//AutoDimerHomepage/AutoDimerProgramHomepage.htm

2.7.2. Preparación de estándares para los ensayos de qPCR

Los estándares para los ensayos de qPCR estaban constituidos por plásmidos linealizados conteniendo las secuencias blanco específicas. Las secuencias blanco se encontraban flanqueadas por las secuencias específicas del gen (al menos 255 bases considerando ambos extremos) y estaban contenidas en el plásmido pCR4.0-TOPO[®] (TOPO TA Cloning kit for sequencing, Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos). Los clones que fueron elegidos como estándar para cada ensayo correspondían a las secuencias más representativas encontradas en sedimentos de la costa Patagónica al utilizar bibliotecas de productos de PCR de dichos genes (Tabla 2.3, [Lozada *et al.*, 2008; Dionisi *et al.*, 2011; Marcos *et al.*, 2012]). Los plásmidos utilizados como estándares en las reacciones de qPCR fueron purificados utilizando un kit de minipreparación de plásmidos QIAprep[®] Spin Miniprep Kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA, Estados Unidos). Luego, los plásmidos fueron linealizados utilizando la enzima de restricción *NotI* (Promega, Madison, WI, Estados Unidos), la cual digiere al vector pCR[®]4.0-TOPO[®] en un solo sitio y no digiere a los insertos. Los plásmidos linealizados fueron purificados nuevamente utilizando el kit Wizard SV gel and PCR clean-up system (Promega, Madison, WI, Estados Unidos) para eliminar la enzima de restricción y el buffer utilizados en la digestión. Los estándares fueron cuantificados utilizando un fluorómetro DyNA Quant 200 (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, CA, Estados Unidos) y el colorante Hoechst

33258 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, Estados Unidos). La concentración de cada estándar fue confirmada en geles de agarosa utilizando el marcador de peso molecular High DNA Mass™ Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos). El número de copias/μl de los estándares fue calculado de acuerdo a su tamaño molecular (5.407 pb para el estándar del gen ARNr 16S de Bacteria, y entre 4.399 y 4.442 pb para los estándares de los genes de dioxigenasas de HAPs) y asumiendo un peso molecular de 660 Da por cada par de bases, según la fórmula:

$$\text{Nro. copias de los estándares}/\mu\text{l} = \frac{\text{Concentr. de ADN de los estándares (g}/\mu\text{l)} \times 6,022 \times 10^{23}}{\text{Tamaño molecular (pb)} \times 660 \text{ Da}}$$

Posteriormente, los estándares se diluyeron a una concentración de 10^9 copias/μl, a partir de la cual se realizaron diluciones decimales de los estándares cubriendo el rango de 10^7 copias/reacción hasta 5 (ensayos C, E y *phnAc*) o 3 (ensayos A, B, D, *phnAl* y *nahAc*) copias/reacción. Las curvas de estándares del ensayo diseñado para cuantificar genes de ARNr 16S de Bacteria se realizaron en el rango de 10^9 a 10^2 copias del gen/reacción.

Tabla 2.3. Clones elegidos como estándares para los ensayos de qPCR.

Gen blanco	Clon	Acceso a GenBank
A	Ac-OR04-B5	AM930895
B	Ac-OR05-71	AM930915
C	Ac-OR06-180	AM930936
D	Ac-OR05-93	AM930919
E	Ac-OR06-11	AM930924
<i>phnAl</i>	Cycp-OR05-15	AM930516
<i>phnAc</i>	Ac-SC04-5	AM930890
<i>nahAc</i>	Ac-OR06-41	AM930928
ARNr 16S	16S-EC-03	-

El gen de ARNr 16S fue clonado de *Escherichia coli* DH5-α

2.7.3. Optimización de los ensayos de qPCR

Las reacciones de qPCR se realizaron en un termociclador Chromo4 (BioRad, Hercules, CA, Estados Unidos) en un volumen final de 20 μ l y utilizando los cebadores detallados en la Tabla 4.1. Los ensayos fueron optimizados para establecer sus condiciones óptimas, con el fin de alcanzar una alta especificidad, sensibilidad y reproducibilidad en los mismos. Dentro de los parámetros evaluados, se incluyeron el tipo y concentración de los reactivos utilizados y los programas de amplificación. Se evaluaron dos tipos de reactivos: (i) una mezcla preparada en el laboratorio utilizando el colorante fluorescente EvaGreen (Biotium, Hayward, CA, Estados Unidos) y (ii) una mezcla comercial conteniendo el colorante fluorescente SYBR Green (PerfeCTa[®] SYBR[®] Green Supermix, Quanta BioSciences, Inc., Gaithersburg, MD, Estados Unidos).

2.7.3.1. Optimización de ensayos utilizando una mezcla preparada en el laboratorio

Para la puesta a punto de cada ensayo se utilizaron las siguientes condiciones iniciales: 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 9, 0,1% (v/v) Triton X-100, 2,5 mM MgCl₂, 0,2 μ M dNTPs, 200, 300 o 400 nM de cebadores según los mismos tuvieran 0, 1 o 2 degeneraciones, 1 \times EvaGreen (Biotium, Hayward, CA, Estados Unidos), 0,75 U de enzima Taq polimerasa T-Free (InbioHighway, Tandil, Argentina) y 10⁶ copias del gen blanco/reacción. A partir de esta condición inicial, se optimizaron los siguientes parámetros:

- a) Programa de amplificación: para cada ensayo se realizó un gradiente de temperaturas en la etapa de alineado de los cebadores. El programa de amplificación consistió en un paso inicial de desnaturalización de 5 min a 95°C, seguido por 45 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a las temperaturas indicadas en la Tabla 2.4, 30 s a 72°C y 20 s de incubación a la temperatura de lectura indicada en la Tabla 2.4, seguido de la lectura de la fluorescencia. Al finalizar el programa de amplificación se realizó una curva de desnaturalización, que consistió en lecturas de fluorescencia a intervalos de 0,2°C, cubriendo el rango de temperaturas de 70 a 95°C.
- b) Enzima Taq polimerasa: en aquellos ensayos en los que se observó escasa amplificación del gen blanco al utilizar la enzima Taq polimerasa T-Free (InbioHighway, Tandil, Argentina), se evaluó el funcionamiento de otras dos enzimas: Taq polimerasa T-Plus (InbioHighway, Tandil, Argentina) y Taq ADN polimerasa

(Productos Bio-Lógicos, Universidad Nacional de Quilmes, Argentina). Para evaluar esta condición se amplificó una curva de estándares en el rango de 10^6 a 10 copias/reacción.

- c) Concentración del ion magnesio: se probaron las siguientes concentraciones de $MgCl_2$ para cada ensayo: 1,5 – 2 – 2,5 – 3 mM.
- d) Concentraciones de cebadores: se evaluaron todas las combinaciones posibles de concentraciones de cada cebador para 200, 400 y 600 nM.
- e) Concentración de colorante EvaGreen: se evaluaron las siguientes concentraciones de EvaGreen: $0,6\times$ – $0,8\times$ – $1\times$ – $2\times$. Para evaluar esta condición se amplificó una curva completa de estándares.
- f) Concentración de enzima Taq polimerasa: se evaluaron las siguientes condiciones: 0,75 – 1 – 1,5 – 2 U Taq/reacción.

Al finalizar cada ensayo, el umbral o *threshold* fue determinado manualmente dentro de la zona de amplificación exponencial, y en cada una de las etapas de optimización se eligió como mejor condición aquella en la cual se obtuviera el menor valor de Ct para el templado amplificado.

Tabla 2.4. Condiciones evaluadas durante la optimización del programa de amplificación de los ensayos de qPCR utilizando la mezcla combinada en el laboratorio

Ensayo	Gradiente de temperaturas de alineado de los cebadores (°C)	Temperatura de lectura de placa (°C)
A	60-61-62-63	79
B	60-61-62-63	79
C	60-61-62-63	80
D	61-62-63-64	83
E	61-62-63-64	85
<i>phnA1</i>	59-60-61-62	81
<i>phnAc</i>	58-59-60-61	79
<i>nahAc</i>	59-60-61-62	83
16S	50-55-60	-

2.7.3.2. Optimización de ensayos utilizando la mezcla comercial

Las condiciones de los ensayos de qPCR fueron también optimizadas utilizando la mezcla comercial PerfeCTa[®] SYBR[®] Green Supermix (Quanta BioSciences, Inc., Gaithersburg, MD, Estados Unidos). La puesta a punto de estos ensayos involucró la determinación de las temperaturas óptimas de alineado de los cebadores, para lo cual se utilizaron las concentraciones de cebadores que resultaron óptimas en ensayos utilizando la mezcla combinada en el laboratorio. Con excepción del ensayo *nahAc*, no fue necesario incorporar en el protocolo una temperatura mayor previa a la lectura de placa, ya que no fueron detectados dímeros de cebadores

Para determinar las temperaturas óptimas de alineado de los cebadores se utilizó como templado ADN de las siguientes muestras, en donde se tenía evidencia de la presencia del gen blanco [Lozada *et al.*, 2008]: OR04 (A), OR06 (B, C, D y E), EM06 (*phnA1* y *nahAc*) y GR06 (*phnAc*). Mayor información sobre las muestras EM06 y GR06 puede obtenerse en [Lozada *et al.*, 2008]. El programa de amplificación consistió en un paso inicial de desnaturalización de 5 min a 95°C y luego 45 ciclos de 30 s a 95°C, un gradiente de temperaturas de alineado de entre 56 y 65°C durante 30 s, 30 s a 72°C y finalmente la lectura de fluorescencia. Además, en el ensayo *nahAc*, se incorporó una etapa de incubación a 79°C durante 20 s previa a la lectura de la fluorescencia. Se eligió como temperatura de alineado óptima para cada ensayo aquella en la cual el valor de Ct del ADN templado amplificado fuera menor.

2.7.4. Determinación de la especificidad de los fragmentos de genes amplificados

Los productos de amplificación fueron evaluados para verificar si los fragmentos que estaban siendo cuantificados correspondían efectivamente al blanco de cada ensayo. Se realizaron tres análisis para verificar la especificidad de los fragmentos amplificados:

- a) Curvas de desnaturalización: luego del protocolo de amplificación se realizaron curvas de desnaturalización del ADN amplificado en un rango de temperaturas de 70 a 95°C, con incrementos cada 0,2°C. Se graficó el cambio en la intensidad de fluorescencia con la temperatura ($-dI/dT$; en donde dI es la derivada primera de la intensidad de fluorescencia y dT es el cambio en temperatura) en función de la temperatura [Bustin y Nolan, 2004a]. Se considera que un amplicón es específico cuando su temperatura de desnaturalización coincide con la de los estándares del ensayo.

- b) Electroforesis en geles de agarosa: productos de amplificación y estándares seleccionados para cada ensayo fueron sembrados en geles de agarosa al 2,5% (p/v) de acuerdo al protocolo indicado en el punto 2.4. Se evaluó si el tamaño molecular de los productos de qPCR de las muestras ambientales coincidía con el de los estándares para cada ensayo.
- c) Secuenciación de los fragmentos amplificados: los productos de qPCR fueron secuenciados ya sea directamente o luego de su clonado con el fin de confirmar inequívocamente la especificidad de los fragmentos amplificados. Productos de qPCR de los ensayos A, B y D fueron sembrados en geles de agarosa 2,5% (p/v) de acuerdo al protocolo indicado en el punto 2.4. Los productos de amplificación fueron escindidos de los geles y luego purificados utilizando el kit HiYield Gel/PCR DNA Mini Kit (Real Biotech Corporation, Taipei, Taiwán). Los productos purificados fueron secuenciados comercialmente en Macrogen (Seúl, Corea). Para el resto de los ensayos, los productos de qPCR fueron clonados en el vector pCR[®]4.0 TOPO[®] (TA Cloning Kit for Sequencing, Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos) siguiendo las instrucciones del fabricante. Entre 2 y 5 clones de cada uno de los ensayos fueron enviados a secuenciar al mismo servicio de secuenciación. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con las secuencias específicas de cada tipo de gen cuantificado.

2.7.5. Determinación de la concentración óptima de templado y análisis de su efecto inhibitorio sobre las reacciones de qPCR

La concentración de ADN templado fue optimizada para cada muestra y ensayo, eligiéndose en cada caso aquellas concentraciones en las cuales: (i) se observara en la curva de desnaturalización un pico único y coincidente con el pico específico del ensayo; y (ii) no se detectara inhibición o bien esta fuera lo más baja posible. El rango de concentraciones de ADN evaluado fue de 1 a 10 ng/reacción.

Para evaluar la presencia de inhibidores se realizaron reacciones de qPCR en un volumen final de 20 µl, conteniendo PerfeCTa[®] SYBR[®] Green Supermix (Quanta BioSciences, Inc., Gaithersburg, MD, Estados Unidos), los cebadores específicos, y a) estándar en una concentración de 10³ copias/reacción y 1 a 10 ng/reacción de muestra ambiental; o b) estándar en una concentración de 10³ copias/reacción y agua bidestilada esterilizada. Simultáneamente, se realizó una curva de estándares para calcular el número de copias del gen/µg de ADN

templado en presencia y ausencia de la muestra ambiental. El porcentaje de inhibición se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = 100 - \frac{\text{Copias del gen}/\mu\text{g de ADN en reacción a}}{\text{Copias del gen}/\mu\text{g de ADN en reacción b}} \times 100$$

Estos ensayos se repitieron para distintas concentraciones de ADN de cada muestra ambiental a fin de evaluar cómo variaba el porcentaje de inhibición dentro del rango de concentraciones de ADN ensayado.

2.7.6. Análisis del ADN de muestras ambientales por qPCR

Las muestras de sedimentos fueron analizadas utilizando los parámetros establecidos como óptimos durante la puesta a punto de los ensayos diseñados. Las reacciones de qPCR se realizaron en un termociclador Chromo4 (Bio-Rad, Hercules, CA, Estados Unidos) en un volumen final de 20 μl conteniendo 1 \times PerfeCTa[®] SYBR[®] Green Supermix (Quanta BioSciences, Inc., Gaithersburg, MD, Estados Unidos), los cebadores de la Tabla 4.1 a las concentraciones indicadas en la Tabla 4.2 y el ADN templado. El programa de amplificación consistió en un paso inicial de desnaturalización de 5 min a 95°C, seguido por 45 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a la temperatura de alineado indicada en la Tabla 4.2, 30 s a 72°C y un paso de detección de fluorescencia. En el ensayo *nahAc*, previo a la detección de fluorescencia se incorporó un paso de incubación de 20 s a 79°C para evitar la cuantificación de dímeros de cebadores [Pfaffl, 2004]. Al finalizar el programa de amplificación se realizaron curvas de desnaturalización cubriendo el rango de 70 a 95°C, con lecturas realizadas a intervalos de 0,2°C.

Para cada uno de los ensayos se prepararon curvas de estándares en el rango de 10⁷ copias/reacción hasta 5 (ensayos C, E y *pnhAc*) o 3 (ensayos A, B, D, *phnA1* y *nahAc*) copias/reacción, realizando diluciones decimales a partir del estándar 10⁹ copias/ μl , con excepción del ensayo diseñado para cuantificar el gen ARNr 16S de Bacteria, en donde se cubrió el rango de 10⁹ hasta 10² copias/reacción. Todas las muestras ambientales fueron analizadas por triplicado, utilizando la concentración de ADN determinada como óptima para cada muestra durante la puesta a punto de los ensayos. Además, todas las corridas incluyeron un control negativo, conteniendo todos los reactivos necesarios para que se produzca la

amplificación con excepción del ADN templado, el cual fue reemplazado por agua bidestilada estéril.

En cada una de las corridas se determinó manualmente la posición del umbral o *threshold* dentro de la zona de amplificación exponencial, calculándose de esta manera el valor de Ct de cada reacción de qPCR. Para cada corrida, se graficó el logaritmo del número de copias del estándar en la reacción en función del Ct obtenido. A partir de este gráfico se obtuvo el rango de linealidad del ensayo, el límite de detección y la eficiencia de la reacción de amplificación. La eficiencia de amplificación es considerada como del 100% cuando la cantidad de ADN se duplica en cada ciclo de amplificación, y se calcula utilizando la siguiente fórmula [Pfaffl, 2004]:

$$\% \text{ Eficiencia} = (10^{-1/x} - 1) \times 100$$

en donde 1/x es la pendiente de la curva del logaritmo del número de copias en función del Ct.

Los gráficos de logaritmo del número de copias del gen en función del Ct también se utilizaron para calcular el número de copias del gen/reacción de las muestras incógnita, y el número de copias del gen/ μg de ADN. Las tres determinaciones correspondientes a cada muestra fueron promediadas y se calculó el desvío estándar de las mediciones.

2.8. IDENTIFICACIÓN DE GENES DE DIOXIGENASAS DE BACTERIAS GRAM-POSITIVAS EN SEDIMENTOS INTERMAREALES

2.8.1. Diseño de cebadores

Se diseñaron dos pares de cebadores específicos para detectar la presencia de genes de dioxigenasas de bacterias Gram-positivas en los sedimentos. Los cebadores NMR331f y NMR1134r (Tabla 6.1, [Marcos *et al.*, 2009]) se diseñaron en base a un alineamiento de secuencias de genes que codifican la subunidad α de dioxigenasas de HAPs identificadas en bacterias de los géneros *Nocardioides*, *Mycobacterium* y *Rhodococcus* disponibles al mes de junio de 2004. Además, se diseñó un par de cebadores específico que tuvo como blanco sólo genes de dioxigenasas de bacterias del género *Rhodococcus* (cebadores RHO5f/RHO1308r, Tabla 6.1). El diseño se realizó siguiendo la metodología descrita en la sección 2.7.1, con la excepción de que los fragmentos a amplificar fueron de mayor longitud (Tabla 6.1).

2.8.2. Amplificación de fragmentos de genes de dioxigenasas de bacterias Gram-positivas

La amplificación fue llevada a cabo en un volumen final de 25 μ l conteniendo 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 9, 0,1% (v/v) Triton X-100, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 μ M dNTPs, cebadores a las concentraciones indicadas en la Tabla 6.1 y 1 U de ADN polimerasa T-PLUS (Inbio-Highway, Tandil, Argentina). Además, se agregó 1M Betaína y 5% dimetil sulfóxido (DMSO) en las reacciones que utilizaban los cebadores RHO5f/RHO1308r. La concentración de ADN templado fue de entre 1 y 10 ng de ADN/reacción. Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador PTC-100[®] (MJ Research, Waltham, MA, Estados Unidos), utilizando el siguiente programa: un paso inicial de desnaturalización a 94°C durante 5 min, 40 ciclos de: 30 s a 94°C, 30 s a la temperatura de alineado indicada en la Tabla 6.1, 30 s (NMR331f/NMR1134r) o 1 min 15 s (RHO5f/RHO1308r) a 72°C, y un paso final de extensión a 72°C durante 30 min. En cada ensayo se incluyó un control negativo conteniendo todos los reactivos necesarios para la amplificación con excepción del ADN templado, que fue reemplazado por agua destilada. Además, en todas las reacciones de PCR se utilizó como control positivo de amplificación 5 ng/reacción de ADN extraído de *Rhodococcus opacus* MR22. Los productos de amplificación fueron separados por electroforesis en geles de agarosa (1,2 o 1,5%, dependiendo del tamaño del fragmento amplificado) de acuerdo al protocolo indicado en el punto 2.4.

2.8.3. Clonado de los productos de amplificación

Para el clonado de los productos de amplificación se combinaron 5 reacciones de PCR independientes. Luego de sembrar los productos de amplificación combinados en un gel de agarosa 1,5%, la banda de tamaño molecular esperado fue escindida del gel y purificada utilizando el kit Wizard SV gel and PCR clean-up system (Promega, Madison, WI, Estados Unidos). Los fragmentos purificados fueron diluidos en los mismos reactivos que los utilizados para la amplificación, e incubados durante 30 min a 72° C con el fin de reincorporar los nucleótidos A en los extremos 3' de dichos fragmentos que pudieran haberse perdido durante el proceso de purificación. Los productos de amplificación fueron entonces ligados al vector pCR[®]4.0 TOPO[®] (TA cloning kit for sequencing, Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos) y los plásmidos resultantes se utilizaron para transformar células de

Escherichia coli DH5- α químicamente competentes [Sambrook y Russell, 2001]. Las células conteniendo el plásmido fueron seleccionadas utilizando el antibiótico Km.

Los plásmidos fueron purificados utilizando el método de lisis alcalina (sección 2.3.2.1) y los insertos fueron amplificados utilizando las condiciones descritas en la sección 2.8.2. Los fragmentos amplificados fueron analizados por RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*, por Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción). Los productos de amplificación fueron digeridos con 5 U de la enzima de restricción *Hae*III (Promega, Madison, WI, Estados Unidos), y los fragmentos de ADN fueron separados por electroforesis en geles de agarosa NuSieve 2% (p/v) (FMC BioProducts, Rockland, ME, Estados Unidos). Los clones seleccionados fueron secuenciados en MacroGen (Seúl, Corea) utilizando los cebadores universales M13F y M13R-pUC del vector.

2.8.4. Análisis filogenético de las secuencias

Las secuencias de nucleótidos obtenidas fueron comparadas con la base de datos de GenBank utilizando la herramienta TBLASTX de BLAST [McGinnis y Madden, 2004]. Como método adicional utilizado para verificar que las enzimas tuvieran función de oxigenasas, las secuencias deducidas de aminoácidos fueron también comparadas con tres bases de datos adicionales: COG (*Clusters of Orthologous Groups*, www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/) [Tatusov *et al.*, 2000], KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*, www.genome.jp/kegg/) [Ogata *et al.*, 1999] y GO (*The Gene Ontology*, www.geneontology.org/) [Ashburner *et al.*, 2000].

Las secuencias deducidas de aminoácidos de los clones fueron alineadas utilizando el programa ClustalX 2.0 [Thompson *et al.*, 1997]. En estos alineamientos también se incluyeron secuencias correspondientes a la subunidad α de enzimas dioxigenasas de compuestos aromáticos obtenidas de la base de datos de GenBank. A partir de estos alineamientos, las secuencias fueron agrupadas al 99% de identidad de secuencias y se seleccionó una secuencia representativa de cada grupo para construir árboles filogenéticos. El programa MEGA 4 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) [Tamura *et al.*, 2007] se utilizó para construir los dendrogramas por el método de *neighbor-joining*, en base a 1.000 repeticiones.

2.8.5. Análisis de diversidad de las bibliotecas

Las secuencias deducidas de aminoácidos fueron utilizadas para calcular índices de diversidad y similitud de las bibliotecas de productos de PCR. Se utilizó el programa DOTUR [Schloss y Handelsman, 2005] (incorporado actualmente dentro del programa mothur v.1.22.2 [Schloss *et al.*, 2009]), para calcular el número de OTUs observados al 85% de identidad en la secuencia de aminoácidos (S_{obs} , ver sección 2.6.2.4.a), el índice de similitud de Bray-Curtis (sección 2.6.2.5), el índice de dominancia de Simpson (D , [Simpson, 1949], ver sección 2.6.2.4.b) y el índice de diversidad de Shannon (H) [Shannon y Weaver, 1949], según la siguiente fórmula:

$$H = - \sum (n_i/N)(\log_2 n_i/N)$$

donde n_i/N es la proporción de secuencias de cada OTU respecto del total de secuencias.

Por último, se calculó la cobertura de cada biblioteca (C) [Good, 1953], utilizando la fórmula descrita en la sección 2.6.2.4.e).

2.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS Y DE ORDENAMIENTO

2.9.1. Análisis de comparación de medias

2.9.1.1. Análisis paramétricos

Se realizó un análisis de la varianza de un factor para determinar si existían diferencias entre los valores medios de abundancia del gen ARNr 16S (datos transformados \log_{10}) en las distintas muestras de sedimentos, utilizando para ello el paquete estadístico SPSS v15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, Estados Unidos). Luego, el test de Tukey de comparaciones múltiples realizado *a posteriori* permitió identificar cuáles eran las medias que diferían significativamente [Tukey, 1949].

2.9.1.2. Análisis no paramétricos

El test estadístico de Kruskal-Wallis [Kruskal y Wallis, 1952] se realizó utilizando el paquete estadístico SPSS v15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, Estados Unidos), para evaluar si existían diferencias en el valor medio de los metadatos obtenidos *in situ* durante la obtención de las muestras de sedimentos. Cuando el resultado de esta prueba estadística indicó diferencias entre las medias comparadas, se realizó la prueba no paramétrica de Dunn para detectar cuáles eran las medias que diferían significativamente [Dunn, 1964].

2.9.2. Análisis no paramétricos de correlaciones

Los análisis de correlaciones entre las abundancias, medidas por qPCR, de las distintas variantes de genes de dioxigenasas (transformados calculando su raíz cuadrada) y las concentraciones de HAPs normalizadas (ver sección 2.9.3.1) fueron realizadas calculando el rango de correlación de Spearman con el paquete estadístico SPSS v15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, Estados Unidos).

2.9.3. Análisis de ordenamiento multivariado y asociación entre variables biológicas y ambientales

2.9.3.1. Relación entre la estructura de las comunidades bacterianas obtenida por pirosecuenciación y la concentración de hidrocarburos en muestras de sedimentos

Se analizó utilizando el paquete estadístico PRIMER v6 (Plymouth Marine Laboratory, [Clarke y Gorley, 2006]). Los datos de la abundancia de OTUs definidos al 97% de identidad de secuencias se utilizaron para calcular una matriz de similitud de Bray-Curtis entre los pares de muestras (sección 2.6.2.5), la cual fue posteriormente utilizada para realizar un análisis de ordenamiento MDS (por sus siglas en inglés *Multidimensional Scaling*) [Clarke, 1993]. La información sobre la estructura de las comunidades fue relacionada con los datos de concentración de hidrocarburos alifáticos totales y de HAPs (totales y agrupados de acuerdo a la cantidad de anillos bencénicos de la molécula), utilizando la herramienta BIO-ENV del programa PRIMER v6 [Clarke, 1993]. Para ello, los datos de concentración de hidrocarburos fueron previamente normalizados por estar expresados en distintas unidades, sustrayendo de

cada valor el promedio de la variable en todas las muestras y luego dividiendo por el desvío estándar de la variable [Clarke y Gorley, 2006]. Una vez normalizados los datos de hidrocarburos, los mismos se utilizaron para construir matrices de distancia Euclídea entre las muestras de sedimentos (una matriz de distancia para cada una de todas las posibles combinaciones de estas variables ambientales), de acuerdo a la siguiente fórmula [Austin y Orloci, 1966]:

$$E = \sqrt{\sum_{i=1}^n (X_{ij} - X_{ih})^2}$$

donde X_{ij} es la abundancia de la variable i en la muestra j , X_{ih} es la abundancia de la variable i en la muestra h , y n es la cantidad total de variables medidas.

La herramienta BIO-ENV se utilizó para calcular el grado de asociación entre la concentración de hidrocarburos y la estructura de las comunidades, mediante el cálculo del rango de correlación de Spearman (ρ) entre cada una de las matrices de distancia Euclídea y la matriz de disimilitud de Bray-Curtis.

2.9.3.2. Relación entre la abundancia de genes de dioxigenasas medida por qPCR y las variables ambientales

Se calculó la relación entre la abundancia de genes de dioxigenasas medidas por qPCR (excluyendo a los genes *nahAc*, que fueron detectados por debajo del límite de cuantificación en todas las muestras) y las siguientes variables ambientales: concentración de HAPs individuales y agrupados de acuerdo a la cantidad de anillos de la molécula, concentración de HAPs totales, temperatura mensual promedio del mes de muestreo y tiempo transcurrido (en meses) desde la fecha del primer muestreo (octubre de 2004). Para ello, se siguió el procedimiento descrito en la sección 2.9.3.1, con las siguientes modificaciones: (i) los datos de la abundancia de genes fueron transformados calculando su raíz cuadrada y aquellos genes detectados por debajo del límite de cuantificación del ensayo fueron reemplazados por el valor del límite de cuantificación (*phnA1*: 800 copias del gen/ μ g ADN; *A*: 900 copias del gen/ μ g ADN; *phnAc*: 1.300 copias del gen/ μ g ADN), y (ii) los datos de concentración de HAPs detectados por debajo del límite de cuantificación de la técnica (10 μ g/kg PSS) fueron reemplazados por el límite de cuantificación/2 [Farnham *et al.*, 2002]. A partir de la matriz de

similitud de Bray-Curtis basada en los datos de abundancia de genes se realizó un análisis de agrupamiento y los grupos obtenidos al 75% y 65% de similitud fueron superpuestos en el gráfico del ordenamiento MDS.

Se utilizó el paquete estadístico PRIMER v6 para identificar aquellos genes que resultaban más influyentes en el ordenamiento de MDS obtenido [Clarke y Gorley, 2006]. Se calcularon en primer lugar las matrices de similitud de Bray-Curtis entre las muestras ambientales utilizando todas las combinaciones posibles de datos de abundancia de genes de dioxigenasas. Luego, se identificó el subgrupo más pequeño de genes cuya matriz de similitud mejor correlacionara con la matriz calculada a partir del conjunto de datos completo. La “mejor” correlación, en este análisis, está dado por un rango de correlación de Spearman $\geq 0,95$.

2.10. NÚMEROS DE ACCESO A GENBANK

Las secuencias obtenidas en la sección 2.8.3 de esta Tesis fueron depositadas en la base de datos de GenBank, bajo los números de acceso FJ493400 a FJ493456.

Capítulo 3

ESTRUCTURA Y DIVERSIDAD DE LAS COMUNIDADES BACTERIANAS DE SEDIMENTOS INTERMAREALES DE LA PATAGONIA

3.1. INTRODUCCIÓN

La zona intermareal es el área de la costa que queda sumergida durante la pleamar y expuesta en bajamar. Estos sistemas representan una interfase entre los ambientes oceánicos, atmosféricos y terrestres, y se caracterizan por estar sometidos a rápidas fluctuaciones en la temperatura, humedad, concentración de nutrientes y exposición a la radiación UV, como resultado del efecto de las mareas [Decho, 2000]. Desde la perspectiva de un microorganismo, este hábitat constituye un ambiente extremo por los cambios en las condiciones ambientales anteriormente mencionados, y por las intensas interacciones biológicas que sufren los microorganismos debido a la competencia por los nutrientes y por el espacio [Ortega-Morales *et al.*, 2010]. Debido a ello, las comunidades microbianas de los sedimentos de la zona intermareal resultan de particular interés, ya que albergan una gran diversidad de microorganismos que juegan un rol esencial en el ecosistema costero y que pueden presentar numerosas aplicaciones biotecnológicas [Musat *et al.*, 2006].

Los sistemas costeros de la Patagonia contienen una gran riqueza de especies de invertebrados, aves y mamíferos [Miloslavich *et al.*, 2011], y si bien la biodiversidad microbiana en estos ambientes podría ser igualmente importante, ésta aún se encuentra mayormente inexplorada. En particular, estos microorganismos tienen gran importancia para la calidad ambiental de los ecosistemas costeros [Ortega-Morales *et al.*, 2010]. Por lo tanto, el estudio de la estructura y diversidad de las comunidades microbianas de los sedimentos intermareales de Patagonia con distintos niveles de impacto por actividades antropogénicas

proveerá información esencial que permitirá comenzar a comprender los efectos de dichos impactos sobre las comunidades microbianas, y los servicios que estas comunidades proveen.

Se estima que sólo entre un 0,01 y un 0,1% de los microorganismos de los ecosistemas marinos pueden ser cultivados. Por esta razón, la utilización de técnicas dependientes de cultivo resulta inapropiada cuando el objeto del estudio es la comunidad completa [Connon y Giovannoni, 2002; Fuhrman y Hagström, 2008]. El surgimiento en los años '80s y '90s de técnicas moleculares basadas en la amplificación de fragmentos del gen ARNr 16S a partir de ADN purificado de la comunidad (entre ellas DGGE, T-RFLP o bibliotecas de productos de amplificación) permitió estudiar estas comunidades en mayor detalle, y por consiguiente comenzar a vislumbrar la enorme diversidad bacteriana existente [Harayama *et al.*, 2004; Abed, 2009; Konopka, 2009]. Estas herramientas resultan a menudo suficientes para abordar estudios ecológicos en cultivos de enriquecimiento o comunidades microbianas simples. Sin embargo, la profundidad de análisis que permiten estas técnicas resulta insuficiente para estudiar comunidades extremadamente complejas como las que habitan los suelos o los sedimentos marinos [Fuhrman, 2009]. El reciente advenimiento de las técnicas de secuenciación de segunda generación aplicadas al estudio de comunidades microbianas permitió incrementar enormemente la profundidad de los análisis, posibilitando la detección de hasta los organismos menos abundantes en comunidades complejas [Sogin *et al.*, 2006; Elshahed *et al.*, 2008; Galand *et al.*, 2009; Sjöstedt *et al.*, en prensa]. Utilizando el mismo marcador filogenético, los productos de PCR son en este caso secuenciados en gran escala utilizando estas tecnologías de secuenciación de segunda generación, lo cual permite obtener una profunda descripción de las propiedades estructurales de las comunidades microbianas en estudio. Si bien esta técnica sufre de los desvíos asociados con las técnicas independientes del cultivo de microorganismos (extracción de ADN ambiental, PCR, secuenciación), la información generada aporta una visión semicuantitativa de la estructura de estas comunidades microbianas.

En este capítulo, se describirán en primer lugar los sitios de muestreo elegidos para este trabajo de Tesis, localizados en las zonas norte-centro y sur de la costa Patagónica, dado que estos sitios serán mencionados en todos los capítulos siguientes. En segundo lugar, se proveerá información sobre las concentraciones de HAPs presentes en los sedimentos obtenidos en estos sitios de muestreo. A continuación, se presentará información sobre la

calidad del ADN metagenómico purificado a partir de las muestras de sedimentos, punto de inicio de las distintas metodologías utilizadas en esta Tesis doctoral. Además de introducir esta información general, el objetivo de este capítulo fue explorar la estructura y diversidad de las comunidades bacterianas que habitan los sedimentos intermareales de la costa Patagónica expuestos a distintos niveles de contaminación con hidrocarburos. Mediante la pirosecuenciación de la región V4 del gen ARNr 16S bacteriano, se describirá en profundidad a las comunidades bacterianas presentes en estos ambientes, y en particular, se evaluará la abundancia relativa y la diversidad de las poblaciones bacterianas que podrían presentar el potencial para degradar estos contaminantes.

3.2. RESULTADOS

3.2.1. Sitios de estudio

Para el desarrollo de esta Tesis se seleccionaron dos regiones de la costa Patagónica argentina con un alto grado de exposición a contaminación con hidrocarburos: Caleta Córdova (Chubut) y Bahía Ushuaia (Tierra del Fuego) (Figura 3.1), dado que actualmente presentan uno de los niveles más altos de impacto antropogénico de la región [Esteves *et al.*, 2006; Commendatore y Esteves, 2007]. Además, se eligió a Playa Fracasso, en la Península Valdés, provincia del Chubut como sitio no contaminado (Figura 3.1). En la Tabla 3.1 se detallan las muestras obtenidas en estos sitios, como así también las fechas de muestreo y coordenadas geográficas. A continuación se describen con mayor profundidad las características geográficas y ambientales los tres sitios de muestreo de mayor relevancia para esta Tesis.



Figura 3.1. Sitios de muestreo Playa Fracasso (PF), Caleta Córdova (CC) y Bahía Ushuaia (OR)

Tabla 3.1. Sitios y fechas de muestreo de sedimentos intermareales

Provincia	Sitio	Localización	Muestra	Fecha (MM/AA)
Chubut	Playa Fracasso	42° 25' 25'' S	PF08	05/08
		64° 07' 52'' O		
		45° 44' 19'' S	CC08-1	04/08
	Caleta Córdova	67° 22' 42'' O	CC10-1	06/10
		45° 45' 02'' S	CC08-2	04/08
		67° 22' 29'' O	CC10-2	06/10
Tierra del Fuego			OR04	10/04
			OR05	09/05
	Bahía Ushuaia	54° 48' 15'' S	OR06	04/06
		68° 17' 18'' O	OR07	06/07
			OR08	12/08
			OR10	09/10

3.2.1.1. Playa Fracasso

Playa Fracasso (Figura 3.1) es un humedal localizado en el extremo sureste del Golfo San José, el cual pertenece a la eco-región marina de los “Golfos Norpatagónicos” [Spalding *et al.*, 2007]. Forma parte de la Reserva Natural Turística Península Valdés, que es de gran importancia debido a que constituye un lugar esencial para la nidificación, descanso y alimentación de diversas aves playeras migratorias y para la alimentación y reproducción de numerosos mamíferos marinos [Yorio *et al.*, 1998; Campagna *et al.*, 2006; Bala, 2008]. En particular, Playa Fracasso forma parte del Subsitio Golfo San José, que fue nombrado como sitio de importancia internacional por la Red Hemisférica de Reservas de Aves Playeras (RHRAP) debido a la gran cantidad de aves playeras que lo visitan durante primavera y

otoño, y además recientemente ha sido incluida en la lista Ramsar de humedales de importancia internacional (www.ramsar.org). Debido a su importancia ecológica, resulta de gran valor evaluar regularmente cómo las actividades llevadas a cabo en esta zona afectan su calidad ambiental.

El Golfo San José, en donde se localiza Playa Fracasso, es el más chico de los golfos norpatagónicos (817 km²), y se comunica al norte con el Golfo San Matías por medio de una pequeña boca de aproximadamente 6,9 km de ancho [Amoroso y Gagliardini, 2010]. Su profundidad media es de 30 m, y su profundidad máxima es de 80 m. Las precipitaciones en la zona son escasas, con un promedio de 180 mm anuales [Amoroso y Gagliardini, 2010]. La temperatura del aire en la región oscila entre 7°C en invierno y 21,2°C en verano (Estadística Servicio Meteorológico Nacional). Los vientos predominantes son fuertes, con una velocidad promedio de 15 km/h, y provienen predominantemente del SO. La temperatura superficial del mar en el golfo es más cálida en la zona este que al oeste durante los meses de verano, mientras que este fenómeno se revierte en los meses de invierno, y durante la primavera y otoño se observa una homogeneización de la temperatura superficial del agua [Amoroso y Gagliardini, 2010]. En la zona SE del golfo, la temperatura superficial del mar es de aproximadamente 18,2°C en el verano y de 11,6°C en los meses de invierno [Guerrero *et al.*, 2008a; Guerrero *et al.*, 2008b]. La salinidad superficial en las aguas del golfo es en promedio 33,6 – 33,8 ups (unidades prácticas de salinidad) y no presenta un patrón estacional [<http://atlas.ambiente.gov.ar>; Solís, 2007].

Playa Fracasso posee forma de media luna, con una extensión de 3,0 km entre sus extremos este y oeste, y una amplitud máxima en su parte central de 0,8 km durante la bajamar [Hernández *et al.*, 2008]. En este humedal existe un ambiente intermareal compuesto principalmente de sedimentos arenosos finos y barrosos limitado en sus extremos por playas rocosas, así como un área central de la playa con vegetación de tipo halófila [Hernández, 2006]. Este humedal recibe el aporte de agua marina del océano durante dos ciclos de mareas diarios, dejando un área expuesta de aproximadamente 1,6 km² durante la bajamar [Hernández y Bala, 2007].

3.2.1.2. Caleta Córdova

Caleta Córdova está ubicada en el Golfo San Jorge, 540 km al sur de Playa Fracasso sobre la costa Atlántica y 16 km al norte de la ciudad de Comodoro Rivadavia (Figura 3.1). Este sitio, al igual que Playa Fracasso, pertenece a la eco-región marina de los “Golfos Norpatagónicos” [Spalding *et al.*, 2007]. El Golfo San Jorge se extiende desde el Cabo Dos Bahías (Chubut) hasta el Cabo Tres Puntas (Santa Cruz), abarcando una superficie de 39.340 km² [Fernández *et al.*, 2005]. La profundidad máxima del golfo se localiza en la región central del mismo y no supera los 110 m [Fernández *et al.*, 2005]. Al norte del golfo, en un área que se extiende desde Comodoro Rivadavia hasta la localidad de Bahía Camarones, se creó en el año 2008 el Parque Interjurisdiccional Marítimo Costero “Patagonia Austral” (Ley 26.446), el primer parque de Argentina que tiene jurisdicción sobre el espacio marino. Este parque incluye unas 42 islas y fue creado con el propósito principal de proteger el patrimonio paisajístico, natural y cultural de la región. El golfo constituye además una zona de cría de especies marinas de interés comercial, como la merluza común y el langostino [Fernández *et al.*, 2005].

El tipo de costa de Caleta Córdova corresponde principalmente a plataformas de abrasión y restingas, playas de material grueso con algunos sectores de acantilado (Marta Commendatore, comunicación personal). Las precipitaciones en la región son escasas: durante el período 2001-2009 se registró en Comodoro Rivadavia un promedio de precipitaciones anuales de 223,9 mm (Estadística Servicio Meteorológico Nacional). La temperatura media anual es de 13,1°C, con valores máximos en enero de 19,6°C y mínimos en el mes de julio de 6,6°C (Estadística Servicio Meteorológico Nacional). Los vientos son fuertes y predominantes del O, con una velocidad promedio de 22 km/h. Las escasas precipitaciones y los fuertes vientos determinan un clima en la región de tipo árido. La temperatura superficial del mar es de 16,2°C en el verano y de 9,0°C en el invierno, con una amplitud máxima anual de la temperatura superficial del mar de 8°C [Bava, 2004]. La salinidad superficial del mar es relativamente baja, con un promedio anual de entre 33,2 y 33,4 ups (<http://atlas.ambiente.gov.ar>).

Caleta Córdova está expuesta a la contaminación con hidrocarburos a causa de las actividades de extracción de petróleo que se realizan en la zona, las actividades de carga de petróleo crudo para su transporte por vía marítima, y a las actividades de un pequeño puerto

para embarcaciones pesqueras. La carga de petróleo crudo hacia refinerías nacionales o el mercado exterior se realiza a través de monoboyas ubicadas a 3.500 m de la costa, y esta terminal de despacho es tercera en el país en lo que respecta al volumen de hidrocarburos transportados al año, superando los 5,5 millones de m³ anuales [Foro para la conservación del mar Patagónico y áreas de influencia, 2008]. Estudios previos han demostrado la presencia de altas concentraciones de hidrocarburos de origen antropogénico en la zona de Caleta Córdova y Comodoro Rivadavia [Commendatore *et al.*, 2000]. En este mismo estudio se detectó en los sedimentos la presencia de petróleo degradado y con cierto tiempo de exposición ambiental junto con petróleo recientemente derramado, lo que sugiere un alto grado de exposición de la región a pequeños derrames de hidrocarburos a causa de las actividades de extracción y transporte que allí se desarrollan [Commendatore *et al.*, 2000]. Además, en los últimos años se han registrado dos importantes derrames de hidrocarburos en este sitio: el primero ocurrió el 26 de diciembre de 2007, cuando se derramaron 300 m³ de petróleo durante las actividades de carga que realizaba un buque ya obsoleto a través de una de las monoboyas. Los responsables no dieron aviso del derrame, que se descubrió cuando la mancha arribó a la costa. Un año después, el 2 de diciembre de 2008, se produjo un nuevo vertido de crudo durante las actividades de carga. Si bien esta vez el derrame fue mucho menor (2 a 8 m³ de petróleo), los hidrocarburos también llegaron a la costa afectando una playa 7 km al norte de Caleta Córdova. Es importante destacar que en esta caleta conviven actividades relacionadas a la extracción de petróleo con pesquerías artesanales y estas costas son utilizadas por los habitantes de esta zona. Por lo tanto, los altos niveles de contaminación por hidrocarburos que se encuentran en esta caleta pueden tener efectos negativos sobre la salud de la población, tanto a través de contacto físico como por ingesta de los productos de la pesca artesanal [Commendatore y Esteves, 2007].

3.2.1.3. Bahía Ushuaia

Bahía Ushuaia, localizada en la Isla Grande de Tierra del Fuego, en la costa norte del canal de Beagle (Figura 3.1), es la más grande de tres bahías sobre las cuales tiene influencia la ciudad de Ushuaia, siendo las otras dos Bahía Encerrada y Bahía Golondrina [Dionisi *et al.*, 2011]. Las bahías Ushuaia y Encerrada están artificialmente conectadas, permitiendo el intercambio de agua entre ambas en cada ciclo de mareas [Torres *et al.*, 2009]. Bahía Ushuaia

tiene una extensión de aproximadamente 5 km de largo y 6 km de ancho, con una superficie total de 24 km² [Amin *et al.*, 2011]. Su profundidad es de 6 a 30 m en la zona oeste, y de 100 a 170 m en la zona este [Biancalana *et al.*, 2007]. El clima de la región es húmedo y templado a frío, con temperaturas promedio del aire de 2,4°C en el invierno y de 9,6°C en verano [Dionisi *et al.*, 2011], precipitaciones de aproximadamente 600 mm anuales distribuidas a lo largo de todo el año, y una época de nevadas que se extiende entre los meses de mayo a agosto [Gil *et al.*, 2011]. La temperatura superficial del agua en la bahía varía entre 4,5°C en el mes de julio y 9,7°C en el mes de enero [Dionisi *et al.*, 2011]. Ingresos estacionales de agua dulce en la Bahía Ushuaia ocasionan variabilidad de la salinidad del agua de esta bahía [Dionisi *et al.*, 2011].

Bahía Ushuaia constituye una zona de gran biodiversidad, y debido a esto ha sido designada una zona de protección especial [Prefectura Naval Argentina, 1998; Commendatore *et al.*, 2012]. Sin embargo, la calidad del agua en Bahía Ushuaia se ha visto afectada por actividades antrópicas, que incluyen el vertido de efluentes cloacales sin ningún tratamiento previo, el vertido de efluentes industriales, la contaminación con residuos urbanos de la ciudad de Ushuaia y la contaminación con hidrocarburos a causa de actividades de almacenamiento y transporte de productos refinados del petróleo, un intenso tráfico marítimo y operaciones portuarias [Esteves y Amín, 2004; Esteves *et al.*, 2006; Torres *et al.*, 2009; Dionisi *et al.*, 2011; Gil *et al.*, 2011; Commendatore *et al.*, 2012]. El combustible refinado llega a Bahía Ushuaia por transporte marítimo, para ser posteriormente almacenado en tanques ubicados cercanos a la costa, en la terminal de despacho perteneciente a la empresa YPF denominada Planta Orión. Esta terminal, la más austral del país y única que abastece a la Isla Grande de Tierra del Fuego, cuenta con un muelle para la carga y descarga de combustibles que opera comercialmente hidrocarburos persistentes (derivados pesados, gas oil, fuel oil, etc.) y no persistentes (naftas) (www.tierradelfuego.org.ar; Fundación NUESTROMAR, www.nuestromar.org) y tiene un abastecimiento de 144.630 m³ de combustible al año (<http://energia3.mecon.gov.ar>). Debido a actividades de carga y descarga de estos combustibles, la zona cercana al muelle de esta planta de combustibles se encuentra expuesta a la contaminación crónica con compuestos refinados del petróleo [Commendatore *et al.*, 2012]. El sitio de muestreo elegido dentro de Bahía Ushuaia se encuentra en proximidad de dicho muelle (Orión, OR). El tipo de contaminación observada en Ushuaia es

por lo tanto diferente al de Caleta Córdova, siendo esta última principalmente afectada por contaminación con petróleo crudo.

La circulación predominante de las corrientes marinas dentro de la bahía es desde el Muelle Orión y hacia la zona más poblada de la ciudad de Ushuaia, por lo que la contaminación por hidrocarburos puede afectar a sus habitantes [Balestrini *et al.*, 1998] o incluso generarse zonas de acumulación más alejadas del centro de la ciudad [Commendatore *et al.*, 2012]. Un estudio publicado recientemente identificó dentro de Bahía Ushuaia tres zonas con distinto grado de impacto: una región de bajo impacto al este de la bahía, una zona central de acumulación de hidrocarburos debido a la proximidad a los muelles y favorecida por las características de los sedimentos, y una zona al sur oeste de la bahía, donde los hidrocarburos se acumulan principalmente debido a la circulación de las corrientes marinas [Commendatore *et al.*, 2012]. La corriente predominante de la bahía puede incluso llevar la contaminación hasta zonas más lejanas, poniendo en riesgo áreas con una alta sensibilidad ambiental, como la Reserva de Biósfera Cabo de Hornos ubicada al sur del Canal de Beagle, la cual ha sido reconocida por UNESCO para proteger la biodiversidad terrestre y marina de esta región [Rozzi *et al.*, 2007].

3.2.2. Muestreo y representatividad de los sedimentos

Existen distintas estrategias de muestreo, y la elección de una metodología u otra depende de los objetivos del estudio [Gray y Elliott, 2009]. La técnica de muestreo elegida para esta Tesis fue la de utilizar muestras compuestas, la cual consiste en la recolección de varias muestras que luego son físicamente mezcladas previo a su análisis [Patil, 2002]. El objetivo de este tipo de muestreo es fundamentalmente incrementar la representatividad de cada muestreo, y es particularmente efectivo en casos en los que los costos elevados de los análisis en el laboratorio impiden analizar una gran cantidad de muestras, o bien, los costos asociados al muestreo son muy bajos en comparación con el análisis de las muestras [Correll, 2001; United States Environmental Protection Agency (EPA), 2002].

Nuestros muestreos consistieron en la toma de sedimentos a partir de 7 a 10 puntos elegidos al azar separados por una distancia de aproximadamente un metro, a partir de la zona intermareal baja de la costa. Estas muestras fueron combinadas y homogeneizadas para así obtener una muestra compuesta. En la Tabla 3.1 se indican las fechas en las que se realizaron

los muestreos. Playa Fracasso fue muestreada una vez (PF08), mientras que Caleta Córdova fue muestreada dos veces, en los años 2008 y 2010 (CC08 y CC10), obteniéndose en cada caso dos muestras a aproximadamente 1,4 km de distancia. En Orión, por otra parte, se obtuvieron seis muestras compuestas, entre los años 2004 y 2010 (OR04-OR08 y OR10).

3.2.3. Concentración de HAPs en sedimentos intermareales de Patagonia

La determinación de la concentración de HAPs fue realizada en el Programa de Investigación en Ecotoxicología de la Universidad Nacional de Luján, utilizando cromatografía gaseosa con detector de masa en modo SIM, de acuerdo a la metodología indicada en Materiales y Métodos. No se detectaron HAPs en la muestra PF08 (Figura 3.2), resultado consistente con el obtenido en una muestra del mismo sitio en el año 2005, en la cual tampoco se detectó la presencia de HAPs [Lozada *et al.*, 2008]. Por el contrario, todas las muestras obtenidas en Caleta Córdova y Bahía Ushuaia contenían HAPs (Figura 3.2). En las muestras de Caleta Córdova se detectaron entre 3 y 8 HAPs distintos, de los cuales del 21,4 al 67,7% correspondían a moléculas de bajo peso molecular (2 y 3 anillos). El único HAP que fue detectado en todas las muestras obtenidas en Caleta Córdova fue pireno, y el hidrocarburo detectado en mayor concentración fue benzo[*a*]pireno (252 µg/kg PSS, en la muestra CC10-2). Además, tres HAPs fueron detectados (antraceno en CC10-1, fluoreno y pireno en CC10-2), aunque su concentración se encontraba por debajo del límite de cuantificación del método (10 µg/kg PSS). La concentración de HAPs totales en las muestras de Caleta Córdova varió entre 378 y 1.054 µg/kg PSS. El 69,6% de los HAPs detectados en Caleta Córdova superaron los límites establecidos para evaluar la calidad de los sedimentos marinos (Canadian Environmental Quality Guidelines, <http://st-ts.ccme.ca/>), si bien se encontraban por debajo a concentraciones en las cuales puedan causar efectos adversos sobre los organismos. Sin embargo es importante recalcar que, dentro de la zona intermareal, la zona muestreada no es aquella en donde ocurren las mayores acumulaciones de hidrocarburos. Además, el muestreo fue realizado aproximadamente 100 y 900 días luego del derrame, por lo que es probable que en otras zonas de la región intermareal y en fechas más cercanas al derrame la concentración de estos compuestos haya sido mayor. La presencia de naftaleno, un hidrocarburo muy volátil, en las muestras CC10-1 y CC10-2 (ambas muestras obtenidas el mismo día) sugiere un aporte reciente de hidrocarburos en los sedimentos de Caleta Córdova.

De igual manera, en todas las muestras de sedimentos obtenidas en la zona del muelle de la planta Orión entre los años 2004 y 2010 se detectó presencia de HAPs en concentraciones que variaron entre 151 y 4.127 $\mu\text{g}/\text{kg}$ PSS (Figura 3.2). En estos sedimentos se identificaron entre 1 y 11 HAPs diferentes. El 73,9% de estos compuestos se encontraron en concentraciones que superan los límites establecidos para evaluar la calidad de los sedimentos, mientras que el 17,4% se encontraban en concentraciones por sobre las cuales es frecuente que ocurran efectos adversos sobre los organismos (Canadian Environmental Quality Guidelines, <http://st-ts.ccme.ca/>). En particular, en la muestra OR08 se detectó el hidrocarburo de alto peso molecular benzo[*g,h,i*]perileno (6 anillos) en una concentración de 3.315 $\mu\text{g}/\text{kg}$ PSS. En la muestra OR04 sólo se cuantificaron hidrocarburos de bajo peso molecular, mientras que el porcentaje de estos hidrocarburos en las otras muestras fue muy variable (entre el 1,3 y el 76,8%). En la muestra OR10, el hidrocarburo criseno fue detectado por debajo del límite de cuantificación del método (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ PSS).

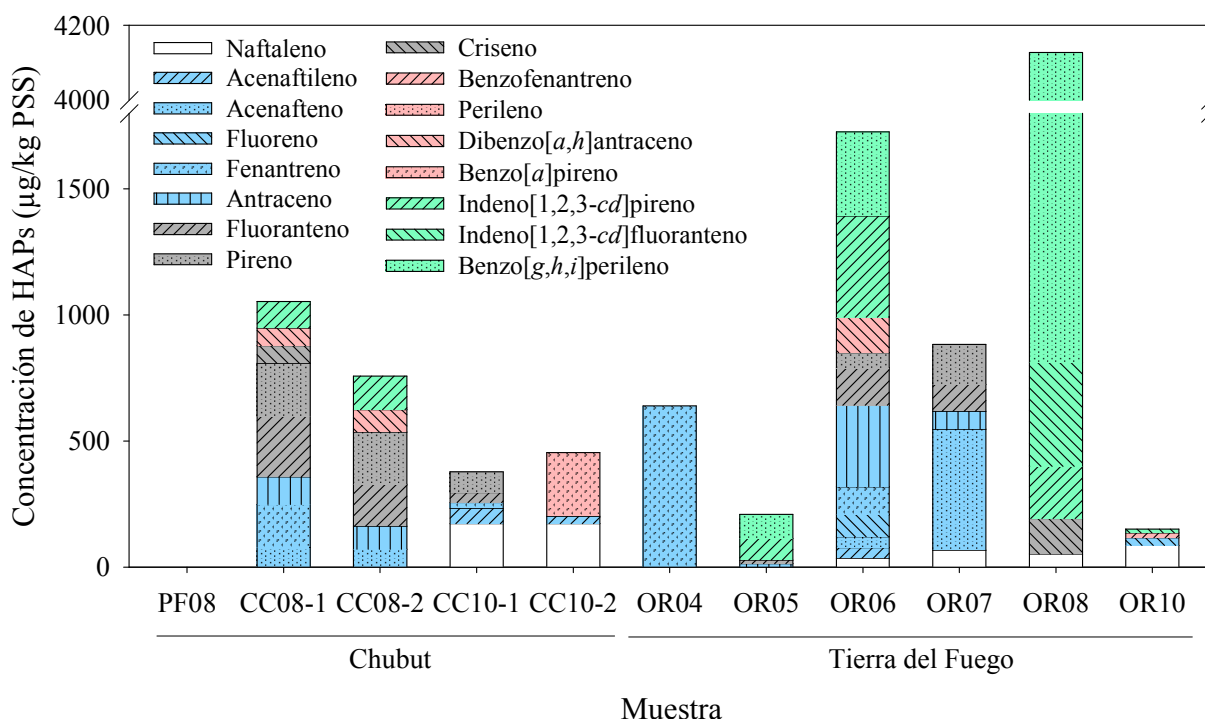


Figura 3.2. Concentración de HAPs en muestras de sedimentos intermareales. El color corresponde al número de anillos de los HAPs: blanco, 2 anillos; celeste, 3 anillos; gris, 4 anillos; rosa, 5 anillos; verde, 6 anillos

3.2.4. Purificación y cuantificación del ADN metagenómico de los sedimentos

El ADN purificado a partir de muestras ambientales (ADN metagenómico) debe, idealmente, cumplir con los siguientes requisitos: a) ser representativo de la comunidad microbiana, b) ser de un peso molecular suficiente, lo cual varía de acuerdo a la técnica a utilizar, y c) ser de la mayor pureza posible, es decir, con baja o nula concentración de sustancias inhibitoras que puedan haber copurificado con el mismo [Luna *et al.*, 2006]. Para la extracción de ADN metagenómico a partir de muestras de sedimentos intermareales de Patagonia se utilizó el kit FastDNA para Suelos (MP Biomedicals, Solon, OH, Estados Unidos), el cual está indicado como apropiado para la extracción a partir de diversas muestras ambientales. El ADN purificado mostró ser en su mayor parte de un elevado peso molecular (10 a 20 kb), si bien en algunas muestras se observa una gran proporción de fragmentos de menor peso molecular (Figura 3.3). Los distintos análisis moleculares empleados en esta Tesis amplificaron fragmentos de entre 75 y 1.250 pb, por lo que en todos los casos la mayor parte del ADN extraído presentaba un peso molecular muy superior (Figura 3.3. B). El rendimiento varió entre 0,2 y 6,8 μg de ADN/g de sedimento húmedo (Tabla 3.2), y se observó que el rendimiento del ADN obtenido a partir de cada muestra fue consistente al realizar distintas extracciones. Diferencias en el rendimiento entre muestras de sedimentos ya han sido reportadas, y podrían deberse a distintas cantidades de biomasa en las muestras o a una recuperación desigual de ADN a partir de distintas muestras [Dionisi *et al.*, 2004].

El rendimiento del ADN no tiene tanta implicancia para los ensayos utilizados, siempre que el ADN obtenido sea representativo de la comunidad microbiana, y que la cantidad de ADN recuperado sea suficiente para los subsiguientes análisis moleculares [Forney *et al.*, 2004]. Si bien es muy difícil evaluar qué tan representativo es el ADN extraído, se utilizó un homogeneizador específico para este tipo de muestras (bead-beater) y matrices adecuadas para la lisis celular. Éste es considerado como uno de los métodos más eficientes para la ruptura de células resistentes (como las de bacterias Gram-positivas o esporas) y por lo tanto permite obtener un ADN representativo de toda la comunidad [Maarit Niemi *et al.*, 2001]. Por otra parte, la utilización de kits para la purificación de los ácidos nucleicos permite obtener ADN de alta pureza, aunque en general el rendimiento de las extracciones es menor que el que se obtiene cuando se emplean métodos tradicionales de extracción. En consecuencia, la combinación de métodos mecánicos para la ruptura de las células con la utilización de kits

durante la extracción permitió obtener ADN de alta pureza y representatividad [Maarit Niemi *et al.*, 2001], y por lo tanto esta estrategia resultó la más adecuada para los métodos moleculares utilizados en esta Tesis. Además, otra estrategia utilizada para obtener una buena representatividad de los distintos grupos microbianos en este estudio consistió en realizar dos extracciones de ADN independientes a partir de cada muestra de sedimentos y posteriormente combinarlas.

Como método de control adicional, el ADN purificado de los sedimentos fue utilizado como templado en reacciones de PCR para amplificar el gen que codifica el ARNr 16S de bacterias, utilizando los cebadores 16S-1055f/16S-1392r [Lane, 1991; Ferris *et al.*, 1996]. Este control es particularmente importante cuando las muestras contienen altas concentraciones de sustancias contaminantes, lo cual generalmente dificulta la utilización de métodos moleculares de análisis [Al-Soud y Rådström, 2000; Rådström *et al.*, 2004; Seo *et al.*, 2011]. La correcta amplificación del gen permitió descartar la presencia de una alta concentración de sustancias inhibidoras que interfirieran en su amplificación, y comprobar que el ADN presentaba una calidad suficiente para ser utilizado en análisis moleculares (datos no mostrados). La presencia de inhibidores de la amplificación en el ADN templado fue evaluada con mayor o menor detalle en función del tipo de análisis molecular que se realizaría sobre dicho ADN, y los métodos empleados para evaluar la calidad en cada caso serán descritos en los respectivos capítulos de esta Tesis.

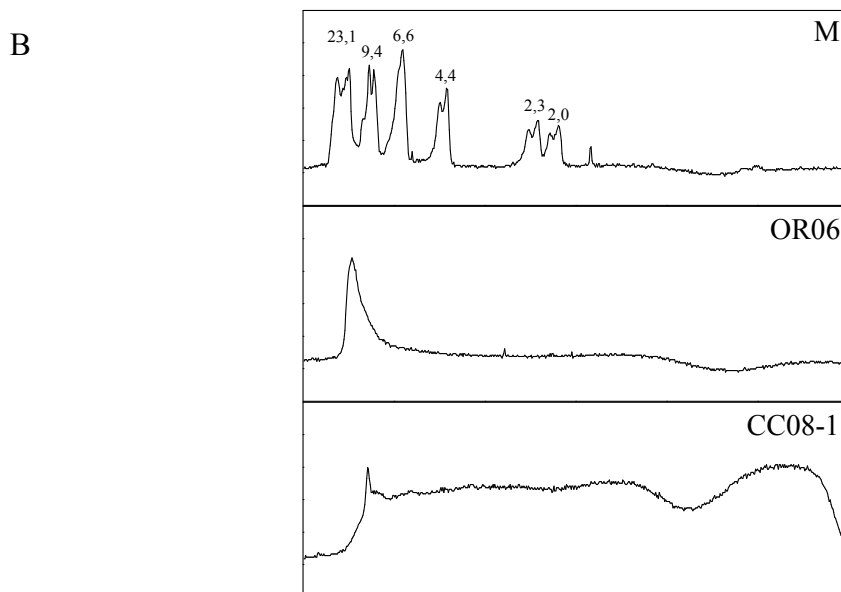
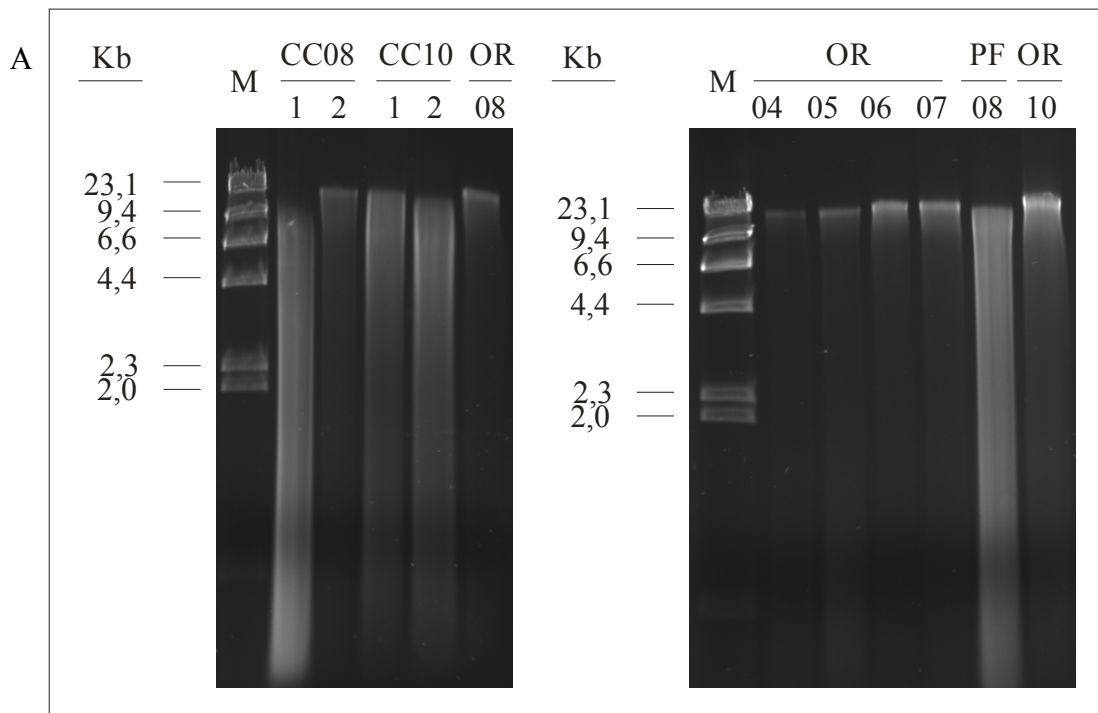


Figura 3.3. Extracción de ADN metagenómico. A: electroforesis en geles de agarosa del ADN purificado de los sedimentos intermareales de Patagonia. Agarosa 0,8% (p/v) en buffer TBE 0,5×, teñido con bromuro de etidio, B: análisis de densitometría de algunas calles del gel. Los números en el gráfico de densitometría corresponden al tamaño de los fragmentos del marcador de peso molecular (Kb). M: Marcador de peso molecular λ HindIII (Productos Bio-Lógicos)

Tabla 3.2. Concentración de ADN metagenómico purificado de las muestras de sedimentos intermareales de Patagonia

Muestra	Rendimiento (μg ADN/g sedimento)	Muestra	Rendimiento (μg ADN/g sedimento)
PF08	5,0	OR04	0,2
CC08-1	6,3	OR05	0,4
CC08-2	1,4	OR06	0,7
CC10-1	5,0	OR07	0,8
CC10-2	6,8	OR08	0,4
		OR10	4,5

3.2.5. Descripción de las comunidades bacterianas que habitan sedimentos intermareales de la Patagonia

En el contexto de la caracterización integral del potencial para degradar HAPs que presentan las comunidades microbianas de ambientes costeros de Patagonia, el primer objetivo de esta Tesis doctoral fue explorar la estructura y diversidad de las comunidades bacterianas de los sedimentos, ya que las poblaciones bacterianas que degradan HAPs forman parte de dicha comunidad. Para ello, se eligieron muestras de sedimentos representativas de los tres sitios anteriormente mencionados y obtenidas durante las estaciones moderadas (otoño o primavera) del mismo año. Tres de las muestras correspondían a sitios con un alto grado de exposición a contaminación con hidrocarburos de la zona norte-centro (CC08-1 y CC08-2) y sur de Patagonia (OR08), y la cuarta al sitio no contaminado (PF08). Dado que las características físico-químicas y ambientales presentan una gran influencia sobre la estructura de las comunidades microbianas [Horner-Devine *et al.*, 2004], se realizaron una mayor cantidad de determinaciones de dichas variables para estas cuatro muestras.

3.2.5.1. Metadatos

El incremento exponencial en los últimos años a nivel mundial de proyectos de secuenciación de metagenomas, como así también de la determinación de la estructura de la comunidad utilizando métodos de secuenciación de segunda generación, se ha visto acompañado por el reconocimiento de la comunidad científica de la necesidad de que estos estudios estén acompañados de información sobre el contexto ambiental de la comunidad microbiana en estudio, y acerca de los métodos experimentales utilizados [Field *et al.*, 2008]. Estos datos contextuales asociados al análisis en profundidad de las comunidades microbianas, los cuales son denominados “metadatos”, permiten relacionar el potencial genético, la diversidad de microorganismos, o la estructura de una comunidad de un determinado hábitat a las condiciones físico-químicas y ambientales del sitio. Esto facilita la interpretación de cómo estos factores afectan a la comunidad microbiana, en particular cuando se analizan los datos y metadatos producidos a partir de distintos estudios [Seshadri *et al.*, 2007; Field *et al.*, 2008].

Durante la recolección de las muestras se obtuvieron los siguientes metadatos *in situ*: posición geográfica precisa del sitio de muestreo, temperatura, pH y potencial de óxido reducción de los sedimentos intermareales (Tabla 3.3). Se observaron diferencias significativas en la temperatura medida *in situ* en los sedimentos ($p < 0,05$; Tabla 3.3), mientras que no se observaron, en general, diferencias en las otras variables. Como era esperable, los sedimentos del sitio de mayor latitud fueron los que presentaron menor temperatura, a pesar de que dicha muestra fue obtenida hacia fines de la primavera (Tablas 3.1 y 3.3). Por otra parte, los sedimentos de Playa Fracasso presentaron menor temperatura que los de Caleta Córdova. Si bien estas tres muestras fueron obtenidas en otoño, la diferencia observada entre las temperaturas de CC08 y PF08 (Tabla 3.3) podría atribuirse a que la muestra PF08 se obtuvo un mes después que las de CC08 (Tabla 3.1). Si bien es importante conocer la temperatura al momento del muestreo, el efecto sobre la comunidad estará dado por las temperaturas a las cuales los sedimentos están expuestos durante todo el año, tanto del agua como del aire. En este sentido, si bien la diferencia térmica del agua entre los meses de invierno y verano es similar para ambas regiones (entre 5 y 7°C), la temperatura del aire es más homogénea en el ambiente costero de Bahía Ushuaia que la que se observa en la zona norte-centro de Patagonia (aproximadamente 7°C de diferencia en la zona de Bahía Ushuaia y

13 a 14°C en las zonas de Caleta Córdova y Playa Fracasso, respectivamente), en donde la amplitud térmica a lo largo del año podría llegar a alcanzar un máximo de 50°C [Rechimont, 2011]. Por otra parte, los siguientes metadatos fueron obtenidos en una etapa posterior, durante el análisis de las muestras en el laboratorio: granulometría (Figura 3.4), porcentaje de materia orgánica (Figura 3.5), concentración de amonio (Figura 3.5), concentración de hidrocarburos alifáticos (Figura 3.6) y HAPs (Figura 3.2).

Tabla 3.3. Metadatos de las muestras de sedimentos medidos *in situ* durante el muestreo

Muestra	Posición geográfica precisa	Temperatura (°C)	pH	Potencial de óxido- reducción (mV)
	Playa Fracasso			
PF08	42° 25,410' S; 64° 07,867' O	10,0 ± 0,5 ^{ab}	8,43 ± 0,17 ^b	194 ± 27 ^a
	Caleta Córdova			
CC08-1	45° 44,322' S; 67° 22,695' O	13,5 ± 0,5 ^{bc}	7,49 ± 0,38 ^a	145 ± 6 ^a
	Caleta Córdova			
CC08-2	45° 45,033' S; 67° 22,486' O	14,8 ± 0,2 ^c	7,83 ± 0,09 ^a	208 ± 6 ^a
	Planta Orión			
OR08	54° 48,256' S; 68° 17,296' O	6,8 ± 0,04 ^a	7,36 ± 0,03 ^a	n.d.

Los valores que difieren significativamente según la prueba no paramétrica de Dunn se indican con superíndices para las variables: temperatura, pH y potencial de óxido-reducción. n.d.: no determinado

El conocimiento de la granulometría de los sedimentos es importante porque la misma tiene un efecto sobre la concentración de los hidrocarburos, ya que los sedimentos con partículas de mayor tamaño dejan libre una menor superficie disponible para la adsorción de estos compuestos [Benlahcen *et al.*, 1997]. El tipo de granulometría predominante en sedimentos costeros de Patagonia es la de partículas de arena y grava [Commendatore *et al.*, 2000; Commendatore y Esteves, 2007]. La granulometría de la muestra CC08-1 presentó un mayor porcentaje de partículas finas que las otras dos muestras de Chubut, mientras que la muestra CC08-2, obtenida aproximadamente a 1,4 km de distancia de la primera, presentó un mayor porcentaje de grava. La muestra PF08 está compuesta casi en su totalidad por partículas de arena (Figura 3.4), y si bien la granulometría de OR08 no fue determinada, a simple vista se observó que esta muestra estaba compuesta en su mayor parte de grava.

La materia orgánica representa la fuente de carbono disponible para el crecimiento de los organismos y su medición proporciona información útil sobre el estado trófico y la calidad ambiental de los sistemas marinos costeros [Dell'Anno *et al.*, 2002]. La muestra CC08-1 presentó un mayor porcentaje de materia orgánica (Figura 3.5), lo cual podría deberse a la presencia de una mayor concentración de hidrocarburos en esta muestra (Tabla 3.4). Por otra parte, la concentración de amonio más elevada se registró en la muestra PF08 (Figura 3.5), y disminuyó al aumentar el nivel de contaminación de las muestras (concentración de amonio: PF08 > CC08-2 > CC08-1). Estos resultados sugieren que podría existir cierta limitación nutricional para los microorganismos que habitan los sitios contaminados. Los metadatos materia orgánica y concentración de amonio de la muestra OR08 no fueron determinados.

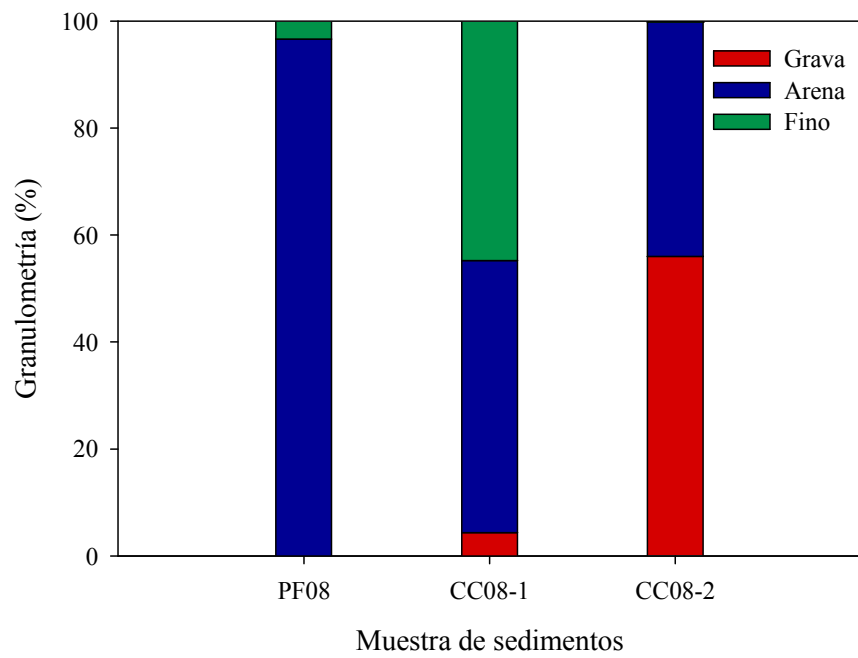


Figura 3.4. Granulometría de las muestras de sedimentos intermareales de Chubut

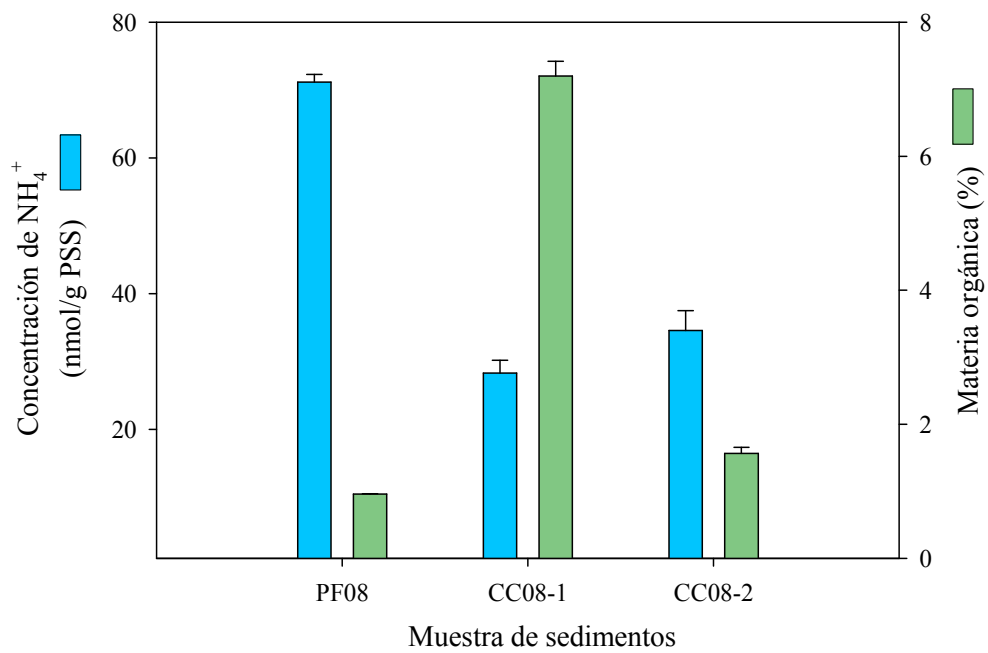


Figura 3.5. Porcentaje de materia orgánica y concentración de NH_4^+ en sedimentos intermareales de Chubut

Además de la determinación de HAPs previamente mencionada (Figura 3.2), se cuantificó la concentración de hidrocarburos alifáticos en las cuatro muestras seleccionadas para estudiar la estructura de la comunidad bacteriana. Muchos microorganismos pueden degradar alcanos utilizándolos como fuente de carbono [Rojo, 2009], y a diferencia de muchos hidrocarburos aromáticos, los alcanos no son considerados tóxicos, aunque los de cadena corta (C₅ a C₁₂) pueden afectar las membranas biológicas [Coates, 2004]. Las dos muestras de sedimentos de la zona costera de Caleta Córdova obtenidas en el año 2008 mostraron elevadas concentraciones de hidrocarburos alifáticos totales (Tabla 3.4), similares a las encontradas en zonas de actividad portuaria y/o industrial y afectadas por derrames de petróleo [UNEP *et al.*, 1992]. Estas concentraciones superan los valores de hidrocarburos alifáticos previamente reportados para este área en muestras obtenidas en el año 1995 [Commendatore *et al.*, 2000], resultado esperable ya que las muestras analizadas en este estudio fueron colectadas 105 días luego del derrame ocurrido en Caleta Córdova en diciembre de 2007. Las concentraciones halladas en OR08 fueron en cambio más bajas (Tabla 3.4), y similares en orden de magnitud a las encontradas para la zona del muelle Orión en un estudio previo realizado en la región en enero de 2001 [Esteves *et al.*, 2006]; aunque fueron menores que aquellas obtenidas para muestras colectadas en el año 2006 [Commendatore *et al.*, 2012]. En OR08 la Σ HAPs (4.127 $\mu\text{g}/\text{kg}$ PSS) fue relativamente mayor a los hidrocarburos alifáticos totales (AT, Tabla 3.4). Esto podría deberse a una acumulación preferencial de HAPs, en particular de alto peso molecular (HAPs de 6 anillos: 95,3%), por adsorción y mayor persistencia de estos compuestos en los sedimentos. En PF08, la concentración de hidrocarburos alifáticos totales fue baja (< 3 $\mu\text{g}/\text{g}$ PSS, Tabla 3.4), coincidiendo con los datos de concentración de HAPs, que no fueron detectados en esta muestra (Figura 3.2).

Las relaciones $n\text{-C17}/\text{Pr}$ y $n\text{-C18}/\text{Fi}$ son habitualmente utilizadas como indicadores de procesos de biodegradación [Colombo *et al.*, 1989]. En general, valores de estos índices comprendidos entre 1,5 y 3,5 corresponden a petróleo crudo o a sus productos derivados que presentan un grado bajo o nulo de biodegradación, mientras que valores más bajos sugieren la presencia de hidrocarburos que han sufrido procesos de biodegradación [Commendatore y Esteves, 2004]. En las tres muestras provenientes de sitios con un alto grado de exposición a contaminación (CC08-1, CC08-2 y OR08), los valores de estos índices sugieren la presencia de procesos de biodegradación, los cuales fueron relativamente mayores en CC08-1 (Tabla

3.4). Estos resultados sugieren la presencia de comunidades microbianas adaptadas a la contaminación con hidrocarburos, con un alto poder degradativo. Además, los bajos valores de la relación $\sum n\text{-alc}/\text{MCNR}$ para las muestras CC08-1, CC08-2 y OR08 confirman la presencia de residuos degradados a muy degradados (Tabla 3.4). La MCNR en estas tres muestras presentó una distribución bimodal (Figura 3.6), evidenciando la existencia de fracciones livianas y pesadas de hidrocarburos en estos sedimentos. Esta distribución podría estar relacionada con aportes frescos de hidrocarburos junto a otros más antiguos y con mayor tiempo de exposición ambiental, así como al aporte de productos con diferente composición. En la muestra PF08, el valor elevado del índice $n\text{-C17}/\text{Pr}$ no estaría asociado a hidrocarburos no biodegradados, sino al origen de los hidrocarburos en esta muestra. Los hidrocarburos impares de cadena corta ($C < 20$) como el $n\text{-C17}$ son característicos de aportes biogénicos marinos (fitoplancton y macroalgas), por lo tanto es posible que la presencia de hidrocarburos de este origen en PF08 sea responsable de un elevado valor del índice $n\text{-C17}/\text{Pr}$.

Los índices $\sum\text{par}/\sum\text{impar}$, $\sum n\text{-alc}/n\text{C16}$ e IPC permiten inferir el origen de los hidrocarburos en los sedimentos [Clarck Jr. y Finley, 1973; Colombo *et al.*, 1989; Volkman *et al.*, 1992]. Por ejemplo, una alta abundancia de hidrocarburos impares (reflejada en valores < 1 del índice $\sum\text{par}/\sum\text{impar}$) podría estar asociada a presencia de material biogénico proveniente de fitoplancton y/o macroalgas (aporte marino) o de plantas vasculares (aporte terrestre) [Commendatore y Esteves, 2004]. Asimismo, valores < 15 del índice $\sum n\text{-alc}/n\text{C16}$ evidencian contaminación con hidrocarburos del petróleo, mientras que valores altos (> 50) de este índice están asociados a fuentes biogénicas [Commendatore y Esteves, 2004]. Por último, el índice IPC es cercano a 1 cuando los hidrocarburos son de origen petrogénico, y toma valores entre 3 y 6 cuando las fuentes de estos compuestos son plantas vasculares terrestres [Commendatore y Esteves, 2004]. En las dos muestras de Caleta Córdova se observan algunos aportes de origen biogénico terrestre (en CC08-1 y CC08-2 mayor abundancia de hidrocarburos impares, y en CC08-2 el índice $\sum n\text{-alc}/n\text{C16} > 50$, Tabla 3.4). Sin embargo, el origen petrogénico es predominante en ambas muestras (concentración elevada de hidrocarburos resueltos y de MCNR, IPC cercano a 1). Por otra parte, en OR08 se observa la serie homóloga de $n\text{-alcanos}$, los isoprenoides pristano y fitano y la MCNR, todas ellas características composicionales de hidrocarburos de origen petrogénico. En PF08, la baja concentración de hidrocarburos, junto a características composicionales como la ausencia de

la serie homóloga de *n*-alcanos y de MCNR, estarían indicando una probable asociación a fuentes biogénicas.

Tabla 3.4. Concentración de hidrocarburos alifáticos (expresadas en µg/g PSS) e índices de biodegradación en las muestras de sedimentos intermareales

Muestra	ART	MCNR	AT	$\frac{n-C17}{Pr}$	$\frac{n-C18}{Fi}$	$\frac{\sum n-alc}{MCNR}$	$\frac{Par}{Impar}$	$\frac{\sum n-alc}{nC16}$	IPC
PF08	2,9	-	2,9	4,3	0,5	na	0,7	13,4	na
CC08-1	543,6	4.458	5.002	0,3	0,4	0,02	0,6	25,6	1,2
CC08-2	129,8	1.539	1.669	1,1	0,9	0,02	0,7	67,9	0,8
OR08	4,1	19,4	23,5	1,2	1,4	0,09	1,0	59,5	0,8

ART: alifáticos resueltos totales, MCNR: mezcla compleja no resuelta, AT: alifáticos totales, Pr: pristano, Fi: fitano, BPM: alcanos de bajo peso molecular ($\leq C20$), APM: alcanos de alto peso molecular ($\geq C21$), IPC: índice de preferencia de carbono, -: no detectado, na: no aplica

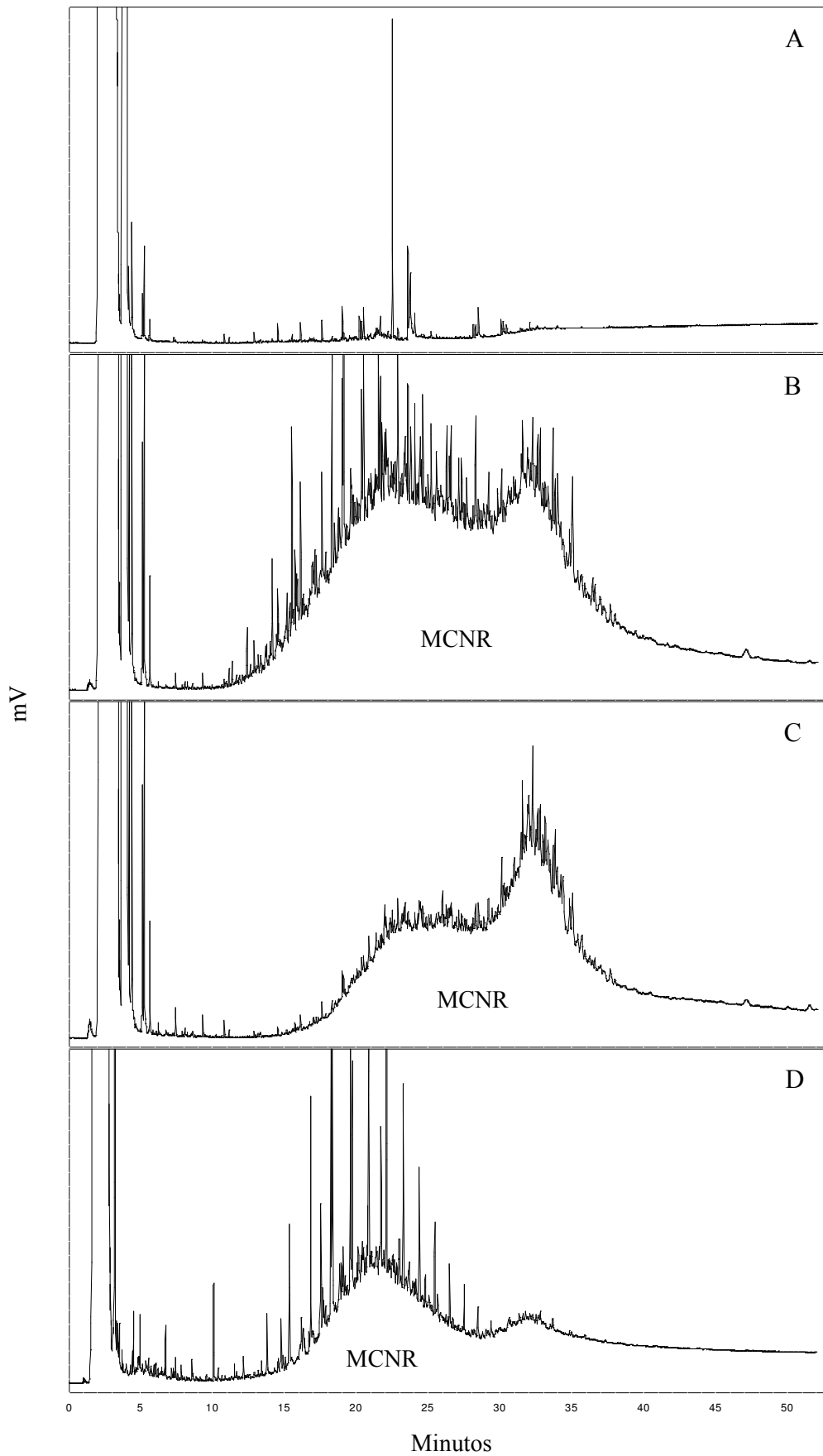


Figura 3.6 (Página anterior). Perfiles cromatográficos de las muestras de sedimentos. A: PF08, B: CC08-1, C: CC08-2, D: OR08

3.2.5.2. Calidad del ADN metagenómico purificado de los sedimentos

Debido a que para la pirosecuenciación de fragmentos hipervariables del gen ARNr 16S se amplifican fragmentos pequeños (la metodología utilizada en este estudio permitía obtener en promedio lecturas de 250 pb), la obtención de ADN metagenómico de muy alto peso molecular no es un requisito indispensable para esta técnica [Parsley *et al.*, 2011]. Sin embargo, una alta pureza de los ácidos nucleicos sí es un requisito muy importante al utilizar estas tecnologías, que por otra parte presentan un costo elevado. La calidad de los ácidos nucleicos purificados a partir de las muestras PF08, CC08-1, CC08-2 y OR08 fue evaluada en este caso utilizando una metodología más sensible que la PCR tradicional, con el fin de comprobar que los mismos fueran aptos para ser aplicados a esta tecnología. Además de evaluar el peso molecular y rendimiento del ADN (tal como se describe en la sección 3.2.4), se verificó que su amplificación no estuviera inhibida por la presencia de contaminantes en la muestra. Para ello, el ADN metagenómico fue utilizado como templado en reacciones de qPCR utilizando los cebadores 16S-1055f/16S-1392r, con el fin de cuantificar el gen ARNr 16S (Tabla 4.1, [Lane, 1991; Ferris *et al.*, 1996]). Al cuantificar un gen a partir de concentraciones diferentes de un mismo ADN templado es esperable que, en ausencia de inhibición, el número de copias del gen expresado por μg de ADN ambiental sea constante para las distintas concentraciones evaluadas. En cambio, en presencia de inhibición, es esperable que el número de copias del gen cuantificadas en el ADN templado más concentrado sea menor a la cuantificada en la muestra más diluida, debido a que al diluir el ADN se diluyen también los inhibidores que interfieren con la amplificación. Al cuantificar el gen de ARNr 16S a partir de dos concentraciones de templado (5 y 0,5 ng de ADN/reacción) no se observó inhibición de la amplificación en ninguna de las cuatro muestras evaluadas (Tabla 3.5). Estos resultados indican que la calidad del ADN metagenómico obtenido a partir de los sedimentos resulta apropiada para la pirosecuenciación de fragmentos hipervariables de este marcador filogenético. Las curvas de desnaturalización del fragmento amplificado, realizadas en la PCR en tiempo real al finalizar el programa de amplificación, permitieron además verificar la especificidad de los fragmentos amplificados (Figura 3.7).

Tabla 3.5. Cuantificación del gen de ARNr 16S a partir de dos concentraciones de ADN metagenómico de cada muestra, a fin de evaluar la presencia de inhibición de la amplificación

Muestra	Concentración de	Copias del gen
	templado (ng/reacción)	μg ADN
PF08	5,0	$4,1 \times 10^7$
	0,5	$8,2 \times 10^6$
CC08-1	5,0	$3,5 \times 10^7$
	0,5	$1,7 \times 10^7$
CC08-2	5,0	$3,9 \times 10^7$
	0,5	$1,5 \times 10^7$
OR08	5,0	$6,0 \times 10^7$
	0,5	$2,3 \times 10^7$

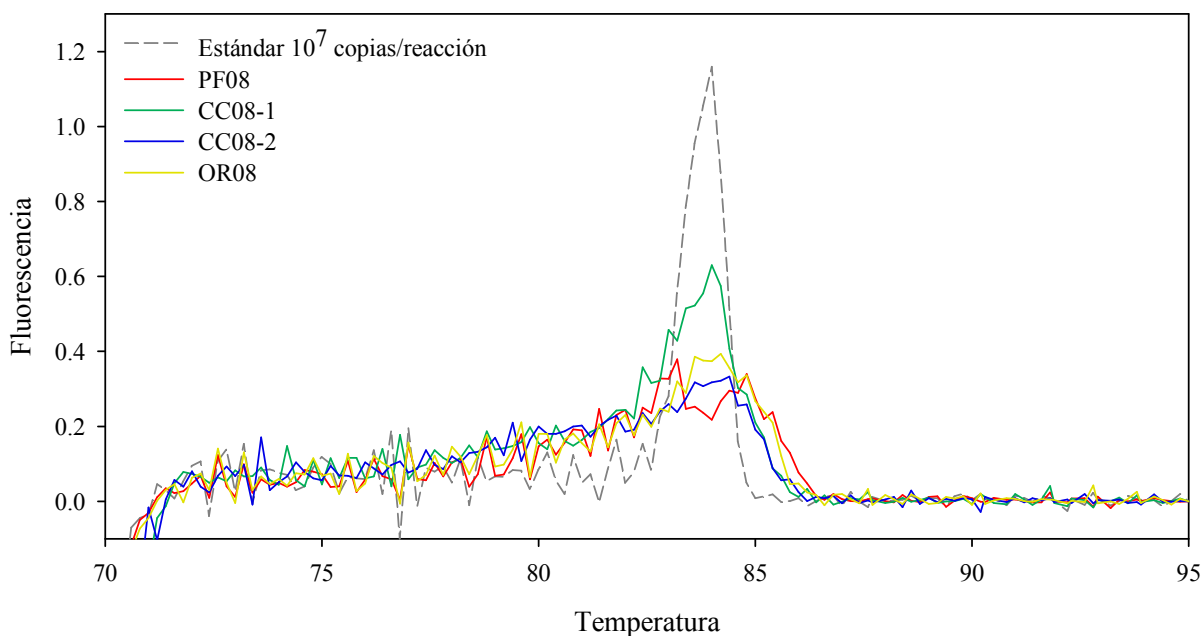


Figura 3.7. Curvas de desnaturalización del ensayo de qPCR de genes ARNr 16S bacterianos en las muestras de sedimento. Las curvas de desnaturalización de las muestras ambientales corresponden a las reacciones conteniendo una concentración de templado de 5 ng/reacción

3.2.5.3. Estructura de comunidades bacterianas en los sedimentos intermareales de Patagonia

Con el propósito de estudiar la estructura y diversidad de las comunidades bacterianas que habitan sedimentos intermareales de la Patagonia, se analizaron las muestras PF08, CC08-1, CC08-2 y OR08 utilizando un método de secuenciación masiva y paralela. La pirosecuenciación de la región variable V4 del gen ARNr 16S bacteriano a partir de las cuatro muestras ambientales resultó en un total de 123.258 lecturas. A través de un proceso de filtrado de secuencias de corta longitud, de baja calidad, que no fueran asignadas al dominio Bacteria, o que fueran identificadas como quimeras, se descartó el 18,6% de estas secuencias. Luego de estos pasos, importantes para mejorar la calidad de los resultados obtenidos, el total de secuencias analizadas para cada muestra fue de 26.357 (PF08), 25.450 (CC08-1), 33.196 (CC08-2) y 15.304 (OR08). En promedio, las secuencias analizadas presentaron una longitud de 225 pb, con valores mínimos de 205 pb y máximos de 259 pb.

La comparación de las secuencias obtenidas con la base de datos del Ribosomal Database Project (RDP, [Wang *et al.*, 2007a]) resultó en la identificación de entre 20 y 25 phyla bacterianos distintos por muestra. El phylum dominante en las cuatro muestras fue Proteobacteria, representado por 35,9 a 56,7% de las secuencias (Figura 3.8). En el caso de la muestra OR08, el phylum Acidobacteria se encontró representado en una abundancia comparable al de las Proteobacterias. Otros phyla que se encontraron en altas abundancias en al menos alguna de las cuatro muestras analizadas fueron: Acidobacteria (representando entre un 5,7 y un 35,8% en las muestras PF08, CC08-2 y OR08), Actinobacteria (8,9% en OR08), Firmicutes (5,8% en PF08 y proporciones similares en las dos muestras de Caleta Córdova) y Fusobacteria (5,5% en CC08-1). Entre un 8,5% y un 28,4% de las secuencias en las cuatro muestras no pudieron ser asignadas a ningún phyla bacteriano (Figura 3.8). Gran parte de la diversidad microbiana existente se encuentra aún inexplorada, en parte a causa de que la mayoría de los microorganismos no han podido ser cultivados. Debido a esto, las técnicas moleculares para el análisis de comunidades microbianas (particularmente aquellas que permiten una gran profundidad de análisis) generalmente permiten detectar secuencias de organismos que no han sido previamente descritos, y por lo tanto sus secuencias no han sido depositadas en las bases de datos [Polymenakou *et al.*, 2009]. Las secuencias de este estudio que no han podido ser clasificadas probablemente correspondan a organismos no

representados en la base de datos del RDP [Wang *et al.*, 2007a], que fue la utilizada para realizar las asignaciones taxonómicas.

Los phyla más abundantes se analizaron en mayor detalle para evaluar su composición al nivel taxonómico de clase. La clase más abundante dentro del phylum Proteobacteria fue Gammaproteobacteria, seguida de las clases Delta y Alphaproteobacteria (Figura 3.9). Estos tres grupos también surgieron como dominantes en ecosistemas marinos bentónicos, en un estudio de patrones de diversidad beta de ambientes marinos a escala mundial [Zinger *et al.*, 2011]. La alta abundancia de acidobacterias en la muestra OR08 (35,8%) se concentró en una clase dominante, Acidobacteria Gp4. La clase Clostridia fue la más abundante del phylum Firmicutes, aunque también se observó una alta abundancia de Firmicutes que no pudieron ser asignados al nivel de clase. Por último, las clases Actinobacteria y Fusobacteria fueron las más abundantes dentro de los phyla Actinobacteria y Fusobacteria, respectivamente (Figura 3.9).

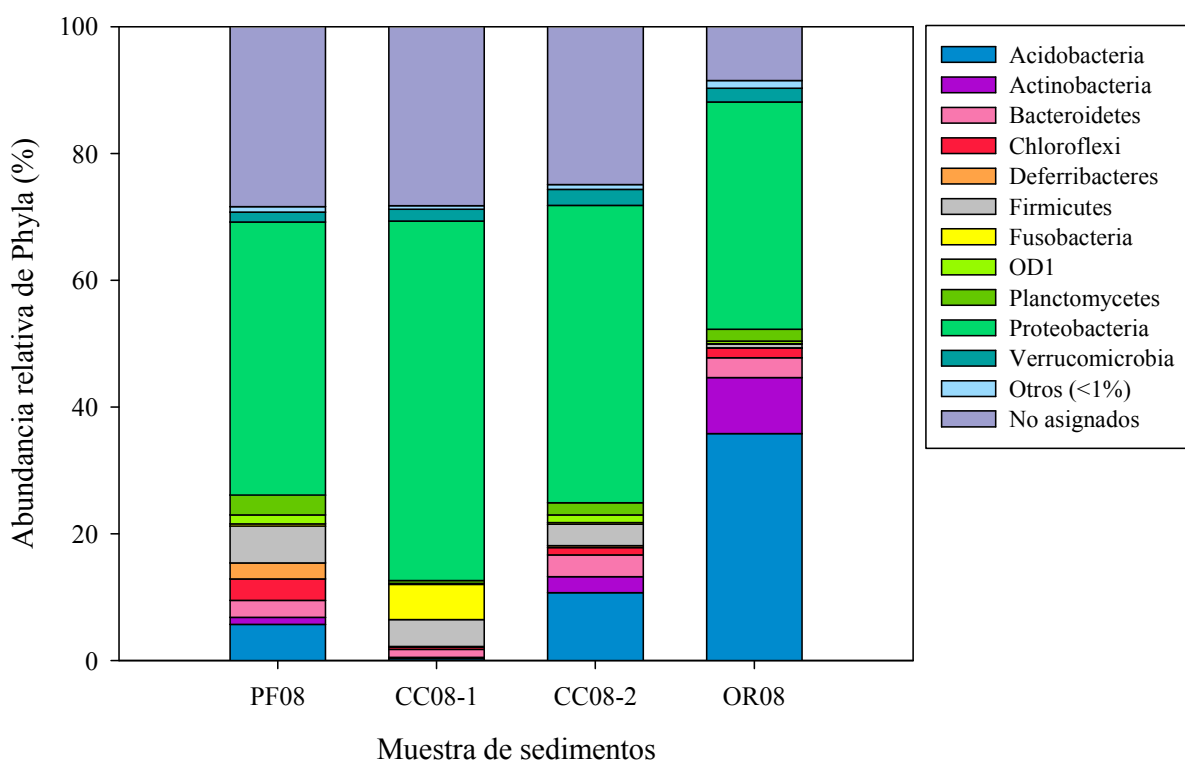


Figura 3.8. Estructura de las comunidades bacterianas de las muestras de sedimentos intermareales al nivel taxonómico de phylum. Dentro del grupo “otros” se encuentran aquellos phyla detectados en todas las muestras en abundancias inferiores al 1%

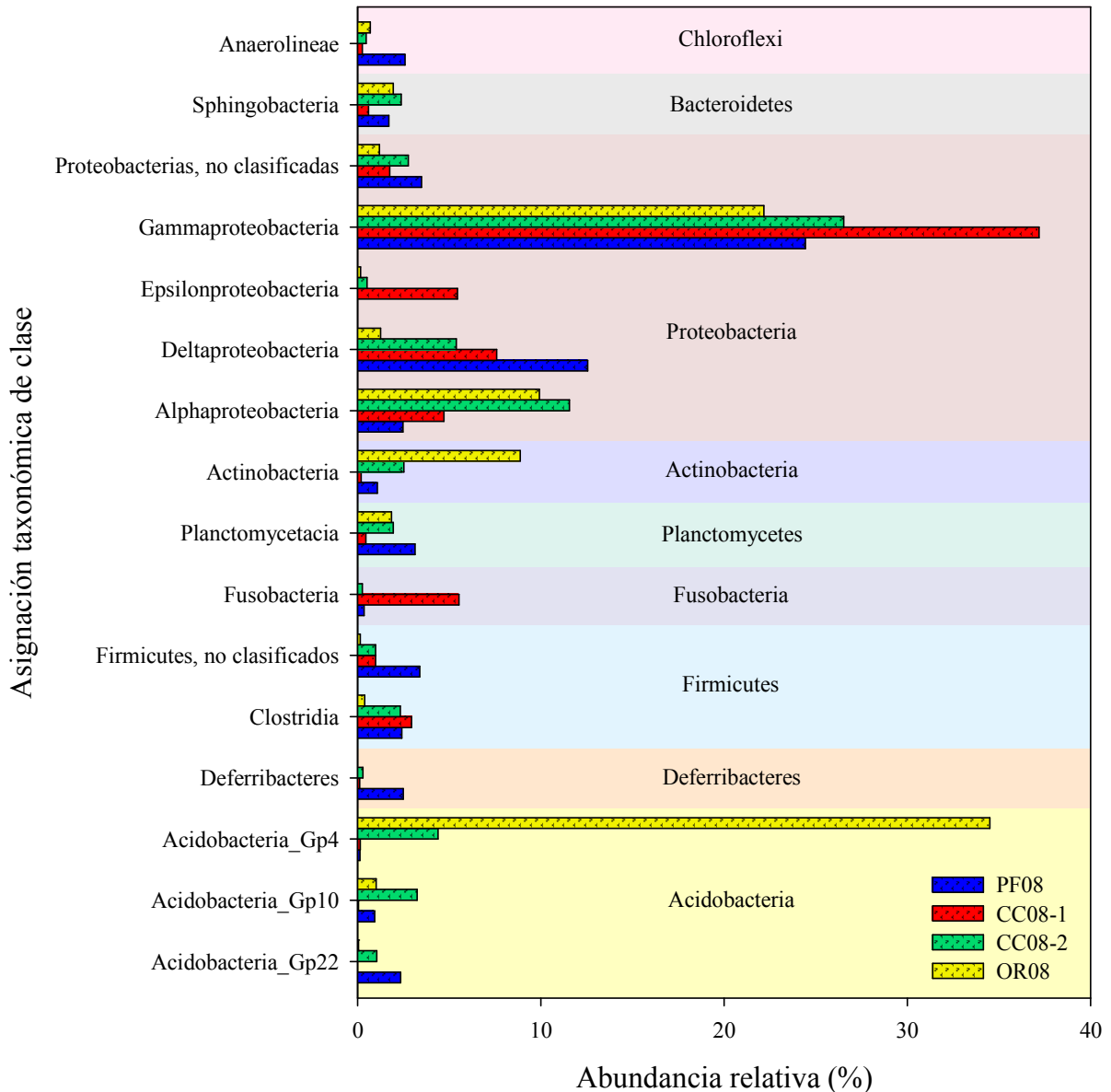


Figura 3.9. Estructura de las comunidades bacterianas de las muestras de sedimentos intermareales al nivel taxonómico de clase (se muestran sólo las clases de abundancia superior al 2%)

3.2.5.4. Similitud en la estructura de las comunidades bacterianas de los sedimentos

A fin de evaluar el grado de similitud en la estructura de las comunidades bacterianas de los distintos sedimentos intermareales, se utilizó el programa mothur v.1.22.2 para realizar un

análisis de agrupamiento utilizando el índice Bray-Curtis [Schloss *et al.*, 2009]. A pesar de encontrarse geográficamente más distantes, la estructura de la comunidad bacteriana de CC08-2 presentó una mayor similitud con la estructura de la comunidad de PF08 que con la de CC08-1 (Figura 3.10 A). De esta manera, el agrupamiento de las muestras no parece estar asociado con la distancia geográfica dentro de las tres muestras obtenidas dentro de la provincia del Chubut. Posteriormente, la herramienta BIO-ENV del programa PRIMER v6 [Clarke, 1993] nos permitió evaluar la relación que existía entre la concentración de hidrocarburos y la estructuración de las comunidades bacterianas. La herramienta BIO-ENV permite calcular el rango de correlación de Spearman entre la matriz de distancia de Bray-Curtis basada en los datos de estructura de comunidades y matrices de distancia Euclídea calculadas en base a los datos ambientales, para así elucidar cuál es la combinación de variables ambientales que mejor explica la estructura de comunidades observada [Clarke y Gorley, 2006]. Al realizar este análisis, la concentración de HAPs totales junto con la concentración de hidrocarburos alifáticos totales o HAPs de 3 anillos fueron las dos posibles combinaciones de variables ambientales que mostraron la mayor correlación ($\rho = 0,943$) con la matriz de Bray-Curtis basada en los datos de estructura de las comunidades. Las muestras de sedimentos PF08 y CC08-2, que presentan las comunidades menos disímiles, fueron a su vez las menos contaminadas con hidrocarburos (Figura 3.10). En cambio, las muestras CC08-1 y OR08 son las que presentaron o bien mayor concentración de HAPs (OR08, Figura 3.10 B), o alternatively mayor concentración de hidrocarburos alifáticos o HAPs de 3 anillos (CC08-1, Figuras 3.10 C y D). Estos resultados sugieren que dentro de cada región geográfica estudiada, los hidrocarburos detectados podrían ejercer mayor influencia en la estructuración de las comunidades que las variables asociadas a la localización geográfica.

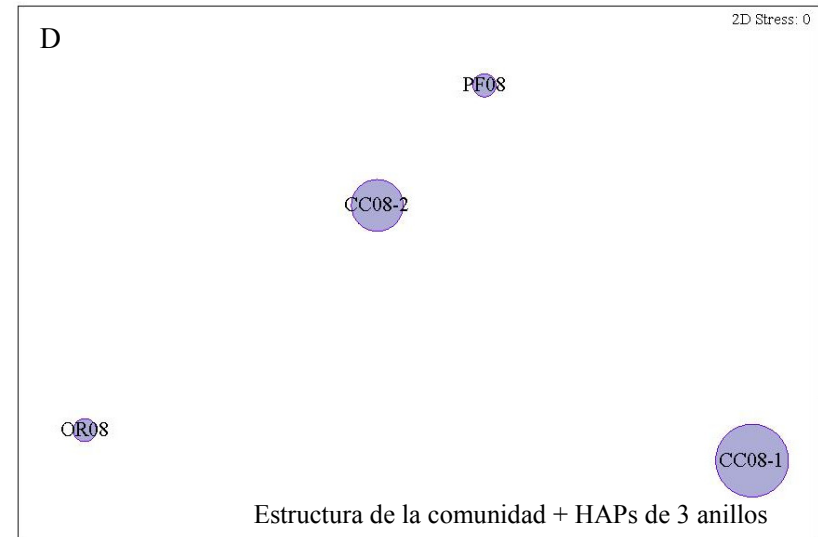
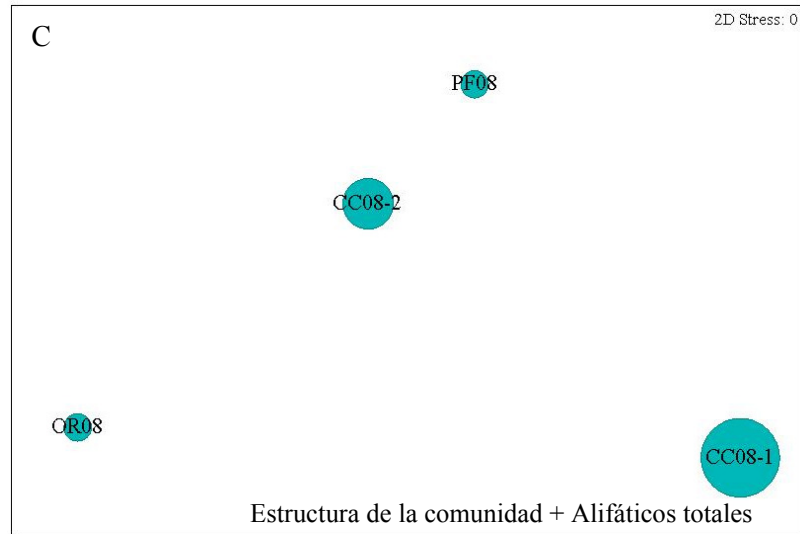
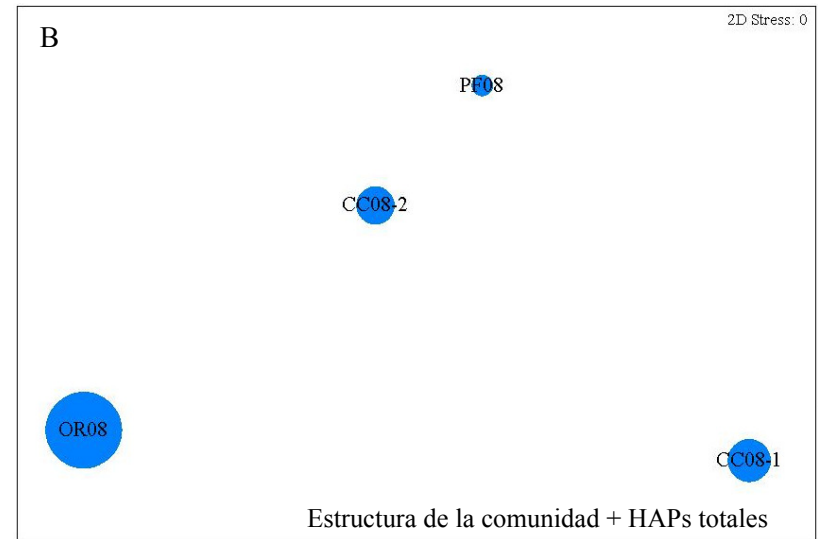
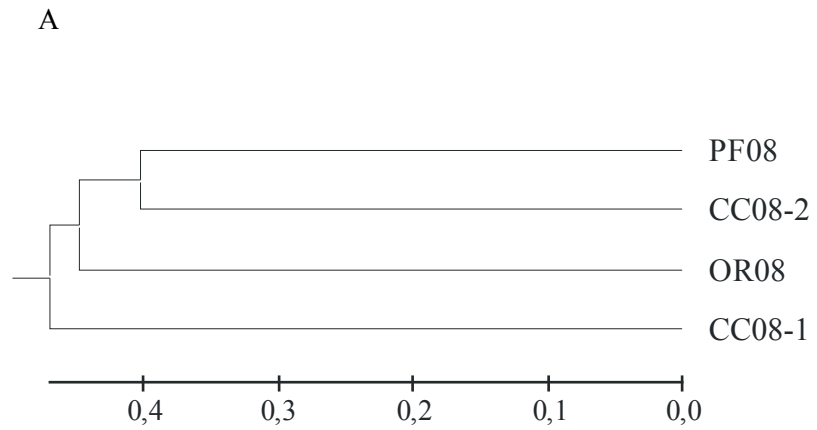


Figura 3.10 (Página anterior). Similitud en la estructura de las comunidades bacterianas de sedimentos intermareales. A: análisis de agrupamiento de las muestras de acuerdo a la estructura de sus comunidades bacterianas (índice de disimilitud: Bray-Curtis). B, C y D: análisis de ordenamiento MDS de las muestras de sedimentos basado en la estructura de sus comunidades. Los círculos superpuestos representan la concentración de los compuestos que, en conjunto, mejor explican el ordenamiento de las muestras: HAPs totales (B), hidrocarburos alifáticos totales (C) o HAPs de 3 anillos (D). El tamaño de los círculos es proporcional a la concentración de estos compuestos en los sedimentos, previa normalización de los datos, como se indica en la sección 2.9.3.1, del capítulo Materiales y métodos

3.2.5.5. Diversidad bacteriana en los sedimentos intermareales de Patagonia

La diversidad alfa es la variedad de especies y sus abundancias relativas en un determinado hábitat [Magurran, 2004]. En las muestras de sedimentos, la diversidad alfa fue calculada por medio de la inversa del índice de Simpson ($1/D$), cuyos valores pueden variar entre 1 y el número total de OTUs en la muestra [Magurran, 2004]. Para el cálculo de este índice, los OTUs fueron definidos al 97% de identidad de secuencia, lo cual es aproximadamente indicativo de géneros bacterianos. Basado en este análisis, la muestra con mayor diversidad es CC08-2 (Tabla 3.6). Por otra parte, CC08-1 (la muestra con mayor contaminación de hidrocarburos alifáticos, Tabla 3.4) y OR08 (la muestra con mayor concentración de HAPs, Figura 3.2) son las muestras con menor diversidad bacteriana (Tabla 3.6). La alta diversidad bacteriana observada se debe principalmente a la gran riqueza de OTUs, dado que la equitatividad en las tres muestras fue muy baja (Tabla 3.6). Una baja equitatividad, caracterizada por la presencia de pocos grupos dominantes y una gran abundancia de especies raras, ha sido previamente reportada para comunidades microbianas complejas [Sogin *et al.*, 2006; Elshahed *et al.*, 2008; Galand *et al.*, 2009].

A partir de la información de OTUs al 97% de identidad de secuencia, se confeccionaron curvas de rarefacción de OTUs observados a distintos esfuerzos de muestreo. Debido a que la riqueza de OTUs observados se ve afectada por el esfuerzo de muestreo, previo a la confección de las curvas de rarefacción las muestras con mayor número de secuencias fueron sub-muestreadas, a fin de que el número total de secuencias analizadas sea idéntico en todos los casos (15.304, que es el número de secuencias obtenidas en la muestra con menor esfuerzo de muestreo). Coincidiendo con los resultados previos, las curvas de rarefacción indicaron

que para un mismo número de secuencias analizadas, CC08-2 es la muestra en donde se observó una mayor riqueza de OTUs (Figura 3.11). Ninguna de las curvas de rarefacción logra alcanzar una meseta, indicando que incluso la profundidad de estos análisis es insuficiente para describir completamente la alta riqueza de OTUs presente en las cuatro muestras (estimada en más de 3.200 OTUs, índice de estimación de riqueza *Chao1*, [Chao, 1984; Colwell, 2006], Tabla 3.6). Estos resultados, que evidencian la existencia de una enorme diversidad biológica en los sedimentos, coinciden con lo observado al calcular el índice de cobertura (Tabla 3.6, [Good, 1953]). Si bien los valores de cobertura observados son altos y resultarían elevados para otras metodologías de análisis de comunidades (tales como DGGE o bibliotecas de productos de amplificación, que permiten una menor profundidad de análisis), los mismos sugieren que debido a la gran diversidad presente en estos sedimentos, sería posible detectar un nuevo OTU si se analizaran tan sólo 6 (PF08 y CC08-2) u 8 (CC08-1 y OR08) secuencias adicionales.

Tabla 3.6. Diversidad bacteriana en muestras de sedimentos intermareales

Muestra	$1/D^a$	$E_{1/D}^a$	$Sobs^a$	$Chao1^a$	Cobertura ^b
PF08	163,8 (153,9 – 175,2)	0,05	3.122	6.321,8 (5.919,6 – 6.781,8)	84,4%
CC08-1	28,8 (27,4 – 30,3)	0,01	2.272	4.439,2 (4.131,9 – 4.797,4)	88,1%
CC08-2	522,4 (499,4 – 547,7)	0,13	3.898	7.567,1 (7.156,6 – 8.029,3)	82,6%
OR08	23,1 (22,0 – 24,3)	0,01	1.879	3.240,4 (3.019,7 – 3.503,7)	87,7%

$1/D$: inversa del índice de diversidad de Simpson (entre paréntesis se indican los límites superior e inferior del intervalo de confianza al 95%); $E_{1/D}$: índice de equitatividad de Simpson; $Sobs$: número de OTUs observados; $Chao1$: índice de estimación de riqueza *Chao1* (entre paréntesis se indican los límites superior e inferior del intervalo de confianza al 95%); Cobertura: índice de cobertura de Good. ^a: índices calculados utilizando el mismo número de secuencias totales para todas las muestras (15.304, que equivale al número de secuencias de la muestra con menor esfuerzo de muestreo); ^b: índice calculado utilizando el total de secuencias de cada muestra

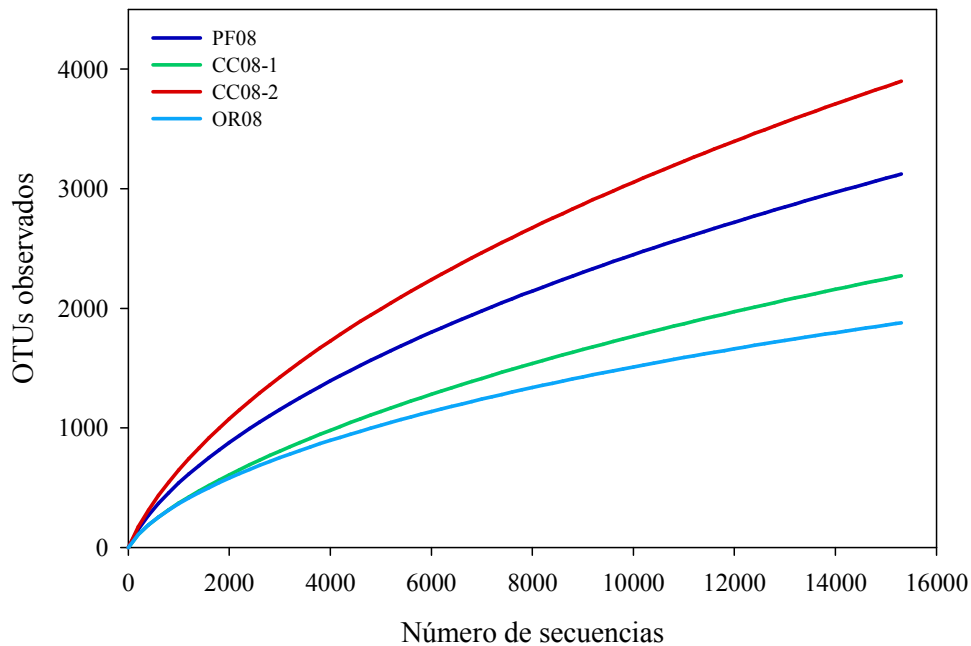


Figura 3.11. Curvas de rarefacción de especies observadas, calculado a partir de OTUs definidos al 97% de identidad de secuencias. Las curvas se construyeron en base a la información de 15.304 secuencias de cada muestra, para que todas las muestras fueran analizadas con el mismo esfuerzo de muestreo

3.2.6. Poblaciones bacterianas asociadas a la biodegradación de hidrocarburos en los sedimentos intermareales

El segundo objetivo de este capítulo fue evaluar la riqueza y abundancias relativas de poblaciones bacterianas que podrían presentar potencial para degradar hidrocarburos en los mismos sedimentos intermareales de la zona norte-centro y sur de Patagonia. Este análisis se realizó a dos niveles filogenéticos: familia y género. A niveles taxonómicos superiores a familia, el análisis filogenético no es lo suficientemente informativo del potencial biodegradativo de la comunidad. Por otra parte, a nivel de géneros bacterianos muchas secuencias no pudieron ser clasificadas y se corre el riesgo de basar el análisis solamente en la información de unas pocas secuencias, por lo que la información a nivel de familia sirve para complementar dicho análisis. OR08 mostró una alta riqueza de familias en donde se han

identificado microorganismos degradadores de hidrocarburos. Estas familias se encontraban equitativamente distribuidas, es decir, sin grupos altamente dominantes (Figura 3.12). Entre las familias más abundantes se encontraron Rodobacteraceae (Alfaproteobacteria, Rhodobacterales), Alteromonadaceae (Gamaproteobacteria, Alteromonadales), Oceanospirillaceae (Gamaproteobacteria, Oceanospirillales), Nocardioideae (Actinobacteria, Actinomycetales), Pseudoalteromonadaceae (Gamaproteobacteria, Alteromonadales) y Moraxellaceae (Gamaproteobacteria, Pseudomonadales). Todas estas familias están representadas en OR08 por uno o dos géneros bacterianos dominantes, con reconocido potencial para degradar hidrocarburos aromáticos y/o alifáticos, incluyendo: *Sulfitobacter* (Rhodobacteraceae, 1,4%), *Glaciecola* (Alteromonadaceae, 2,1%), *Marinobacter* (Alteromonadaceae, 1,2%), *Oleispira* (Oceanospirillaceae, 2,9%), *Nocardioides* (Nocardioideae, 1,9%), *Pseudoalteromonas* (Pseudoalteromonadaceae, 2,4%) y *Psychrobacter* (Moraxellaceae, 1,3%).

CC08-1 presentó en cambio una baja riqueza de grupos que podrían tener potencial degradativo, pero algunos de estos grupos se encontraron en muy alta abundancia (Figura 3.12). Entre ellos, la familia Psychromonadaceae (Gammaproteobacteria, Alteromonadales), representada en esta muestra por un único género, *Psychromonas*, y la familia Vibrionaceae (Gammaproteobacteria, Vibrionales) se encontraron en abundancias cercanas al 16% y 5% de las secuencias totales, respectivamente. Por otra parte, si bien se observó en CC08-2 una alta riqueza de familias que comprenden organismos degradadores y algunas de ellas incluso en alta abundancia (Figura 3.12), la mayoría de estas familias se vio representada por organismos que no han sido reportados como degradadores o secuencias que no pudieron ser asignadas a ningún género existente en la base de datos. El único género detectado en CC08-2 en abundancias relativamente altas fue *Glaciecola* (Gamaproteobacteria, Alteromonadales, Alteromonadaceae; 1,2%). Por último, en PF08 todas las familias estudiadas se encontraron en bajas abundancias (Figura 3.12). La familia Alteromonadaceae fue la más abundante (1,8%, Figura 3.12), y se encontró casi exclusivamente representada por el género *Haliea*.

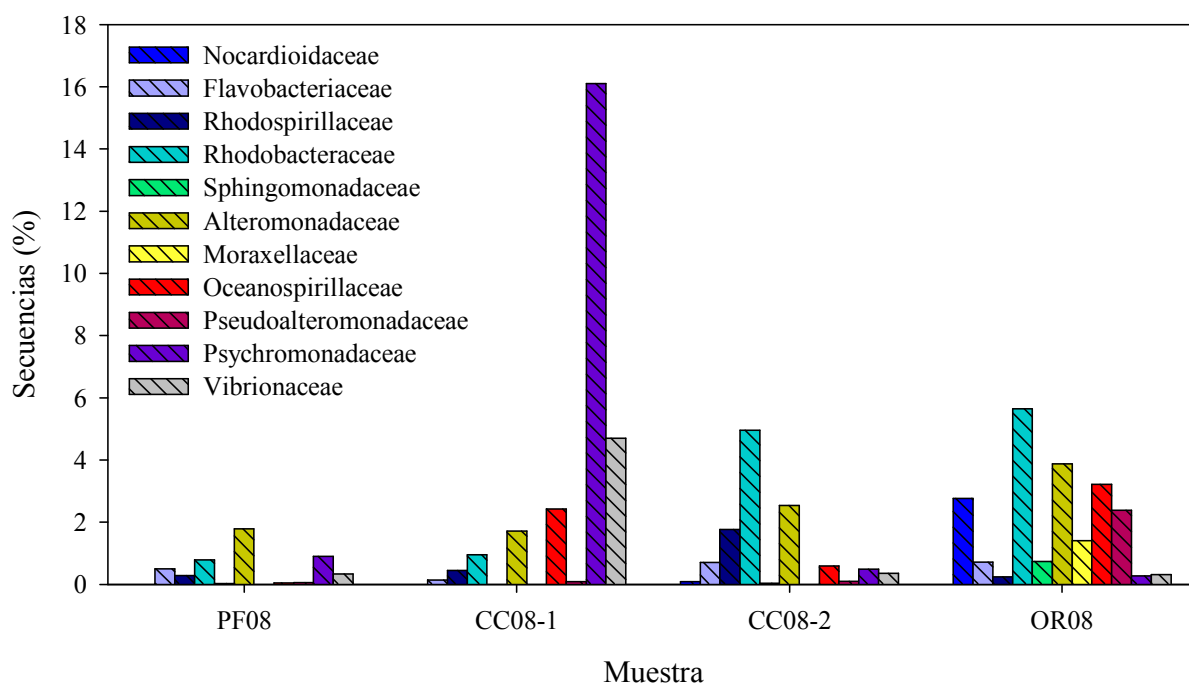


Figura 3.12. Abundancia relativa de familias bacterianas que comprenden organismos degradadores de hidrocarburos en los sedimentos intermareales. Se muestran sólo las familias que se encontraron en abundancias superiores al 0,5% en al menos alguna de las muestras

3.3. DISCUSIÓN

En el marco de la caracterización de poblaciones bacterianas de sedimentos de la costa Patagónica que presentan potencial para degradar HAPs, se decidió explorar en primer lugar la estructura y diversidad de las comunidades bacterianas de las cuales estas poblaciones forman parte. Para ello, se utilizó una técnica desarrollada recientemente, que consiste en la secuenciación en gran escala de un marcador filogenético, en este caso la región variable V4 del gen ARNr 16S de bacterias [Youssef *et al.*, 2009]. A partir de estos estudios se pudo determinar la estructura y diversidad de bacterias presentes en sedimentos de la región expuestos a diferentes condiciones ambientales y sustancias contaminantes. Estudios previos realizados en suelos, sedimentos intermareales y agua de mar de la zona de Comodoro Rivadavia y Caleta Córdova han evaluado cambios en las comunidades bacterianas luego de

su exposición a contaminación con hidrocarburos, aunque debido a las metodologías utilizadas, sólo pudieron ser detectados aquellos cambios ocurridos en la fracción cultivable de estas comunidades [Peressutti *et al.*, 2003; Pucci *et al.*, 2009; Pucci *et al.*, 2011]. En un estudio publicado por autores extranjeros [Prabakaran *et al.*, 2007], se estudió la diversidad bacteriana en agua de mar de Bahía Ushuaia con y sin la adición de la fracción soluble en agua del petróleo crudo, por medio del análisis de aproximadamente 200 clones de bibliotecas de fragmentos de genes ARNr 16S. Por otra parte, los restantes estudios realizados en Patagonia estuvieron principalmente orientados al aislamiento y caracterización de consorcios bacterianos [Nievas *et al.*, 2005; Kleinstüber *et al.*, 2006; Nievas *et al.*, 2006; Olivera *et al.*, 2009] o cepas [Alvarez *et al.*, 1996; Morán *et al.*, 2000; Olivera *et al.*, 2000; Lanfranconi *et al.*, 2003; Olivera *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2010; Madueño *et al.*, 2011] degradadoras de hidrocarburos a partir de residuos de sentina de buques, suelos o sedimentos marinos. Por lo tanto, el análisis presentado en este capítulo constituye el primer estudio de este tipo realizado en sedimentos marinos de la costa Patagónica, los cuales son los receptores naturales de los hidrocarburos. Nuestros resultados muestran la gran diversidad de géneros bacterianos que coexisten en estos sedimentos, y por lo tanto el gran potencial genético y biotecnológico presente en estos ambientes.

Debido a la necesidad de incrementar nuestros conocimientos sobre las comunidades microbianas de ambientes de la Patagonia, hasta el momento mayormente inexploradas, el primer objetivo de este capítulo fue estudiar su estructura y diversidad de las comunidades bacterianas de ambientes costeros de esta región con distinto grado de exposición a hidrocarburos. Para ello, se seleccionaron muestras de sedimentos intermareales representativas de dos sitios con un alto grado de exposición a la contaminación con hidrocarburos y ubicados en dos regiones biogeográficas diferentes, así como también una muestra obtenida en un sitio no contaminado. Caleta Córdova, ubicada en cercanías de la ciudad de Comodoro Rivadavia, se seleccionó como representativa de sitios con un alto grado de exposición a hidrocarburos de la zona norte-centro de Patagonia, y de allí se obtuvieron las muestras CC08-1 y CC08-2. Estas muestras, que fueron obtenidas 105 días después del derrame ocurrido en diciembre de 2007, mostraron evidencias de contaminación con hidrocarburos de origen petrógeno. La muestra CC08-1 presentaba evidencias de contaminación por hidrocarburos a simple vista, mientras que CC08-2, colectada en cercanías del puerto, no mostraba signos del derrame reciente. Los índices de biodegradación

calculados sugieren la presencia de procesos de biodegradación en ambas muestras, los cuales fueron relativamente mayores en CC08-1. La muestra de sedimentos representativa del sur de Patagonia (OR08) fue obtenida en la ciudad de Ushuaia, en cercanías de la planta de almacenaje de combustible denominada “Terminal Orión”. Esta muestra, en concordancia con los resultados previos de caracterización del sitio, también mostró evidencias de contaminación con hidrocarburos de origen petrogénico, y se detectó la existencia de procesos de biodegradación, aunque no tan evidentes como en las muestras de Caleta Córdova, posiblemente a causa de las bajas temperaturas de este sitio. Por otra parte, se seleccionó Playa Fracasso como un sitio no contaminado, y de allí se obtuvo la muestra PF08. En los sedimentos analizados de Playa Fracasso, obtenidos en mayo de 2008, no se detectó contaminación con hidrocarburos, como tampoco fueron detectados estos compuestos en muestras de este mismo sitio obtenidas en el año 2005 [Lozada *et al.*, 2008].

Los sedimentos estudiados presentaron una alta diversidad microbiana, y aún el profundo nivel de análisis utilizado resultó insuficiente para describir completamente a las comunidades bacterianas que los habitan. La muestra que presentó la menor diversidad fue OR08, que además evidenció un índice de equitatividad muy bajo, indicando la presencia de una mayor cantidad de géneros dominantes. Los sedimentos intermareales de Bahía Ushuaia, además de estar crónicamente expuestos a la contaminación con hidrocarburos y desechos industriales y urbanos, se encuentran expuestos a otras condiciones ambientales extremas que podrían estar afectando su diversidad microbiana. Por ejemplo, esta región se encuentra expuesta parte del año a altas radiaciones UV-B [Dionisi *et al.*, 2011]. Si bien es posible que estas radiaciones no afecten directamente a la composición de las comunidades bacterianas [Winter *et al.*, 2001], las mismas podrían actuar en sinergismo con los contaminantes presentes potenciando su efecto tóxico, y conduciendo a un cambio en la estructura de la comunidad hacia la dominancia de unas pocas especies tolerantes a estas condiciones [Bancroft *et al.*, 2007]. Además, las bajas temperaturas de Ushuaia y la posibilidad de nevadas a lo largo de todo el año constituyen otra condición ambiental que podría estar limitando el desarrollo de una gran diversidad bacteriana, ya que la diversidad tiende a ser baja en zonas de climas fríos [Fuhrman, 2009]. Por otra parte, resulta notable la gran diferencia en diversidad bacteriana entre las muestras CC08-1 y CC08-2, que fueron obtenidas en la misma playa y durante la misma campaña de muestreo, y por lo tanto estaban expuestas a similares condiciones ambientales. Sin embargo, CC08-1 presentó una concentración de hidrocarburos alifáticos 3

veces más alta y una concentración de HAPs un 40% superior con respecto a CC08-2, y probablemente esta mayor contaminación haya afectado a la biodiversidad bacteriana en CC08-1. Finalmente, resulta interesante que la muestra CC08-2, que es la muestra de Chubut en donde se detectaron los valores intermedios de contaminación con hidrocarburos, sea más diversa que la muestra no contaminada, PF08. Teniendo en cuenta que estos contaminantes representan un disturbio al ambiente, la menor diversidad en PF08 podría explicarse mediante la hipótesis de la perturbación intermedia [Connell, 1978], que propone que la diversidad biológica tiende a ser más alta cuando la intensidad o frecuencia de los disturbios es intermedia. Sin embargo, dado que los ambientes estudiados están expuestos a múltiples variables ambientales sería incorrecto suponer que los efectos sobre la diversidad de esta comunidad microbiana se deban exclusivamente a causa del disturbio producido por los hidrocarburos [Horner-Devine *et al.*, 2004]. Resulta necesario, entonces, realizar experiencias de exposición a los hidrocarburos en condiciones controladas de laboratorio, a fin de poder evaluar en forma independiente el efecto de distintas variables sobre la comunidad bacteriana. Experiencias de este tipo están siendo llevadas a cabo en nuestro laboratorio [Guibert *et al.*, 2012].

Los resultados obtenidos a partir de la técnica de pirosecuenciación permitieron realizar además una profunda descripción de la estructura de las comunidades bacterianas presentes en estas cuatro muestras de sedimentos intermareales. Los análisis de similitud entre muestras y las correlaciones con los datos ambientales sugirieron que la estructura bacteriana podría estar siendo influenciada por el tipo y concentración de hidrocarburos derramados. Estos resultados, en conjunto con las observaciones previas de una menor riqueza y mayor dominancia en las comunidades de las muestras CC08-1 y OR08, nos condujeron a explorar si los grupos dominantes encontrados en estos sedimentos podían corresponder a microorganismos con potencial degradativo. En la muestra CC08-1, coincidiendo con los resultados de diversidad mencionados, se observó una importante dominancia de bacterias del género *Psychromonas* (Gammaproteobacteria, Alteromonadales, Psychromonadaceae), superando el 15% de las secuencias analizadas en esta muestra. Este género comprende especies psicrófilas, marinas, anaeróbicas aerotolerantes y anaerobias facultativas [Mountfort *et al.*, 1998; Ivanova *et al.*, 2004] y ha sido identificado previamente en estudios de biodegradación de hidrocarburos a bajas temperaturas, por ejemplo en enriquecimientos con petróleo en agua de mar entre 0 y 5°C [Brakstad y Bonaunet, 2006], o en experimentos de

biorremediación en sedimentos intermareales del Ártico [Røberg *et al.*, 2011]. Sin embargo, su rol en la biodegradación de hidrocarburos no ha sido aún establecido con claridad. El género *Vibrio* (Gammaproteobacteria, Vibrionales, Vibrionaceae), que comprende representantes capaces de degradar hidrocarburos aromáticos [Rockne *et al.*, 2000; Hedlund y Staley, 2001], también fue detectado en altas abundancias en esta muestra. Los órdenes Alteromonadales y Vibrionales incluyen a bacterias de rápido crecimiento, con estilos de vida flexibles y que ejercen importantes roles en el reciclado de nutrientes en ecosistemas marinos costeros y pelágicos [Evans *et al.*, 2008]. Es posible que los géneros *Psychromonas* y *Vibrio* presentes en CC08-1 estén representados por bacterias oportunistas que podrían estar cumpliendo otros roles en el proceso de atenuación natural, como por ejemplo, la descomposición de materia orgánica proveniente de organismos muertos luego del derrame, lo cual concuerda con el elevado porcentaje de materia orgánica detectado en esta muestra.

A diferencia de lo observado en CC08-1, la muestra del sur de Patagonia presentó una gran diversidad de familias bacterianas que incluyen microorganismos con capacidad degradativa. Entre ellos, se detectaron en alta abundancia los géneros: *Sulfitobacter*, perteneciente a la familia Rhodobacteraceae (Alfaproteobacteria, Rhodobacterales), *Glaciacola* y *Marinobacter*, pertenecientes a la familia Alteromonadaceae (Gamaproteobacteria, Alteromonadales), *Oleispira*, de la familia Oceanospirillaceae (Gamaproteobacteria, Oceanospirillales), *Nocardioides*, como representante de la familia Nocardioideaceae (Actinobacteria, Actinomycetales), *Pseudoalteromonas*, perteneciente a la familia Pseudoalteromonadaceae (Gamaproteobacteria, Alteromonadales) y *Psychrobacter*, de la familia Moraxellaceae (Gamaproteobacteria, Pseudomonadales). Los géneros *Sulfitobacter*, *Roseobacter*, *Glaciacola* y *Psychrobacter* fueron previamente detectados en experimentos de agua de mar de esta misma región suplementada con hidrocarburos [Prabakaran *et al.*, 2007]. En otros estudios, los géneros *Glaciacola*, *Psychrobacter*, *Marinobacter* y *Pseudoalteromonas* fueron enriquecidos a partir de muestras de hielo y/o agua de mar del Ártico expuestas a petróleo crudo [Deppe *et al.*, 2005; Brakstad *et al.*, 2008]. Estas observaciones sugieren la importancia de organismos psicrófilos y psicrotolerantes en la degradación de hidrocarburos en estos ambientes.

Las bajas temperaturas no sólo actúan condicionando los microorganismos que pueden crecer en este ambiente marino (favoreciendo principalmente a organismos psicrófilos o

psicotolerantes), sino que además afectan las características fisicoquímicas del petróleo, permitiendo que se establezcan sólo comunidades capaces de degradar específicamente los compuestos biodisponibles [Golyshin *et al.*, 2010]. Por ejemplo, a bajas temperaturas los alcanos de cadena corta son menos volátiles y más solubles en agua, mientras que los alcanos de cadena larga son sólidos y menos accesibles [Golyshin *et al.*, 2010]. En OR08, la concentración de hidrocarburos alifáticos de bajo peso molecular fue mayor que la de alto peso molecular, y dadas las bajas temperaturas características de este sitio es posible que estos compuestos se encuentren solubles y disponibles para los microorganismos. Esto explicaría la presencia en esta muestra de altas abundancias de bacterias de los géneros *Oleispira* y *Marinobacter*, ya que estas son bacterias marinas hidrocarbonoclásticas obligadas altamente especializadas en la degradación de estos compuestos alifáticos [Yakimov *et al.*, 2007], y en el caso de *Marinobacter* también de compuestos aromáticos [Duran, 2010]. La comunidad degradadora establecida en OR08 debe además ser capaz de tolerar la presencia de elevadas concentraciones de HAPs de alto peso molecular (que superaron en un orden de magnitud a las concentraciones observadas en las muestras de Caleta Córdova). Las bacterias Gram-positivas, que en OR08 están representadas por un 2,4% de las secuencias totales (Familia Nocardioideae), son capaces de biodegradar los HAPs de alto peso molecular más persistentes, y son dominantes en sitios contaminados con HAPs que ya llevan cierto tiempo de exposición [Leys *et al.*, 2005; Uyttebroek *et al.*, 2006; Cébron *et al.*, 2008]. No sólo la presencia de bacterias Gram-positivas sino también de miembros de la familia Rhodobacteraceae han sido propuestos como indicadores de una posible sucesión hacia grupos degradadores de hidrocarburos recalcitrantes [Kostka *et al.*, 2011], y particularmente esta última familia fue la más abundante en OR08, representada por un 5,8% de las secuencias totales.

Recientemente, en nuestro laboratorio se determinó el efecto que tiene la adición de petróleo crudo (con y sin el agregado de nutrientes) sobre la estructura de la comunidad bacteriana de la muestra OR08, utilizando la técnica de pirosecuenciación de la región V4 del gen ARNr 16S [Guibert *et al.*, 2012]. En este estudio se observó que de los géneros presentes en alta abundancia en OR08, sólo *Sulfitobacter* y *Nocardioides* se encontraron también en alta abundancia en las suspensiones de sedimentos adicionados con petróleo crudo, a la vez que se observó un enriquecimiento de otros géneros que se encontraban en muy baja abundancia en la muestra original (*Spongiibacter*, *Sphingopyxis*, *Maribius* y *Robiginitomaculum*). Por otra

parte, las suspensiones de sedimentos de OR08 suplementadas con petróleo crudo y nutrientes mostraron un importante enriquecimiento de microorganismos de los géneros *Alcanivorax* (que alcanzaron una abundancia cercana al 46%), *Thalassospira*, *Sulfitobacter* y varios Flavobacteriales [Guibert *et al.*, 2012]. Sorprendentemente el género *Sulfitobacter* se encontró en alta abundancia en los dos tratamientos realizados a las suspensiones de sedimentos (adición de petróleo crudo, con y sin el agregado de nutrientes), como así también en la muestra de sedimentos original, OR08, sugiriendo que microorganismos de este género posiblemente cumplan un rol importante en la biodegradación de hidrocarburos de este sitio subantártico.

La familia Rhodobacteraceae fue también muy abundante en la muestra CC08-2, detectada en abundancias comparables a las que presentó en la muestra del sur de Patagonia. Sin embargo, al realizar un análisis al nivel taxonómico de género, no se detectaron en esta muestra muchos géneros bacterianos reportados como degradadores asociados a esta u a las restantes familias, sugiriendo que tal vez el nivel de resolución de familia no sea el más apropiado para analizar esta muestra en particular. El género *Glaciecola* (Gamaproteobacteria, Alteromonadales, Alteromonadaceae) fue el único asociado a la degradación de hidrocarburos detectado en abundancias relativamente altas en esta muestra, dejando abierto el interrogante sobre qué otras poblaciones podrían estar participando en la biodegradación de hidrocarburos en este sitio. Este género comprende organismos aerobios estrictos, psicrófilos y asociados al medio ambiente marino [Bowman *et al.*, 1998]. Si bien se desconoce si estos organismos podrían jugar un rol en la degradación de hidrocarburos, su abundancia se vio incrementada en comunidades de hielos árticos luego de su exposición a contaminación con petróleo crudo [Brakstad *et al.*, 2008]. Finalmente, en PF08 las familias que fueron analizadas en este estudio, en las cuales existen representantes degradadores de hidrocarburos, se encontraron, en general, en bajas abundancias. La familia más abundante (Alteromonadaceae) se encontró casi exclusivamente representada en el género *Haliewia* (Gamaproteobacteria, Alteromonadales, Alteromonadaceae). Este género comprende organismos sensibles a la contaminación con petróleo, y fue propuesto como un posible indicador de contaminación ambiental con estos compuestos [dos Santos *et al.*, 2011].

El enfoque utilizado en este capítulo nos permitió conocer en gran detalle la estructura y diversidad de las comunidades bacterianas que habitan los sedimentos intermareales del

ambiente marino patagónico, dos aspectos ecológicos importantes sobre los cuales se contaba con escasa información previa. Este estudio provee información de base acerca del contexto en el cual se encuentran las poblaciones microbianas responsables de la biodegradación de HAPs en estos ambientes, las cuales constituyen una pequeña parte de esta compleja comunidad de microorganismos. Además, mediante un análisis filogenético se estudió la diversidad y abundancia relativa de las bacterias que podrían presentar el potencial para degradar hidrocarburos en estos sedimentos. Sin embargo, el conocimiento de la estructura de la comunidad degradadora basada en la información proporcionada por un marcador filogenético como el gen del ARNr 16S no necesariamente refleja el potencial metabólico de estos microorganismos, su estado fisiológico o la función ecológica que cumplen en ese ambiente [Prosser, 2002; Junier *et al.*, 2010]. Además, muchos genes que codifican para enzimas de las vías degradativas de hidrocarburos se localizan en plásmidos, y la posibilidad de transferencia horizontal de genes permite que tanto microorganismos filogenéticamente cercanos como distantes puedan adquirir fácilmente una nueva función [Ma *et al.*, 2006]. En consecuencia, un marcador filogenético no necesariamente detectará bacterias con el potencial para degradar HAPs. Los marcadores funcionales, en cambio, tienen como blanco genes asociados directamente a los procesos de biodegradación, y es por ello que resultan más apropiados para analizar el potencial degradativo de una comunidad [Junca y Pieper, 2010]. En los siguientes capítulos de esta Tesis se utilizará una estrategia funcional, independiente del cultivo de microorganismos, para estudiar el potencial que presentan las comunidades microbianas de estos sitios para degradar HAPs.

Capítulo 4

DISEÑO Y OPTIMIZACIÓN DE ENSAYOS DE qPCR PARA LA CUANTIFICACIÓN DE GENES DE DIOXIGENASAS DE HAPs

4.1. INTRODUCCIÓN

Utilizando un enfoque funcional independiente del cultivo de microorganismos, en nuestro laboratorio se caracterizó, previo al inicio de esta Tesis doctoral, la diversidad de genes que codifican a enzimas dioxigenasas de HAPs en sedimentos intermareales de la Patagonia ([Lozada *et al.*, 2008], sección 1.5 del capítulo 1 de esta Tesis). Utilizando un par de cebadores diseñados en base a secuencias de genes identificados en microorganismos Gram-negativos aislados a partir de ambientes terrestres [Wilson *et al.*, 1999] y un par de cebadores que tienen como blanco dioxigenasas de microorganismos pertenecientes al género *Cycloclasticus*, los autores detectaron en los sedimentos la presencia de 8 variantes de genes de dioxigenasas de HAPs [Lozada *et al.*, 2008]. Otros cebadores utilizados, que tenían como blanco variantes conocidas de genes de dioxigenasas de HAPs, no generaron productos de amplificación a partir de ADN de sedimentos contaminados con hidrocarburos, sugiriendo que su abundancia en los sedimentos era baja [Lozada *et al.*, 2008]. Cinco de las variantes detectadas, que los autores denominaron A a E, fueron únicamente encontradas en sedimentos de Bahía Ushuaia, Tierra del Fuego, y no habían sido reportadas con anterioridad [Lozada *et al.*, 2008]. Los genes restantes corresponden a las variantes ya conocidas *nahAc*, genes característicos del género *Pseudomonas*, *phnAc*, identificado en *Alcaligenes faecalis* AFK2 y *phnA1*, de organismos pertenecientes al género *Cycloclasticus*.

Si bien estos resultados muestran la existencia en el ambiente marino subantártico de una diversidad hasta ese momento desconocida de genes de dioxigenasas de HAPs, la metodología utilizada (amplificación, clonado y secuenciación de los productos amplificados)

no permite hacer inferencias sobre la relevancia ecológica de las poblaciones bacterianas que portan estos genes para la biodegradación de HAPs en este hábitat. La técnica de qPCR es, en cambio, la más apropiada para responder este tipo de interrogantes, ya que permite estimar la abundancia de un determinado gen dentro de la comunidad microbiana. Esta metodología es robusta, sensible y reproducible, y por lo tanto es muy utilizada en estudios de microbiología ambiental [Smith y Osborn, 2009]. Una de las ventajas de esta metodología frente a la PCR tradicional es que no presenta los desvíos asociados con el análisis de los productos de amplificación al final del proceso, cuando la reacción se encuentra saturada [Smith *et al.*, 2006]. Por el contrario, la qPCR permite medir la acumulación de los productos de amplificación en tiempo real, y particularmente durante la etapa exponencial de la reacción, cuando la cantidad de producto acumulado es proporcional a su abundancia inicial en la muestra [Ginzinger, 2002].

Los ensayos de qPCR han resultado esenciales en estudios ecológicos para incrementar nuestra comprensión sobre los procesos de detoxificación microbianas en el contexto de sus comunidades. Además, esta metodología es considerada como una de las técnicas moleculares que presentan mayor potencial para evaluar la capacidad degradativa del ambiente durante protocolos de biorremediación [Stenuit *et al.*, 2008]. Se considera que la información aportada por ensayos de qPCR puede reducir tanto el tiempo como los costos asociados con los protocolos de biorremediación, ayudando a identificar sitios en donde la atenuación natural monitoreada sería efectiva, o donde las condiciones son limitantes para la actividad degradativa y sería necesario utilizar estrategias de bioestimulación o bioaumentación [Lebrón *et al.*, 2011]. Las limitaciones asociadas con esta metodología incluyen: (i) la distribución no uniforme de los microorganismos en el ambiente, (ii) el insuficiente conocimiento sobre genes blanco que sean claves para el proceso degradativo y (iii) la posible presencia de sustancias inhibitorias que interfieren con los procesos de extracción de ácidos nucleicos y la amplificación [Lebrón *et al.*, 2011]. Cada uno de estos puntos tiene un efecto importante sobre la calidad y la interpretación de los datos obtenidos por qPCR, por lo que la realización de los controles adecuados es esencial para minimizar el impacto de los mismos.

En este capítulo se describe el diseño y optimización de ocho ensayos de qPCR que tienen como blanco cada una de las variantes de los genes de dioxigenasas de HAPs previamente identificadas en sedimentos intermareales de la región Patagónica. Estos ensayos

de qPCR fueron diseñados con el objetivo de estudiar la abundancia relativa de cada uno de estos genes en las comunidades microbianas de los sedimentos intermareales de esta región, resultados que serán descritos en el capítulo 5 de esta Tesis doctoral. Además, se seleccionó de la bibliografía un par de cebadores que permitan cuantificar el gen ARNr 16S bacteriano. Debido a que el óptimo funcionamiento de los ensayos es de fundamental importancia para la obtención de información de relevancia ecológica, se trabajó metódicamente en la optimización de las distintas variables que pueden influir en la eficiencia, reproducibilidad y/o especificidad de la amplificación. El correcto diseño de los cebadores y la optimización de factores tales como el control de la presencia de inhibidores de la amplificación, la calidad y concentración de los reactivos y la puesta a punto del programa de amplificación fueron tenidos en cuenta antes de aplicar los ensayos en las muestras ambientales. Ensayos correctamente diseñados y optimizados minimizan las posibilidades de amplificaciones azarosas y conducen al éxito de las reacciones de cuantificación, además de que permiten garantizar la confiabilidad de los resultados obtenidos y su correcta interpretación [Gundry y Poulson, 2011; Kavanagh *et al.*, 2011].

4.2. RESULTADOS

4.2.1. Diseño de los cebadores y validación de los ensayos

Se diseñaron ocho pares de cebadores para cuantificar genes de dioxigenasas de HAPs de los grupos A a E, *phnA1* (*Cycloclasticus* spp.), *phnAc* (*Alcaligenes faecalis* AFK2 y otras Betaproteobacteria) y *nahAc* (*Pseudomonas* spp. y otras Gammaproteobacteria) [Lozada *et al.*, 2008]. A partir de un alineamiento de todas las secuencias de cada una de las variantes de los genes conocidas al mes de julio de 2007, se obtuvieron secuencias consenso de cada uno de estos grupos a partir de la cual se diseñaron manualmente los cebadores. Como ejemplo, se muestra la secuencia consenso obtenida a partir del alineamiento de los genes de dioxigenasas de la variante C y el sitio en donde se posicionaron los cebadores diseñados para este ensayo (Figura 4.1). En el caso de los ensayos diseñados para cuantificar los genes *phnA1*, *phnAc* y *nahAc*, se incorporaron además al alineamiento todas las secuencias que se encontraban disponibles en la base de datos de GenBank. Los genes *phnAc* y *nahAc* presentaron una mayor variabilidad en sus secuencias que las de los grupos restantes, y esta alta variabilidad

se vio reflejada en la necesidad de incorporar una mayor cantidad de degeneraciones en los cebadores diseñados (Tabla 4.1).

Los criterios utilizados para el diseño de los cebadores se detallan en la sección 2.7.1 del capítulo Materiales y Métodos. Se realizó un análisis *in silico* para intentar predecir la formación de estructuras secundarias y dímeros de cebadores, y este fue uno de los criterios utilizados para la selección de los mismos. Para ninguno de los cebadores elegidos se predijo la formación de estructuras secundarias estables, las cuales deben evitarse debido a que reducen la cantidad de cebadores disponibles para alinearse con el templado. De igual manera, se predecía una baja probabilidad de generar dímeros de cebadores. Sin embargo, a pesar de una baja estabilidad teórica de estos dímeros, se observó que algunos cebadores fueron capaces de formar estas estructuras. Los oligonucleótidos diseñados fueron además comparados contra la base de datos de GenBank en el momento del diseño para evaluar que el blanco de los cebadores correspondiera únicamente al gen de interés, y de este modo evitar obtener productos de amplificación inespecíficos.

```
GAGTCGGCkAyTCCCrATGCCGGGGATTTTTTCACTACCTkCATGGGCCAGGATGCGGTGCTGGTGGT
GCGCCAGGAhGACsGTTTCGGTCAAGGCrTTCCTGAAyTATTGCCAGCATCGyGGCAACAAGGTGTGCT
TyGCCGATTCGGGTAATGCCAAGGCTTTCACCTGTAActAyCATGGCTGGTCCTACGGCGGCACGGG
CGTCTGGCCGCGGTGCCTCTyGAACACGAGGTCTATCTGGGyGGCTTCGATCGCrCCGCGCAyGCGCT
yGAACCCmTCGCACAGGTGmAAAGCTAyCGCGGCTTCGTrrTTCGGATGCATGGACCCGGATGCGCCGC
CGTTrgCCGARrTATCTCGGTGAGATGGGCTGGTATCTGrATAGCTTCATGgyGGGCGAyGGACAGGGC
GCCGAActGGTCrGGCCGCCCATGAAGTCGATyCyGCGTTG
```

Figura 4.1. Secuencia consenso utilizada para diseñar los cebadores que permitieran cuantificar los genes de dioxigenasas de la variante C. Las letras en rojo corresponden al código IUPAC para bases degeneradas. El sombreado celeste corresponde al sitio en donde se ubicó el cebador hacia delante, y el sombreado verde al sitio del cebador reverso

Tabla 4.1. Cebadores diseñados para cuantificar genes de dioxigenasas de compuestos aromáticos y utilizados para cuantificar el gen de ARNr 16S de Bacteria en sedimentos intermareales de Patagonia

Cebador	Secuencia	Amplicón	Referencia
Agroup-f	5' CAGAAAGATGGTTCGGTCAAAG 3'	83 pb	[Marcos <i>et al.</i> , 2012]
Agroup-r	5' GTATTCCTGCTTCAACTGATG 3'		
Bgroup-f	5' GGATTTGTCTACGGTTGTTTCG 3'	75 pb	[Dionisi <i>et al.</i> , 2011]
Bgroup-r	5' GAGGTACCACGCAAATTCTC 3'		
Cgroup-f	5' CTTCGT r TTCGGATGCATG 3'	86 pb	[Dionisi <i>et al.</i> , 2011]
Cgroup-r	5' CATGAAGCTAT y CAGATACCAG 3'		
Dgroup-f	5' AACCCCTCACCTGCTCCTAC 3'	86 pb	[Marcos <i>et al.</i> , 2012]
Dgroup-r	5' TAAAGTAGGCGCT y TGCTCC 3'		
Egroup-f	5' GGCTTCGTATGCAGCTATCAC 3'	115 pb	[Lozada <i>et al.</i> , 2008]
Egroup-r	5' CAGGCCGTTGATCGACTTG 3'		
<i>phnAlf</i>	5' GGGTGGACTAGCTGGAA 3'	120 pb	[Dionisi <i>et al.</i> , 2011]
<i>phnAlr</i>	5' TTCGCATGAATAGCGATGG 3'		
<i>phnAcf</i>	5' CC y AGCTTGAATGACTATCTTG 3'	109 pb	[Marcos <i>et al.</i> , 2012]
<i>phnAcr</i>	5' AGTT yAAy AATGATCGACTTGG 3'		
<i>nahAcf</i>	5' TATCACGGCTGGG r CTTC 3'	138 pb	[Marcos <i>et al.</i> , 2012]
<i>nahAcr</i>	5' GAA s CCATGGAAGCTCTC 3'		
16S-1055f	5' ATGGCTGTCGTCAGCT 3'	352 pb	[Lane, 1991; Ferris <i>et al.</i> , 1996]
16S-1392r	5' ACGGGCGGTGTGTAC 3'		

Las letras en color rojo corresponden al código IUPAC para bases degeneradas

Debido al gran crecimiento que experimentaron las bases de datos en los últimos años, las secuencias de los cebadores diseñados se volvieron a comparar recientemente con las secuencias depositadas en la base de datos de GenBank, con el fin de evaluar su cobertura en la actualidad. Al momento de escribir esta Tesis existían 16 secuencias del gen *phnAl* depositadas en GenBank, de las cuales 8 pertenecen a microorganismos cultivados pertenecientes al género *Cycloclasticus* y las restantes corresponden a secuencias de este gen identificadas por métodos independientes del cultivo. Los cebadores diseñados para este tipo de dioxigenasa (*phnAlf/pnnAlr*) son capaces de hibridar con todas ellas sin errores a lo largo de toda su secuencia.

Con respecto al ensayo específico para detectar genes de tipo *phnAc*, los cebadores *phnAcf/phnAcr* coinciden perfectamente con 92 de las 94 secuencias de este gen depositadas en esta base de datos. Sin embargo, las dos secuencias restantes presentan sólo una base diferente en el extremo 5' del cebador *phnAcr*. Sólo siete de estas 94 secuencias depositadas en GenBank fueron identificadas a partir de microorganismos cultivados, pertenecientes a los géneros *Burkholderia* (4 secuencias), *Alcaligenes* (1), *Acidovorax* (1) y *Delftia* (1). Las 87 secuencias restantes fueron identificadas utilizando métodos independientes del cultivo. Por otra parte, existen actualmente 119 secuencias del grupo de genes *nahAc* depositadas en la base de datos GenBank que cubren el fragmento a amplificar; 63 de ellas pertenecen a organismos cultivados del género *Pseudomonas* y las 56 restantes fueron identificadas utilizando métodos independientes del cultivo de microorganismos. Los cebadores *nahAcf/nahAcr* coinciden perfectamente con 115 de estas secuencias. Además, dos de las secuencias presentaron una base de diferencia con en el extremo 3' del cebador *nahAcf*, y otras dos secuencias presentaron una base diferente con el extremo 5' del cebador *nahAcr*. Por último, no se han depositado en GenBank nuevas secuencias pertenecientes a genes de las variantes A-E.

Al comparar todos los cebadores con la base de datos de GenBank también se observó que ninguno de ellos (incluyendo los pares de cebadores que tienen como blanco genes de dioxigenasas con representantes cultivados como así también los que tienen como blanco las variantes de genes A a E) presentó coincidencias con genes que no correspondían a los respectivos genes blanco del ensayo, indicando una alta especificidad de los cebadores diseñados.

Además de los ensayos de qPCR que presentan como blanco variantes de genes de dioxigenasas de HAPs, se seleccionó un par de cebadores para cuantificar por qPCR el gen de ARNr 16S de Bacteria. Para ello, se seleccionó el par de cebadores 16S-1055f/16S-1392r (Tabla 4.1, [Lane, 1991; Ferris *et al.*, 1996]), previamente utilizado en ensayos de qPCR [Harms *et al.*, 2003], el cual amplifica un fragmento de 352 pb del gen ARNr 16S de bacterias. A fin de evaluar la cobertura de estos cebadores, se comparó su secuencia con la base de datos SILVA SSU r108 (última versión actualizada a la fecha de hacer el análisis, en septiembre de 2011) utilizando la herramienta TestProbe 2.2, que se encuentra disponible en la página web de la misma base de datos SILVA para el análisis en línea (www.arb-

silva.de/search/testprobe/). Esta base de datos cuenta con más de 530.000 secuencias del gen ARNr 16S del dominio Bacteria, curadas y con una longitud superior a 1.200 pb. El 51,3% y 54,7% de las secuencias de la base de datos coincidieron perfectamente con los cebadores 16S-1055f y 16S-1392r, respectivamente.

4.2.2. Optimización de los ensayos de qPCR

Los ensayos de qPCR fueron optimizados en primer lugar utilizando una mezcla de reactivos de amplificación combinada en el laboratorio. Esta etapa de optimización incluyó a los ocho ensayos diseñados, y al ensayo de qPCR que tiene como blanco al gen ARNr 16S bacteriano (Tabla 4.1). En cada etapa de optimización, se eligió la condición en la cual se encontró el Ct más bajo, ante una misma concentración de molécula blanco, a fin de identificar las condiciones óptimas para cada ensayo. Si bien luego de su optimización los ensayos funcionaban adecuadamente en un amplio rango de concentraciones del estándar, los genes de dioxigenasas blanco de los ensayos se encontraban a menudo a concentraciones por debajo del límite de detección en el ADN metagenómico purificado de los sedimentos. Por lo tanto, los límites de detección de los ensayos no resultaban adecuados para su utilización en las muestras de sedimento en estudio. En consecuencia, se decidió evaluar una mezcla comercial específicamente optimizada por el fabricante para el equipo de PCR en tiempo real utilizado, a fin de determinar si de esta manera era posible mejorar el límite de detección de los ensayos. Todos los ensayos mostraron un límite de detección al menos 10 veces menor al utilizar la mezcla comercial, por lo que la misma fue elegida para cuantificar los distintos genes blanco en las muestras de sedimento. De aquí en adelante se describen a modo de ejemplo los resultados obtenidos durante la optimización del ensayo de genes de dioxigenasa de tipo C, tanto utilizando la mezcla preparada en el laboratorio como la adquirida comercialmente.

4.2.2.1. Mezcla de amplificación combinada en el laboratorio

a) *Temperatura de alineado de los cebadores y temperatura de lectura de placa*: Tomando como punto de partida la temperatura de fusión teórica de los cebadores (T_m , calculada utilizando el programa para análisis en línea indicado en la Tabla 2.2), se evaluó un gradiente

de temperatura de alineado que cubriera 2 a 3°C por debajo y por encima de este valor. En algunos casos el ensayo se repitió para ajustar el gradiente y encontrar la mejor temperatura de alineado del ensayo. Como ejemplo, se muestra el gráfico del logaritmo de la fluorescencia en función del ciclo de amplificación para cuatro temperaturas de alineado evaluadas en el ensayo de genes de la variante C (Figura 4.2). En la Figura 4.2 se observa que la temperatura óptima de alineado del programa de cuantificación de los genes de la variante C es de 61°C, ya que temperaturas mayores o menores a 61°C resultan en mayores valores de Ct. Las temperaturas óptimas de alineado de todos los ensayos se detallan en la Tabla 4.2.

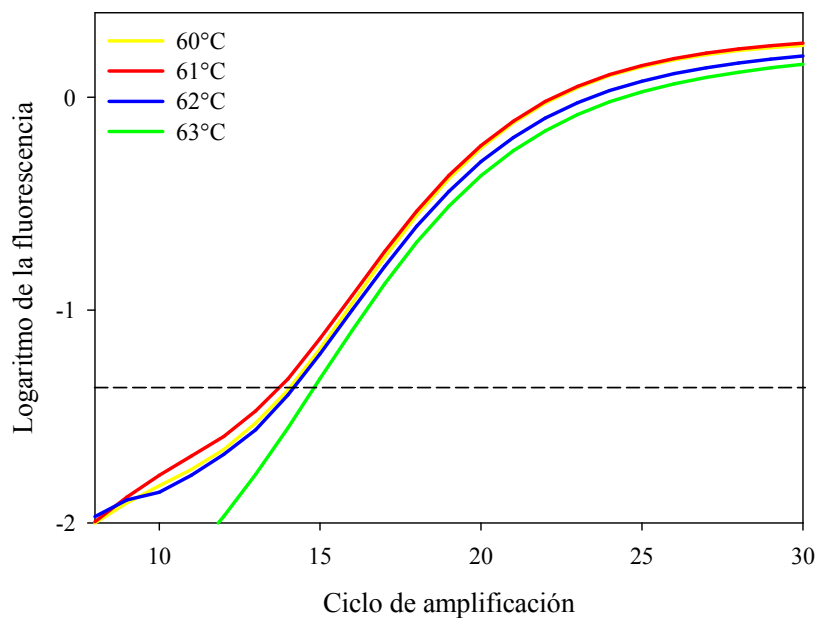


Figura 4.2. Optimización de la temperatura de alineado de los cebadores del ensayo C. Se evaluó la amplificación en un gradiente de temperaturas de 60 a 63°C. El Ct para cada condición está determinado por el ciclo de amplificación en el cual cada curva atraviesa el umbral de fluorescencia o *threshold* (línea punteada). Templado: ADN del estándar del ensayo en una concentración de 10^6 copias/reacción

Al finalizar el programa de amplificación de cada ensayo se realizaron curvas de desnaturalización para evaluar la especificidad de los fragmentos amplificados, como así también la posible formación de dímeros de cebadores u otros ensamblados oligoméricos. Al observar las curvas de desnaturalización de los estándares se detectó la presencia de estas estructuras, las cuales se evidencian como uno o más picos de desnaturalización de menor

temperatura que el del gen blanco [Bustin y Nolan, 2004a]. En la Figura 4.3 se muestra una curva de desnaturalización de los estándares del ensayo C. El pico correspondiente a los dímeros tiene una temperatura de desnaturalización de 77°C, mientras que el pico de desnaturalización correspondiente al gen blanco presenta una temperatura superior, de 85,5°C. La contribución de los dímeros a la señal cuantificada se evitó incorporando un paso de incubación durante 20 s a 80°C previo a la lectura de la fluorescencia. Las temperaturas de lectura de placa establecidas para cada uno de los ensayos a fin de evitar la cuantificación de estas estructuras de cebadores se detallan en la Tabla 4.2.

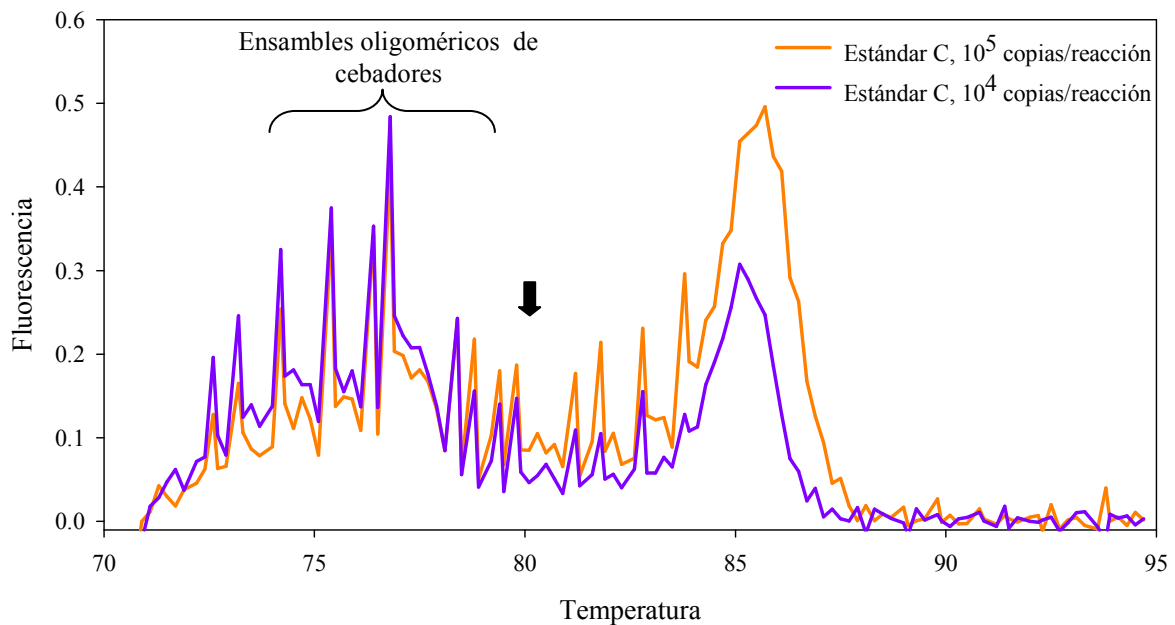


Figura 4.3. Curva de desnaturalización del ensayo C, donde se señala el pico de desnaturalización de las estructuras oligoméricas de cebadores. La flecha negra indica la temperatura de lectura de placa incorporada para evitar cuantificar estas estructuras

b) *Enzima Taq polimerasa*: Durante las primeras etapas de optimización se observó que los ensayos de las variantes de genes A y E presentaban señales muy débiles. Dado que el tipo de enzima polimerasa puede influir en la eficiencia de la amplificación [Wolffs *et al.*, 2004], se decidió en estos ensayos evaluar el funcionamiento de otras marcas de enzima Taq polimerasa. Cada enzima fue evaluada junto a los buffers recomendados para las mismas, los cuales contienen una solución amortiguadora de pH, que mantiene la concentración de

protones en el rango apropiado para que ocurra la reacción [Sambrook y Russell, 2001], y otros compuestos que la estabilizan. Además de la enzima Taq polimerasa T-Free (InbioHighway, Tandil, Argentina), se probaron las enzimas T-Plus del mismo fabricante y la enzima Taq ADN polimerasa de Productos Bio-Lógicos (Universidad Nacional de Quilmes, Argentina). A modo de ejemplo se muestra el efecto que tienen dos marcas de enzima polimerasa sobre la amplificación de los genes de la variante A (Figura 4.4). La enzima Taq ADN polimerasa de Productos Bio-Lógicos produjo curvas de amplificación con rangos de concentración lineal más amplios y ajustes de regresión mucho más altos con respecto a la enzima Taq polimerasa T-Free de InbioHighway para este ensayo, y el mismo resultado se observó en el ensayo de cuantificación de los genes E. No ocurrió lo mismo para los otros sistemas, para los cuales la enzima Taq polimerasa T-Free de InbioHighway funcionó adecuadamente en un amplio rango de concentraciones de los genes blanco del ensayo.

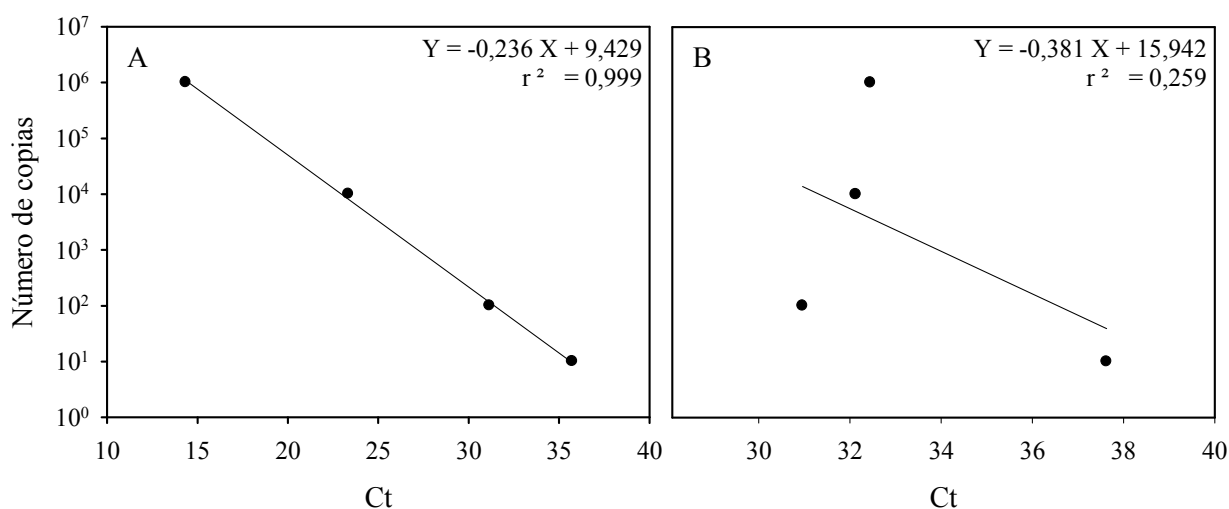


Figura 4.4. Optimización de la marca de enzima Taq polimerasa y su buffer de reacción en el ensayo de cuantificación de los genes A. A: Enzima Taq ADN polimerasa de Productos Bio-Lógicos. B: Enzima Taq polimerasa T-Free de InbioHighway. Templado: ADN del estándar del ensayo en el rango de concentraciones de 10⁶ a 10 copias/reacción

c) *Concentración del ion magnesio*: La etapa siguiente de optimización de los ensayos fue la puesta a punto de la concentración de MgCl₂ en la mezcla de reacción. Se evaluó un gradiente de concentraciones de MgCl₂ cubriendo el rango de 1,5 hasta 3,0 mM en todos los

ensayos de genes de dioxigenasas. A modo de ejemplo, se muestran las curvas de fluorescencia obtenidas utilizando distintas concentraciones de $MgCl_2$ en el ensayo de cuantificación de los genes C (Figura 4.5). Las concentraciones en el rango de 2,0 a 3,0 mM generaron curvas de fluorescencia con valores de Ct muy similares, por lo que se eligió a 2,5 mM como la concentración óptima para este ensayo (Figura 4.5). En la Tabla 4.2 se detallan las concentraciones de $MgCl_2$ seleccionadas para cada ensayo.

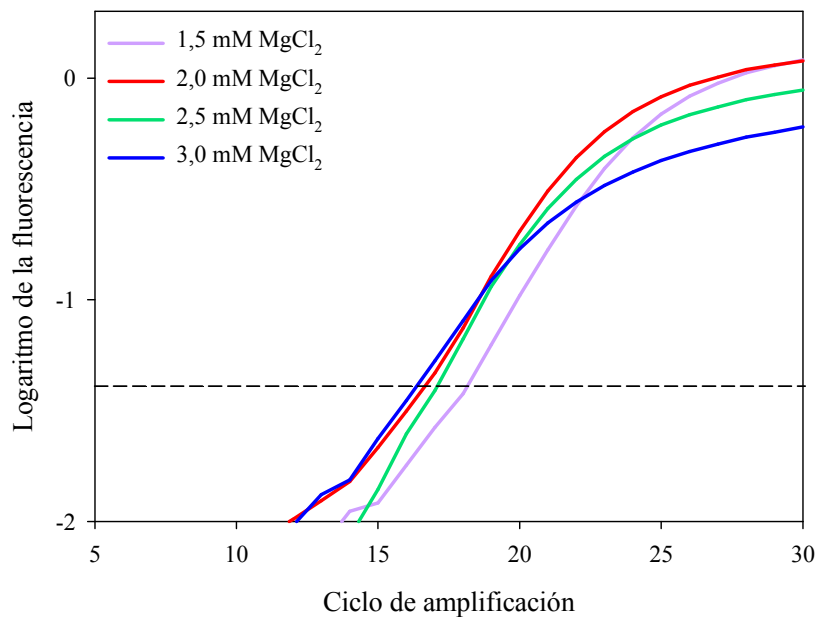


Figura 4.5. Optimización de la concentración del ion magnesio para el ensayo de cuantificación de los genes C. Se evaluó la amplificación en un gradiente de concentraciones desde 1,5 mM hasta 3,0 mM de $MgCl_2$. Línea punteada: *threshold* o umbral de fluorescencia. Templado: ADN del estándar del ensayo en una concentración de 10^6 copias/reacción

d) *Concentraciones de cebadores*: Para la optimización de las concentraciones de cebadores se diseñó una matriz en donde se combinaron distintas concentraciones de cebadores hacia delante y reverso (200, 400 y 600 nM para cada cebador), y luego se evaluaron todas las combinaciones posibles, para elegir aquella que producía el menor valor de Ct. En la Figura 4.6 se muestran a modo de ejemplo las curvas de fluorescencia producidas al amplificar el estándar de la variante C con todas las combinaciones de concentraciones de

cebadores evaluadas. La mejor amplificación fue obtenida al utilizar una concentración de 600 nM para ambos cebadores. Se observó además, que al evaluar la combinación de 200 nM para ambos cebadores, la diferencia de valor de Ct fue de 5 ciclos, mostrando la gran importancia que tiene esta etapa de la optimización para obtener una alta eficiencia de amplificación. Las concentraciones óptimas de cebadores específicas para cada uno de los ensayos se detallan en la Tabla 4.2.

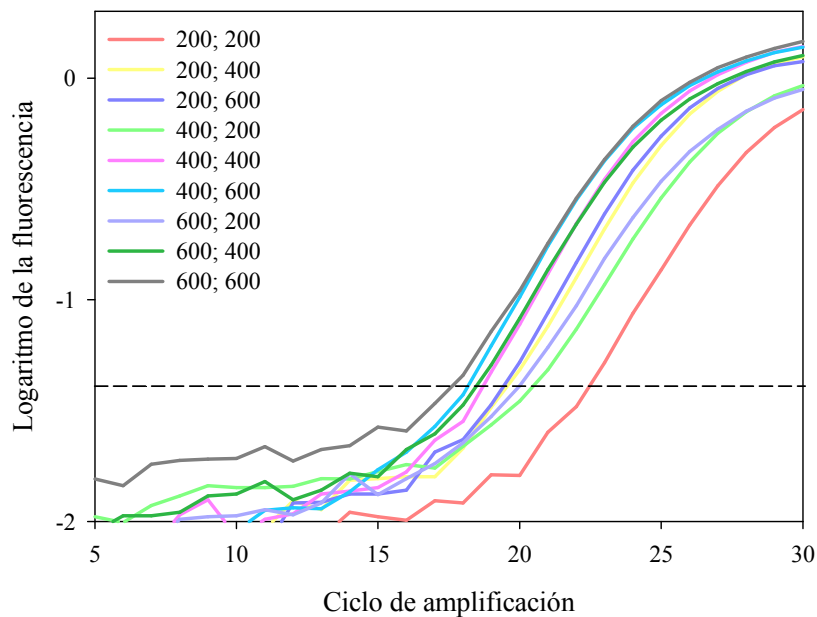


Figura 4.6. Optimización de las concentraciones de cebadores del ensayo C. Las concentraciones de cebadores se indican en la figura de la siguiente manera: cebador hacia delante; cebador reverso, ambas concentraciones expresadas en nM. Línea punteada: *threshold* o umbral de fluorescencia. Templado: ADN del estándar del ensayo en una concentración de 10^6 copias/reacción

e) *Concentración del colorante EvaGreen*: Para evaluar la concentración óptima de EvaGreen en la mezcla de amplificación, se analizó un gradiente de concentraciones entre 0,6 y $2\times$ (siendo $1\times$ equivalente a una concentración de EvaGreen $1,33\ \mu\text{M}$, recomendada por el fabricante). Los ensayos consistieron en amplificar una curva de estándares de la variante C en el rango de 10^2 a 10^8 copias del gen/reacción con mezclas de amplificación que sólo difirieron en su concentración de EvaGreen. A modo de ejemplo se muestran los resultados

obtenidos para las concentraciones de $2\times$ y $0,8\times$ del colorante (Figura 4.7). Al utilizar la concentración más baja del colorante mejoró la eficiencia de la amplificación y el coeficiente de correlación lineal de las curvas de amplificación. Este resultado era esperable, ya que se ha demostrado que altas concentraciones de EvaGreen retrasan la amplificación produciendo aumentos en los valores de Ct [Mao *et al.*, 2007].

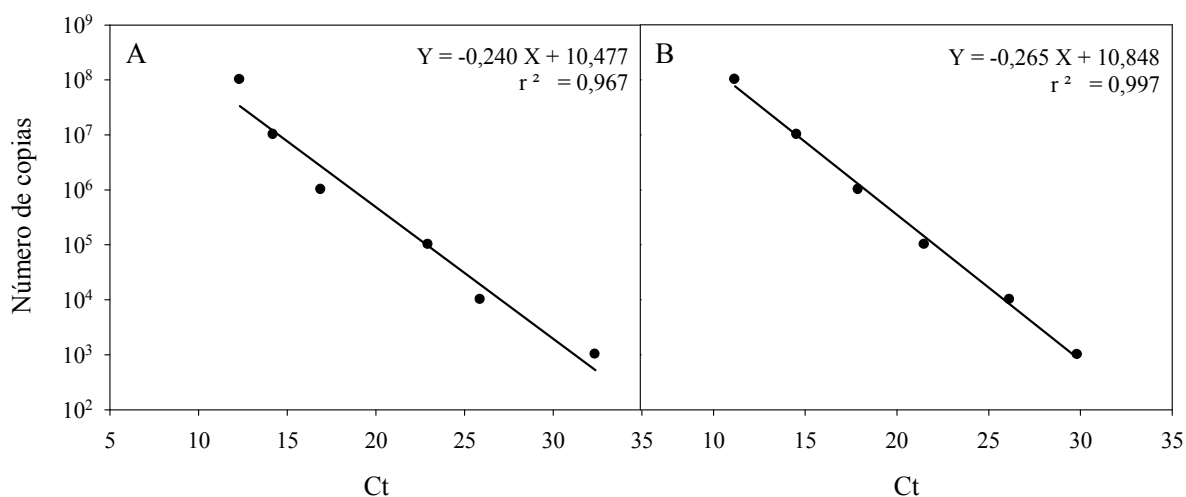


Figura 4.7. Optimización de la concentración de EvaGreen. A: Concentración $2\times$, B: Concentración $0,8\times$

f) *Concentración de enzima Taq polimerasa*: Finalmente, el ensayo diseñado para cuantificar el gen ARNr 16S fue utilizado como modelo para optimizar la concentración de enzima Taq polimerasa de la mezcla en amplificación. Utilizando como template el estándar correspondiente a una concentración de 10^4 copias/reacción, se evaluaron cuatro concentraciones de enzima polimerasa cubriendo el rango de 0,75 a 2 U Taq/reacción. La concentración de enzima que demostró ser óptima para estos ensayos fue 1,5 U Taq/reacción (Figura 4.8). Concentraciones más altas o por debajo de este valor generaron incrementos importantes en los valores de Ct.

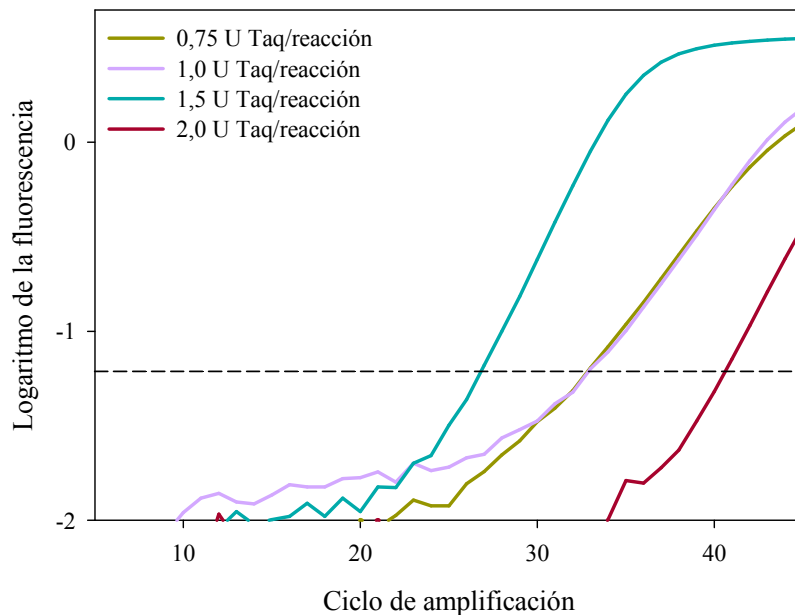


Figura 4.8. Optimización de la concentración de enzima polimerasa para el ensayo de cuantificación del gen ARNr 16S de Bacteria. Línea punteada: *threshold* o umbral de fluorescencia. Templado: ADN del estándar del ensayo en una concentración de 10^4 copias/reacción

4.2.2.2. Mezcla de amplificación comercial

Todos los ensayos fueron optimizados utilizando la mezcla comercial de qPCR PerfeCTa[®] SYBR[®] Green Supermix (Quanta BioSciences, Inc., Gaithersburg, MD, Estados Unidos), utilizando las concentraciones óptimas de cebadores previamente establecidas para la mezcla preparada en el laboratorio. A continuación se detallan los resultados de la optimización de las restantes condiciones utilizando la mezcla de amplificación comercial.

a) *Temperatura de alineado de los cebadores*: Para esta optimización se utilizó como templado de las reacciones de qPCR el ADN metagenómico purificado a partir de muestras de sedimento en donde ya se había detectado previamente la presencia de las distintas variantes de genes de dioxigenasas [Lozada *et al.*, 2008]. En la sección 2.7.3.2 del capítulo de Materiales y Métodos se detalla qué muestras de ADN fueron utilizadas para la puesta a punto de la temperatura de alineado de cada ensayo. Por ejemplo, en la optimización de la temperatura de alineado del ensayo diseñado para cuantificar la variante C se utilizó como

templado el ADN purificado de la muestra ambiental OR06, a una concentración de 2,5 ng/reacción. Se evaluaron para el ensayo C temperaturas de alineado de 59, 61 y 63°C (Figura 4.9). La amplificación de la muestra ambiental resultó más eficiente a 59°C que a temperaturas más elevadas. A 61°C el valor de Ct se incrementó en 4,5 ciclos y a 63°C ya no se observó amplificación. Al evaluar dos temperaturas de alineado por debajo de 59°C (57°C y 58°C) se obtuvieron valores de Ct similares a los obtenidos a 59°C. Es por ello que, a fin de disminuir la probabilidad de obtener amplificaciones inespecíficas, se seleccionó la temperatura más elevada de estas tres. Las temperaturas de alineado de todos los ensayos optimizados para la utilización de la mezcla de reactivos de amplificación comercial se encuentra detallada en la Tabla 4.2.

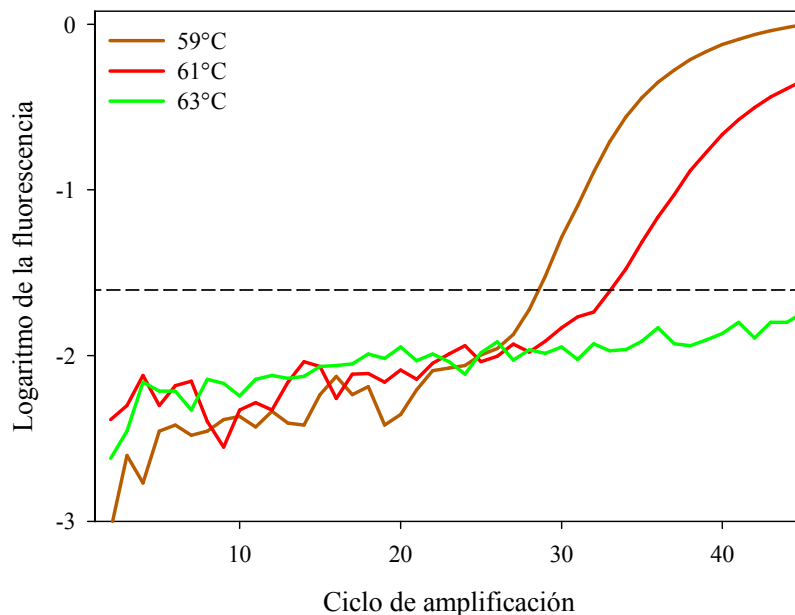


Figura 4.9. Optimización de la temperatura de alineado de los cebadores del ensayo de cuantificación de los genes C utilizando la mezcla de amplificación comercial. Línea punteada: *threshold* o umbral de fluorescencia. Templado: ADN de la muestra ambiental OR06 [Lozada *et al.*, 2008], a una concentración de 2,5 ng/reacción

b) *Temperatura de lectura de placa*: La mezcla PerfeCTa[®] SYBR[®] Green Supermix (Quanta BioSciences, Inc., Gaithersburg, MD, Estados Unidos) ya está optimizada para reducir la detección de dímeros de cebadores y por lo tanto, en la mayoría de los casos la incorporación de una temperatura de lectura de placa es innecesaria. Por lo tanto, los

fabricantes no recomiendan un paso de incubación previo a la lectura de fluorescencia. Sólo el ensayo de cuantificación de los genes de la variante *nahAc* requirió la incorporación de una temperatura de lectura de fluorescencia, ya que las curvas de desnaturalización de este ensayo evidenciaban la presencia de dímeros de cebadores (datos no mostrados). Para este ensayo se estableció una temperatura de lectura de 79°C.

Tabla 4.2. Condiciones óptimas determinadas para los ensayos de qPCR

Ensayo	Mezcla de laboratorio			Mezcla comercial	Concent. de cebadores (nM)
	T. alineado (°C)	T. lectura de placa (°C)	Concent. Mg ²⁺ (mM)	T. alineado (°C)	
A	62	79	2,0	58	600-400
B	63	79	1,5	61	600-600
C	61	80	2,5	59	600-600
D	61	83	2,0	59	600-600
E	63	85	2,5	65	400-600
<i>phnA1</i>	62	81	2,0	60	600-600
<i>phnAc</i>	58	79	2,5	56	600-600
<i>nahAc</i>	59	83	2,5	63	400-400
ARNr 16S	50	-	2,5	50	500-500

La concentración de los cebadores se indica como: cebador hacia delante-cebador reverso

4.2.2.3. Comparación del funcionamiento de los ensayos optimizados para la utilización de la mezcla preparada en el laboratorio y de la mezcla comercial

Si bien los ensayos de qPCR fueron optimizados utilizando las dos mezclas de amplificación, al comparar la mezcla preparada en el laboratorio con la mezcla PerfeCTa®

SYBR[®] Green Supermix (Quanta BioSciences, Inc., Gaithersburg, MD, Estados Unidos) se observó que ésta última mejoraba notoriamente el funcionamiento de los ensayos. La mezcla comercial no sólo mejoró el coeficiente de regresión lineal de los estándares, sino que además aumentó la sensibilidad y reproducibilidad del ensayo (Figura 4.10). Por esta razón, a pesar de su mayor costo, se decidió utilizar la mezcla comercial para la cuantificación de los genes de dioxigenasas presentes en las muestras ambientales.

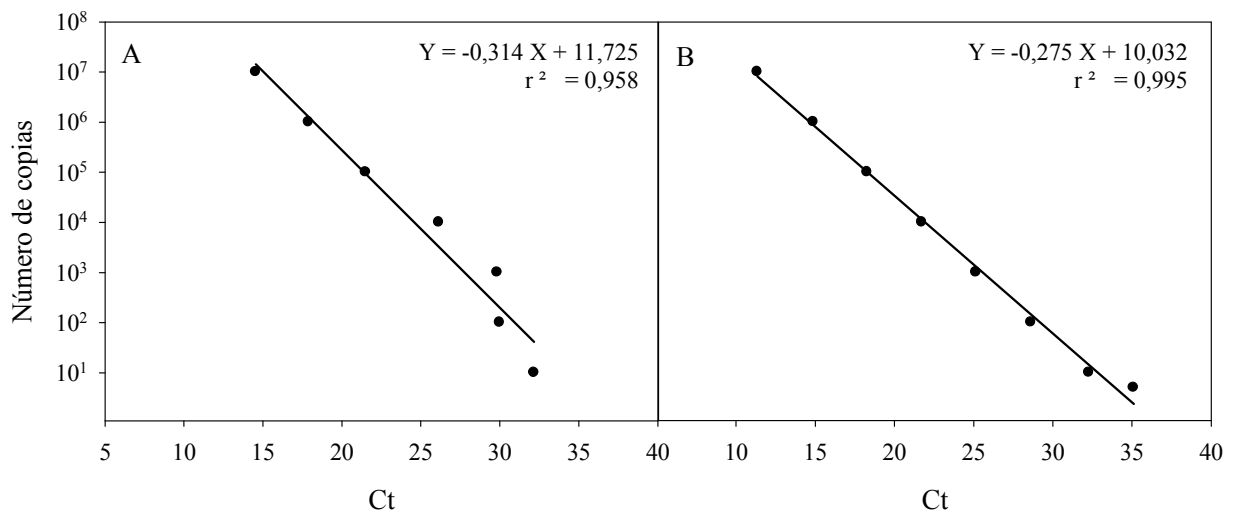


Figura 4.10. Comparación del funcionamiento del ensayo de cuantificación de los genes C al utilizar las dos mezclas de amplificación. A: mezcla de reactivos combinados en el laboratorio. B: mezcla comercial PerfeCTa[®] SYBR[®] Green Supermix (Quanta BioSciences, Inc., Gaithersburg, MD, Estados Unidos)

4.2.3. Especificidad de los fragmentos amplificados

Se utilizaron tres métodos para determinar la especificidad de los fragmentos amplificados en los ensayos de qPCR: curvas de desnaturalización realizadas en todas las reacciones de qPCR, como así también electroforesis en geles de agarosa y secuenciación de los fragmentos amplificados en reacciones seleccionadas. A modo de ejemplo se muestran en la Figura 4.11 las curvas de desnaturalización del estándar correspondiente al ensayo de cuantificación de los genes de la variante C, incluyendo el estándar y ADN purificado de dos muestras ambientales (OR06 y CC10-2). Las curvas generadas a partir del ADN ambiental mostraron una temperatura de desnaturalización de 81,2°C a 81,4°C, coincidentes con las temperaturas de los estándares del ensayo. La curva de desnaturalización del ADN

amplificado de la muestra OR06 presenta un pico ligeramente ensanchado en la base, cuya apariencia se asemeja a la de dos picos muy próximos fusionados, sugiriendo que el producto de amplificación podría estar contaminado con secuencias inespecíficas. Esta característica fue distintiva de todas las muestras obtenidas en la Planta Orión, y no se observó en ninguna de las muestras de sedimentos de la zona norte-centro de Patagonia, así como tampoco en los productos de amplificación de los ensayos de qPCR que tienen como blanco otras variantes de genes de dioxigenasas (datos no mostrados). La especificidad de estos fragmentos amplificados fue posteriormente confirmada mediante la determinación de su secuencia, de modo que la forma de estas curvas de desnaturalización podría deberse a una mayor diversidad de estos genes en los sedimentos.

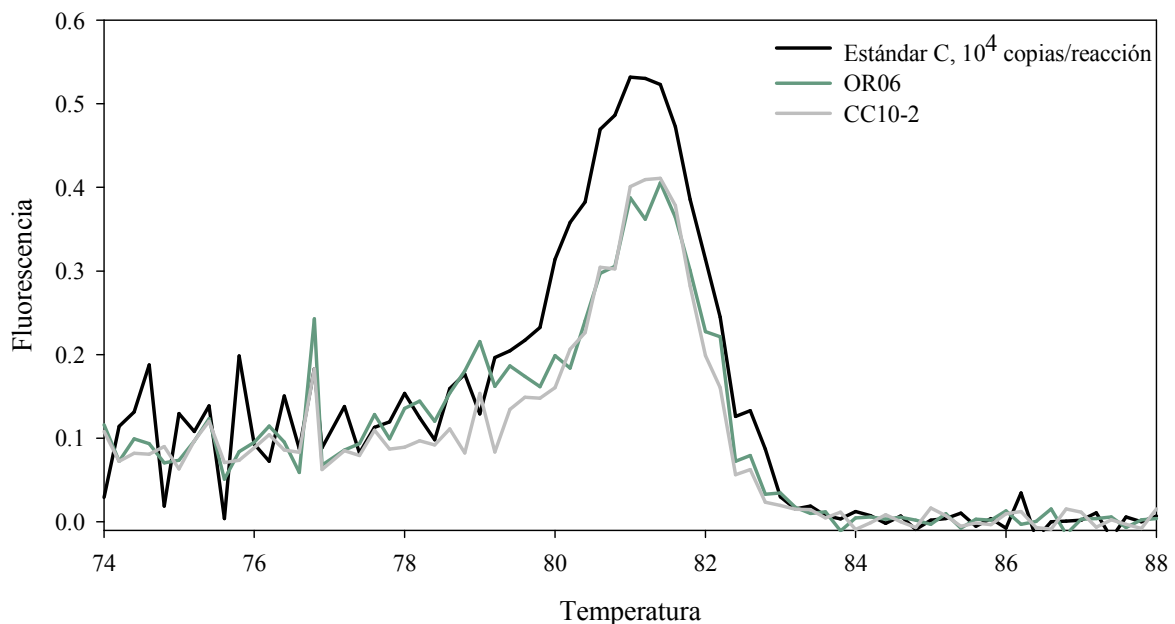


Figura 4.11. Curvas de desnaturalización del ensayo diseñado para cuantificar los genes C

Por otra parte, se realizaron electroforesis en geles de agarosa para evaluar el tamaño molecular de los fragmentos amplificados. La Figura 4.12 muestra los productos de amplificación obtenidos utilizando los cebadores que tienen como blanco genes de la variante C y el ADN ambiental de muestras de sedimentos de Ushuaia y Chubut como templado. En el gel se observa la presencia de una única banda de 86 pb, coincidente con el tamaño molecular esperado de los productos de amplificación de este ensayo. Por último, la especificidad de los

fragmentos de genes amplificados fue confirmada por medio de su secuenciación. En el caso de los ensayos diseñados para cuantificar las variantes C y *nahAc* los fragmentos amplificados fueron clonados y secuenciados, con el objetivo de verificar su especificidad. El clonado de fragmentos muy pequeños (menores a 100 pb) en presencia de SYBR Green resultó dificultoso, por lo tanto en el caso de los ensayos diseñados para cuantificar los genes A, B y D la estrategia consistió en secuenciar directamente el producto de PCR purificado a partir de un gel de agarosa. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con la secuencia consenso de cada grupo de genes y con la base de datos de GenBank. Todos los productos secuenciados resultaron ser genes de dioxigenasas, con excepción del ensayo *nahAc*, en donde se observó, además de los productos específicos, la presencia de productos de amplificación inespecíficos en el ADN purificado a partir de muestras de sedimento.

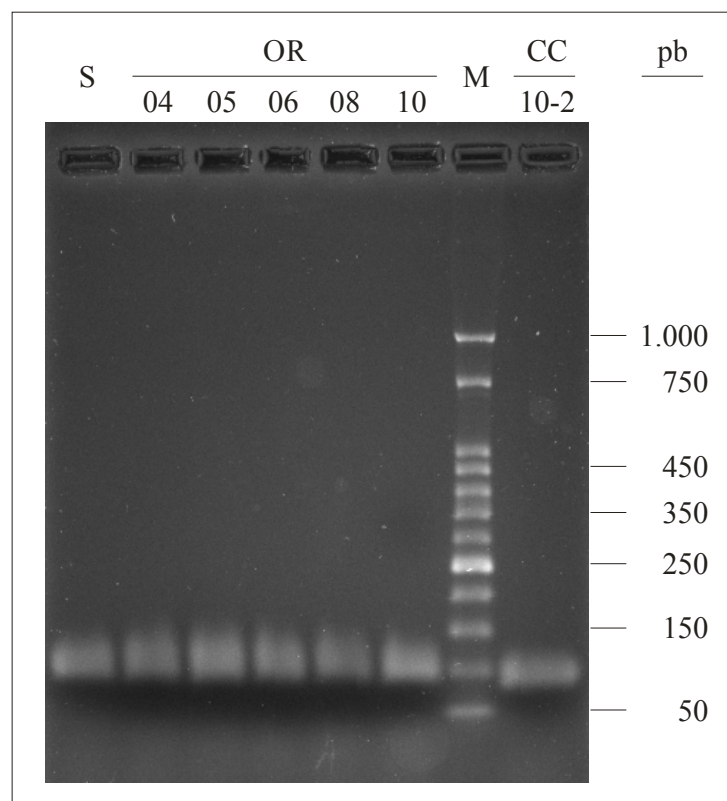


Figura 4.12. Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos amplificados con los cebadores *Cgroupf/Cgroupr*. Todas las muestras amplificaron un único fragmento del tamaño molecular esperado (86 pb). Agarosa 2,5% (p/v) en buffer TBE 0,5×, teñido con bromuro de etidio. S: Estándar de 100 copias/reacción, M: Marcador de peso molecular de 50 pb (Productos Bio-Lógicos, Universidad Nacional de Quilmes, Argentina). Al evaluar las curvas de fluorescencia, no se detectó amplificación en la reacción control sin templado agregado (blanco), por lo cual la misma no fue sembrada en el gel

4.2.4. Optimización de las concentraciones de ADN templado

El ADN purificado a partir de las muestras de sedimentos intermareales fue evaluado en ensayos de qPCR utilizando un rango de concentraciones, con el propósito de encontrar la concentración óptima de ADN para cada muestra y ensayo. Además, se utilizó el estándar de cada ensayo en una concentración de 10^3 copias/reacción para calcular el porcentaje de inhibición, de la siguiente manera: para cada concentración de ADN evaluada se realizaron dos reacciones, una conteniendo el estándar y el ADN metagenómico y otra conteniendo sólo el estándar. En ausencia de inhibidores de la amplificación en la solución de ADN metagenómico, ambas reacciones producían el mismo valor de Ct, mientras que en presencia de inhibidores, el Ct de la reacción conteniendo ADN metagenómico era mayor al de la reacción conteniendo sólo el estándar. El porcentaje de inhibición se calculó como se indica en la sección 2.7.5 de capítulo Materiales y Métodos. La condición utilizada para cuantificar los genes en las muestras de sedimentos fue aquella en la cual se observó únicamente el producto de amplificación específico y con el menor porcentaje de inhibición posible, el cual fue <10% en la mayoría (80%) de las muestras cuantificadas. La concentración del gen fue reportada luego de corregir por el porcentaje de inhibición observado, cuando no se encontró una concentración de ADN en la cual no se observara inhibición. Por ejemplo, en ensayos de qPCR de genes de la variante C utilizando ADN metagenómico purificado de la muestra OR05 se evaluaron concentraciones de ADN de 2,5 a 7,5 ng de ADN/reacción. Si bien el rango de concentraciones de ADN evaluado es pequeño, se observa que la inhibición aumenta al incrementar la concentración de ADN evaluada (Figura 4.13). El número de copias del gen de la variante C/ μg de ADN para la concentración más alta evaluada fue de $4,8 \times 10^4$, detectándose un porcentaje de inhibición de la amplificación del 91,9%. Para la concentración intermedia, se cuantificaron 1×10^5 copias del gen C/ μg de ADN y se detectó un porcentaje de inhibición del 73%, y finalmente, cuando se utilizó la menor concentración de ADN se detectó una inhibición del 34,2% y se cuantificaron $2,3 \times 10^5$ copias del gen/ μg de ADN. Teniendo en cuenta el número de copias del gen C detectadas para esta muestra, la abundancia estimada de este gen sería $3,5 \times 10^5$ copias/ μg de ADN metagenómico.

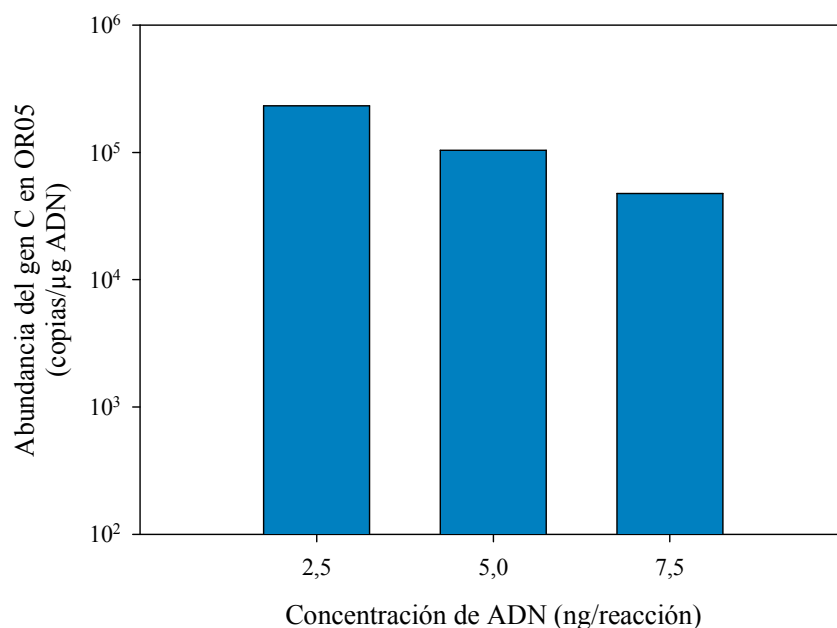


Figura 4.13. Inhibición de la amplificación en ADN purificado de las muestras de sedimentos. La abundancia de la variante C cuantificada en ADN metagenómico de la muestra OR05 disminuye al aumentar la concentración de ADN agregada a cada reacción de PCR

4.2.5. Evaluación de los parámetros de las curvas de estándares

Las curvas de estándares fueron lineales ($r^2 > 0,99$) en un rango de entre 6 y 7 órdenes de magnitud, con límites de detección de hasta 5 (ensayos C, E y *phnAc*) o 3 (ensayos A, B, D, *phnA1* y *nahAc*) copias/reacción, a excepción del ensayo utilizado para cuantificar el gen ARNr 16S de Bacteria, cuyo límite de detección fue de 100 copias/reacción. La eficiencia de amplificación de los ensayos fue superior al 88%, con excepción de los ensayos *phnAc* y *nahAc*, que tuvieron eficiencias algo más bajas (superiores al 78% para *phnAc* y al 70% para *nahAc*). Los valores de la ordenada al origen de las curvas de estándares fueron en general bajos, de entre 32 y 37 ciclos, indicando una alta sensibilidad de los ensayos diseñados. Los ensayos con eficiencias de amplificación más bajas presentaron también valores más altos de ordenada al origen (entre 36,5 y 43 ciclos). En el ensayo utilizado para cuantificar el gen ARNr 16S, el valor de Ct del control negativo de amplificación fue de entre 24,8 y 27,5 ciclos, mientras que el Ct de la reacción conteniendo 100 copias del estándar fue siempre al

menos 0,25 unidades de Ct menor al del blanco. No se observó amplificación en los controles negativos de los ensayos de cuantificación de los genes de dioxigenasas.

Debido a que no todas las muestras ambientales fueron cuantificadas simultáneamente en el mismo ensayo de qPCR para cada uno de los genes cuya abundancia se deseaba estimar, los valores de abundancia de cada gen fueron estimados utilizando dos curvas de estándares distintas: la curva correspondiente a cada ensayo individual y una curva “universal”, que consiste en la curva promedio de distintas corridas de un mismo ensayo (Figura 4.14). Si bien se observaron mínimas diferencias al utilizar estos dos métodos, la cuantificación realizada utilizando las curvas universales afectó a todas las muestras por igual, de modo que en términos generales, la abundancia relativa de los genes en las distintas muestras no se vio afectada. Es por esto que de aquí en adelante los resultados presentados fueron calculados utilizando las curvas de cada ensayo individual.

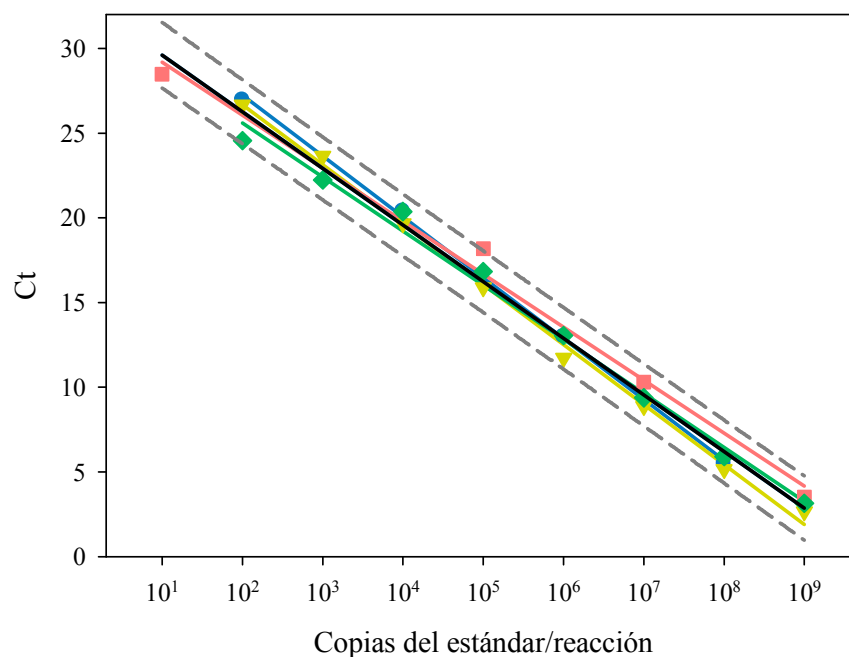


Figura 4.14. Curvas de estándares de cuatro ensayos para cuantificar el gen ARNr 16S y curva universal obtenida a partir de las cuatro anteriores. La curva universal se indica en color negro y las curvas en colores corresponden a los ensayos individuales. Las curvas en gris representan el intervalo de predicción. Ecuación de la regresión de la curva universal: $Y = -3,341X + 32,933$, $r^2 = 0,99$

4.3. DISCUSIÓN

En este capítulo se describe el diseño y optimización de ocho ensayos de qPCR específicos para cuantificar, en forma independiente, las variantes de genes de dioxigenasas *phnA1*, *phnAc*, *nahAc* y A a E, las cuales fueron detectadas o identificadas previamente en sedimentos intermareales de Patagonia [Lozada *et al.*, 2008]. Es importante aclarar que el gen *phnAc* identificado en Patagonia y cuantificado en esta Tesis no corresponde al gen *phnAc* identificado en *Burkholderia* sp. RP007, el cual constituye otra variante de gen de dioxigenasa con el mismo nombre. Ambos son genes de betaproteobacterias pero con bajo porcentaje de similitud en sus secuencias (59% de similitud entre los genes *phnAc* de *Alcaligenes faecalis* AFK2 y *Burkholderia* sp. RP007), y si bien ambos genes codifican a enzimas capaces de degradar fenantreno, sólo la dioxigenasa de la cepa RP007 es capaz de degradar naftaleno [Habe y Omori, 2003]. A pesar de haberse utilizado cebadores que tuvieran como blanco los genes *phnAc* identificados en la cepa RP007, los mismos no fueron detectados en los sedimentos intermareales de Patagonia [Lozada *et al.*, 2008] y en consecuencia, no se diseñaron cebadores para su cuantificación por qPCR. Por otra parte, el ensayo de qPCR para genes de la variante E, si bien fue diseñado y optimizado, no fue utilizado para cuantificar esta variante en las muestras ambientales. Esto es debido a que este gen fue detectado a muy bajas concentraciones en el sedimento. Dado que sólo se contaba con una secuencia de esta variante para el diseño, resultaba imposible identificar regiones conservadas en esta variante. Para evitar subestimar la abundancia e importancia ecológica de las poblaciones bacterianas conteniendo estos genes, se decidió esperar a tener nueva información genética sobre esta variante para rediseñar el ensayo y realizar estudios cuantitativos sobre este gen. Recientemente, se han identificado otras secuencias relacionadas con esta variante a partir de sedimentos del sitio OR, las cuales presentan 70,8 a 71,2% de identidad a nivel de nucleótidos con la secuencia previamente conocida. Esta información confirma que el ensayo E diseñado subestima la abundancia de genes de la variante E en los sedimentos, ya que no captura la diversidad natural de esta variante presente en el sitio.

Los cebadores fueron diseñados manualmente a partir de las secuencias consenso de los alineamientos de secuencias de nucleótidos de cada una de las variantes. Si bien los cebadores idealmente deberían cumplir con una serie de requisitos (ver sección 2.7.1 del capítulo 2 de esta Tesis), difícilmente la secuencia consenso contenga regiones conservadas que cumplan

con todos ellos, y debido a esto con frecuencia los programas computacionales fallan en encontrar regiones adecuadas para posicionar los cebadores. El diseño manual de los cebadores permite ser más flexible con estos requisitos y seleccionar regiones que muchas veces no son detectadas por los programas de diseño. El análisis *in silico* de los cebadores diseñados para cuantificar genes de dioxigenasas indicó que los ensayos presentan una alta especificidad para los genes blanco de los mismos, ya que sus secuencias coinciden con las secuencias de genes de dioxigenasas de las variedades seleccionadas que han sido depositadas en las bases de datos, pero no con secuencias que no son blanco del ensayo. Sin embargo, las secuencias depositadas en las bases de datos sólo representan una pequeña parte de la verdadera diversidad de genes existente en la naturaleza, y por lo tanto este análisis sólo constituye un valor de referencia para estimar la cobertura de los cebadores [Iwai *et al.*, 2011]. De hecho, resulta imposible conocer qué proporción de toda la diversidad de estos genes presentes en los sitios analizados son capaces de ser detectadas por los ensayos diseñados. Por lo tanto, la información aportada es una estimación de la abundancia del gen en los sedimentos, y un valor de referencia mínimo para dicha abundancia. Se seleccionó, además, un set de cebadores que tienen como blanco el gen ARNr 16S de bacterias y que ha sido previamente utilizado en muestras ambientales como un ensayo de tipo TaqMan [Harms *et al.*, 2003; Dionisi *et al.*, 2004]. Este gen es comúnmente utilizado como método para estimar la concentración de bacterias totales en los sedimentos [Dionisi *et al.*, 2004]. Si bien esta determinación es incapaz de cubrir el 100% de los genes ARNr 16S presentes en la muestra, aún puede ser utilizada como marco de referencia.

Los ensayos fueron optimizados utilizando dos tipos de reactivos: mezclas preparadas en el laboratorio utilizando reactivos de origen nacional y una mezcla comercial importada optimizada específicamente para el modelo de termociclador disponible en el laboratorio. Como primera medida al utilizar la mezcla de reactivos combinada en el laboratorio se optimizó el programa de amplificación, incluyendo la temperatura de alineado de los cebadores y la temperatura previa a la lectura de fluorescencia. En general, al aumentar la temperatura de alineado de los cebadores se disminuye la probabilidad de que los mismos se unan a secuencias no específicas [Bustin y Nolan, 2004b]. Este paso es por lo tanto muy importante, porque de existir amplificación inespecífica se sobreestima la concentración de las moléculas blanco, en particular cuando utilizamos colorantes fluorescentes que se unen a cualquier ADN de cadena doble. Por otra parte, temperaturas muy elevadas reducirán la

eficiencia de las hibridaciones específicas, subestimándose de esta forma la concentración de genes blanco en los sedimentos. La optimización del programa de amplificación incluyó, además, la determinación de una temperatura de incubación previa a la lectura de fluorescencia para cada ensayo. La incorporación al protocolo de amplificación de un paso adicional previo a la lectura de fluorescencia, que consista en una etapa de incubación a una temperatura superior a la de formación de los dímeros pero inferior a la de formación del pico de desnaturalización del gen específico es una opción simple y efectiva para evitar la cuantificación de estas estructuras de cebadores sin necesidad de tener que rediseñar el ensayo [Pfaffl, 2004].

Los pasos siguientes de la puesta a punto de los ensayos involucraron la determinación de las concentraciones óptimas de los diferentes reactivos. La concentración del ion magnesio afecta tanto la especificidad de la reacción como su eficiencia [Edwards y Logan, 2009]. Concentraciones muy elevadas de Mg^{2+} generan desnaturalizaciones incompletas y bajo rendimiento de amplificación, e incrementan la formación de productos de amplificación inespecíficos y dímeros de cebadores. En cambio, concentraciones muy bajas de magnesio disminuyen la capacidad de la enzima polimerasa para extender los oligonucleótidos [Edwards y Logan, 2009]. Es muy importante, además, determinar la concentración óptima de los cebadores por las siguientes razones: por un lado, la formación de dímeros reduce la concentración de cebadores que está libre para unirse al ADN templado, produciendo una disminución en la cantidad de producto de amplificación obtenido [Innis y Gelfand, 1990]. Por otra parte, cuando la secuencia de los cebadores incluye degeneraciones, la concentración real de cada oligonucleótido también es menor, y sólo una parte de los oligonucleótidos agregados a la mezcla de reacción tendrá la secuencia complementaria a la del ADN templado que se desea amplificar. En estas dos situaciones (cebadores degenerados o que forman dímeros), un incremento en la concentración de cebadores mejora el funcionamiento de la reacción, si bien concentraciones muy elevadas de cebadores en la mezcla de reacción pueden promover la formación de productos inespecíficos [Innis y Gelfand, 1990].

La concentración del colorante EvaGreen fue otra de las variables optimizadas. Debido a que el colorante fluorogénico es una molécula de unión al ADN, inevitablemente afectará el proceso de amplificación si se encuentra en concentraciones muy elevadas, pudiendo hasta incluso inhibir la amplificación [Mao *et al.*, 2007]. Factores tales como: el tipo de ADN

polimerasa, las secuencias de los cebadores, el tamaño del amplicón, los componentes del buffer y el protocolo de amplificación afectan la concentración óptima del colorante fluorogénico. Por último, se optimizó la concentración de enzima polimerasa. La importancia de este paso de optimización radica en que incrementos en la concentración de esta enzima permiten aumentar la sensibilidad de los ensayos, mientras que un exceso de la misma puede generar productos de amplificación inespecíficos [Exner y Lewinski, 2002].

A pesar del gran esfuerzo empleado para la optimización de los ensayos utilizando la mezcla preparada en el laboratorio, ésta presentó una menor sensibilidad y una mayor variabilidad con respecto a la mezcla de reactivos comercial. Existe una gran diferencia entre el costo de la mezcla de reactivos preparada en el laboratorio y la mezcla de reactivos comercial (costo de los reactivos de origen nacional: \$1/reacción; costo de la mezcla comercial: \$5/reacción). A estos valores hay que adicionarle además el costo de las campañas de muestreo, kits de extracción de ADN, material descartable, síntesis de cebadores, el costo del mantenimiento y calibración de equipos, etc. [Lebrón *et al.*, 2011]. El bajo costo de los ensayos es deseable en caso de analizarse una gran cantidad de muestras, por ejemplo para su aplicación en áreas a remediar, ya sea durante la caracterización del sitio contaminado como así también durante el monitoreo de los protocolos de biorremediación. Un bajo costo favorecería el uso de metodologías moleculares durante la remediación de sitios contaminados. La información que puede aportar esta herramienta es muy valiosa, y se refleja en una mejor caracterización del sitio impactado y de la evolución del proceso de remediación, permitiendo acortar los tiempos de remediación y por lo tanto disminuir el costo total del proceso [Lebrón *et al.*, 2011].

Debido a una mejor reproducibilidad y límite de detección en los ensayos, se decidió utilizar la mezcla comercial para analizar las muestras de sedimentos. Las mezclas comerciales presentan la ventaja de que todos sus componentes son de alta calidad, y ya están combinados en sus concentraciones óptimas. Por esta razón, sólo requieren de mínimos pasos de optimización. En este caso se utilizó ADN metagenómico de muestras en las cuales ya se había detectado la presencia del gen como templado para la optimización del programa de amplificación. Las eficiencias de amplificación de fragmentos de genes a partir de ADN metagenómico (el cual consiste en mezclas de genes homólogos) pueden ser inferiores a las de los estándares del ensayo (que consisten en plásmidos conteniendo un único gen). Esto

puede deberse a la presencia de inhibidores en el ADN purificado de muestras ambientales [Becker *et al.*, 2000] o debido a variaciones en las secuencias de genes de la variante analizada que no fueron consideradas en el diseño de los cebadores. Debido a esto, es posible que las condiciones que resultan óptimas durante la puesta a punto de ensayos utilizando como templado ADN de estándares pudieran llegar a ser demasiado estrictas para la amplificación de un gen a partir de ADN de muestras ambientales. En este caso se corre el riesgo de obtener falsos negativos o valores que subestiman la abundancia del gen en una muestra. Sin embargo, el utilizar ADN metagenómico en todas las etapas de optimización es a veces impracticable, dado que la optimización de todas las condiciones de amplificación involucra múltiples reacciones y las muestras de ADN son generalmente limitadas.

Los ensayos de qPCR diseñados utilizan como método de detección de fluorescencia, colorantes de unión al ADN de doble hebra (EvaGreen en la mezcla de reactivos combinada en el laboratorio y SYBR Green en la mezcla comercial). Debido a que estos compuestos pueden unirse de forma inespecífica a cualquier secuencia de ADN es muy importante evaluar la especificidad de los fragmentos amplificados [Bustin y Nolan, 2004a]. Los cebadores diseñados para cuantificar las distintas variantes de genes de dioxigenasas resultaron ser altamente específicos, según se determinó *in silico* al compararlos con las secuencias depositadas en la base de datos de GenBank. Sin embargo, existe la posibilidad de que los cebadores alineen con secuencias que no han sido depositadas aún en esta base de datos, o de que se hayan elegido condiciones de amplificación poco estrictas bajo las cuales los cebadores puedan hibridizar con genes que no son el blanco del ensayo. Debido a que no es necesaria una hibridización perfecta entre los cebadores y el ADN templado para que se produzca amplificación, es posible que en estos casos se obtengan productos de amplificación inespecíficos, los cuales serán detectados por el colorante de unión al ADN de doble hebra y como consecuencia se estará sobreestimando la abundancia del gen en la muestra. Por ello, a fin de evaluar la especificidad de las amplificaciones en las muestras de sedimento, se utilizaron geles de agarosa, curvas de desnaturalización y secuenciación. El único ensayo en el que se detectó la presencia de productos inespecíficos de amplificación fue el de genes de la variante *nahAc*. Sin embargo, los productos de amplificación de este ensayo fueron específicos cuando se lo evaluó utilizando una muestra de un biorreactor construido con residuos de sentina de buques [Nievas *et al.*, 2008], el cual contenía una alta abundancia de genes *nahAc* (datos no mostrados). Probablemente la inespecificidad del ensayo encontrada

en las muestras de sedimento se deba a que, como se verá en el capítulo siguiente, los genes *nahAc* resultaron estar presentes en bajas abundancias en nuestras muestras ambientales, y bajo estas condiciones se favorece la amplificación de fragmentos que no son el blanco del ensayo [Kanagawa, 2003].

La presencia de sustancias inhibidoras de la amplificación (como por ejemplo: ácidos húmicos, iones metálicos, restos de etanol provenientes de los kits de purificación del ADN [Nolan *et al.*, 2006]) en la solución de ADN purificado de las muestras ambientales puede ocasionar cuantificaciones erróneas, e incluso resultar en falsos negativos si la inhibición es muy alta. En algunos casos es posible diluir el ADN metagenómico, y por consiguiente también se diluyen las sustancias inhibidoras que pudieran estar afectando la cuantificación, aunque en estos casos se corre el riesgo de no detectar aquellos genes que se encuentren en abundancias cercanas al límite de detección de la técnica. Además, diluir en exceso el ADN tampoco es recomendable, ya que cuando los genes que se desea cuantificar se encuentran en baja abundancia en la muestra, los cebadores pueden unirse por azar a secuencias que no son el blanco del ensayo, generando productos de amplificación inespecífica [Kanagawa, 2003]. Es por ello que resulta muy importante encontrar la concentración óptima de ADN templado que se agregará a cada reacción. En algunos casos no fue posible encontrar una concentración de ADN a la que se pudiera cuantificar el gen deseado en ausencia de inhibición. En estas situaciones se optó por elegir la concentración de ADN en la cual los genes de dioxigenasas se encontraran por encima del límite de detección del ensayo y la inhibición fuera mínima. Luego, los valores de abundancia de genes fueron corregidos teniendo en cuenta el porcentaje de inhibición de esas muestras.

A pesar de que la optimización de los ensayos de qPCR requiere de un esfuerzo y costo adicional generalmente elevado, esta etapa previa a la utilización de los ensayos para analizar las muestras ambientales es sumamente importante. Los resultados obtenidos en un ensayo de qPCR dependen de la concentración óptima de cada uno de los reactivos, así como también de las interrelaciones entre estos componentes [Edwards y Logan, 2009]. Es por ello que el cuidadoso diseño y optimización de los ensayos permite maximizar la sensibilidad de los mismos y obtener resultados confiables y reproducibles [Werbrouck *et al.*, 2007]. Mediante la correcta optimización de los ensayos de qPCR diseñados se logró una alta sensibilidad para cuantificar los genes de dioxigenasas que se encuentran presentes en los sedimentos, aún

cuando su abundancia en las muestras sea muy baja. En el próximo capítulo de esta Tesis se describen los resultados de aplicar los ensayos diseñados al estudio de muestras de sedimentos intermareales, lo que nos permitió conocer la abundancia y diversidad de genes de dioxigenasas en el ambiente marino de Patagonia.

Capítulo 5

DIVERSIDAD, ABUNDANCIA Y DISTRIBUCIÓN BIOGEOGRÁFICA DE POBLACIONES BACTERIANAS DEGRADADORAS DE HAPs EN SEDIMENTOS INTERMAREALES DE PATAGONIA

5.1. INTRODUCCIÓN

La biodegradación de sustancias contaminantes en el medio ambiente ocurre gracias al potencial catabólico combinado de múltiples poblaciones microbianas. Estas poblaciones no sólo se ven afectadas por la concentración y composición de la mezcla de contaminantes y las condiciones físico-químicas y ambientales a las cuales se ven expuestas, sino además por complejas interacciones con los otros miembros de la comunidad microbiana. Debido a la gran complejidad que caracteriza a este proceso, el uso de estrategias reduccionistas, por ejemplo aquellas enfocadas en un único compuesto contaminante, una única cepa microbiana o una única ruta catabólica resultan poco efectivas para avanzar en nuestra comprensión de los mecanismos ecológicos y moleculares que controlan el proceso degradativo [de Lorenzo, 2008]. El rápido desarrollo de técnicas moleculares en las últimas décadas ha sido fundamental para incrementar nuestro conocimiento sobre la diversidad y la ecología de las poblaciones microbianas con capacidad para degradar contaminantes [Vilchez-Vargas *et al.*, 2010]. En particular, los métodos basados en la amplificación de genes que codifican enzimas de las vías degradativas a partir de ADN metagenómico han sido herramientas muy importantes para el estudio de estas poblaciones, si bien aún constituye un desafío el poder evaluar su relevancia ecológica [Junca y Pieper, 2010]. La identificación de las poblaciones claves del proceso degradativo resulta esencial no sólo para estudios ecológicos, sino además

para el diseño de herramientas moleculares que resulten de utilidad para la toma de decisiones sobre las estrategias de remediación a implementar, como así también para el monitoreo de la eficiencia de las mismas [Lebrón *et al.*, 2011].

Los genes que codifican la subunidad α de enzimas dioxigenasas que catalizan el primer paso de la biodegradación aeróbica de HAPs son los más comúnmente utilizados cuando se desea estudiar a las poblaciones bacterianas degradadoras de estos compuestos por medio de métodos independientes del cultivo de microorganismos [Iwai *et al.*, 2011]. Como fue mencionado anteriormente, un estudio previo realizado en nuestro laboratorio detectó en los sedimentos intermareales de Patagonia la presencia de ocho variantes distintas de genes de dioxigenasas de HAPs, cinco de las cuales nunca antes habían sido identificadas [Lozada *et al.*, 2008]. Estas secuencias novedosas (genes de dioxigenasas A a E) fueron identificadas únicamente en sedimentos de Bahía Ushuaia, aún cuando se analizaron muestras a lo largo de 12° de latitud de la costa patagónica, lo cual sugiere una aparente distribución biogeográfica de estas variantes limitada a ambientes de zonas frías [Lozada *et al.*, 2008]. Además, el número de variantes de genes de dioxigenasas y sus frecuencias relativas dentro de cada biblioteca variaron de muestra a muestra, aún en sedimentos obtenidos en el mismo sitio pero en años diferentes [Lozada *et al.*, 2008]. En general, las variantes novedosas de genes de dioxigenasas presentaron una baja abundancia relativa en las bibliotecas construidas a partir de sedimentos subantárticos. Por el contrario, las variantes más abundantes en las bibliotecas construidas a partir de sedimentos de distintos puntos de la costa Patagónica fueron los genes *nahAc* o *phnAc*, y la variante *phnA1* fue amplificada a partir de la mayor parte de las muestras analizadas. Estos resultados sugieren que las poblaciones bacterianas que contienen las variantes A-E serían miembros relativamente minoritarios de la comunidad microbiana de este ambiente subantártico, y que las variantes arquetípicas podrían tener un rol importante en la biodegradación de HAPs en la costa Patagónica [Lozada *et al.*, 2008; Dionisi *et al.*, 2011]. Sin embargo, el clonado de fragmentos de amplificación puede afectar las abundancias relativas de las variantes analizadas [Rainey *et al.*, 1994], y por lo tanto es conveniente utilizar herramientas cuantitativas más precisas para evaluar la importancia ecológica de las poblaciones bacterianas que contienen cada uno de estos genes. Es por ello que utilizamos ensayos de qPCR específicos para cada una de estas variantes de genes de dioxigenasas, con el fin de obtener una estimación de sus abundancias relativas en los sedimentos.

Las observaciones basadas en estudios previos realizados en nuestro laboratorio nos condujeron a plantearnos las siguientes hipótesis: (i) las variantes arquetípicas de genes de dioxigenasas de HAPs (genes *nahAc*, *phnAc* y *phnAI*) son más abundantes que las variantes novedosas de estos genes en sedimentos de Bahía Ushuaia, sugiriendo que bacterias conteniendo genes arquetípicos tendrían un rol clave en la biodegradación de HAPs en este ambiente subantártico; (ii) existe una variabilidad temporal en la abundancia de las distintas variantes de genes de dioxigenasas, la cual podría ser atribuida a cambios en las condiciones ambientales, en particular de las concentraciones y composición de los HAPs; y (iii) las variantes novedosas de genes de dioxigenasas presentan una distribución biogeográfica restringida a ambientes fríos, por lo que bacterias conteniendo estos genes sólo serían capaces de prosperar exitosamente en estas condiciones extremas de temperatura. A fin de poner a prueba estas hipótesis, se utilizaron los ensayos de qPCR cuyo diseño y optimización fueron descritos en el capítulo anterior para analizar muestras de sedimento intermareal de distintos puntos de la costa Patagónica. Los genes de la variante E no fueron blanco de este estudio, debido a las razones mencionadas en la discusión del capítulo anterior de esta Tesis. Por otra parte, se utilizó un ensayo para cuantificar el gen ARNr 16S de bacterias, como método de estimación de las bacterias totales presentes en los sedimentos. En este capítulo, se analizaron por qPCR muestras de sedimento obtenidas en el sitio OR de Bahía Ushuaia a lo largo de una escala temporal de seis años, como sitio representativo del sur de Patagonia. Además, se seleccionó a Caleta Córdova como sitio contaminado de la zona norte-centro de Patagonia, y a Playa Fracasso como sitio no contaminado de esta misma región. Finalmente, se evaluó la existencia de posibles correlaciones entre las concentraciones de HAPs y las abundancias relativas de las variantes de genes de dioxigenasas en los sedimentos.

5.2. RESULTADOS

5.2.1. Abundancia del gen ARNr 16S en los sedimentos intermareales

Se determinó la abundancia del gen ARNr 16S bacteriano en once muestras de sedimentos intermareales de la costa Patagónica utilizando el ensayo de qPCR indicado en la Tabla 4.1. Los valores obtenidos a partir de este ensayo fueron expresados como copias de este gen por μg de ADN metagenómico y por g de sedimento, teniendo en cuenta en este

último caso la cantidad de sedimento utilizada para la extracción de ADN (Figura 5.1). La abundancia del gen ARNr 16S de bacterias varió como máximo 0,6 órdenes de magnitud entre las distintas muestras cuando fue expresado por μg de ADN, siendo algunas de estas diferencias en abundancia estadísticamente significativas (Test de Tukey de comparaciones múltiples realizado *a posteriori* con los datos transformados \log_{10} , $p < 0,05$). Dado que la mayor parte de los microorganismos que habitan los sedimentos son bacterias, y debido a la gran diversidad bacteriana que existe en los mismos, sería esperable encontrar similares abundancias relativas de este gen blanco en las distintas muestras [Dionisi *et al.*, 2004]. Esto es debido a que estas bacterias tendrán aproximadamente el mismo tamaño promedio de cromosoma y número promedio de genes ARNr 16S por cromosoma. Por lo tanto, de no existir grandes diferencias en las proporciones de microorganismos pertenecientes a los dominios Bacteria, Archaea y Eukarya en las distintas muestras de sedimento, no deberían encontrarse diferencias significativas en las abundancias relativas de este gen por μg de ADN. Por lo tanto, una posible explicación por las diferencias encontradas es que las comunidades microbianas de las muestras CC10-1 y CC10-2 podrían presentar una menor abundancia relativa del gen ARNr 16S al presentar una mayor proporción de microorganismos eucariotas. Sin embargo, esta posibilidad no ha sido evaluada.

Por otra parte, al reportar la abundancia de genes ARNr 16S bacterianos por gramo de sedimento, se observan mayores diferencias entre las distintas muestras analizadas (Figura 5.1). Estas diferencias fueron de hasta 1,5 órdenes de magnitud en la abundancia del gen de ARNr 16S calculada por gramo de sedimento, y resultaron estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Estas diferencias en la abundancia del gen podrían deberse a distintas cantidades de biomasa presentes en los sedimentos, y/o del contenido de humedad de las muestras. Sin embargo, estas diferencias también podrían atribuirse a desvíos producidos durante la extracción de ADN metagenómico, como por ejemplo pérdidas desiguales durante la extracción de ADN [Dionisi *et al.*, 2003; Dionisi *et al.*, 2004]. Es por ello que se decidió expresar a los resultados obtenidos por qPCR como la abundancia relativa expresada en copias del gen blanco por microgramo de ADN metagenómico, ya que de este modo se introducen menos fuentes de error que al expresar la abundancia de genes como número de copias/gramo de sedimento o número de células/gramo de sedimento [Sharma *et al.*, 2007].

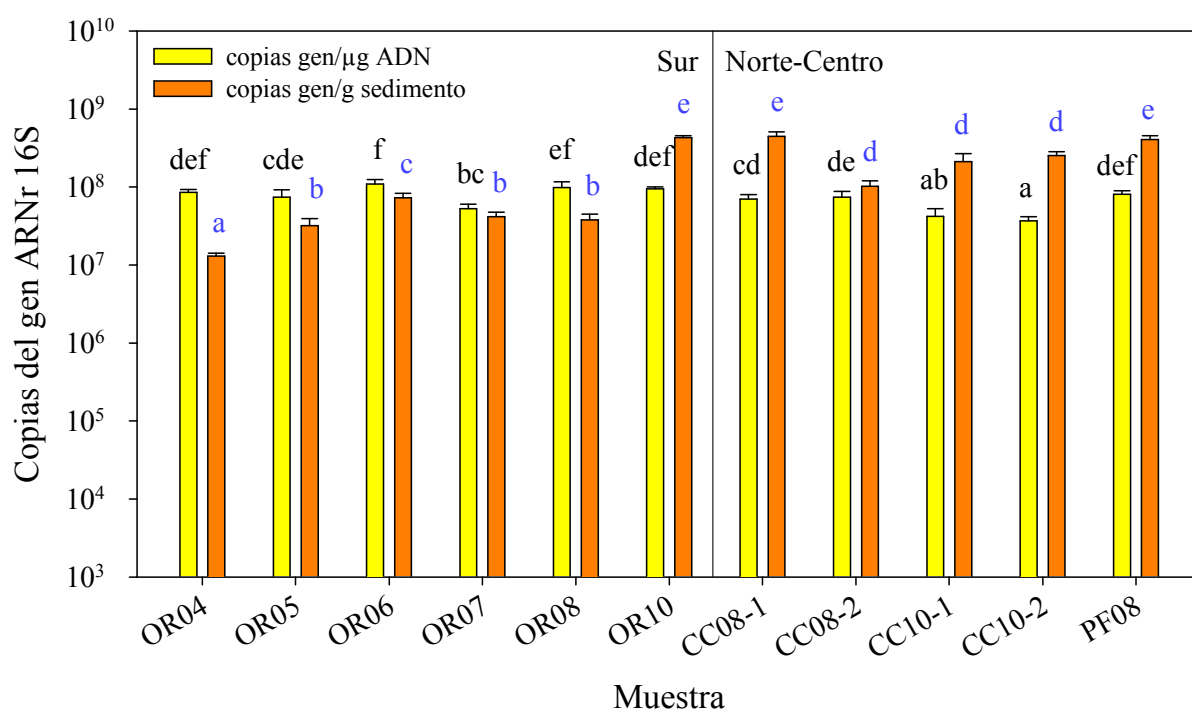


Figura 5.1. Abundancia del gen ARNr 16S de Bacteria en sedimentos intermareales. Los resultados de las pruebas de Tukey de comparaciones múltiples se indican con letras sobre las barras: letras en color negro para la comparación de copias del gen ARNr 16S/μg ADN y en color azul para la comparación de copias del gen/g sedimento

5.2.2. Genes de dioxigenasas de HAPs en sedimentos intermareales del sur de Patagonia

5.2.2.1. Diversidad y abundancia de las variantes de genes de dioxigenasas

Con el fin de testear las dos primeras hipótesis planteadas en este capítulo, se utilizaron los ensayos de qPCR diseñados y optimizados en el capítulo 4 para estimar la abundancia relativa de siete variantes de genes de dioxigenasas en muestras de sedimentos intermareales obtenidas entre los años 2004 y 2010 en el sitio OR de Bahía Ushuaia. Se compararon las abundancias relativas de las variantes arquetípicas de dioxigenasas *nahAc*, *phnAc* y *phnAl* con las variantes novedosas A, B, C y D. Contrario a los resultados obtenidos a partir del clonado de productos de amplificación [Lozada *et al.*, 2008; Dionisi *et al.*, 2011], las variantes novedosas de genes de dioxigenasas se encontraron en altas abundancias relativas en los

sedimentos analizados, superiores en la mayoría de los casos a las abundancias estimadas para los genes arquetípicos (Figura 5.2. A). En particular, la variante D fue la que mostró la mayor concentración en el ADN metagenómico de todas las muestras analizadas, con valores de hasta el 2% de la abundancia del gen ARNr 16S bacteriano (Tabla 5.1). Los genes B y C también se encontraron presentes en todas las muestras analizadas, aunque su abundancia relativa fue menor (hasta 0,03% y 0,63% con respecto al gen ARNr 16S, respectivamente). Con respecto a la variante A, sólo se detectó en alta abundancia en muestras de sedimento obtenidas en los dos primeros años de la serie temporal. El gen *nahAc* fue detectado en todas las muestras de sedimento, aunque en una muy baja abundancia, por debajo del límite de cuantificación de la técnica (8×10^2 copias/ μg de ADN) (Figura 5.2 A). De igual manera, la variante *phnAc* se encontró en bajas abundancias en la mayoría de las muestras analizadas, y sólo pudo ser cuantificada en la muestra OR04. Los genes de la variante *phnAl*, por otra parte, presentaron altas abundancias en cuatro de las seis muestras analizadas.

Con excepción del gen *nahAc*, el cual no pudo ser cuantificado debido a su baja abundancia en el sedimento, la mayoría de las variantes analizadas presentaron una cierta tendencia decreciente en la serie temporal (Figura 5.2 A). La abundancia de estos genes fue máxima en las muestras OR04 y OR05, y disminuyó entre uno y dos órdenes de magnitud en las dos últimas muestras de la serie temporal. Por lo tanto, se observó una disminución en el tiempo del potencial degradativo de las poblaciones bacterianas blanco de este estudio, estimado como la suma de las abundancias de todos los genes de dioxigenasas cuantificados en las muestras de sedimento del sitio OR (Figura 5.3).

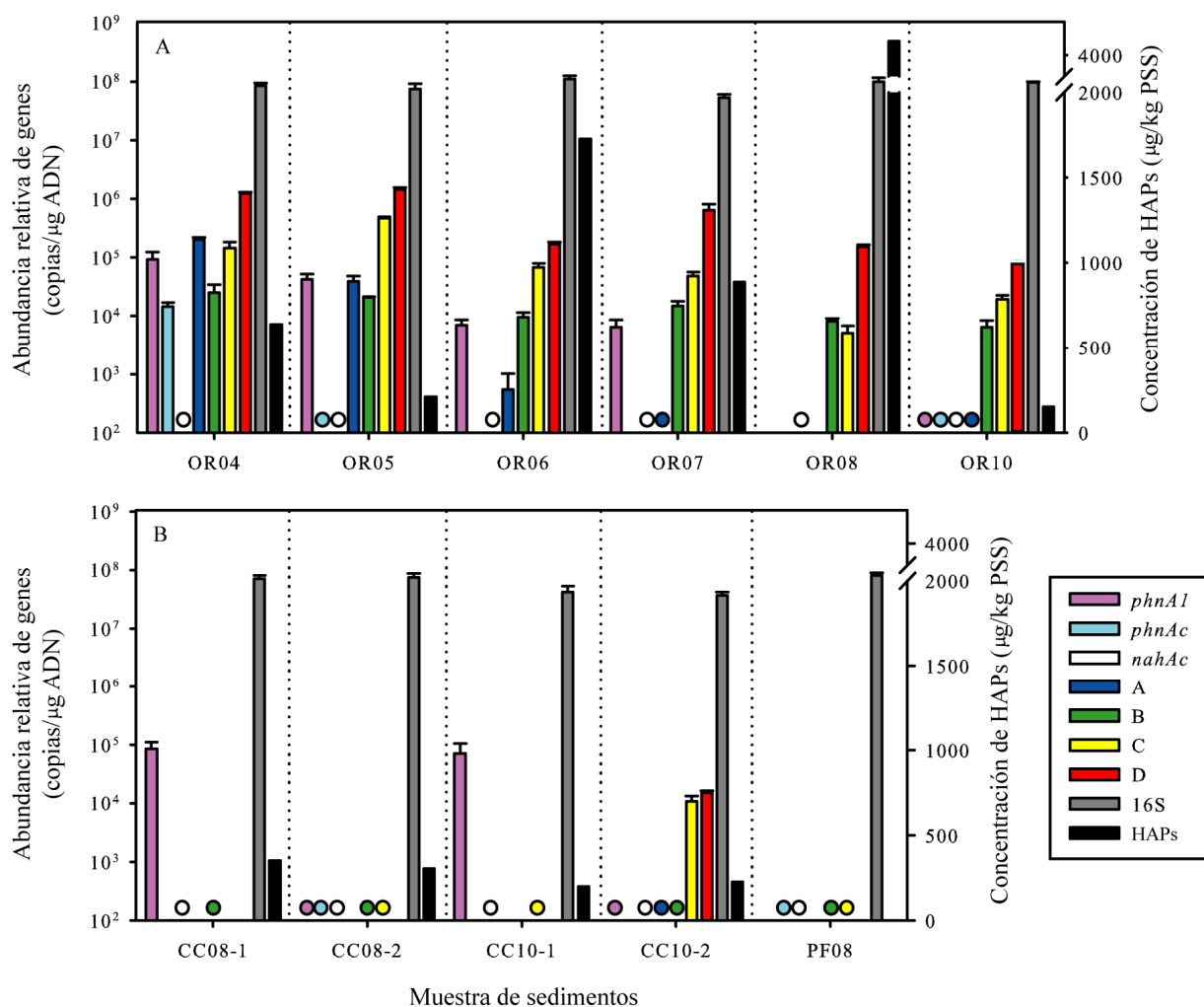


Figura 5.2. Abundancia relativa de genes de dioxigenasas en sedimentos intermareales del sur (A), y norte-centro (B) de Patagonia (promedio de copias del gen/μg de ADN purificado de los sedimentos \pm DS). Los genes detectados por debajo del límite de cuantificación de la técnica (8×10^2 copias/μg de ADN para los ensayos de genes *phnA1*, *nahAc*, B y D, 9×10^2 copias/μg de ADN para los ensayos de cuantificación de los genes A y $1,3 \times 10^3$ copias/μg de ADN para los ensayos *phnAc* y C) se indican con círculos coloreados. En la figura se indica también la abundancia del gen ARNr 16S (16S) y la concentración de HAPs totales (HAPs, μg/kg PSS). Las concentraciones de HAPs individuales se pueden encontrar en el capítulo 3 de esta tesis

Tabla 5.1. Porcentaje que representan los genes de dioxigenasas relativos al gen ARNr 16S bacteriano

	Muestra de sedimentos										
	Sur						Norte-Centro				
	OR04	OR05	OR06	OR07	OR08	OR10	CC08-1	CC08-2	CC10-1	CC10-2	PF08
A	0,24	0,05	0,001	dlc	nd	dlc	nd	nd	nd	dlc	nd
B	0,03	0,03	0,01	0,03	0,01	0,01	dlc	dlc	nd	dlc	dlc
C	0,17	0,63	0,06	0,09	0,01	0,02	nd	dlc	0,0001	0,03	dlc
D	1,43	1,94	0,16	1,21	0,16	0,08	nd	nd	nd	0,04	nd
<i>phnA1</i>	0,11	0,06	0,01	0,01	nd	dlc	0,12	dlc	0,17	dlc	nd
<i>phnAc</i>	0,02	dlc	nd	nd	nd	dlc	nd	dlc	nd	nd	dlc
<i>nahAc</i>	dlc	dlc	dlc	dlc	dlc	dlc	dlc	dlc	dlc	dlc	dlc

Para cada muestra, se resaltó el gen que resultó proporcionalmente más abundante. nd: el gen no fue detectado en la muestra. dlc: el gen fue detectado por debajo del límite de cuantificación

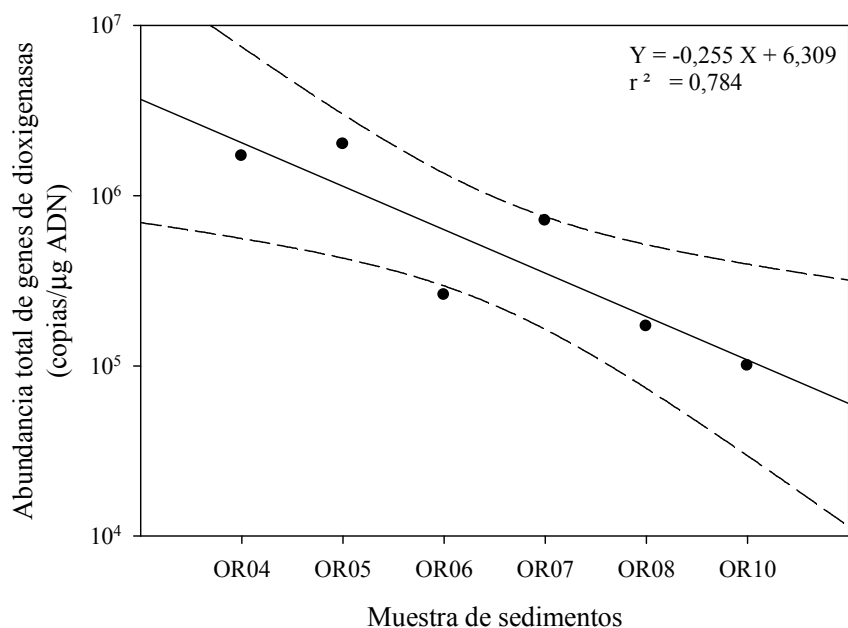


Figura 5.3. Potencial degradativo de los sedimentos intermareales de Bahía Ushuaia, estimado por medio de la suma de las abundancias relativas de todos los genes de dioxigenasas cuantificados en este estudio. Línea punteada: intervalo de confianza al 95%

5.2.2.2. Relación entre la abundancia de genes de dioxigenasas de HAPs y las variables físico-químicas y ambientales

Los datos de abundancia de genes de dioxigenasas obtenidos por qPCR (excluyendo la variante *nahAc*) permitieron realizar un análisis de ordenamiento de las muestras de sedimento del sitio OR. Este análisis permitió visualizar el grado de similitud que existe entre las muestras de este sitio, en lo que respecta a las abundancias de las variantes de dioxigenasas utilizadas como blanco de este estudio. El análisis de MDS mostró una tendencia temporal en el ordenamiento de las muestras de sedimentos (Figura 5.4. A). El análisis de agrupamiento realizado respaldó esta observación, ya que mostró que cada uno de los grupos constituidos integraba a muestras obtenidas en muestreos sucesivos dentro de la serie temporal analizada (Figura 5.4. B). Los resultados de estos análisis sugieren la ocurrencia de variaciones no aleatorias en las abundancias de los genes estudiados, en donde los cambios observados en la estructuración del gremio degradativo de HAPs se asemejan a una serie temporal. Se evaluó además si existía alguna variante que influía en mayor medida

en el ordenamiento observado. El grupo de genes que produjo una matriz de similitud (índice Bray-Curtis) que presentaba una mayor correlación con la matriz generada a partir de la totalidad de los datos ($\rho = 0,95$) estuvo conformado por *phnA1*, *phnAc*, A y D. Considerando que la variante *nahAc* no fue incluida en este análisis debido a su baja abundancia en los sedimentos, este análisis muestra que la mayoría de los genes estudiados están influenciando dicho ordenamiento.

La herramienta BIO-ENV del mismo programa estadístico fue utilizada para explorar cuáles de las variables ambientales medidas en este estudio podrían estar ejerciendo una mayor influencia sobre la estructura del gremio degradativo en las muestras del sitio OR. Este análisis permitió detectar que las concentraciones de hidrocarburos de 2 y 4 anillos, HAPs totales y la variable temporal (tiempo transcurrido en meses desde la fecha del primer muestreo) fueron las variables ambientales que, en conjunto, presentaron una mayor correlación ($\rho = 0,693$) con el ordenamiento de las muestras obtenido en base a la abundancia de genes de dioxigenasas (Tabla 5.2). Estos resultados sugieren que cambios en el tipo de HAPs y sus abundancias podrían estar afectando la diversidad de genes de dioxigenasas de HAPs presentes en los sedimentos, como así también la abundancia de las poblaciones bacterianas que contienen las distintas variantes de los genes que fueron blanco de este estudio.

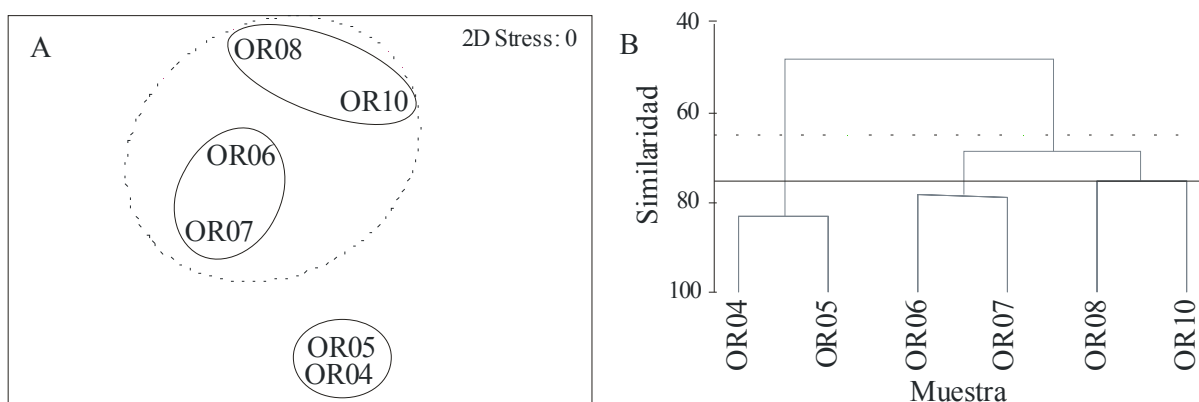


Figura 5.4. Similitud entre muestras de sedimentos del sitio OR, basadas en la abundancia de las distintas variantes de genes de dioxigenasas (luego de transformar los datos calculando su raíz cuadrada). A: Análisis de ordenamiento MDS. B: Análisis de agrupamiento. Dos niveles de similitud arbitrarios fueron superpuestos en las figuras: 75% de similitud (línea entera) y 65% de similitud (línea punteada). Índice de similitud: Bray-Curtis

Tabla 5.2. Combinaciones de las variables ambientales (elegidas de a k variables por vez) que presentan la correlación más alta con la diversidad y abundancia de genes de dioxigenasas en sedimentos subantárticos (según el análisis BIO-ENV realizado con el programa PRIMER v6 [Clarke y Ainsworth, 1993])

k	Mejores combinaciones de variables				
1	2 anillos (0,602)	Tem (0,564)	4 anillos (0,146)	HAPs Tot (0,096)	...
2	4 anillos, Tem (0,593)	2 anillos, Tem (0,561)	HAPs Tot, Tem (0,557)	2 anillos, HAPs Tot (0,539)	...
3	2 anillos, HAPs Tot, Tem (0,629)		2 anillos, 6 anillos, Tem (0,604)	2 anillos, 4 anillos, Tem (0,593)	...
4	2 anillos, 4 anillos, HAPs Tot, Tem (0,693)		2 anillos, 4 anillos, 6 anillos, Tem (0,650)	...	
5	2 anillos, 3 anillos, 4 anillos, HAPs Tot, Tem (0,611)				

Entre paréntesis se indica el rango de correlación de Spearman (ρ) para cada combinación de variables. Tem: variable temporal (cantidad de meses transcurridos desde el primer muestreo), n anillos: concentración de HAPs de n anillos, HAPs Tot: concentración de HAPs totales

5.2.3. Abundancia de genes de dioxigenasas en sedimentos intermareales de la región norte-centro de la Patagonia

Con el fin de testear la tercera hipótesis, es decir, evaluar si las variantes novedosas de genes de dioxigenasas presentan una distribución biogeográfica limitada a zonas frías, o si por el contrario, estos genes también se encuentran presentes en otras regiones costeras de la Patagonia, se analizaron por qPCR cuatro muestras de sedimentos intermareales de Caleta Córdova obtenidas en los años 2008 y 2010. Además, se analizó una muestra obtenida en el año 2008 en Playa Fracasso, Península Valdés, sitio en el cual no se ha detectado HAPs de origen antropogénico [Lozada *et al.*, 2008]. La Figura 5.2. B muestra la abundancia relativa de los genes de dioxigenasas de HAPs en sedimentos de la región norte-centro de Patagonia y la Tabla 5-1 el porcentaje que representan las distintas variantes de genes cuantificadas en estos sedimentos en relación al gen ARNr 16S bacteriano. A pesar de ser un sitio con un alto grado de exposición a contaminación con hidrocarburos, de haber sufrido un episodio reciente de contaminación por petróleo crudo y de presentar concentraciones elevadas de HAPs, las abundancias relativas de los genes estudiados fueron muy bajas en sedimentos del sitio CC, a menudo por debajo de los límites de detección o cuantificación de los ensayos. El potencial degradativo total de los sedimentos, estimado como la suma de las abundancias de todos los genes de dioxigenasas cuantificados en las muestras, presentó valores al menos 5 veces menor que los encontrados en muestras de Bahía Ushuaia (datos no mostrados). Las variantes novedosas de genes de dioxigenasas fueron detectadas en las muestras de Caleta Córdova, aunque en la mayoría de los casos sus abundancias se encontraban por debajo del límite de cuantificación de la técnica. Por otra parte, los genes *phnA1*, característicos del género *Cycloclasticus*, fueron detectados en las cuatro muestras de Caleta Córdova (Figura 5.2. B). Interesantemente, cuatro de los siete genes de dioxigenasas evaluados (los genes novedosos B y C y los arquetípicos *phnAc* y *nahAc*) fueron también detectados en la muestra no contaminada, si bien todos ellos se encontraron por debajo del límite de cuantificación de la técnica (Figura 5.2. B).

5.2.4. Importancia ecológica de bacterias conteniendo genes *phnA1* en las dos regiones biogeográficas estudiadas

La variante *phnA1* de genes de dioxigenasas fue detectada en 9 de las 11 muestras de sedimento analizadas, aunque en sólo 6 de ellas este gen fue encontrado a concentraciones por sobre el límite de cuantificación del ensayo (Figura 5.2). Se realizaron distintos análisis de correlación entre las abundancias de este gen y las concentraciones de HAPs en los sedimentos (capítulo 3 de esta Tesis). Se observó una alta correlación positiva entre la abundancia relativa del gen *phnA1* y la concentración de HAPs de tres anillos ($\rho = 0,789$, $p = 0,004$) o de fenantreno ($\rho = 0,781$, $p = 0,005$). Además, se observó una correlación positiva entre la abundancia del gen y la concentración de HAPs de bajo peso molecular (dos y tres anillos, $\rho = 0,708$, $p = 0,015$). Por otra parte, no se detectaron correlaciones entre la abundancia de genes *phnA1* y de HAPs de alto peso molecular.

5.3. DISCUSIÓN

En este capítulo se utilizaron siete ensayos de qPCR diseñados para cuantificar en forma independiente variantes de genes de dioxigenasas de HAPs, las cuales habían sido detectadas en los sedimentos intermareales de Patagonia por medio del clonado y secuenciación de productos de amplificados a partir de ADN metagenómico [Lozada *et al.*, 2008]. Se seleccionaron muestras de sedimentos intermareales subantárticos obtenidas en el sitio OR, con el fin de evaluar por qPCR la abundancia relativa de los genes de dioxigenasas novedosos A a D en comparación con la abundancia de los genes con representantes cultivados *phnA1*, *phnAc* y *nahAc*. Las muestras de sedimentos seleccionadas se utilizaron también para evaluar, en una escala temporal de seis años, la dinámica de las poblaciones bacterianas que contienen dichos genes, en particular teniendo en cuenta el principal factor ambiental que afecta a estas poblaciones, la concentración de HAPs.

Cuatro de las seis muestras analizadas del sitio OR habían sido previamente caracterizadas por medio de la construcción de bibliotecas de productos de amplificación [Lozada *et al.*, 2008; Dionisi *et al.*, 2011], por lo que existían resultados preliminares sobre las variantes que sería esperable encontrar en estos sedimentos. Sin embargo, la abundancia relativa de los genes de dioxigenasas estimada por qPCR difirió en gran medida de las frecuencias relativas observadas en las bibliotecas de genes catabólicos [Lozada *et al.*, 2008;

Dionisi *et al.*, 2011]. Como fue mencionado en el capítulo 1 de esta Tesis (sección 1.4.3.2), las bibliotecas de productos de amplificación construidas utilizando cebadores que permiten amplificar mezclas de genes homólogos no constituyen una herramienta cuantitativa, ya que en esta metodología la abundancia relativa de cada gen en el producto final de amplificación no necesariamente refleja la proporción de los mismos en la mezcla inicial [Suzuki y Giovannoni, 1996; Polz y Cavanaugh, 1998; Kanagawa, 2003]. La metodología utilizada en este capítulo se encuentra libre de los desvíos asociados a la utilización de un único par de cebadores para amplificar múltiples templados a partir del ADN metagenómico, debido a que cada ensayo fue diseñado específicamente para cuantificar una única variante de genes de dioxigenasas.

Otra de las posibles causas de las diferencias entre las abundancias relativas de los genes cuantificados por qPCR y las frecuencias de los mismos en las bibliotecas de genes catabólicos podría atribuirse a las distintas condiciones de amplificación utilizadas para cada una de estas dos metodologías. Para la producción de las bibliotecas de productos de amplificación se utilizaron cebadores con 6 degeneraciones [Wilson *et al.*, 1999] y una baja temperatura de alineado en las reacciones de PCR (43°C). Si bien esta estrategia permitió la detección de variantes muy divergentes a la de las secuencias utilizadas para el diseño de los mismos [Lozada *et al.*, 2008], la baja temperatura de alineado de los cebadores tuvo como consecuencia la obtención de productos de amplificación inespecíficos en casi todas las bibliotecas. Esto no representó un problema dado que el análisis de las secuencias incluye las etapas de clonado y secuenciación, en donde los clones inespecíficos son detectados y eliminados. Sin embargo, amplificaciones inespecíficas representan un gran problema en reacciones de qPCR, en particular utilizando colorantes fluorescentes que se unen inespecíficamente a ADN de doble hebra [Mackay *et al.*, 2002]. Por ello, es deseable que los cebadores utilizados en las reacciones de qPCR presenten bajo número de degeneraciones, como así también el utilizar la mayor temperatura de alineado posible. En el caso de los cebadores diseñados en esta Tesis para qPCR, las temperaturas de alineados óptimas se encontraron entre 56 y 63°C. Estas condiciones de amplificación favorecieron una mayor especificidad de hibridización entre los cebadores y los grupos de genes de dioxigenasas específicos. Por último, el clonado también puede haber contribuido a las diferencias entre los resultados obtenidos por ambas metodologías, debido a que los sistemas de clonado TA pueden ligar preferencialmente determinadas secuencias cuando los insertos que se desea

clonar son genes amplificados a partir de múltiples templados (mezclas de genes homólogos), como es el caso de los productos de amplificación de muestras ambientales [Palatinszky *et al.*, 2011].

A pesar de haberse observado mayoritariamente genes de tipo *nahAc* en las bibliotecas de productos de amplificación construidas a partir de tres de las cuatro muestras del sitio OR analizadas utilizando esta metodología [Lozada *et al.*, 2008; Dionisi *et al.*, 2011], los ensayos de qPCR determinaron que si bien las poblaciones bacterianas conteniendo estos genes eran miembros estables de la comunidad de este sitio, sus abundancias eran muy bajas. Las diferencias en abundancia observadas con ambas metodologías podría deberse a que los cebadores utilizados en el estudio anterior tendrían una mayor especificidad por genes *nahAc* que por otras variantes de genes de dioxigenasas, probablemente debido a que la mayoría de las secuencias utilizadas para su diseño correspondían a genes de tipo *nahAc* [Wilson *et al.*, 1999]. Los genes de tipo *nahAc*, que codifican enzimas dioxigenasas de naftaleno, son los más ampliamente caracterizados y han sido mayormente identificados en bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas*. Los genes de este grupo presentan una alta homología, con una identidad a nivel de nucleótidos de aproximadamente 90% [Habe y Omori, 2003]. Este grupo de genes incluye secuencias identificadas en *Pseudomonas* spp. aisladas a partir de muestras de suelos [Ensley *et al.*, 1982; Denome *et al.*, 1993; Simon *et al.*, 1993; Takizawa *et al.*, 1999]. Sin embargo, su distribución no está limitada al ambiente terrestre, ya que fueron también detectados en el medio ambiente marino [Bosch *et al.*, 1999; Ferrero *et al.*, 2002]. Existen numerosos estudios que demuestran la importancia de los genes *nahAc*, asociados al catabolismo del naftaleno, en la degradación de este compuesto en ambientes contaminados [Tuomi *et al.*, 2004; Nyssönen *et al.*, 2006; Park y Crowley, 2006; Wang *et al.*, 2007b; Baldwin *et al.*, 2008; Salminen *et al.*, 2008]. Sin embargo, en algunos ambientes las poblaciones que contienen estos genes parecen ser poco relevantes en la biodegradación de HAPs [Laurie y Lloyd-Jones, 2000; Gomes *et al.*, 2007; Johnsen y Karlson, 2007; Johnsen *et al.*, 2007]. Debido a que las poblaciones bacterianas conteniendo genes *nahAc* no siempre presentan una alta importancia ecológica, el utilizar solamente estos genes como blanco de estudio podría subestimar la capacidad del ambiente para degradar HAPs de bajo peso molecular [Laurie y Lloyd-Jones, 2000; Debruyne *et al.*, 2007]. Por lo tanto, estudios que involucran el análisis de múltiples genes, como en el caso de este capítulo, nos brindan una perspectiva más representativa de la respuesta de la comunidad ante su

exposición a sustancias contaminantes, y permiten visualizar las interacciones que existen entre las distintas poblaciones microbianas capaces de degradar estos compuestos [Debruyne *et al.*, 2007].

El segundo gen que era esperable encontrar en altas abundancias en sedimentos de Bahía Ushuaia es *phnA1*, identificado en gamaproteobacterias pertenecientes al género *Cycloclasticus*. Estos genes fueron detectados en altas abundancias en las cuatro primeras muestras de la serie temporal del sitio OR. Sin embargo, en las dos últimas muestras su abundancia disminuyó considerablemente. Hasta el momento, todas las bacterias aisladas pertenecientes al género *Cycloclasticus* son marinas, y presentan una amplia distribución geográfica [Staley, 2010]. Estos organismos son utilizadores obligados de hidrocarburos, razón por la cual forman parte del grupo de las bacterias hidrocarbonoclasticas obligadas [Yakimov *et al.*, 2007]. Numerosos estudios han reportado un enriquecimiento de *Cycloclasticus* spp. en sedimentos o agua de mar luego de su exposición a hidrocarburos [Kasai *et al.*, 2002; Maruyama *et al.*, 2003; Coulon *et al.*, 2007; McKew *et al.*, 2007; Teira *et al.*, 2007; Cui *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008; Niepceyron *et al.*, 2010; dos Santos *et al.*, 2011], sugiriendo un rol importante de estos microorganismos en la degradación de HAPs en el medio ambiente marino.

Los genes de dioxigenasas de tipo *phnAc*, identificados inicialmente en *Alcaligenes faecalis* AFK2, también fueron detectados en sedimentos de la Planta Orión, aunque sólo en la muestra obtenida en el año 2004 [Lozada *et al.*, 2008]. Los genes relacionados con *phnAc* detectados en Patagonia constituyen la primera evidencia de la presencia de estos genes en el medio ambiente marino [Lozada *et al.*, 2008], si bien los sedimentos marinos representan mezclas complejas de materiales de origen marino y terrestre, y especies provenientes de ambientes terrestres cercanos pueden adaptarse y sobrevivir en el ambiente marino [Jensen *et al.*, 1991; Jensen y Fenical, 1996; Lohrer *et al.*, 2004]. Los resultados del análisis de qPCR de este gen concuerdan con lo observado en las bibliotecas de productos de amplificación, dado que se observó una alta concentración de este gen sólo en la muestra OR04. *Alcaligenes faecalis* AFK2 fue aislada a partir de muestras de suelo gracias a su capacidad para utilizar fenantreno como única fuente de carbono [Kiyohara *et al.*, 1982]. Genes de la variante *phnAc* característicos de AFK2 fueron también encontrados en otras betaproteobacterias del orden Burkholderiales: *Burkholderia* sp., cepas Ch1-1, Ch3-5, Cs1-4 y Eh1-1 [Vacca *et al.*, 2005],

Delftia sp. Cs1-4 [Zhao, 2009], *Acidovorax* sp. NA3 [Singleton *et al.*, 2009], como así también en *Comamonas testosteroni* GZ38 y *Acidovorax* sp. GZ39 [Pesce, 2008]. Todos estos organismos fueron aislados a partir de ambientes terrestres o de agua dulce, gracias a su capacidad de degradar o crecer en fenantreno. En suelos de Alemania expuestos a este hidrocarburo se observó una alta dominancia de los genes *phnAc* de *Burkholderia* sp. Eh1-1, aunque esta respuesta de las comunidades bacterianas no se observó en otros suelos expuestos al mismo contaminante [Ding *et al.*, 2010]. En este estudio se diseñaron y optimizaron por primera vez ensayos de qPCR específicos para estimar la abundancia en muestras ambientales de genes de la variante *phnAc*, similares a los identificados en la cepa AFK2. Hasta el momento se ha reportado en la literatura el diseño de cebadores degenerados de amplia cobertura para ser utilizados en ensayos de qPCR, los cuales tienen como blanco genes de dioxigenasas de bacterias Gram-positivas o Gram-negativas [Cébron *et al.*, 2008], e incluso se han diseñado cebadores muy abarcativos, que tienen como blanco genes de dioxigenasas de ambos grupos [Ding *et al.*, 2010]. Estos ensayos podrían ser apropiados para estimar el potencial biodegradativo general en ambientes contaminados. Sin embargo, el riesgo de sobreestimar o subestimar la abundancia de estos genes es muy grande, y además no nos permiten evaluar la importancia ecológica de cada una de las poblaciones bacterianas con capacidad para degradar estos compuestos.

Los genes novedosos pertenecientes a los grupos B, C y D fueron los únicos, entre todos los genes de dioxigenasas analizados, que se encontraron presentes en altas abundancias relativas en todas las muestras analizadas del sitio OR. Sus concentraciones fueron comparables o superiores a la de los genes *phnA1*, *phnAc* y *nahAc* en la mayoría de las muestras, es decir que bacterias conteniendo estos genes novedosos fueron miembros relativamente estables de la comunidad durante los seis años de estudio. En particular, los genes de tipo D fueron detectados en concentraciones superiores a los genes arquetípicos en todas las muestras y, remarcablemente, su concentración fue sólo 2 a 3 órdenes de magnitud inferior con respecto a los genes ARNr 16S de Bacteria. Los genes de la variante A fueron detectados también en una alta abundancia en muestras de sedimento de Planta Orión, similares a la encontrada para el gen *phnA1* en la muestra OR04. Estos resultados permiten rechazar nuestra primera hipótesis, ya que los análisis por qPCR de genes tanto arquetípicos como novedosos sugieren que bacterias conteniendo los genes novedosos previamente

identificados tendrían un rol clave en la biodegradación de HAPs en este ambiente subantártico.

Aspectos físico-químicos del ambiente, como por ejemplo la disponibilidad de fuentes de carbono y energía, aceptores de electrones, agua, temperatura o radiación UV son fundamentales en la estructuración no sólo de la comunidad microbiana sino además del gremio degradativo. El sitio OR es un ambiente intermareal que sufre cambios repentinos y frecuentes de humedad, luz y salinidad [Dionisi *et al.*, 2011], y que está expuesto a bajas temperaturas, a la contaminación crónica por hidrocarburos, y a una alta exposición a la luz UV parte del año. Todos estos factores tienen un efecto directo sobre la estructura y función de la comunidad microbiana autóctona de estos sedimentos expuestos a condiciones extremas de habitabilidad [Cowan *et al.*, 2009; Ortega-Morales *et al.*, 2010]. Estos factores físico-químicos y ambientales no pudieron ser controlados en nuestro estudio, al contrario de lo que ocurriría en un sistema experimental simplificado. Las muestras fueron obtenidas en distintas estaciones y en distintos años y además, se observaron grandes diferencias en las concentraciones de HAPs totales entre las distintas muestras, como así también en el número y tipo de HAPs encontrados, lo cual era esperable dado que en este tipo de costas el petróleo se acumula en parches rodeados de zonas con baja acumulación de hidrocarburos [Hayes *et al.*, 1992]. Por lo tanto, era esperable que la diversidad de genes de dioxigenasas y sus abundancias relativas sufrieran cambios en estas muestras a lo largo de los seis años de estudio. Una evidencia de ello se observó en las bibliotecas de productos de amplificación, en donde la frecuencia relativa de la variante C de genes de dioxigenasas se vio gradualmente incrementada en muestras de OR obtenidas en años consecutivos [Dionisi *et al.*, 2011]. Por ello, planteamos como segunda hipótesis la existencia de una variabilidad temporal en la abundancia de las distintas variantes de genes de dioxigenasas. Los resultados de los análisis multivariados respaldaron esta hipótesis, ya que mostraron una tendencia temporal en el ordenamiento de las muestras basado en la abundancia de las distintas variantes de este gen. Además, los análisis multivariados mostraron que las concentraciones de HAPs de 2 y 4 anillos y de HAPs totales en conjunto con la variable temporal estarían influyendo sobre la abundancia de los distintos genes de dioxigenasas, sugiriendo que cambios en el tipo y la abundancia de HAPs podrían estar provocando cambios en la abundancia de las poblaciones bacterianas que contienen estos genes. Sin embargo, y a pesar de la presencia de diversos HAPs en los sedimentos que podrían ser fuente de carbono y energía, la abundancia total de

los genes de dioxigenasas cuantificados sufrió una importante disminución, con una diferencia de un orden de magnitud entre las primeras y las últimas muestras de la serie temporal. Notoriamente, se produjo una importante disminución en las abundancias de los genes *phnA1*, *phnAc* y A en los años sucesivos. Es posible que a pesar de la disminución en la abundancia de los genes blanco de este estudio, la capacidad degradativa de la comunidad microbiana no se haya visto afectada, ya que se ha visto que comunidades microbianas dinámicas con respecto a su composición son capaces de mantener una función ecosistémica estable [Fernández *et al.*, 1999; Layton *et al.*, 2005]. Nuestros análisis sugieren que los cambios observados en la estructura de la comunidad degradadora podrían ser en gran medida debido a las diferencias observadas en la composición de HAPs entre las muestras de sedimento. Estos cambios en la composición de los sustratos de crecimiento podría haber favorecido a bacterias degradadoras de HAPs que no han sido blanco de estos estudios, como por ejemplo, bacterias Gram-positivas, las cuales podrían haber sido más competitivas en las etapas más tardías de la serie temporal. Sin embargo, sería necesario realizar más estudios para comprobar esta hipótesis.

Nuestra tercera hipótesis plantea que las variantes novedosas de genes de dioxigenasas presentan una distribución biogeográfica restringida a ambientes subantárticos, es decir que bacterias conteniendo estos genes serían capaces de prosperar exitosamente solamente en estas condiciones extremas de temperatura. Para testear esta hipótesis comparamos la diversidad y abundancias relativas de los genes de dioxigenasas de HAPs en muestras de sedimento obtenidas en dos regiones biogeográficas diferentes: Caleta Córdova, ubicada en el Golfo San Jorge, y Bahía Ushuaia, localizada en el Canal Beagle. Los análisis de qPCR mostraron que, si bien los genes novedosos fueron encontrados en altas concentraciones mayormente en las muestras de Bahía Ushuaia, todos los genes novedosos analizados fueron detectados en sedimentos de Caleta Córdova. Además, los genes C y D fueron detectados en concentraciones por encima del límite de cuantificación en una muestra obtenida en Caleta Córdova en invierno de 2010, en donde el sedimento presentaba una temperatura por debajo de los 4°C. Estos resultados sugieren que si bien estos genes presentan una distribución relativamente limitada a zonas frías, su distribución se extiende al menos a las dos regiones biogeográficas estudiadas en este capítulo. Aún es necesario determinar si los genes identificados en sedimentos subantárticos se encuentran presentes también en ambientes marinos de otras latitudes, o si se encuentran presentes en otros hábitats distintos al marino.

En un estudio reciente en el cual se analizaron bibliotecas de productos de amplificación de muestras de agua subterránea contaminada con residuos de alquitrán [Yagi y Madsen, 2009] se identificaron secuencias que presentaron un alto porcentaje de identidad con los genes de dioxigenasas de la variante A (79,5% y 92,3% de identidad a nivel de nucleótidos y aminoácidos, respectivamente, a lo largo de un pequeño fragmento de 78 pb). Esta observación sugiere que al menos la variante A podría tener una distribución biogeográfica amplia, y que no solamente se encontraría restringida al medio ambiente marino.

La única variante de genes de dioxigenasas con representantes cultivados que pudo ser cuantificada en Caleta Córdova fue *phnA1*, y estos genes se encontraron en alta abundancia en dos de las muestras de este sitio. Notablemente, estos genes fueron detectados en la mayoría de las muestras de las dos regiones biogeográficas, y un análisis de correlación que integró a todas las muestras analizadas de Patagonia mostró que a lo largo de esta amplia región, la abundancia de los genes *phnA1* correlacionó positivamente con las concentraciones de fenantreno, HAPs de 3 anillos y HAPs de bajo peso molecular, pero sin embargo no se detectó ninguna correlación significativa con HAPs de alto peso molecular. Estos resultados son consistentes con un estudio previo en el cual se determinó que la enzima dioxigenasa purificada de *Cycloclasticus* sp. A5 era capaz de degradar naftaleno, metilnaftaleno, fenantreno, dibenzofuran y dibenzotieno, además de bifenilo y difenilmetano aunque con menor eficiencia [Kasai *et al.*, 2003], siendo todos estos compuestos de hasta tres anillos bencénicos. Por lo tanto, los resultados observados al cuantificar la variante *phnA1* sugieren que la bacteria marina hidrocarbonoclástica obligada *Cycloclasticus* podría estar cumpliendo una función importante en la biodegradación de HAPs de bajo peso molecular en los sedimentos marinos de Patagonia.

Las técnicas moleculares que permiten procesar un gran número de muestras de forma rápida tienen un gran potencial para ser utilizadas como herramientas tanto en la caracterización del sitio contaminado como durante el monitoreo de la biorremediación [Stenuit *et al.*, 2008]. A pesar de ello, uno de los principales obstáculos para su implementación es que aún no se dispone de conocimientos suficientes sobre cuáles son los biomarcadores clave que deben ser monitoreados [Stroo, 2010]. En este capítulo hemos demostrado que poblaciones bacterianas aún no aisladas que contienen variantes novedosas de genes de dioxigenasas, como así también la bacteria hidrocarbonoclástica obligada

Cycloclasticus spp. son algunos de los organismos que podrían estar cumpliendo un rol importante en la biodegradación de hidrocarburos en los sedimentos marinos de Patagonia. Por otra parte, el análisis de las muestras de sedimentos del sur de Patagonia también demostró que la abundancia de los genes cuantificados disminuyó con el transcurso del tiempo. A pesar de haberse utilizado 5 pares de cebadores para la identificación de genes de dioxigenasas de HAPs en sedimentos marinos de Patagonia tratando de cubrir todas las variantes de genes de bacterias Gram-negativas conocidos hasta ese momento [Lozada *et al.*, 2008; Dionisi *et al.*, 2011], es muy posible que aún existan otros grupos de genes de dioxigenasas aún no identificados presentes en estos sedimentos que podrían estar surgiendo como dominantes en reemplazo de las poblaciones degradadoras que están disminuyendo en su abundancia. Es por eso que en el próximo capítulo se describirá la identificación de genes de dioxigenasas de compuestos aromáticos a partir de muestras de esta misma zona, relacionados con genes identificados en bacterias Gram-positivas.

Capítulo 6

DIVERSIDAD DE GENES DE DIOXIGENASAS ASOCIADOS A BACTERIAS GRAM-POSITIVAS DEGRADADORAS DE HAPs EN SEDIMENTOS INTERMAREALES DEL SUR DE PATAGONIA

6.1. INTRODUCCIÓN

Hasta el momento se conocen cuatro variantes de genes que codifican la subunidad α de dioxigenasas identificadas en bacterias Gram-positivas: (i) los genes *narAa* de *Rhodococcus* sp. NCIMB12038 (identificados también en otras cepas del mismo género y en *Gordonia* sp. CC-NAPH129-6), (ii) los genes *phdA/pdoA2* de *Nocardioides* sp. KP7 y *Mycobacterium* spp., (iii) los genes *nidA/pdoA1* de *Mycobacterium* spp. y (iv) los genes *nidA3/fadA1* de *Mycobacterium* spp. y *Terrabacter* spp. [Habe y Omori, 2003; Cébron *et al.*, 2008]. La mayoría de estos organismos han sido aislados del medio ambiente terrestre y sólo la bacteria *Nocardioides* sp. KP7 se ha aislado a partir del medio ambiente marino [Iwabuchi *et al.*, 1998]. A pesar de ello, es posible que bacterias Gram-positivas cumplan un rol importante en las comunidades de los sedimentos marinos [Gontang *et al.*, 2007], particularmente en lo que respecta a la biodegradación de HAPs [Zhuang *et al.*, 2003; Alonso-Gutiérrez *et al.*, 2009; Uad *et al.*, 2010].

La información obtenida hasta el momento acerca de las poblaciones bacterianas con capacidad para degradar HAPs de los ambientes intermareales de la Patagonia utilizando una estrategia funcional independiente del cultivo de microorganismos se refiere únicamente a biomarcadores relacionados con genes identificados a partir de aislamientos de bacterias

Gram-negativas [Lozada *et al.*, 2008; Dionisi *et al.*, 2011; capítulo 5 de esta Tesis]. Si bien resultados obtenidos por medio de la pirosecuenciación del marcador filogenético ARNr 16S bacteriano sugiere que bacterias Gram-positivas podrían tener un rol importante en la biodegradación de estos compuestos en los ambientes costeros de la Patagonia (capítulo 3 de esta Tesis), aún no se dispone de información sobre este grupo de microorganismos desde una perspectiva funcional. Dado que la caracterización de las poblaciones bacterianas relevantes para la biodegradación de estos compuestos no estaría completa sin estudiar este importante grupo de microorganismos, el objetivo de este capítulo fue la identificación de biomarcadores funcionales de la biodegradación de HAPs relacionados con bacterias Gram-positivas en ambientes subantárticos de la costa Patagónica. Esta información ayudará al esclarecimiento del rol que tienen las bacterias Gram-positivas en la biodegradación de HAPs en este ambiente. En este capítulo se describe el diseño de cebadores específicos para la amplificación de fragmentos de genes que codifican la subunidad α de enzimas dioxigenasas relacionados con aquellos previamente identificados en bacterias Gram-positivas. Estos cebadores fueron utilizados para amplificar fragmentos de dichos genes a partir de ADN aislado de sedimentos subantárticos. Los fragmentos de genes amplificados fueron clonados, secuenciados y comparados con cuatro bases de datos, con el fin de evaluar la posible función de las proteínas que ellos codifican. Estas bases de datos utilizan distintos criterios para predecir la función de las proteínas y son habitualmente utilizadas en análisis metagenómicos para obtener información sobre las funciones que desarrollan las comunidades de distintos ambientes [Tringe *et al.*, 2005; Harrington *et al.*, 2007; Mou *et al.*, 2008; Rentsch y Orenge, 2009]. Aquellos fragmentos que codificaban enzimas dioxigenasas fueron luego clasificados utilizando el sistema de clasificación recientemente propuesto por Kweon y colaboradores [Kweon *et al.*, 2008]. Los resultados obtenidos nos permitieron expandir nuestros conocimientos sobre la diversidad de genes de dioxigenasas que participan en la biodegradación de compuestos aromáticos presentes en los sedimentos marinos subantárticos.

6.2. RESULTADOS

6.2.1. Diseño y validación de cebadores para detectar genes de dioxigenasas de bacterias Gram-positivas

Con el objetivo de identificar genes que codifican enzimas dioxigenasas de bacterias Gram-positivas presentes en las comunidades microbianas de sedimentos intermareales de Bahía Ushuaia, se diseñaron dos pares de cebadores (Tabla 6.1) utilizando la información de secuencias disponible en la base de datos de GenBank. El par de cebadores NMR331f/NMR1134r es de amplia cobertura y tiene como blanco genes de dioxigenasas identificados en bacterias de los géneros *Nocardioides*, *Mycobacterium* y *Rhodococcus*, mientras que los cebadores RHO5f/RHO1308r son específicos para genes de dioxigenasas de *Rhodococcus* spp.

El diseño de los cebadores se realizó siguiendo los mismos criterios descriptos para el diseño de cebadores de qPCR (sección 2.7.1), con la única diferencia del tamaño de los fragmentos a amplificar. Mientras que la corta longitud del fragmento es un factor importante en los ensayos de qPCR, en la construcción de bibliotecas de productos de amplificación es deseable que el tamaño del fragmento sea lo más extenso posible, y que además contenga regiones conservadas de importancia para el análisis, como por ejemplo el sitio activo. Para el diseño de los cebadores NMR331f/NMR1134r (Tabla 6.1), se alinearon 20 secuencias de la subunidad α de dioxigenasas de HAPs disponibles en la base de datos de GenBank al mes de junio de 2004, previamente identificadas en la bacteria marina *Nocardioides* sp. KP7 (1 secuencia), en microorganismos del género *Mycobacterium* (12 secuencias) y en *Rhodococcus* spp. (7 secuencias). Luego se obtuvo la secuencia consenso del alineamiento, lo que permitió el posicionamiento manual de los cebadores (Figura 6.1). Las secuencias de estos cebadores fueron comparadas recientemente con la base de datos de GenBank para evaluar su actual cobertura, dado el gran crecimiento que esta base de datos ha tenido en los últimos años. Al momento de escribir este capítulo, se encontraron en la base de datos 62 secuencias relacionadas con las utilizadas en el diseño y que abarcan la región en donde se posicionaron ambos cebadores. Los cebadores hibridizan sin errores con 43 de estas secuencias, mientras que 17 secuencias presentaron sólo una base diferente en el extremo 5' del cebador NMR331f, y dos secuencias presentaron una base diferente en el extremo 3' del cebador

NMR1134r. Dado que la presencia de una sola base no complementaria en el extremo 5' del cebador probablemente no comprometa la hibridización con el gen de interés, estos resultados evidencian una alta cobertura de los cebadores diseñados con las secuencias blanco disponibles en la base de datos de GenBank. Este dato constituye sólo un valor de referencia, ya que no es posible conocer su cobertura con respecto a la gran diversidad de genes presentes en el ambiente, muchos de los cuales aún no han sido identificados.

Los cebadores RHO5f/RHO1308r se diseñaron utilizando nueve secuencias de la subunidad α de dioxigenasas de HAPs disponibles en la base de datos de GenBank al mes de abril de 2007, todas ellas identificadas en microorganismos del género *Rhodococcus* (Figura 6.2 y Tabla 6.1). Al comparar nuevamente estos cebadores con la base de datos de GenBank para evaluar su cobertura en la actualidad, se encontraron 11 secuencias relacionadas con las utilizadas en el diseño y que abarcan la región en donde se posicionaron ambos cebadores, las cuales fueron identificadas en microorganismos de los géneros *Rhodococcus* y *Gordonia*. Los cebadores RHO5f/RHO1308r hibridizan perfectamente con todas estas secuencias y no alinean con ninguna otra secuencia que no sea blanco del ensayo.

Tabla 6.1. Cebadores diseñados para identificar genes de dioxigenasas de HAPs asociados a bacterias Gram-positivas presentes en los sedimentos marinos de Patagonia

Cebador	Secuencia	Conc. cebadores (nM)	Temp. alineado (°C)	Amplificación (pb)	Referencia
NMR331f	5' TGCCC d TACCACGG y TGG 3'	500	53	803	[Marcos <i>et al.</i> , 2009]
NMR1134r	5' CTCGGCGTCGTCCTG y TC 3'	500			
RHO5f	5' TGAGCAACGAACTCCGGCAGACC 3'	200	51	1.256	Este estudio
RHO1308r	5' GAGCATGAGCTGCATCCAGTATTCG 3'	200			

Las letras en color rojo corresponden al código IUPAC para bases degeneradas

Capítulo 6. Diversidad de genes de dioxigenasas asociados a bacterias Gram-positivas degradadoras de HAPs en sedimentos intermareales del sur de Patagonia

A	Núm. Acc.	Gen	Cepa	Secuencia
	AJ494745	<i>pdoA1</i>	6PY1	ACCGCGCACTTCCAATGCCCCGTACCACGGCTGGGTGTACAGCAACAC
	AF548347	<i>nidA</i>	BB1	ACCGCGCACTTCCAATGCCCCGTACCACGGCTGGGTGTACAGCAACAC
	AF546904	<i>nidA</i>	S65	ACCGCGCACTTCCAATGCCCCGTACCACGGCTGGGTGTACAGCAACAC
	AF249301	<i>nidA</i>	PYR-1	ACCGCGCACTTCCAATGCCCCGTACCACGGCTGGGTGTACAGCAACAC
	AY365117	<i>nidA</i>	PYR-1	ACCGCGCACTTCCAATGCCCCGTACCACGGCTGGGTGTACAGCAACAC
	AY330100	<i>nidA</i>	KMS	ACCGCGCACTTCCAATGCCCCGTACCACGGCTGGGTGTACAGCAACAC
	AF548343	<i>nidA</i>	PYR-GCK	ACCGCGCACTTCCAATGCCCCGTACCACGGCTGGGTGTACAGCAACAC
	AB179737	<i>nidA</i>	MHP-1	ACCGCGCACTTCCAATGCCCCGTACCACGGCTGGGTGTACAGCAACAC
	AF548345	<i>nidA</i>	Fan9T	ACCGCGCACTTCCAATGCCCCGTACCACGGCTGGGTGTACAGCAACAC
	AY330098	<i>nidA</i>	JLS	ACCGCGCACTTCCAATGCCTGTACCACGGCTGGGTGTACAGCAACAC
	AY330102	<i>nidA</i>	MCS	TCCTGTCT--TTCCAATGCCCCGTACCACGGCTGGGTGTACAGCAACAC
	AF546905	<i>pdoA</i>	S65	ACCGCCCACTTCCAGTGCCCCGTACCACGGCTGGGTGTACAGCAATAC
	AY392423	<i>narAa</i>	P400	GCCTCACACTTCCGGTGCCCCGTACCACGGCTGGACCTACAGCAACAC
	AY392424	<i>narAa</i>	P200	GCCTCACACTTCCGGTGCCCCGTACCACGGCTGGACCTACAGCAACAC
	AF121905	<i>nidA</i>	I24	GCCTCACACTTCCGGTGCCCCGTACCACGGCTGGACCTACAGCAACAC
	AB110633	<i>dodA</i>	SAO101	GCCTCGCACTTCCGGTGCCCCGTACCACGGCTGGACCTACAGCAACAC
	AB024936	<i>rnoA2-3</i>	CIR2	ACCTCACACTTCCGATGCCCTTACCACGGTTGGACCTACAGCAACAC
	AJ401612	<i>narA</i>	1BN	ACCTCACACTTCCGATGCCCTTACCACGGTTGGACCTACAGCAACAC
	AF082663	<i>narAa</i>	NCIMB12038	ACCTCACACTTCCGATGCCCTTACCACGGTTGGACCTACAGCAACAC
	AB017794	<i>phdA</i>	KP7	ACCTCGCATTTCGCTGCCCATACCACGGCTGGACCTACAAGAACAC

Cebador NMR331f

5' TGCCCDTACCACGGYTGG 3'

B	Núm. Acc.	Gen	Cepa	Secuencia
	AJ494745	<i>pdoA1</i>	6PY1	CCAGGTGGGGTTTTTCGAACAGGACGACGCCGAGGCATGGAAGGCCAT
	AF548347	<i>nidA</i>	BB1	CCAGGTGGGGTTTTTCGAACAGGACGACGCCGAGGCATGGAAGGCCAT
	AF546904	<i>nidA</i>	S65	CCAGGTGGGGTTTTTCGAACAGGACGACGCCGAGGCATGGAAGGCCAT
	AF249301	<i>nidA</i>	PYR-1	CCAGGTGGGGTTTTTCGAACAGGACGACGCCGAGGCATGGAAGGCCAT
	AY365117	<i>nidA</i>	PYR-1	CCAGGTGGGGTTTTTCGAACAGGACGACGCCGAGGCATGGAAGGCCAT
	AY330100	<i>nidA</i>	KMS	CCAGGTGGGGTTTTTCGAACAGGACGACGCCGAGGCATGGAAGGCCAT
	AF548343	<i>nidA</i>	PYR-GCK	CCAGGTGGGGTTTTTCGAACAGGACGACGCCGAGGCATGGAAGGCCAT
	AB179737	<i>nidA</i>	MHP-1	CCAGGTGGGGTTTTTCGAACAGGACGACGCCGAGGCATGGAAGGCCAT
	AF548345	<i>nidA</i>	Fan9T	CCAGGTGGGGTTTTTCGAACAGGACGACGCCGAGGCATGGAAGGCCAT
	AY330098	<i>nidA</i>	JLS	CCAGGTGGGGTTTTTCGAACAGGACGACGCCGAGGCATGGAAGGCCAT
	AY330102	<i>nidA</i>	MCS	CCAGGTGGGGTTTTTCGAACAGGACGACGCCGAGGCATGGAAGGCCAT
	AF546905	<i>pdoA</i>	S65	CCGGCCGGTGTTTTTGAACAGGACGACGCCGAGGCATGGAAGGCCAT
	AY392423	<i>narAa</i>	P400	ATCTCCGGTGCCTTCGAACAGGACGACGCCGAGAACTGGCGCAGTAT
	AY392424	<i>narAa</i>	P200	ATCTCCGGTGCCTTCGAACAGGACGACGCCGAGAACTGGCGCAGTAT
	AF121905	<i>nidA</i>	I24	ATCTCCGGTGCCTTCGAACAGGACGACGCCGAGAACTGGCGCAGTAT
	AB110633	<i>dodA</i>	SAO101	ATCTCCGGCGCCTTCGAACAGGACGACGCCGAGAACTGGCGCAGTAT
	AB024936	<i>rnoA2-3</i>	CIR2	ATCTCCGGCGCCTTCGAACAGGACGACGCCGAGAACTGGCGCAG-AT
	AJ401612	<i>narA</i>	1BN	ATCTCCGGCGCCTTCGAACAGGACGACGCCGAGAACTGGCGCAGCAT
	AF082663	<i>narAa</i>	NCIMB12038	ATCTCCGGCGCCTTCGAACAGGACGACGCCGAGAACTGGCGCAGCAT
	AB017794	<i>phdA</i>	KP7	GTGTCCGGGGTGTTTTTGAGCAGGACGACGCCGAGACCTGGCGATCGAT

Cebador NMR1134r (IC)

5' GARCAGGACGACGCCGAG 3'

5' CTCGGCGTCGTCCTGYTC 3'

Capítulo 6. Diversidad de genes de dioxigenasas asociados a bacterias Gram-positivas degradadoras de HAPs en sedimentos intermareales del sur de Patagonia

Figura 6.1 (Página anterior). Alineamiento de secuencias de genes de dioxigenasas obtenidas de la base de datos de GenBank para el diseño de los cebadores NMR331f/NMR1134r. Se indica a la izquierda de cada secuencia el número de acceso a GenBank (Núm. Acc.), el nombre del gen de dioxigenasa y la cepa bacteriana en donde se identificó dicho gen. El sombreado gris del alineamiento corresponde a la zona en donde se posicionaron los cebadores NMR331f (A) y NMR1134r (B). IC: secuencia inversa complementaria. Los números de acceso coloreados en azul corresponden a secuencias del género *Mycobacterium*, en negro a secuencias del género *Rhodococcus* y en rojo a la secuencia del género *Nocardioides*

A			
Núm. Acc.	Gen	Cepa	Secuencia
AY392423	<i>narAa</i>	P400	ATGCTGAGCAACGAACTCCGGCAGACCCTCCAGAAGGGTTTGCACG
AY392424	<i>narAa</i>	P200	ATGCTGAGCAACGAACTCCGGCAGACCCTCCAGAAGGGTTTGCACG
AF121905	<i>nidA</i>	I24	ATGCTGAGCAACGAACTCCGGCAGACCCTCCAGAAGGGTTTGCACG
AB206671	<i>nidA</i>	TKN14	ATGCTGAGCAACGAACTCCGGCAGACCCTCCAGAAGGGTTTGCACG
AB110633	<i>dodA</i>	SAO101	ATGCTGAGCAACGAACTCCGGCAGACCCTCCAGAAGGGTTTGCACG
AB024936	<i>rnoA2-A3</i>	CIR2	ATGCTGAGCAACGAACTCCGGCAGACCCTCCAAAAGGGTTTGCATG
DQ846881	<i>narAa</i>	R7	ATGCTGAGCAACGAACTCCGGCAGACCCTCCAAAAGGGTTTGCATG
AJ401612	<i>narA</i>	1BN	ATGCTGAGCAACGAACTCCGGCAGACCCTCCAAAAGGGTTTGCATG
AF082663	<i>narAa</i>	NCIMB12038	ATGCTGAGCAACGAACTCCGGCAGACCCTCCAAAAGGGTTTGCATG *****
Cebador RHO5f			5' TGAGCAACGAACTCCGGCAGACC 3'
B			
Núm. Acc.	Gen	Cepa	Secuencia
AY392423	<i>narAa</i>	P400	GCAACTTCCTCGAATACTGGATGCAGCTCATGCTCGCGGACACACC
AY392424	<i>narAa</i>	P200	GCAACTTCCTCGAATACTGGATGCAGCTCATGCTCGCGGACACACC
AF121905	<i>nidA</i>	I24	GCAACTTCCTCGAATACTGGATGCAGCTCATGCTCGCGGACACACC
AB206671	<i>nidA</i>	TKN14	GCAACTTCCTCGAATACTGGATGCAGCTCATGCTCGCGGACACACC
AB110633	<i>dodA</i>	SAO101	GCAACTTCCTCGAATACTGGATGCAGCTCATGCTCGCGGACACACC
AB024936	<i>rnoA2-A3</i>	CIR2	GCAACTTCCTCGAATACTGGATGCAGCTCATGCTCGCGGAGTCACC
DQ846881	<i>narAa</i>	R7	GCAACTTCCTCGAATACTGGATGCAGCTCATGCTCGCGGAGTCACC
AJ401612	<i>narA</i>	1BN	GCAACTTCCTCGAATACTGGATGCAGCTCATGCTCGCGGAGTCACC
AF082663	<i>narAa</i>	NCIMB12038	GCAACTTCCTCGAATACTGGATGCAGCTCATGCTCGCGGAGTCACC *****
Cebador RHO1308r (IC)			5' CGAATACTGGATGCAGCTCATGCTC 3' 5' GAGCATGAGCTGCATCCAGTATTTCG 3'

Figura 6.2. Fragmento del alineamiento de secuencias de genes de dioxigenasas utilizadas para el diseño de los cebadores RHO5f (A) y RHO1308r (B). A la izquierda de cada secuencia se indica el número de acceso a GenBank (Núm. Acc.), el nombre del gen de dioxigenasa y la cepa bacteriana en donde se identificó el gen. El sombreado gris indica la zona en donde se posicionaron los cebadores. IC: secuencia inversa complementaria

6.2.2. Construcción de bibliotecas de productos de amplificación

Los dos pares de cebadores diseñados fueron evaluados utilizando ADN metagenómico purificado de sedimentos del sitio OR como templado. Las condiciones utilizadas en las reacciones de amplificación se indican en la Tabla 6.1, y para ambos pares de cebadores se utilizó como control positivo ADN genómico purificado a partir de la cepa *Rhodococcus opacus* MR22. En el caso de los cebadores RHO5f/RHO1308r se agregó betaína y DMSO a las reacciones de amplificación, los cuales facilitan la amplificación de fragmentos de ADN ricos en nucleótidos GC. A pesar de ello, no se logró obtener productos de amplificación específicos en ninguna de las condiciones ensayadas con estos cebadores (datos no mostrados), ya que si bien los productos de amplificación generados presentaban el tamaño molecular esperado, sus secuencias no correspondían al gen blanco del ensayo. Debido a esto, este ensayo fue desechado.

Los cebadores NMR331f/NMR1134r fueron evaluados utilizando ADN metagenómico purificado de cuatro muestras de sedimentos subantárticos del sitio OR (OR04-07). Sólo a partir de dos de estas muestras (OR05 y OR07) se obtuvieron productos de amplificación del tamaño esperado (datos no mostrados), los cuales fueron utilizados para construir dos bibliotecas de productos de amplificación, que se denominaron NMR-OR05 y NMR-OR07. Los clones de las dos bibliotecas fueron en principio analizados por medio de la amplificación del fragmento clonado del gen, seguido por un análisis de RFLP utilizando la enzima de restricción *HaeIII* (Promega, Madison, WI, Estados Unidos), la cual reconoce como sitio de corte la secuencia 5' GGCC 3'. Este análisis nos permitió comparar las secuencias de las bibliotecas, como un paso previo a su secuenciación. Se analizaron por RFLP un total de 170 clones, 74 de ellos pertenecientes a la biblioteca NMR-OR05 y los 96 restantes pertenecientes a la biblioteca NMR-OR07. Los patrones de restricción obtenidos fueron muy diversos, sugiriendo la presencia de una gran diversidad de fragmentos amplificados por estos cebadores (Figura 6.3). En una primera etapa, se secuenciaron clones elegidos al azar representativos de todos los patrones de restricción utilizando los cebadores M13F y M13R-pUC presentes en el vector pCR4. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con la base de datos de GenBank utilizando la herramienta TBLASTX de BLAST. Este programa encuentra regiones de similitud local entre secuencias, al comparar las traducciones en sus seis marcos de lectura de una determinada secuencia incógnita de nucleótidos contra toda la base de datos

de nucleótidos traducida en sus seis marcos de lectura [McGinnis y Madden, 2004]. Si bien este programa es el más lento dentro de las herramientas del BLAST, es capaz de encontrar relaciones muy distantes entre secuencias de nucleótidos. Cuando el resultado de la secuenciación indicó que el producto de amplificación correspondía a un gen de dioxigenasa, se procedía a secuenciar todos los clones que compartieran el mismo patrón de restricción. En el caso contrario, cuando el resultado de la secuenciación indicaba que el fragmento amplificado no correspondía a un gen de dioxigenasa, los clones que compartían el mismo patrón de restricción fueron desechados, porque se asumió que dichas secuencias eran el resultado de uniones inespecíficas de los cebadores a fragmentos de ADN diferentes a los genes blanco del ensayo. Los porcentajes de clones conteniendo productos inespecíficos en las bibliotecas NMR-OR05 y NMR-OR07 fueron elevados, aproximadamente 51% y 72%, respectivamente.

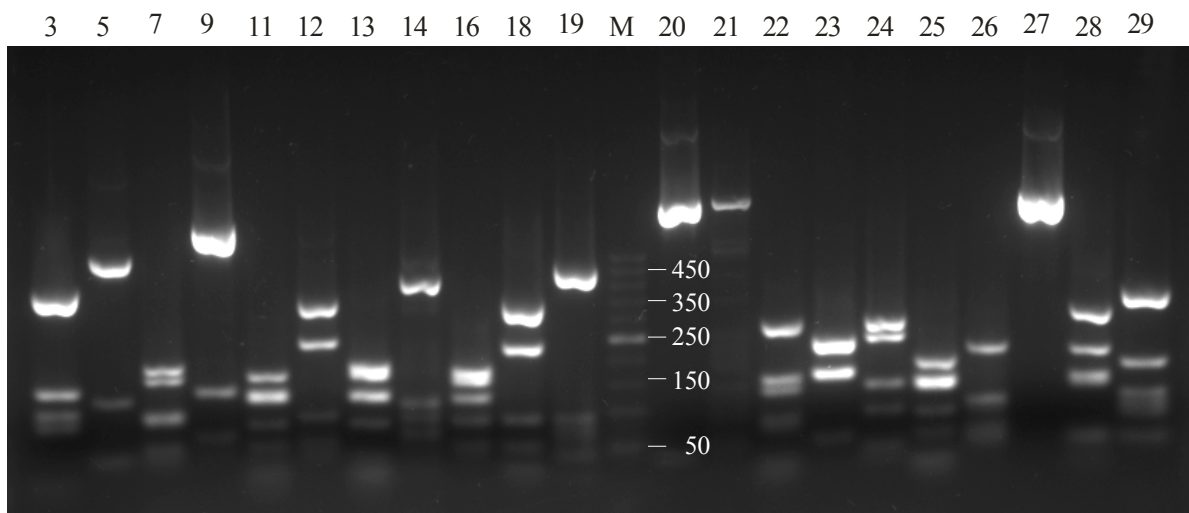


Figura 6.3. Análisis de los patrones de restricción de secuencias de la biblioteca NMR-OR05 generados por digestión con la enzima *HaeIII* (Promega, Madison, WI, Estados Unidos). Gel de agarosa 2% (p/v), teñido con SYBR Safe (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos). Los números en el margen superior de la figura identifican a los clones analizados. M: marcador de peso molecular 50 pb (Productos Bio-Lógicos, Universidad Nacional de Quilmes, Argentina). Los números a la derecha del marcador de peso molecular indican el tamaño en pares de bases de los fragmentos del marcador

6.2.3. Análisis de las bibliotecas de productos de amplificación

6.2.3.1. Análisis de la función de las secuencias deducidas de aminoácidos

Sesenta y dos secuencias de las dos bibliotecas produjeron alineamientos significativos con secuencias de dioxigenasas depositadas en la base de datos de GenBank (Tabla 6.2), principalmente identificadas en bacterias Gram-positivas de los géneros *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Nocardioides*, *Terrabacter* y *Bacillus*. La significancia de los alineamientos está dada por los valores de E: cuanto menores son estos valores, menores son las probabilidades de que el alineamiento se haya producido por azar [Orengo, 2003]. Los porcentajes de similitud e identidad a nivel de aminoácidos con estas proteínas, sin embargo, fueron relativamente bajos, del 38 al 67% y del 33 al 62% de la longitud total de los fragmentos analizados (248 a 271 aminoácidos), respectivamente. Cuatro secuencias (tres pertenecientes a la biblioteca NMR-OR05 y una perteneciente a NMR-OR07) resultaron ser pseudogenes, y por consiguiente no se incluyeron en posteriores análisis a pesar de ser productos específicos. Utilizando el programa DOTUR, que actualmente ha sido incorporado como una herramienta dentro del programa mothur [Schloss *et al.*, 2009], se identificaron 14 grupos distintos o variantes de dioxigenasas, en base a los porcentajes de identidad a nivel de aminoácidos entre las secuencias de los clones. La identidad a nivel de aminoácidos entre secuencias de una misma variante fue igual o superior al 86,7%, mientras que la identidad entre enzimas pertenecientes a variantes diferentes fue igual o inferior al 67%. Estas 14 variantes de dioxigenasas fueron denominadas F a S, a fin de continuar con la nomenclatura utilizada en los estudios previos realizados en nuestro laboratorio [Lozada *et al.*, 2008].

Debido a que las secuencias de las bibliotecas NMR-OR05 y NMR-OR07 presentaron bajos porcentajes de identidad al ser comparadas con la base de datos de GenBank, secuencias representativas de cada uno de los 14 grupos fueron comparadas con tres bases de datos adicionales a fin de obtener mayor evidencia de la posible función de estas proteínas. Para ello, se utilizaron las bases de datos COG (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>, [Tatusov *et al.*, 2000]), KEGG (<http://www.kegg.jp/kegg/>, [Ogata *et al.*, 1999]) y GO (<http://www.geneontology.org/>, [Ashburner *et al.*, 2000]). Todas las secuencias representativas de las variantes F a S alinearon con secuencias de enzimas dioxigenasas de compuestos aromáticos depositadas en las bases de datos, y los alineamientos presentaron

valores de E inferiores a 10^{-16} , 10^{-24} y 10^{-20} para COG, KEGG y GO, respectivamente (Tabla 6.2). Los bajos valores de E observados al comparar las secuencias de las 14 variantes con cuatro bases de datos distintas indicarían que todos estos fragmentos de genes clonados efectivamente codifican para la subunidad α de enzimas dioxigenasas presentes en sedimentos subantárticos. Por otra parte, se identificó en las secuencias deducidas de aminoácidos de las variantes F a S la presencia de dos residuos de histidina completamente conservados (His208 e His213 de acuerdo a la numeración de la enzima NahAc de *Pseudomonas putida* NCIB 9816-4 [AAO64274], datos no mostrados), los cuales permitirían la unión al átomo de hierro del sitio activo de las dioxigenasas [Kauppi *et al.*, 1998]; y un residuo de aspartato completamente conservado (Asp205) involucrado en la transferencia de electrones [Kauppi *et al.*, 1998; Furusawa *et al.*, 2004]. La presencia de residuos de aminoácidos críticos para el funcionamiento de la enzima en las secuencias detectadas en las muestras de sedimentos constituye una evidencia adicional de que los fragmentos amplificados codifican para la subunidad α de enzimas dioxigenasas [Dionisi *et al.*, 2011].

6.2.3.2. Diversidad de las bibliotecas de productos de amplificación

La información sobre la cantidad de variantes de dioxigenasas detectadas en cada biblioteca y la abundancia relativa de cada una de las variantes permitió además calcular índices de diversidad y dominancia de las bibliotecas. Las bibliotecas NMR-OR05 y NMR-OR07 fueron igualmente diversas, y presentaron bajos índices de dominancia (Tabla 6.3). Sin embargo, la similitud entre ambas bibliotecas resultó ser relativamente baja (índice de similitud de Bray-Curtis: 0,52), y esto se debe a que las bibliotecas sólo comparten 4 del total de 14 variantes de dioxigenasas (F, G, I y M). Por último, si bien los porcentajes de cobertura obtenidos fueron altos (superiores al 80%, Tabla 6.3), se podría identificar una nueva variante de dioxigenasas con sólo analizar 5 (NMR-OR05) o 13 (NMR-OR07) nuevos clones conteniendo productos específicos de amplificación. Lamentablemente, los elevados porcentajes de inespecificidad de los fragmentos amplificados con los cebadores NMR331f/NMR1134r representaron un obstáculo para continuar con el análisis de las bibliotecas de productos de amplificación a fin de lograr valores de cobertura más elevados.

Capítulo 6. Diversidad de genes de dioxigenasas asociados a bacterias Gram-positivas degradadoras de HAPs en sedimentos intermareales del sur de Patagonia

Tabla 6.2. Comparación de las secuencias de las bibliotecas NMR-OR05 y NMR-OR07 con cuatro bases de datos: NCBI, COG, KEGG y GO

Variante (Clon)	NCBI	COG	KEGG	GO
F (NMR-OR05-90)	10^{-39} [ACJ12462]	10^{-51} [ZhcaA1]	10^{-48} [mva:Mvan_4415]	10^{-39} [Q53122]
G (NMR-OR05-31)	10^{-41} [ADH94645]	10^{-22} [ZhcaA1]	10^{-41} [mjl:Mjls_1639]	10^{-21} [POA110]
H (NMR-OR05-29)	10^{-44} [ADH94645]	10^{-38} [ZhcaA1]	10^{-46} [pfe:PSF113_3396]	10^{-30} [Q53122]
I (NMR-OR05-40)	10^{-42} [ACM06903]	10^{-23} [ZhcaA1]	10^{-39} [mgi:Mflv_0640]	10^{-25} [Q53122]
J (NMR-OR05-47)	10^{-80} [BAC79226]	10^{-28} [ZhcaA1]	10^{-63} [bts:Btus_2903]	10^{-32} [Q8RTL4]
K (NMR-OR05-60)	10^{-46} [ACI79895]	10^{-54} [ZhcaA1]	10^{-48} [plu:plu2204]	10^{-37} [Q53122]
L (NMR-OR07-33)	10^{-76} [AAD53254]	10^{-29} [ZhcaA1]	10^{-47} [bbr:BB0728]	10^{-31} [Q53122]
M (NMR-OR05-30)	10^{-109} [ACL79591]	10^{-18} [ZhcaA1]	10^{-97} [mjl:Mjls_4220]	10^{-24} [Q53122]
N (NMR-OR07-04)	10^{-100} [ABZ71046]	10^{-16} [ZhcaA1]	10^{-89} [cak:Caul_1917]	10^{-22} [Q53122]
O (NMR-OR05-80)	10^{-34} [ACI79895]	10^{-40} [ZhcaA1]	10^{-34} [sfv:SFV_2586]	10^{-31} [POA110]
P (NMR-OR05-68)	10^{-129} [AEV73736]	10^{-32} [ZhcaA1]	10^{-111} [mrh:MycrhN_3203]	10^{-31} [Q8RTL4]
Q (NMR-OR05-07)	10^{-66} [BAG30872]	10^{-26} [ZhcaA1]	10^{-24} [vej:VEJY3_06610]	10^{-24} [Q53122]
R (NMR-OR05-86)	10^{-179} [ACF23490]	10^{-52} [ZhcaA1]	10^{-128} [psd:DSC_09320]	10^{-98} [Q53122]
S (NMR-OR07-58)	10^{-48} [ACM06903]	10^{-23} [ZhcaA1]	10^{-42} [tro:trd_A0341]	10^{-20} [Q53122]

Se indican los valores de E obtenidos y los códigos de acceso (entre corchetes) de las secuencias de las bases de datos que presentaron el mejor alineamiento con las secuencias de los clones

Tabla 6.3. Análisis de la diversidad de las bibliotecas de productos de amplificación NMR-OR05 y NMR-OR07

Biblioteca	S_{obs}	H	D	C (%)
NMR-OR05	11	1,94	0,18	81,8
NMR-OR07	7	1,79	0,15	92,0

S_{obs} , Número de variantes de dioxigenasas presentes en cada biblioteca, identificadas al 85% de identidad en las secuencias de aminoácidos; H , Índice de diversidad de Shannon; D , Índice de dominancia de Simpson; C (%), Índice de cobertura de Good

6.2.4. Análisis filogenético y clasificación de los fragmentos de genes de dioxigenasas

El dendrograma de la Figura 6.4 representa las relaciones filogenéticas entre las secuencias deducidas de aminoácidos de los fragmentos de genes detectados en las muestras de sedimentos subantárticos y secuencias relacionadas obtenidas de la base de datos de GenBank. Las secuencias de este estudio que presentaban porcentajes de identidad a nivel de aminoácidos iguales o superiores al 98% fueron agrupadas y sólo un clon representativo de estos grupos se incluyó en el árbol filogenético. Las variantes F, G, I y M se encuentran representados por clones pertenecientes a ambas bibliotecas de productos de amplificación, mientras que las variantes restantes sólo están representadas por clones de una única biblioteca. Los agrupamientos forman en general ramificaciones muy profundas, reflejando que las secuencias encontradas en este estudio son muy divergentes con respecto a secuencias de dioxigenasas previamente descritas.

Las secuencias de las bibliotecas de productos de amplificación construidas a partir de las muestras de sedimentos del sitio OR fueron clasificadas utilizando el sistema de clasificación propuesto por Kweon y colaboradores [Kweon *et al.*, 2008], que está basado no sólo en información sobre las secuencias deducidas de aminoácidos, sino también en las interacciones que existen entre los distintos componentes de las enzimas. Utilizando este sistema, secuencias desconocidas pueden asignarse a un tipo de enzimas conocido si el valor de distancia entre la secuencia incógnita y las secuencias conocidas es inferior a un valor umbral definido por estos autores de 0,61. Dado que este valor umbral propuesto fue calculado

utilizando secuencias completas de dichos genes, el análisis de las secuencias de las bibliotecas NMR-OR05 y NMR-OR07 requirió un nuevo cálculo de este valor umbral para cada uno de los tipos de oxigenasas, teniendo en cuenta la longitud y posición del fragmento amplificado. Según este análisis, la variante M sería clasificada como perteneciente al tipo V de enzimas oxigenasas (Figura 6.4), dado que los valores de distancia promedio entre esta variante y las enzimas tipo V es de 0,58, inferior al valor umbral recalculado de 0,62. La variante P, por otra parte, se encuentra en el límite para ser incluida dentro del tipo V, ya que el valor de distancia promedio con las enzimas de este tipo equivale al valor umbral de 0,62.

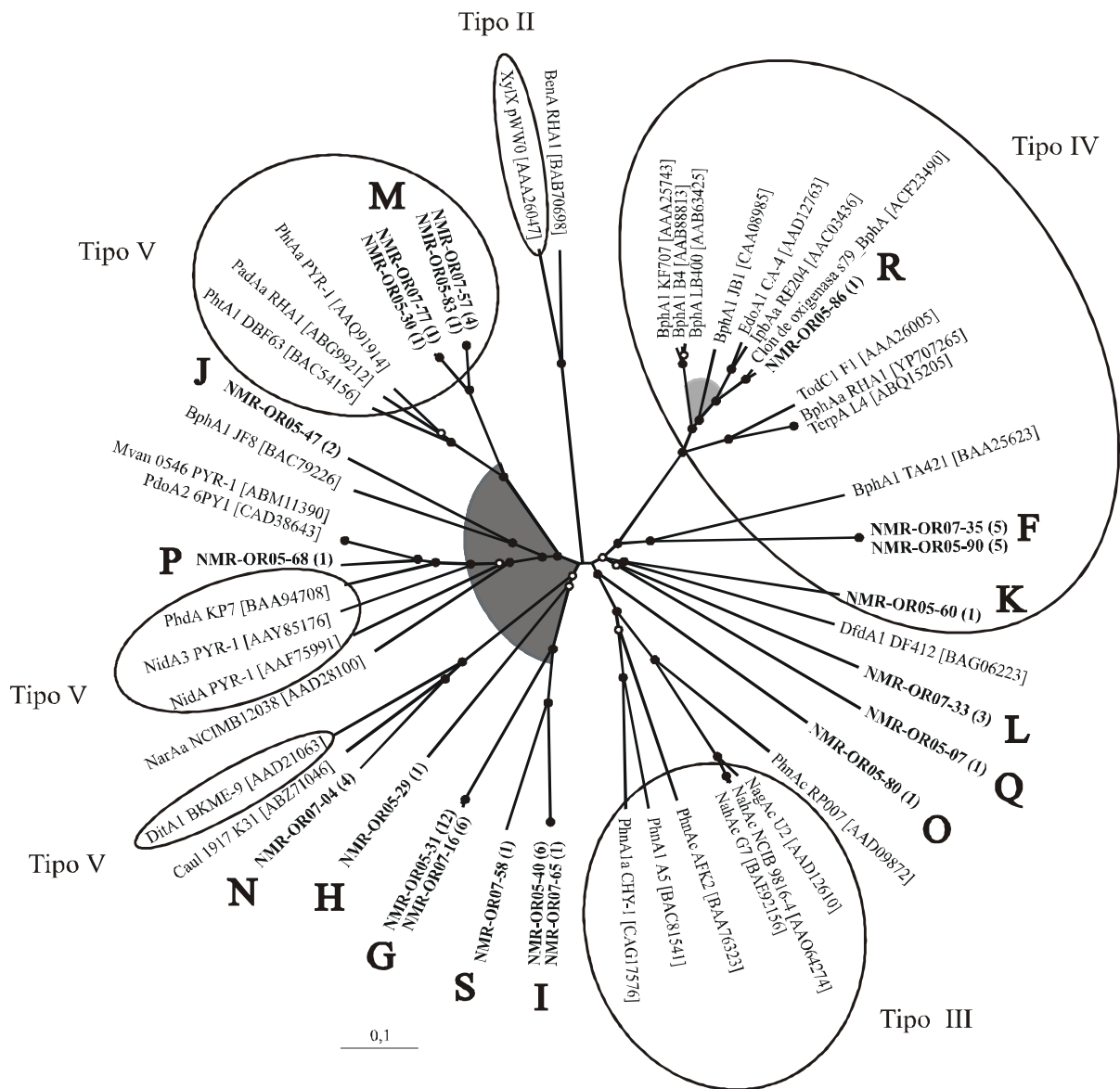


Figura 6.4 (Página anterior). Dendrograma mostrando las relaciones filogenéticas entre las secuencias deducidas de aminoácidos de las bibliotecas NMR-OR05 y NMR-OR07 y secuencias de enzimas dioxigenasas publicadas en la base de datos de GenBank. El árbol filogenético fue construido por el método de *neighbor-joining* utilizando el programa MEGA 4 [Tamura *et al.*, 2007]. Los valores de *bootstrap* fueron calculados como porcentajes basados en 1.000 repeticiones, y los porcentajes superiores a 50% se señalan en las ramificaciones del árbol (51 a 75%: círculos blancos; 76 a 100%: círculos negros). La barra en el margen inferior indica sustituciones por aminoácido. Las zonas sombreadas indican secuencias que contienen indeles (Gris oscuro: indel en la posición 321; Gris claro: indel en la posición 146). Las secuencias representativas de diferentes tipos de oxigenasas (Tipos II al V) se agruparon con círculos. Las secuencias amplificadas a partir de las muestras de sedimentos de la costa Patagónica se encuentran resaltadas, y junto a ellas se indica el nombre de la variante de dioxigenasa a la cual pertenecen. Las secuencias que presentan un porcentaje de identidad a nivel de aminoácidos igual o superior al 98% fueron agrupadas, y sólo una de las secuencias se utilizó para la construcción del árbol. Entre paréntesis al lado del nombre de las secuencias de este estudio se indica el número de clones representados por estas secuencias. En el árbol se incluyen secuencias obtenidas de la base de datos de GenBank, indicándose el nombre de las proteínas y cepas a las que pertenecen. Los nombres de las especies y números de acceso a GenBank son los siguientes: PhnAc RP007: *Burkholderia sp.* RP007 (AAD09872); NagAc U2: *Ralstonia sp.* U2 (AAD12610); NahAc NCIB 9816-4: *Pseudomonas putida* NCIB 9816-4 (AAO64274); NahAc G7: *Pseudomonas putida* G7 (BAE92156); PhnAc AFK2: *Alcaligenes faecalis* AFK2 (BAA76323); PhnA1 A5: *Cycloclasticus sp.* A5 (BAC81541); PhnA1a CHY-1: *Sphingomonas sp.* CHY-1 (CAG17576); Caul 1917 K31: *Caulobacter sp.* K31 (ABZ71046); DitA BKME-9: *Pseudomonas abietaniphila* BKME-9 (AAD21063); NarAa NCIMB12038: *Rhodococcus sp.* NCIMB12038 (AAD28100); NidA PYR-1: *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 (AAF75991); NidA3 PYR-1: *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 (AAY85176); PhdA KP7: *Nocardioides sp.* KP7 (BAA94708); PdoA2 6PY1: *Mycobacterium sp.* 6PY1 (CAD38643); Mvan 0546 PYR-1: *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 (ABM11390); BphA1 JF8: *Bacillus sp.* JF8 (BAC79226); PhtA1 DBF63: *Terrabacter sp.* DBF63 (BAC54156); PadAa RHA1: *Rhodococcus sp.* RHA1 (ABG99212); PhtAa PYR-1: *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 (AAQ91914); XylX pWW0: *Pseudomonas putida* pWW0 (AAA26047); BenA RHA1: *Rhodococcus sp.* RHA1 (BAB70698); BphA1 KF707: *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 (AAA25743); BphA1 B4: *Pseudomonas sp.* B4 (AAB88813); BphA LB400: *Burkholderia xenovorans* LB400 (AAB63425); BphA1 JB1: *Burkholderia sp.* JB1 (CAA08985); EdoA1 CA-4: *Pseudomonas fluorescens* CA-4 (AAD12763); IpbAa RE204: *Pseudomonas putida* RE204 (AAC03436); Clon de oxigenasa s79_BphA: clon s79 de bacteria no cultivada (ACF23490); TodC1 F1: *Pseudomonas putida* F1 (AAA26005); BphAa RHA1: *Rhodococcus sp.* RHA1 (YP707265); TerpA L4: *Rhodococcus sp.* L4 (ABQ15205); BphA1 TA421: *Rhodococcus erythropolis* TA421 (BAA25623); DfdA1 DF412: *Nocardioides sp.* DF412 (BAG06223)

Las dioxigenasas de las variantes G, H, I, J, N y S no pudieron ser asignadas a ningún tipo utilizando el nuevo sistema de clasificación, debido a que los valores de distancia entre sus secuencias y oxigenasas previamente conocidas superan el umbral calculado para cada uno de los tipos. Sin embargo, se observó que estos grupos presentan en sus secuencias de

aminoácidos una inserción que también es compartida por todas las secuencias del tipo V (Figura 6.4), y este resultado podría estar indicando un origen filogenético común. Las inserciones y deleciones conservadas en un grupo de secuencias homólogas, localizadas en la misma posición y flanqueadas por regiones conservadas han sido denominadas indeles, y pueden ser utilizadas para estudios de relaciones evolutivas entre genes. Esto se debe a que es altamente improbable que las inserciones o deleciones en diferentes secuencias se originen a partir de mutaciones puntuales independientes [Gupta, 1998]. El indel que comparten las secuencias de oxigenasas tipo V comienza en la posición 321 de acuerdo a la numeración de la enzima NidA de *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 (Figura 6.5) y su secuencia de aminoácidos es variable. Además, el dendrograma obtenido al realizar un alineamiento únicamente del fragmento del indel reflejó las relaciones filogenéticas del fragmento completo (Figura 6.6). Estas observaciones sugieren que la inserción fue adquirida en una etapa temprana de la divergencia evolutiva de las oxigenasas tipo V.

Las variantes F, K y R fueron clasificadas como oxigenasas tipo IV, debido a que las distancias con este tipo de enzimas son de 0,68, 0,68 y 0,50, respectivamente, y el valor de distancia umbral recalculado es de 0,70. Notablemente, se observó la presencia de otro indel en todas las secuencias integrantes de un grupo monofilético que incluye a las secuencias de las variantes R y algunas otras enzimas tipo IV (Figura 6.4). Este indel se localiza en la posición 146 según la numeración de la enzima BphA de *Burkholderia xenovorans* LB400 (Figura 6.7) y a diferencia del indel descrito anteriormente, su secuencia es completamente conservada, sugiriendo que posiblemente haya sido adquirido recientemente por un ancestro común a este grupo. Finalmente, las variantes L, O y Q no pudieron ser asignadas a ningún tipo de enzimas utilizando valores de distancia entre las secuencias de aminoácidos, ni tampoco se observó en ellos la presencia de alguna inserción o deleción característica de un tipo en particular de oxigenasas.

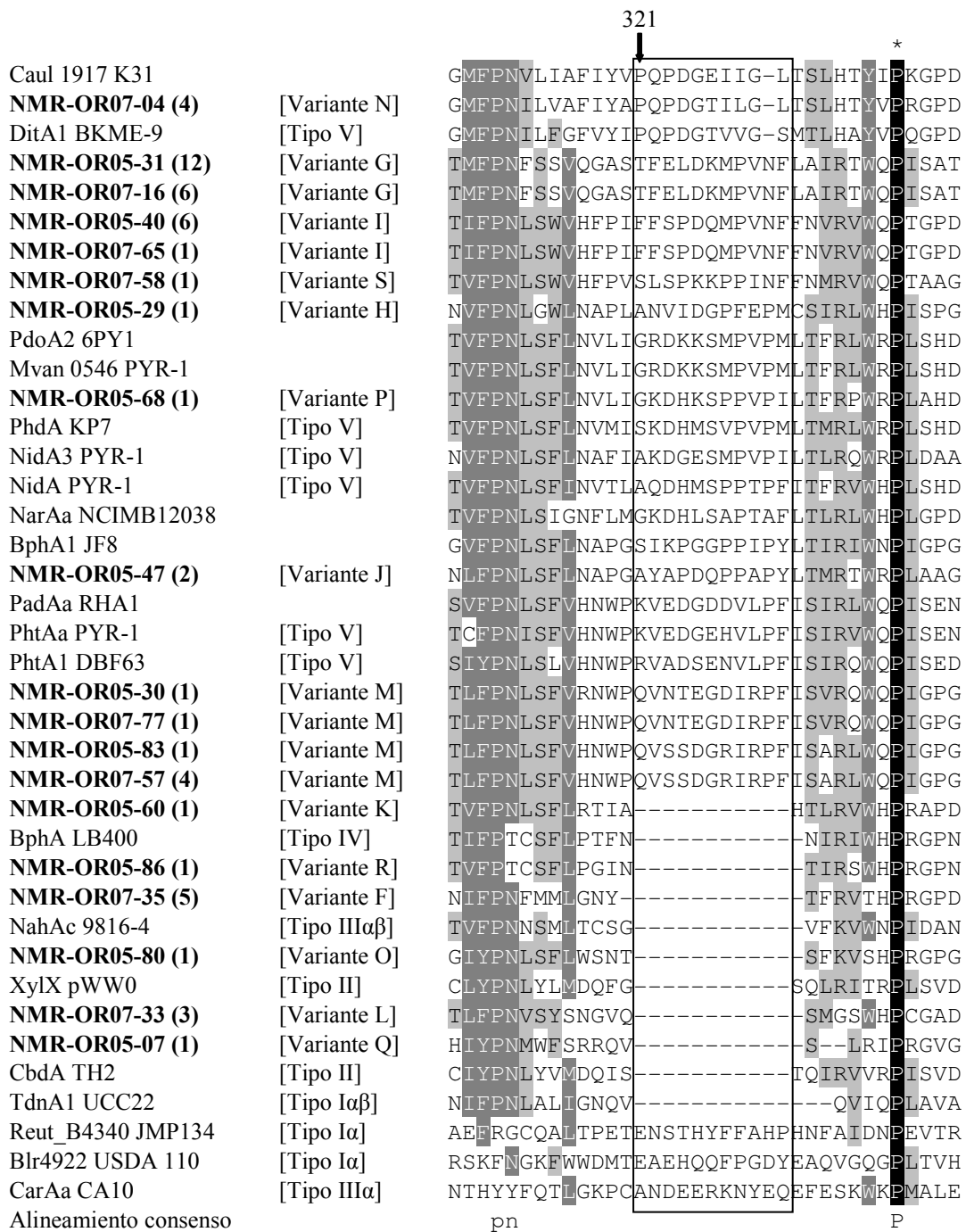


Figura 6.5. Alineamiento de secuencias mostrando el indel localizado en la posición 321 (de acuerdo a la enzima NidA, de *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 [AAF75991]). Las secuencias de las bibliotecas están resaltadas, y entre paréntesis se indica la cantidad de secuencias de cada variante. Los nombres de las enzimas y cepas se indican en la figura, y entre corchetes se indica la variante o tipo de enzima al que pertenecen. Los nombres completos de los microorganismos y los números de acceso se indican en la leyenda de la Figura 6.4. y a continuación: CbdA TH2: *Burkholderia* sp. TH2 (BAB21584); TdnA1 UCC22: *Pseudomonas putida* UCC22 (BAA12807); Reut_B4340 JMP134: *Ralstonia eutropha* JMP134 (YP298537); Blr4922 USDA 110: *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 (NP 771562); CarAa CA10: *Pseudomonas resinovorans* CA10 (BAB32766)

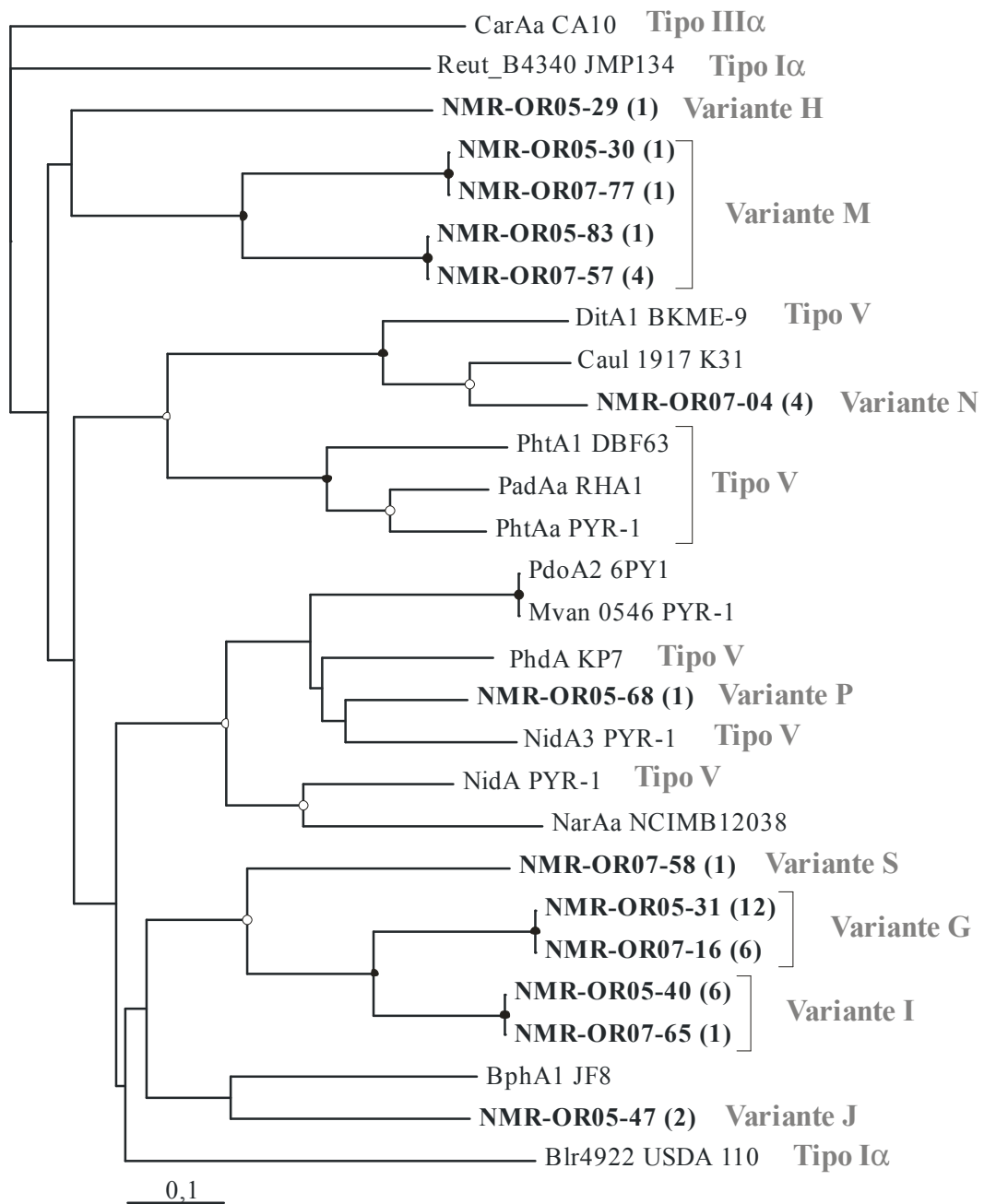


Figura 6.6. Dendrograma resultante del alineamiento del fragmento correspondiente al indel localizado en la posición 321 (numeración de la enzima NidA de *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 [AAF75991]). Se incluyeron en el alineamiento secuencias de dioxigenasas obtenidas de la base de datos de GenBank representativas de los diferentes tipos. El árbol fue construido por el método *neighbor-joining* utilizando el programa MEGA 4.0 [Tamura *et al.*, 2007]. Los valores de *bootstrap* se calcularon en base a 1.000 repeticiones, y aquellos porcentajes superiores al 50% se señalan con círculos en los nodos (51 a 75%: círculos blancos; 76 a 100%: círculos negros). La barra indica sustituciones por aminoácido. Los nombres de las enzimas y las cepas se indican en la figura, los nombres de los microorganismos y los números de acceso se detallan en las leyendas de las Figuras 6.4 y 6.5

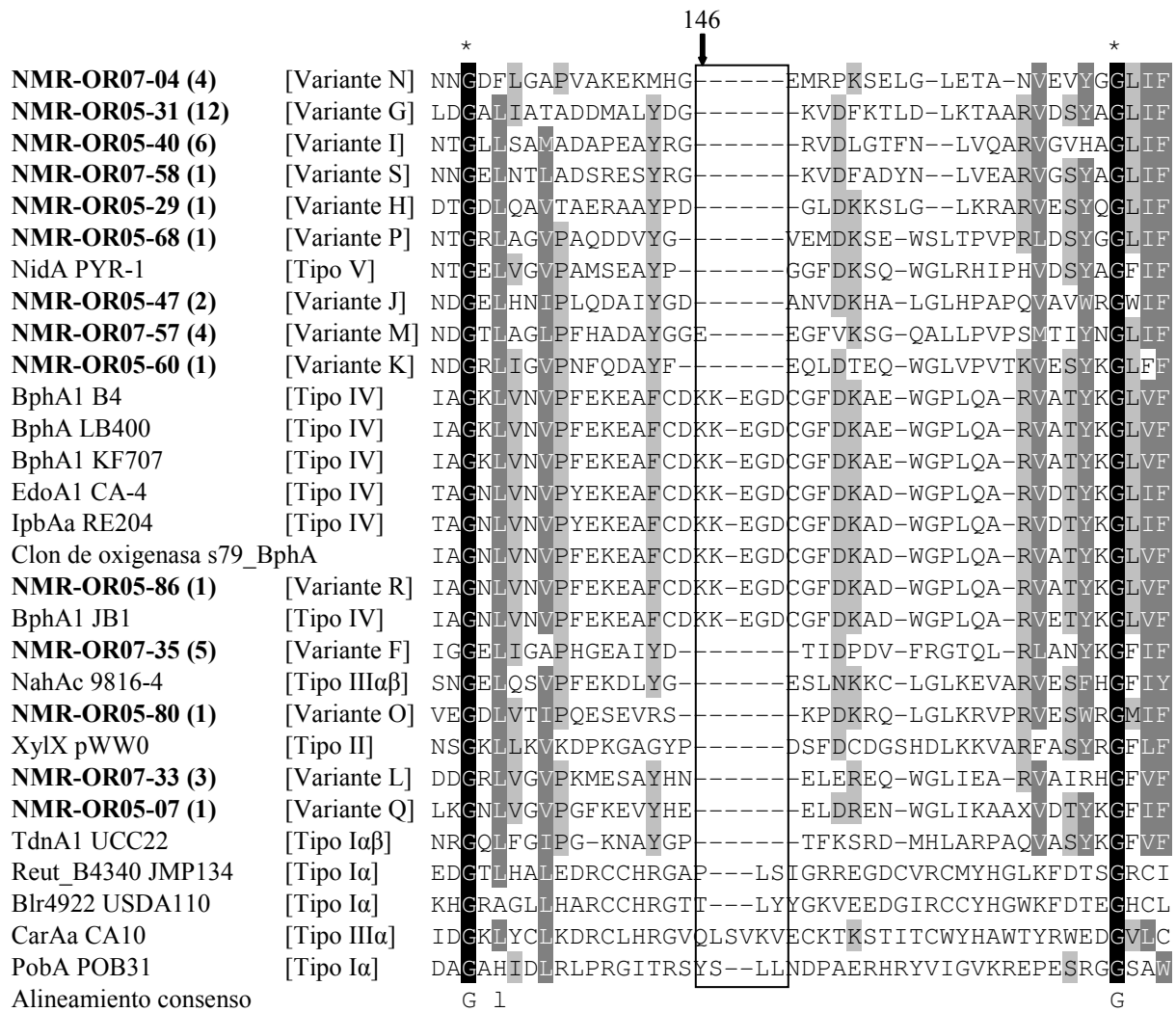


Figura 6.7. Alineamiento de secuencias de dioxigenasas mostrando el indel ubicado en la posición 146 (numeración correspondiente a la dioxigenasa BphA, de *Burkholderia xenovorans* LB400 [AAB63425]). Se muestran en la figura las secuencias pertenecientes a las bibliotecas de productos de amplificación que contienen el indel y un representante de cada una de las variantes que no lo contienen. Las secuencias de las bibliotecas de este estudio se encuentran resaltadas, y se indica entre paréntesis el número de clones representado por cada una de ellas. Los nombres de las variantes o tipos de enzimas se indican entre corchetes. Los nombres de las enzimas y las cepas correspondientes obtenidos de la base de datos de GenBank se indican en la figura, y los nombres completos de los microorganismos y las números de acceso se detallan en las Figuras 6.4, 6.5 y a continuación: PobA POB31: *Pseudomonas pseudoalcaligenes* POB31 (CAA55401)

Posteriormente a nuestro análisis basado en distancias recalculadas para clasificar las secuencias identificadas en sedimentos de Patagonia, el mismo grupo de investigación que propuso el nuevo sistema de clasificación desarrolló el programa bioinformático ClassRHO [Baek *et al.*, 2009], el cual utilizando una interface gráfica permite clasificar las secuencias de oxigenasas de un modo más rápido y menos laborioso. Como primer paso, el programa realiza un análisis de agrupamiento utilizando una matriz de distancia entre las secuencias de proteínas que se desea clasificar y estándares de enzimas oxigenasas ya clasificados. Luego, ClassRHO determina un valor umbral que se utiliza para separar el árbol filogenético en grupos de enzimas oxigenasas. Este valor umbral es optimizado de modo tal que se maximice la relación entre el número de oxigenasas estándar correctamente clasificadas y el número total de oxigenasas estándar utilizadas para el análisis. Finalmente, el programa asigna a las secuencias incógnitas la categoría que corresponde a la mayoría de las oxigenasas estándar que comparten el mismo grupo.

Las secuencias deducidas de aminoácidos de los fragmentos de genes detectados en los sedimentos subantárticos fueron analizadas con este programa, como un método para confirmar la clasificación obtenida mediante el análisis de las distancias entre secuencias y de la presencia de indeles. Además, nuestro objetivo era clasificar aquellas secuencias que no pudieron ser asignadas a ningún tipo de enzimas oxigenasas utilizando estos dos métodos. El programa ClassRHO confirmó la clasificación de las dioxigenasas de las variantes F-K, M, P, R y S obtenida previamente, aunque no pudo clasificar con certeza las dioxigenasas de la variante N, que habían sido asignadas a las enzimas tipo V debido a la presencia de un indel en la posición 321 (Tabla 6.4). Además, ClassRHO permitió clasificar a las secuencias de la variante O como enzimas oxigenasas del tipo III. Las dioxigenasas de las variantes L y Q aún no han podido ser clasificadas con ninguna de las herramientas utilizadas. Probablemente, la actualización del programa ClassRHO con la incorporación de nuevos estándares curados de oxigenasas permitirá en el futuro clasificar estos fragmentos de genes [Baek *et al.*, 2009].

Tabla 6.4. Clasificación de las secuencias deducidas de aminoácidos de las variantes de genes detectados en los sedimentos subantárticos

Variante	Método de clasificación		
	Distancias ^a	Indeles	ClassRHO
F	Tipo IV	-	Tipo IV
G	-	Tipo V	Tipo V
H	-	Tipo V	Tipo V
I	-	Tipo V	Tipo V
J	-	Tipo V	Tipo V
K	Tipo IV	-	Tipo IV
L	-	-	-
M	Tipo V	Tipo V	Tipo V
N	-	Tipo V	-
O	-	-	Tipo III
P	-	Tipo V	Tipo V
Q	-	-	-
R	Tipo IV	Tipo IV	Tipo IV
S	-	Tipo V	Tipo V

^a: corresponde al cálculo manual de distancias entre secuencias; -: variantes que no pudieron ser clasificadas utilizando ese método. Sombreado celeste: ClassRHO confirma la clasificación obtenida previamente mediante el cálculo manual de distancias entre secuencias o por la presencia de indeles. Sombreado rosado: variante cuya clasificación no pudo ser confirmada por el programa ClassRHO. Sombreado amarillo: variante que no había logrado ser clasificada utilizando los métodos manuales y posteriormente fue clasificada por ClassRHO. Sin sombreadar: secuencias que aún no pudieron ser clasificadas

6.3. DISCUSIÓN

Uno de los resultados observados en el capítulo anterior de esta Tesis fue que la abundancia de los genes de dioxigenasas blanco de nuestros estudios fue disminuyendo con el transcurso del tiempo en muestras de sedimentos subantárticos. Sin embargo, no se detectó un aumento en la abundancia de alguna variante de este gen en reemplazo de las variantes que fueron desapareciendo, dejando abierto el interrogante sobre cuáles son las poblaciones que podrían estar ocupando su lugar en la comunidad. Si bien la biodegradación de hidrocarburos en el medio ambiente marino ha estado principalmente asociada hasta el momento a bacterias Gram-negativas [Head *et al.*, 2006; Yakimov *et al.*, 2007], sería esperable encontrar bacterias Gram-positivas degradadoras de estos compuestos en la zona intermareal, ya que por las características de su pared celular estas bacterias están mejor adaptadas para resistir las condiciones ambientales altamente variables que caracterizan a estos ambientes [Zhuang *et al.*, 2003]. Por ejemplo, las Actinobacterias y Firmicutes se encuentran en altas proporciones en sedimentos costeros [Zinger *et al.*, 2011], y el análisis de la estructura de las comunidades microbianas de sedimentos intermareales de la costa Patagónica indicó que estas clases alcanzan abundancias de hasta el 9% de las secuencias. Por otra parte, microorganismos Gram-positivos han mostrado la capacidad para degradar HAPs de alto peso molecular [Kanaly y Harayama, 2010], los cuales han sido detectados en altas concentraciones en sedimentos del sitio OR. Por lo tanto, en este capítulo nos planteamos como objetivo la identificación en sedimentos subantárticos de biomarcadores funcionales relacionados evolutivamente con genes de dioxigenasas identificados a partir de aislamientos de bacterias Gram-positivas. La bacteria Gram-positiva degradadora de HAPs más ampliamente estudiada en el medio ambiente marino es *Nocardioides* sp. KP7, aislada de sedimentos marinos de Kuwait gracias a su capacidad de crecer en fenantreno a 42°C [Iwabuchi *et al.*, 1998]. Otros microorganismos Gram-positivos degradadores de naftaleno han sido aislados de sedimentos intermareales de ambientes tropicales, aunque sus genes catabólicos aún no han sido estudiados [Zhuang *et al.*, 2002; Zhuang *et al.*, 2003]. Sin embargo, las características ambientales de los sitios en donde se identificaron estos microorganismos son muy distintas a las bajas temperaturas de Bahía Ushuaia, con lo cual no contábamos con información previa que nos permitiera inferir qué bacterias Gram-positivas asociadas a la biodegradación de HAPs sería esperable encontrar en este ambiente marino subantártico. Por lo tanto, intentamos

diseñar cebadores con una alta cobertura utilizando la información disponible en las bases de datos.

Para el diseño de los cebadores realizamos alineamientos de genes que codifican la subunidad mayor de dioxigenasas de HAPs identificados en bacterias pertenecientes a los géneros *Rhodococcus*, *Mycobacterium* y *Norcardioides*. Interesantemente, ninguna de las secuencias recuperadas a partir de los sedimentos en bibliotecas de productos de amplificación se encontraba cercanamente relacionada a los genes utilizados para el diseño de los cebadores, sugiriendo que estos genes no se encontrarían en gran abundancia en los sedimentos. Sin embargo, una de las limitaciones del diseño de los cebadores es que depende de las secuencias del gen blanco previamente conocidas y que podrían representar sólo una parte de la diversidad de este gen en el ambiente [Wang y Qian, 2009]. Por lo tanto, es posible que dichos genes se encuentren en altas abundancias en los sedimentos, pero que la diversidad de los mismos no esté completamente representada en los cebadores diseñados, dificultándose su detección. A medida que nueva información sea incorporada en las bases de datos, a menudo a partir de la secuenciación de genomas y metagenomas, puede volverse necesario el rediseño de los cebadores.

Sólo el 36% de los 170 clones analizados contenían fragmentos de genes de dioxigenasas. Similares resultados fueron encontrados en otros pares de cebadores, en donde se observó un alto porcentaje de productos generados por la unión de los cebadores a sitios no específicos [Lozada *et al.*, 2008]. Si bien este es un grave problema en la cuantificación de genes por qPCR, en el caso de las bibliotecas de productos de amplificación estas secuencias simplemente no son tenidas en cuenta en el análisis. Es probable que la alta proporción de productos de amplificación inespecíficos haya sido en parte el resultado de la presencia de degeneraciones, y debido a un alto contenido GC en los cebadores por el alto contenido GC de estos genes. Otro factor que podría haber contribuido al alto porcentaje de productos inespecíficos en las amplificaciones es la utilización de temperaturas de alineado relativamente bajas, con el fin de favorecer la unión de los cebadores en presencia de bases mal apareadas [Dionisi *et al.*, 2011]. A pesar de las dificultades metodológicas encontradas, se pudieron detectar en dos muestras de sedimentos del sitio OR 14 variantes de genes de dioxigenasas novedosos, es decir, genes que resultaron divergentes de aquellos previamente descritos. Cuatro de estas variantes se encontraron presentes en ambas bibliotecas,

sugiriendo que las poblaciones que contienen estos genes podrían ser miembros relativamente estables y abundantes dentro de la comunidad de estos sedimentos.

Secuencias representativas de las 14 variantes de genes de dioxigenasas fueron comparadas con cuatro bases de datos a fin de inferir la posible función de las proteínas codificadas por estos genes. Estas bases utilizan distintos criterios para asignar una función a los productos de genes desconocidos. La herramienta BLAST encuentra regiones de similitud local entre secuencias y calcula la significancia estadística de esta correspondencia, al comparar la secuencia incógnita con la base de datos de GenBank. Esta herramienta permite inferir relaciones evolutivas o funcionales, y ayuda a identificar miembros de una familia de genes [McGinnis y Madden, 2004]. A pesar de que las secuencias depositadas en GenBank no son sometidas a un proceso manual de curado, esta base de datos cuenta con la ventaja de ser la más completa. La base de datos COG utiliza un algoritmo que permite buscar genes ortólogos, es decir, genes en distintas especies que se originaron a partir de un ancestro común [Tatusov *et al.*, 1997]. Cada “COG” constituye un grupo de al menos tres genes ortólogos identificados en genomas completos de distintos linajes y es manualmente validado. Se asume, por lo tanto, que estos genes provienen de un ancestro común y por ello tienen la misma función. Por otra parte, la base de datos KEGG es un recurso para interpretar funciones en los sistemas biológicos utilizando información genómica y molecular [Kanehisa *et al.*, 2006]. Para asignar una función al producto de un determinado gen, KEGG conecta un grupo de genes pertenecientes a un genoma con una red de moléculas que interactúan en las células y están asociadas a una función biológica determinada. Finalmente, GO tiene como finalidad unificar el vocabulario para describir las funciones de los genes y productos de genes de cualquier organismo [Ashburner *et al.*, 2000]. El fundamento de ello se basa en que el conocimiento de las funciones biológicas de proteínas de un determinado organismo puede ser transferido a otros organismos que compartan estas mismas proteínas. Las secuencias deducidas de aminoácidos de las 14 variantes de genes identificadas en este estudio mostraron bajos valores de E con enzimas dioxigenasas de las cuatro bases de datos, señalando que los alineamientos con estas enzimas son significativos y es poco probable que se hayan producido por azar. Sin embargo, no es posible inferir los posibles sustratos de estas enzimas, o si estos sustratos podrían ser HAPs, dado los bajos porcentajes de identidad de los fragmentos clonados con respecto a genes que codifican a las enzimas caracterizadas bioquímicamente. Actualmente, incrementar la cobertura y mejorar la exactitud en la asignación de funciones a

los productos de genes es mucho más importante que la generación de enormes volúmenes de datos en estudios metagenómicos, muchos de los cuales aún no pueden ser interpretados [Rentzsch y Orengo, 2009]. Para ello, es muy importante utilizar múltiples herramientas que se complementen y que permitan visualizar distintos aspectos de las secuencias, para así lograr la correcta predicción de la función de las secuencias de interés.

Las secuencias deducidas de aminoácidos de los genes de dioxigenasas detectados en este estudio fueron clasificadas utilizando un nuevo sistema propuesto por Kweon y colaboradores. La clasificación de enzimas oxigenasas ha sido una tarea compleja, principalmente debido a que muchas veces la información sobre la estructura y diversidad de estas enzimas se encuentra incompleta. Desde comienzos de los años 90 se han propuesto distintos sistemas de clasificación de enzimas dioxigenasas multicomponentes, basados en el número de componentes que presentan y la naturaleza de los centros redox [Batie *et al.*, 1991], el grado de homología en sus secuencias de aminoácidos, la cantidad de componentes del sistema enzimático multicomponente y el ordenamiento de los genes [Werlen *et al.*, 1996], o en el grado de homología entre secuencias de aminoácidos de la subunidad α de la oxigenasa terminal [Nam *et al.*, 2001]. Recientemente, Kweon y colaboradores propusieron un nuevo sistema de clasificación basado no sólo en información sobre las secuencias de aminoácidos, sino también en las interacciones que existen entre los distintos componentes de las enzimas, es decir con las ferredoxinas y reductasas [Kweon *et al.*, 2008]. Su principal ventaja es que permite clasificar oxigenasas desconocidas utilizando los valores de distancia entre las secuencias, aún cuando no se cuente con información sobre la cadena transportadora de electrones, o bien esta información sea incompleta. Sin embargo, este nuevo sistema no nos proporciona información sobre la especificidad de sustratos de las enzimas, y por lo tanto tampoco nos permite inferir qué compuestos serían capaces de degradar. Por otra parte, es posible que exista un desvío hacia la caracterización de poblaciones bacterianas degradadoras de hidrocarburos nativas del hemisferio norte [Yakimov *et al.*, 2007] dada la escasa representatividad de los ambientes del hemisferio sur, posiblemente limitando la caracterización de secuencias detectadas en estos sitios. Probablemente por estas razones sólo cuatro de las 14 variantes de dioxigenasas detectados en las bibliotecas NMR-OR05 y NMR-OR07 pudieron ser clasificados dentro de algún tipo de enzimas oxigenasas conocidas utilizando el sistema propuesto por Kweon y colaboradores [Kweon *et al.*, 2008]. Sin embargo, la inspección visual de las secuencias de aminoácidos de clones de estas dos

bibliotecas de productos de amplificación permitió detectar la presencia de una inserción/delección compartida por todas las secuencias de oxigenasas del tipo V, y que por lo tanto nos permitió clasificar siete variantes de dioxigenasas adicionales, dejando sólo tres de ellas sin clasificar, una de las cuales pudo ser posteriormente clasificada por el programa bioinformático ClassRHO. Posiblemente, la incorporación de nuevas secuencias de oxigenasas estándares al sistema de clasificación propuesto por Kweon [Baek *et al.*, 2009], así como también el crecimiento de las bases de datos en lo que respecta a genes que codifican rutas biodegradativas completas, permitan en un futuro completar la clasificación de todos los grupos de dioxigenasas detectados en este estudio.

En conjunto, las secuencias deducidas de los fragmentos identificados en los sedimentos de Bahía Ushuaia representan tres de los cinco tipos de enzimas oxigenasas existentes en la naturaleza. Las enzimas de tipo III están compuestas de una oxigenasa, ferredoxinas del tipo [2Fe-2S] y reductasas del tipo ferredoxina-NADP⁺ con el dominio [2Fe-2S] unido al extremo N terminal, e incluyen a las dioxigenasas de naftaleno y fenantreno de diversas proteobacterias, entre las cuales se encuentran los géneros *Pseudomonas*, *Cycloclasticus*, *Ralstonia*, *Sphingomonas*, *Alcaligenes* y *Burkholderia* [Kweon *et al.*, 2008]. Las enzimas tipo IV incluyen principalmente dioxigenasas de bifenilo y bifenilos policlorados de diversos géneros. Están compuestas por oxigenasas con subunidades α y β , ferredoxinas del tipo [2Fe-2S] y reductasas del tipo glutatión reductasa [Kweon *et al.*, 2008]. Por último, las enzimas tipo V se caracterizan por ser muy diversas en términos de especificidad de sustratos, presentan oxigenasas con subunidades α y β , ferredoxinas del tipo [3Fe-4S] y reductasas del tipo glutatión reductasa. Incluyen dioxigenasas características de bacterias Gram-positivas, principalmente actinobacterias, tales como la dioxigenasa de fenantreno/naftaleno/antraceno de la bacteria marina *Nocardioides* sp. KP7, las dioxigenasas de fenantreno y pireno de bacterias del género *Mycobacterium*, y dioxigenasas de ftalato de los géneros *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Terrabacter* y *Arthrobacter* [Kweon *et al.*, 2008]. Si bien como se mencionó anteriormente, el método de clasificación utilizado [Kweon *et al.*, 2008] no nos permite hacer inferencias sobre los sustratos de estas enzimas, la diversidad de genes detectados, junto a la posibilidad de que cada una de las enzimas que ellos codifican pueda utilizar múltiples sustratos [de Lorenzo, 2008], sugiere que este ambiente podría presentar un gran potencial metabólico para biodegradar diversos hidrocarburos aromáticos. La utilización de herramientas cuantitativas, como por ejemplo ensayos de qPCR que tengan como blanco los

genes de dioxigenasas F a S, sería el próximo paso para conocer la relevancia ecológica de las poblaciones bacterianas que portan estos genes y para detectar si alguna de estas poblaciones juega un rol fundamental en la biodegradación de HAPs de este medio ambiente marino subantártico.

Capítulo 7

DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

7.1. DISCUSIÓN GENERAL

La biodegradación de hidrocarburos en el medio ambiente marino es un proceso complejo en el que participan una diversidad de poblaciones de microorganismos, muchas de ellas aún desconocidas, que forman parte de comunidades microbianas compuestas por miles de microorganismos diferentes. El desconocimiento de los mecanismos que gobiernan la biodegradación de hidrocarburos en este medio ambiente limita el desarrollo e implementación de estrategias de biorremediación exitosas. Dichas estrategias, idealmente, deberían ser diseñadas basadas en principios científicos que permitan predecir el comportamiento de estas comunidades. Si bien han ocurrido derrames de importancia en la costa Patagónica y existen áreas con concentraciones de HAPs que se encuentran por encima de los límites recomendados para sedimentos marinos, en la Argentina aún no se han utilizado tecnologías de biorremediación para la recuperación de ambientes costeros contaminados con hidrocarburos. El futuro diseño e implementación de protocolos de biorremediación exitosos específicos para el ambiente costero de la Patagonia dependerá de que profundicemos nuestros conocimientos sobre la estructura y función de las comunidades microbianas de estos ambientes, y en particular sobre las poblaciones bacterianas claves para el proceso degradativo.

El objetivo general de esta Tesis fue descubrir cuáles son las poblaciones bacterianas ecológicamente más importantes para la biodegradación de HAPs en sedimentos costeros de

la Patagonia contaminados con hidrocarburos. Para ello se eligieron como sitios de estudio dos regiones de la costa patagónica con un alto grado de exposición a contaminación por hidrocarburos: Caleta Córdova (Chubut) y Bahía Ushuaia (Tierra del Fuego). Ambos sitios presentan diferentes historias y tipos de contaminación: mientras Bahía Ushuaia se encuentra crónicamente expuesta a contaminación con combustibles refinados, Caleta Córdova se encuentra principalmente impactada por la contaminación con petróleo crudo. Además, se eligió a Playa Fracasso (Chubut) como sitio no contaminado. A lo largo de esta Tesis se utilizaron distintas herramientas moleculares, basadas tanto en el análisis de marcadores filogenéticos (genes ARNr 16S bacterianos) como funcionales (genes de dioxigenasas de HAPs). Esto nos permitió tener un panorama más completo sobre las comunidades bacterianas de estos sedimentos, y en particular sobre las poblaciones bacterianas con potencialidad para degradar HAPs. Se analizaron muestras teniendo en cuenta una escala espacial regional, como así también una escala temporal, tratando de reflejar dentro de lo posible estas dos dimensiones de la información. A su vez, el marcador funcional seleccionado tuvo como blanco secuencias identificadas tanto a partir de bacterias Gram-negativas como Gram-positivas, métodos cualitativos como cuantitativos, y en todos los casos el punto de partida fue el diseño y optimización de los ensayos moleculares utilizados.

A fin de estudiar las poblaciones degradadoras de HAPs ecológicamente más relevantes de Bahía Ushuaia, se analizaron muestras de sedimentos intermareales del sitio OR obtenidas a lo largo de seis años de muestreo. El análisis de la abundancia de genes de dioxigenasas en esta escala temporal nos permitió agrupar a las variantes de estos genes en tres grupos: (i) variantes que fueron consistentemente abundantes en todas las muestras analizadas (genes B, C y D), (ii) variantes que fueron poco abundantes de forma constante en todas las muestras (genes *nahAc*), y (iii) variantes de genes cuyas abundancias disminuyeron en gran medida a lo largo de la serie temporal (genes *phnA1*, *phnAc* y A). En términos generales, se observó una importante disminución de la abundancia total de las variantes cuantificadas, con una diferencia de un orden de magnitud entre las primeras y las últimas muestras de la serie temporal. Este resultado fue sorprendente, dada la presencia de importantes concentraciones de HAPs en estas muestras. Una posible explicación de este fenómeno es que las poblaciones bacterianas que contienen estos genes estén siendo desplazadas por otras poblaciones microbianas degradadoras de HAPs que no fueron blanco de los ensayos de qPCR. La detección en el sitio OR de una gran diversidad de variantes de dioxigenasas principalmente asociadas a bacterias Gram-positivas sugiere que las poblaciones bacterianas que contienen

estos genes podrían estar reemplazando a las poblaciones que disminuyeron su abundancia. Aunque el grado de homología con secuencias de las bases de datos fue relativamente bajo, la mayoría de los productos de estos genes novedosos mostraron estar relacionados con enzimas identificadas en actinobacterias. De hecho, al analizar la estructura de la comunidad bacteriana de la muestra OR08 por pirosecuenciación del gen ARNr 16S se observó que las actinobacterias representaban casi el 9% de las secuencias totales en esta muestra. Inclusive, dentro de este grupo se detectaron géneros que tienen representantes conocidos por su capacidad de degradar hidrocarburos, tales como *Nocardioides* y *Aeromicrobium*. Los datos obtenidos por pirosecuenciación de la muestra OR08 también indican la presencia de *Pseudoalteromonas*, una bacteria Gram-negativa conocida por su capacidad para degradar HAPs, cuyos genes degradativos no han sido analizados en este estudio. Otra posible explicación para la disminución de la abundancia de las variantes analizadas es que estén ocurriendo otras interacciones entre miembros de la comunidad que estén afectando negativamente a las poblaciones degradadoras blanco de nuestro estudio. Estas poblaciones microbianas podrían estar compitiendo más eficientemente por los nutrientes disponibles, desplazando así a las poblaciones degradadoras cuantificadas. Por ejemplo, existe en este sitio una gran abundancia de microorganismos degradadores de alcanos [Guibert *et al.*, 2012], lo cual es observado a partir del análisis del marcador filogenético en la muestra OR08 (géneros *Oleispira* y *Sulfitobacter*). Finalmente, los cambios en el tipo y abundancia de HAPs podrían estar influyendo en la abundancia de las distintas variantes de genes de dioxigenasas. Una evidencia a favor de esta hipótesis se observó al realizar un análisis multivariado en donde se evaluó la relación entre variables ambientales y la abundancia de genes de dioxigenasas en el sitio OR. Este análisis arrojó como resultado que HAPs de dos y cuatro anillos, HAPs totales y la escala temporal fueron las variables ambientales que mejor correlacionaron con la abundancia de las distintas variantes de genes de dioxigenasas. El sitio OR, debido a las actividades de una planta de almacenamiento de combustibles, está constantemente expuesto a pequeños derrames de hidrocarburos. Como consecuencia, es esperable que la compleja red de microorganismos degradadores presentes en este ambiente responda a las variaciones en las concentraciones de distintos compuestos químicos con cambios en sus abundancias [de Lorenzo, 2008]. Por lo tanto, a pesar de la disminución observada en la abundancia relativa de genes de dioxigenasas de HAPs por qPCR, probablemente no hayan ocurrido una disminución de la capacidad degradativa de estos compuestos en el ambiente. La abundancia de las poblaciones bacterianas puede cambiar tanto en respuesta a factores ambientales

(temperaturas, salinidad, concentración de contaminantes) como biológicos (interacciones con otros organismos de la comunidad), y esta dinámica no necesariamente implica un cambio en la funcionalidad de la comunidad [Fernández *et al.*, 1999; Kent *et al.*, 2007]. En la actualidad se están llevando a cabo ensayos de exposición a hidrocarburos en el laboratorio, de manera de poder controlar en mayor medida las distintas variables que afectan el comportamiento de las comunidades microbianas.

En el marco del objetivo general planteado para esta Tesis, uno de los objetivos específicos fue estudiar la distribución biogeográfica a nivel regional de las variantes de genes de dioxigenasas de HAPs previamente detectadas en sedimentos intermareales de Patagonia, en particular de las variantes novedosas identificadas en sedimentos subantárticos. Si bien algunas variantes novedosas de genes de dioxigenasas de HAPs fueron abundantes y estables en la comunidad microbiana en sedimentos subantárticos, en sedimentos de la región norte-centro de Patagonia estos genes se encontraron en general en baja abundancia, si bien fueron detectados en este ambiente. Estos resultados permiten extender la distribución biogeográfica de estos genes a la eco-región marina de los Golfos Norpatagónicos [Spalding *et al.*, 2007]. Sin embargo, estos genes no parecerían estar jugando un rol importante en la biodegradación de HAPs en estas latitudes. De hecho, aún no es posible conocer con certeza cuáles son las poblaciones bacterianas que podrían estar desempeñando este rol en los sedimentos de la región norte-centro de Patagonia. Los resultados de pirosecuenciación sugieren que los géneros *Psychromonas* y *Vibrio* podrían estar participando del proceso de atenuación natural de los componentes del petróleo crudo en Caleta Córdova, convirtiéndolos en posibles candidatos a ser investigados con mayor profundidad en el futuro. Además, estudios recientes utilizando bibliotecas de productos de amplificación han identificado una nueva variante novedosa de genes de dioxigenasas, la cual fue detectada en bibliotecas construidas a partir de sedimentos de Caleta Córdova, Bahía Ushuaia, y experimentos en el laboratorio en donde sedimentos del sitio OR fueron expuestos a petróleo crudo. Dado la amplia distribución geográfica de las poblaciones microbianas que contienen estos genes y su respuesta positiva a la contaminación con petróleo crudo, estos microorganismos también serán sujetos a análisis cuantitativos.

Notablemente, las poblaciones degradadoras más abundantes detectadas en las dos regiones biogeográficas analizadas (norte-centro y sur de Patagonia) fueron completamente diferentes, tanto en lo que respecta a los resultados obtenidos a partir del análisis de

marcadores filogenéticos como funcionales (Figura 7.1). Sin embargo, es importante resaltar que los genes *phnA1*, identificados en la bacteria hidrocarbonoclástica obligada *Cycloclasticus* spp., fueron detectados en la mayoría de las muestras de las dos regiones biogeográficas analizadas. Más allá de los desvíos inherentes a las técnicas de pirosecuenciación y de qPCR, existe cierta coherencia entre los resultados obtenidos con respecto a este microorganismo utilizando ambas metodologías. La técnica de pirosecuenciación no detectó secuencias del género *Cycloclasticus* en las muestras CC08-2, PF08 y OR08, y coincidiendo con estos resultados los genes *phnA1* se encontraron por debajo del límite de cuantificación (CC08-2) o de detección (PF08 y OR08) de la técnica de qPCR en estas muestras. En cambio, en CC08-1 se detectaron aproximadamente 10^5 copias del gen *phnA1*/μg de ADN metagenómico utilizando qPCR. Este valor representó el 0,12% de la abundancia del gen ARNr 16S bacteriano. En el caso del análisis del gen ARNr 16S bacteriano por pirosecuenciación, el porcentaje de secuencias asignadas al género *Cycloclasticus* en esta muestra fue de 0,06%. En consecuencia, los valores de abundancia relativa entre ambos genes encontrados por las dos metodologías son muy cercanos. Aún se desconoce el número de copias de ambos genes por genoma en este género y por lo tanto no es posible utilizar esta información para corregir por los desvíos ocasionados por este motivo. Los genes *phnA1* se encontraron presentes en muestras de los distintos sitios analizados y expuestas a una variedad de condiciones ambientales (principalmente distintas temperaturas y distinto tipo y concentración de hidrocarburos), soportando la hipótesis de que este género tiene una amplia distribución biogeográfica y parece ser capaz de adaptarse a una variedad de nichos en el ambiente marino [Staley, 2010]. Además, su abundancia en los sedimentos se vio positivamente correlacionada con la concentración de fenantreno, HAPs de tres anillos y HAPs de bajo peso molecular, sugiriendo que bacterias del género *Cycloclasticus* podrían presentar un rol importante en la biodegradación de HAPs de bajo peso molecular en el ambiente costero de Patagonia.

Uno de los objetivos a mediano plazo que tiene esta línea de investigación es el desarrollo de herramientas moleculares que permitan estimar la capacidad degradativa del ambiente costero de Patagonia de forma rápida, precisa y reproducible. Existe gran interés en el desarrollo de estas herramientas, ya que serían de gran utilidad para mejorar el diseño, la implementación y la efectividad de los protocolos de biorremediación y además podrían reducir tanto el tiempo como los costos asociados con esta tecnología [Strategic Environmental Research and Development Program (SERDP), 2005]. La principal limitación

para el desarrollo de estas herramientas es el escaso conocimiento que aún existe sobre biomarcadores específicos de las actividades catabólicas de interés. Se han diseñado ensayos moleculares basados en la técnica de qPCR para cuantificar a las poblaciones microbianas involucradas en la biodegradación anaeróbica de solventes clorados en agua subterránea. Los mismos han sido evaluados en estudios a campo y se han desarrollado protocolos estandarizados para su aplicación en programas de biorremediación [Lebrón *et al.*, 2011]. En el caso de la biodegradación de hidrocarburos, sin embargo, estas herramientas se encuentran aún en una etapa mucho más temprana de desarrollo, ya que representa un sistema mucho más complejo debido a la diversidad de estructuras moleculares y de poblaciones microbianas involucradas.

En esta Tesis observamos que poblaciones bacterianas aún no identificadas que contienen variantes novedosas de genes de dioxigenasas, junto a una bacteria marina hidrocarbonoclástica obligada podrían estar desempeñando un rol importante en la biodegradación de HAPs en el ambiente marino costero de Patagonia. Asimismo, detectamos otros candidatos que podrían estar jugando un rol igualmente importante en la biodegradación de estos compuestos, si bien aún dichas poblaciones necesitan ser evaluadas en forma cuantitativa para establecer si constituyen miembros ecológicamente relevantes de las comunidades de los sedimentos. No sólo se observó en las comunidades microbianas de los sedimentos analizados alta redundancia funcional en el proceso catabólico, sino que además existieron variaciones importantes en las poblaciones con potencial degradativo tanto en el tiempo como en el espacio. Dicha variabilidad representa un desafío para el desarrollo de herramientas moleculares diagnósticas para la costa Patagónica. Esto es debido principalmente al bajo nivel de similitud de secuencias que presentan las distintas variantes de genes de dioxigenasas de HAPs, lo cual impide el diseño de ensayos de qPCR robustos, reproducibles y con una alta cobertura. En el estado del conocimiento actual en el tema, cualquier ensayo desarrollado subestimaría la capacidad degradativa del ambiente al no considerar biomarcadores de importancia. Otros estudios actualmente en marcha en el laboratorio intentan complementar el conocimiento obtenido en esta Tesis, mediante el estudio de la respuesta de comunidades microbianas de sitios con distintos niveles de contaminación a la exposición a hidrocarburos en ensayos de laboratorio, y mediante el estudio de las vías degradativas utilizadas por los microorganismos del sitio OR.

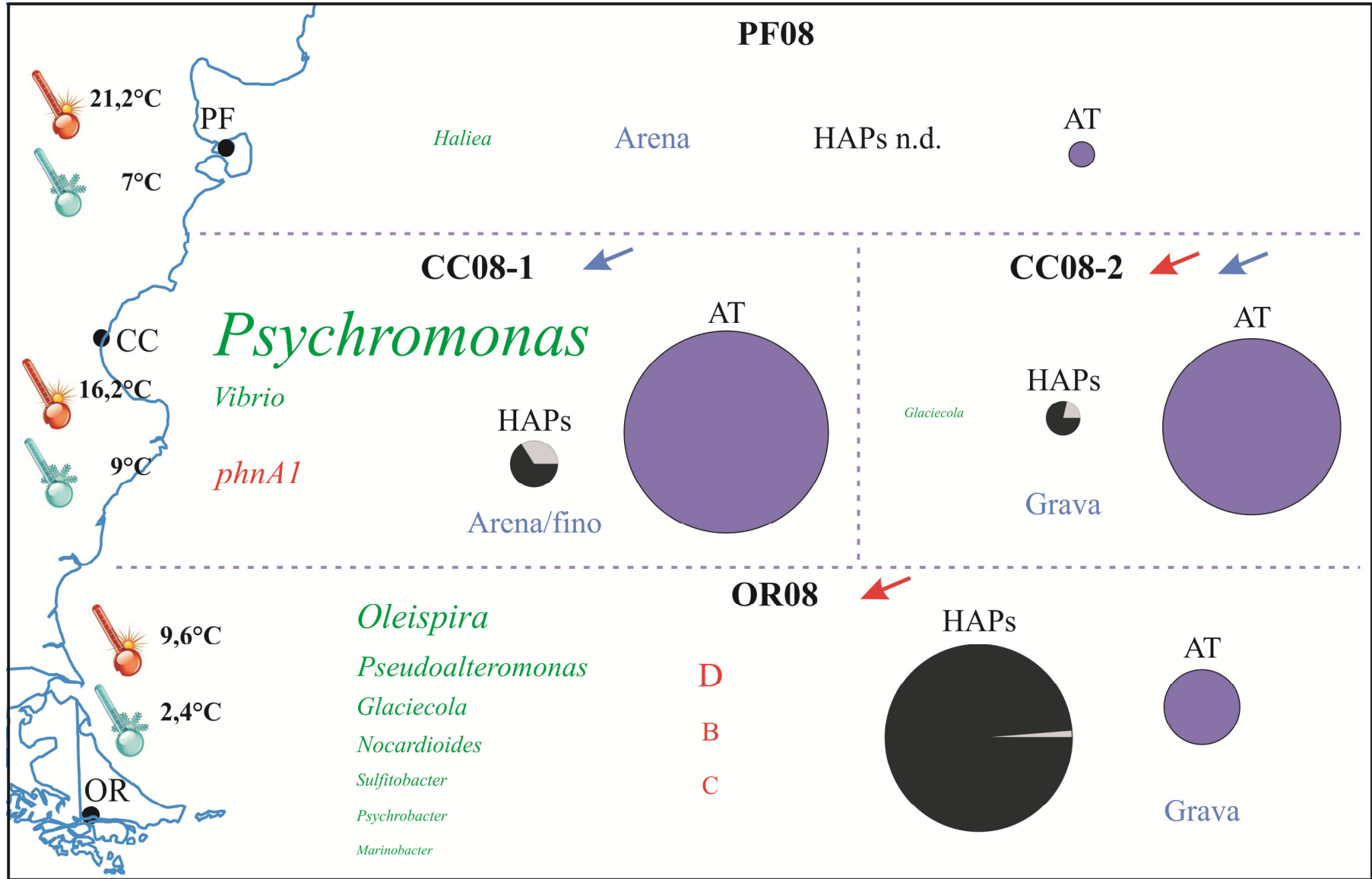


Figura 7.1 (Página anterior). Gráfico integrador de los principales resultados obtenidos en muestras de sedimentos de la zona norte-centro y sur de Patagonia. Se indican los sitios de muestreo, las temperaturas promedio en el mes más cálido y más frío del año, los géneros con representantes degradadores de hidrocarburos más abundantes (en color verde), los genes de dioxigenasas cuantificados (en color rojo), la granulometría de los sedimentos (en color azul), las concentraciones de HAPs y de hidrocarburos alifáticos totales (AT). Se incluyeron en la figura únicamente los géneros con representantes degradadores que se encontraban en abundancias superiores al 1% y sólo los genes de dioxigenasas que se encontraban por sobre el límite de cuantificación del ensayo. El tamaño de letra de los géneros degradadores y el tamaño de los gráficos de HAPs son proporcionales en escala lineal a la abundancia o concentración de los mismos en las muestras de sedimentos, mientras que los genes de dioxigenasas y los gráficos de AT son proporcionales en escala logarítmica a su abundancia o concentración en las muestras. El género *Psychromonas* en CC08-1 no se encuentra a escala, ya que por encontrarse en muy alta abundancia en esta muestra correspondería un tamaño de letra superior. En los gráficos de concentración de HAPs, el color gris representa a los HAPs de bajo peso molecular y el negro a los HAPs de alto peso molecular. n. d., no detectado. Las flechas azules y rojas al lado del nombre de las muestras contaminadas indican que los sedimentos están expuestos a contaminación con petróleo crudo o combustibles refinados, respectivamente

7.2. CONCLUSIONES

A continuación se detallan las principales conclusiones que se desprenden del análisis de los resultados obtenidos a lo largo de esta Tesis:

- ☞ La estructura y diversidad de las comunidades bacterianas que habitan los sedimentos intermareales representativos de dos regiones biogeográficas de la costa patagónica fueron analizadas por primera vez utilizando la secuenciación en gran escala de fragmentos del gen ARNr 16S. Los sedimentos estudiados presentaron una alta diversidad bacteriana y difirieron con respecto a su composición. Se observó una mayor abundancia de géneros bacterianos asociados a la biodegradación de HAPs en sedimentos contaminados. Entre ellos, se detectaron en alta abundancia géneros de bacterias asociadas a la biodegradación de hidrocarburos adaptadas a ambientes fríos.
- ☞ A partir de información obtenida previamente sobre genes de dioxigenasas de HAPs asociados a bacterias Gram-negativas identificados en sedimentos de la costa patagónica, se diseñaron y optimizaron ensayos de qPCR específicos para cuantificar, en forma independiente, ocho variantes de genes de dioxigenasas. Se diseñaron y optimizaron además, ensayos de PCR para detectar en los sedimentos genes de dioxigenasas relacionados con genes previamente identificados en bacterias Gram-positivas.

- ❧ Las poblaciones bacterianas que contienen las variantes novedosas de genes de dioxigenasas B, C y D fueron miembros relativamente estables de la comunidad microbiana de sedimentos de Bahía Ushuaia durante los seis años de estudio, y probablemente presenten un rol clave en la biodegradación de HAPs en este ambiente subantártico.
- ❧ Además, se detectaron en estos sedimentos subantárticos 14 variantes novedosas de genes de dioxigenasas de compuestos aromáticos que podrían estar relacionadas con bacterias Gram-positivas. Estos genes presentaron moderada identidad entre sí y con secuencias previamente descritas.
- ❧ Los análisis basados tanto en marcadores filogenéticos como funcionales en sedimentos subantárticos sugieren que este ambiente presentaría una alta redundancia funcional, que podría estar asociada a un alto potencial metabólico para biodegradar diversos HAPs. Los resultados sugieren además que aún existe una gran diversidad de poblaciones bacterianas degradadoras de estos compuestos por ser identificadas en este ambiente frío crónicamente contaminado.
- ❧ La bacteria marina hidrocarbonoclástica obligada *Cycloclasticus* spp. posiblemente esté jugando un rol importante en la biodegradación de HAPs de bajo peso molecular en los sedimentos de la costa patagónica.
- ❧ Las poblaciones bacterianas asociadas con la degradación de hidrocarburos fueron marcadamente diferentes en las muestras obtenidas en las dos regiones biogeográficas estudiadas, sugiriendo que la distribución de estos microorganismos sigue un patrón biogeográfico. Se observaron también variaciones en el tiempo, y en el espacio dentro de un mismo sitio. Estas diferencias deberán ser tomadas en cuenta para el diseño de herramientas moleculares de diagnóstico ambiental.

Referencias Bibliográficas

- Abed, R.M.M. 2009. Nucleic acid-based techniques for studying diversity and activity of bacterial communities in oil-contaminated sediments. En *The handbook of environmental chemistry*, ed. Kassim, T.A. y Barceló, D., págs. 97-160. Berlin Heidelberg: Springer - Verlag
- Al-Soud, W.A., Rådström, P. 2000. Effects of amplification facilitators on diagnostic PCR in the presence of blood, feces, and meat. *J Clin Microbiol.* 38: 4463-4470
- Alonso-Gutiérrez, J., Figueras, A., Albaigés, J., Jiménez, N., Viñas, M., *et al.* 2009. Bacterial communities from shoreline environments (Costa da Morte, Northwestern Spain) affected by the *Prestige* oil spill. *Appl Environ Microbiol.* 75: 3407-3418
- Alvarez, H.M., Mayer, F., Fabritius, D., Steinbüchel, A. 1996. Formation of intracytoplasmic lipid inclusions by *Rhodococcus opacus* strain PD630. *Arch Microbiol.* 165: 377-386
- Alvarez, P.J.J., Illman, W.A. 2006. *Bioremediation and natural attenuation: process fundamentals and mathematical models*. Hoboken, New Jersey: Wiley. 612 págs.
- Amin, O.A., Comoglio, L.I., Sericano, J.L. 2011. Polynuclear aromatic and chlorinated hydrocarbons in mussels from the coastal zone of Ushuaia, Tierra del Fuego, Argentina. *Environ Toxicol Chem.* 30: 521-529
- Amoroso, R.O., Gagliardini, D.A. 2010. Inferring complex hydrographic processes using remote-sensed images: turbulent fluxes in the Patagonian gulfs and implications for scallop metapopulation dynamics. *J Coastal Res.* 26: 320-332
- Ansorge, W.J. 2009. Next-generation DNA sequencing techniques. *N Biotechnol.* 25: 195-203
- Anyakora, C., Ogbeche, A., Palmer, P., Coker, H. 2005. Determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in marine samples of Siokolo Fishing Settlement. *J Chromatogr A.* 1073: 323-330
- Ashburner, M., Ball, C.A., Blake, J.A., Botstein, D., Butler, H., *et al.* 2000. Gene ontology: tool for the unification of biology. *Nat Genet.* 25: 25-29
- Austin, M.P., Orloci, L. 1966. Geometric models in ecology: II. An evaluation of some ordination techniques. *J Ecol.* 54: 217-227
- Baek, S., Kweon, O., Kim, S.-J., Baek, D.-H., Chen, J.J., Cerniglia, C.E. 2009. ClassRHO: a platform for classification of bacterial rieske non-heme iron ring-hydroxylating oxygenases. *J Microbiol Meth.* 76: 307-309

- Bala, L.O. 2008. Humedales, playeros e invertebrados. En Humedales costeros y aves playeras migratorias, ed. Bala, L.O., Hernández, M.A. y Musmeci, L.R., págs. 120. Puerto Madryn: CENPAT
- Baldwin, B.R., Nakatsu, C.H., Nies, L. 2008. Enumeration of aromatic oxygenase genes to evaluate monitored natural attenuation at gasoline-contaminated sites. *Water Res.* 42: 723-731
- Balestrini, C., Manzella, G., Lovrich, G. 1998. *Simulación de corrientes en el Canal Beagle y Bahía Ushuaia, mediante un modelo bidimensional*, Servicio de Hidrografía Naval, Armada Argentina
- Bamforth, S.M., Singleton, I. 2005. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. *J Chem Technol Biotechnol.* 80: 723-736
- Bancroft, B.A., Baker, N.J., Blaustein, A.R. 2007. Effects of UVB radiation on marine and freshwater organisms: a synthesis through meta-analysis. *Ecol Lett.* 10: 332-345
- Batie, C.J., Ballou, D.P., Correll, C.C. 1991. Phthalate dioxygenase reductase and related flavin-iron-sulfur containing electron transferases. En *Chemistry and biochemistry of flavoenzymes*, ed. Müller, F., págs. 543-556: CRC Press
- Bava, J. 2004. *Metodologías de procesamiento de imágenes NOAA-AVHRR y su utilización en aplicaciones oceanográficas y biológico-pesqueras en el Atlántico Sudoccidental*. Tesis de doctorado. Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina. 213 págs.
- Becker, S., Böger, P., Oehlmann, R., Ernst, A. 2000. PCR bias in ecological analysis: a case study for quantitative *Taq* nuclease assays in analyses of microbial communities. *Appl Environ Microbiol.* 66: 4945-4953
- Begon, M., Townsend, C.R., Harper, J.L. 2006. *Ecology. From individuals to ecosystems*: Blackwell Publishing. 752 págs.
- Benlahcen, K.T., Chaoui, A., Budzinski, H., Bellocq, J., Garrigues, P.H. 1997. Distribution and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in some Mediterranean coastal sediments. *Mar Pollut Bull.* 34: 298-305
- Biancalana, F., Barría de Cao, M.S., Hoffmeyer, M.S. 2007. Micro and mesozooplankton composition during winter in Ushuaia and Golondrina Bays (Beagle Channel, Argentina). *Braz J Oceanogr.* 55: 83-95
- Bloom, S.A. 1981. Similarity indices in community studies: potential pitfalls. *Mar Ecol Prog Ser* 5: 125-128

- Boehm, P.D., Requejo, A.G. 1986. Overview of the recent sediment hydrocarbon geochemistry of Atlantic and Gulf Coast outer continental shelf environments. *Estuar Coast Shelf S.* 23: 29-58
- Bosch, R., García-Valdés, E., Moore, E.R.B. 1999. Genetic characterization and evolutionary implications of a chromosomally encoded naphthalene-degradation upper pathway from *Pseudomonas stutzeri* AN10. *Gene.* 236: 149-157
- Bowman, J.P., McCammon, S.A., Brown, J.L., McMeekin, T.A. 1998. *Glaciecocola punicea* gen. nov., sp. nov. and *Glaciecocola pallidula* gen. nov., sp. nov.: psychrophilic bacteria from Antarctic sea-ice habitats. *Int J Syst Bacteriol.* 48: 1213-1222
- Brakstad, O.G., Bonaunet, K. 2006. Biodegradation of petroleum hydrocarbons in seawater at low temperatures (0-5 °C) and bacterial communities associated with degradation. *Biodegradation.* 17: 71-82
- Brakstad, O.G., Nonstad, I., Faksness, L.G., Brandvik, P.J. 2008. Responses of microbial communities in Arctic sea ice after contamination by crude petroleum oil. *Microb Ecol.* 55: 540-552
- Bray, J.R., Curtis, J.T. 1957. An ordination of the upland forest communities of southern Wisconsin. *Ecol Monogr.* 27: 325-349
- Burke, C., Steinberg, P., Rusch, D., Kjelleberg, S., Thomas, T. 2011. Bacterial community assembly based on functional genes rather than species. *P Natl Acad Sci USA.* 108: 14288-14293
- Bustin, S.A. 2004. Quantification of nucleic acids by PCR. En *A-Z of quantitative PCR*, ed. Bustin, S.A., págs. 5-46. La Jolla, California: IUL Biotechnology Series
- Bustin, S.A., Nolan, T. 2004a. Chemistries. En *A-Z of quantitative PCR*, ed. Bustin, S.A., págs. 217-278. La Jolla, California: IUL Biotechnology Series
- Bustin, S.A., Nolan, T. 2004b. The PCR step. En *A-Z of quantitative PCR*, ed. Bustin, S.A., págs. 399-434. La Jolla, California: IUL Biotechnology Series
- Bustin, S.A., Nolan, T. 2004c. Primers and probes. En *A-Z of quantitative PCR*, ed. Bustin, S.A., págs. 279-328. La Jolla, California: IUL Biotechnology Series
- Campagna, C., Verona, C., Falabella, V. 2006. Situación ambiental en la ecorregión del mar Argentino. En *La situación ambiental Argentina 2005*, ed. Brown, A., Martínez Ortiz, U., Acerbi, M. y Corcuera, J., págs. 323-337. Buenos Aires: Fundación Vida Silvestre Argentina

- Cardenas, E., Tiedje, J.M. 2008. New tools for discovering and characterizing microbial diversity. *Curr Opin Biotechnol.* 19: 544-549
- Cébron, A., Norini, M.-P., 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. *J Microbiol Methods.* 73: 148-159
- Cerniglia, C.E. 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation.* 3: 351-368
- Chakraborty, R., Wu, C.H., Hazen, T.C. 2012. Systems biology approach to bioremediation. *Curr Opin Biotechnol.* 23: 483-490
- Chakravorty, S., Helb, D., Buday, M., Connell, N., Alland, D. 2007. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *J Microbiol Meth.* 69: 330-339
- Chao, A. 1984. Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scand J Statist.* 11: 265-270
- Chao, A., Lee, S.-M. 1992. Estimating the number of classes via sample coverage. *J Am Stat Assoc.* 87: 210-217
- Chazdon, R.L., Colwell, R.K., Denslow, J.S., Guariguata, M.R. 1998. Statistical methods for estimating species richness of woody regeneration in primary and secondary rain forests of Northeastern Costa Rica. En *Forest biodiversity research, monitoring and modeling: conceptual background and old World case studies*, ed. Dallmeier, F. y Comiskey, J.A., págs. 285-309. Carnforth, Lancashire, UK: UNESCO and The Parthenon Publishing Group
- Clarck Jr., R.C., Finley, J.S. 1973. *Techniques for analysis of paraffin hydrocarbons and for interpretation of data to assess oil spill effects in aquatic organisms*. Proceedings of Joint Conference on prevention and control of oil spills, Washington, DC
- Clarke, K.R. 1993. Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Australian Journal of Ecology.* 18: 117-143
- Clarke, K.R., Ainsworth, M. 1993. A method of linking multivariate community structure to environmental variables. *Mar Ecol Prog Ser* 92: 205-219
- Clarke, K.R., Gorley, R.N. 2006. *PRIMER v6: User Manual/Tutorial*, PRIMER-E, Plymouth
- Coates, J.D. 2004. Anaerobic biodegradation of hydrocarbons. En *Biodegradation and bioremediation*, ed. Singh, A. y Ward, O.P., págs. 57-81. Berlin Heidelberg: Springer

- Colombo, J.C., Pelletier, E., Brochu, C., Khalil, M., Catoggio, J.A. 1989. Determination of hydrocarbon sources using n-alkane and polyaromatic hydrocarbon distribution indexes. Case study: Río de la Plata Estuary, Argentina. *Environ Sci Technol.* 23: 888-894
- Colwell, R.K. 2006. *EstimateS 8.0 User's guide*, Department of Ecology & Evolutionary Biology, University of Connecticut, Storrs, Connecticut
- Commendatore, M.G., Esteves, J.L. 2004. Natural and anthropogenic hydrocarbons in sediments from the Chubut River (Patagonia, Argentina). *Mar Pollut Bull.* 48: 910-918
- Commendatore, M.G., Esteves, J.L. 2007. An assessment of oil pollution in the coastal zone of Patagonia, Argentina. *Environ Manage.* 40: 814-821
- Commendatore, M.G., Estéves, J.L., Colombo, J.C. 2000. Hydrocarbons in coastal sediments of Patagonia, Argentina: levels and probable sources. *Mar Pollut Bull.* 40: 989-998
- Commendatore, M.G., Nievas, M.L., Amin, O., Esteves, J.L. 2012. Sources and distribution of aliphatic and polyaromatic hydrocarbons in coastal sediments from the Ushuaia Bay (Tierra del Fuego, Patagonia, Argentina). *Mar Environ Res.* 74: 20-31
- Connell, J.H. 1978. Diveristy in tropical rain forests and coral reefs. *Science.* 199: 1302-1310
- Connon, S.A., Giovannoni, S.J. 2002. High-throughput methods for culturing microorganisms in very-low-nutrient media yield diverse new marine isolates. *Appl Environ Microbiol.* 68: 3878-3885
- Correll, R.L. 2001. The use of composite sampling in contaminated sites - a case study. *Environ Ecol Stat.* 8: 185-200
- Coulon, F., McKew, B.A., Osborn, A.M., McGenity, T.J., Timmis, K.N. 2007. Effects of temperature and biostimulation on oil-degrading microbial communities in temperate estuarine waters. *Environ Microbiol.* 9: 177-186
- Cowan, D.A., Khan, N., Heath, C., Mutondo, M. 2009. Microbiology of Antarctic terrestrial soils and rocks. En *Polar microbiology: the ecology, biodiversity and bioremediation potential of microorganisms in extremely cold environments*, ed. Bej, A.K., Aislabie, J. y Atlas, R.M., págs. 1-29. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press
- Cui, Z., Lai, Q., Dong, C., Shao, Z. 2008. Biodiversity of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from deep sea sediments of the Middle Atlantic Ridge. *Environ Microbiol.* 10: 2138-2149

- da Silva, M.L.B., Alvarez, P.J.J. 2010. Bioaugmentation. En *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*, ed. Timmis, K.N., págs. 4531-4544. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag
- de la Cruz, F., Davies, J. 2000. Horizontal gene transfer and the origin of species: lessons from bacteria. *Trends Microbiol.* 8: 128-133
- de Lorenzo, V. 2008. Systems biology approaches to bioremediation. *Curr Opin Biotechnol.* 19: 579-589
- Dean, J.R. 1998. *Extraction methods for environmental analysis*. New York, USA: Wiley. 240 págs.
- Debruyne, J.M., Chewning, C.S., Sayler, G.S. 2007. Comparative quantitative prevalence of *Mycobacteria* and functionally abundant *nidA*, *nahAc*, and *nagAc* dioxygenase genes in coal tar contaminated sediments. *Environ Sci Technol.* 41: 5426-5432
- Decho, A.W. 2000. Microbial biofilms in intertidal systems: an overview. *Cont Shelf Res.* 20: 1257-1273
- Dell'Anno, A., Mei, M.L., Pusceddu, A., Danovaro, R. 2002. Assessing the trophic state and eutrophication of coastal marine systems: a new approach based on the biochemical composition of sediment organic matter. *Mar Pollut Bull.* 44: 611-622
- Denome, S.A., Stanley, D.C., Olson, E.S., Young, K.D. 1993. Metabolism of dibenzothiophene and naphthalene in *Pseudomonas* strains: complete DNA sequence of an upper naphthalene catabolic pathway. *J Bacteriol.* 175: 6890-6901
- Deppe, U., Richnow, H.-H., Michaelis, W., Antranikian, G. 2005. Degradation of crude oil by an arctic microbial consortium. *Extremophiles.* 9: 461-470
- Ding, G.-C., Heuer, H., Zühlke, S., Spiteller, M., Pronk, G.J., *et al.* 2010. Soil type-dependent responses to phenanthrene as revealed by determining the diversity and abundance of polycyclic aromatic hydrocarbon ring-hydroxylating dioxygenase genes by using a novel PCR detection system. *Appl Environ Microbiol.* 76: 4765-4771
- Dionisi, H.M., Chewning, C.S., Morgan, K.H., Menn, F.-M., Easter, J.P., Sayler, G.S. 2004. Abundance of dioxygenase genes similar to *Ralstonia* sp. strain U2 *nagAc* is correlated with naphthalene concentrations in coal tar-contaminated freshwater sediments. *Appl Environ Microbiol.* 70: 3988-3995
- Dionisi, H.M., Harms, G., Layton, A.C., Gregory, I.R., Parker, J., *et al.* 2003. Power analysis for real-time PCR quantification of genes in activated sludge and analysis of the variability introduced by DNA extraction. *Appl Environ Microbiol.* 69: 6597-6604

- Dionisi, H.M., Lozada, M., Marcos, M.S., Di Marzio, W.D., Loviso, C.L. 2011. Aromatic hydrocarbon degradation genes from chronically polluted subantarctic marine sediments. En *Handbook of molecular microbial ecology. Volume II: Metagenomics in different habitats*, ed. de Bruijn, F.J., págs. 461-473: Wiley-Blackwell
- Dionisi, H.M., Lozada, M., Olivera, N.L. 2012. Bioprospection of marine microorganisms: biotechnological applications and methods. *Rev Argent Microbiol.* 44: 49-60
- dos Santos, H.F., Cury, J.C., do Carmo, F.L., dos Santos, A.L., Tiedje, J., *et al.* 2011. Mangrove bacterial diversity and the impact of oil contamination revealed by pyrosequencing: bacterial proxies for oil pollution. *PLoS One.* 6: e16943
- Dunn, O.J. 1964. Multiple comparisons using rank sums. *Technometrics.* 6: 241-252
- Duran, R. 2010. *Marinobacter*. En *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*, ed. Timmis, K.N., págs. 1725-1735. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag
- Edwards, K.J., Logan, J.M.J. 2009. Performing real-time PCR. En *Real-time PCR: current technology and applications*, ed. Logan, J., Edwards, K. y Saunders, N., págs. 85-93. Norfolk, UK: Caister Academic Press
- Elshahed, M.S., Youssef, N.H., Spain, A.M., Sheik, C., Najar, F.Z., *et al.* 2008. Novelty and uniqueness patterns of rare members of the soil biosphere. *Appl Environ Microbiol.* 74: 5422-5428
- Engelbrekton, A., Kunin, V., Wrighton, K.C., Zvenigorodsky, N., Chen, F., *et al.* 2010. Experimental factors affecting PCR-based estimates of microbial species richness and evenness. *ISME J.* 4: 642-647
- Ensley, B.D., Gibson, D.T., Laborde, A.L. 1982. Oxidation of naphthalene by a multicomponent enzyme system from *Pseudomonas* sp. strain NCIB 9816. *J Bacteriol.* 149: 948-954
- Esteves, J.L., Amín, O. 2004. *Evaluación de la contaminación urbana de las bahías de Ushuaia, Encerrada y Golondrina*, GEF/PNUD/WCS/FPN
- Esteves, J.L., Commendatore, M.G., Nievas, M.L., Massara Paletto, V., Amín, O. 2006. Hydrocarbon pollution in coastal sediments of Tierra del Fuego Islands, Patagonia Argentina. *Mar Pollut Bull.* 52: 582-590
- Evans, F.F., Egan, S., Kjelleberg, S. 2008. Ecology of type II secretion in marine gammaproteobacteria. *Environ Microbiol.* 10: 1101-1107

- Exner, M.M., Lewinski, M.A. 2002. Sensitivity of multiplex real-time PCR reactions, using the LightCycler and the ABI PRISM 7700 sequence detection system, is dependent on the concentration of the DNA polymerase. *Mol Cell Probe*. 16: 351-357
- Farnham, I.M., Singh, A.K., Stetzenbach, K.J., Johannesson, K.H. 2002. Treatment of nondetects in multivariate analysis of groundwater geochemistry data. *Chemometr Intell Lab*. 60: 265-281
- Favenneec, J.-P., Pigeyre, A. 2001. Refining: a technical summary. Investments, margins, costs, probable future developments. En *Petroleum refining. Refinery, operation and management*, ed. Favenneec, J.-P., págs. 117-170. Paris: Institut Français du Pétrole Publications
- Fernández, A., Huang, S., Seston, S., Xing, J., Hickey, R., *et al.* 1999. How stable is stable? Function versus community composition. *Appl Environ Microbiol*. 65: 3697-3704
- Fernández, M., Carreto, J.I., Mora, J., Roux, A. 2005. Physico-chemical characterization of the benthic environment of the Golfo San Jorge, Argentina. *J Mar Biol Ass UK*. 85: 1317-1328
- Ferraro, D.J., Gakhar, L., Ramaswamy, S. 2005. Rieske business: structure-function of Rieske non-heme oxygenases. *Biochem Biophys Res Commun*. 338: 175-190
- Ferrero, M., Llobet-Brossa, E., Lalucat, J., García-Valdés, E., Rosselló-Mora, R., Bosch, R. 2002. Coexistence of two distinct copies of naphthalene degradation genes in *Pseudomonas* strains isolated from the western Mediterranean region. *Appl Environ Microbiol*. 68: 957-962
- Ferris, M.J., Muyzer, G., Ward, D.M. 1996. Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community. *Appl Environ Microbiol*. 62: 340-346
- Field, D., Garrity, G., Gray, T., Morrison, N., Selengut, J., *et al.* 2008. The minimum information about a genome sequence (MIGS) specification. *Nat Biotechnol*. 26: 541-547
- Fingas, M. 2011a. Introduction to oil chemistry and properties. En *Oil spill science and technology*, ed. Fingas, M., págs. 51-59: Gulf Professional Publishing
- Fingas, M. 2011b. Physical spill countermeasures. En *Oil spill science and technology*, ed. Fingas, M., págs. 303-337: Gulf Professional Publishing
- Fingas, M. 2011c. Spill-treating agents. En *Oil spill science and technology*, ed. Fingas, M., págs. 429-433: Gulf Professional Publishing

- Forney, L.J., Zhou, X., Brown, C.J. 2004. Molecular microbial ecology: land of the one-eyed king. *Curr Opin Microbiol.* 7: 210-220
- Foro para la conservación del mar Patagónico y áreas de influencia. 2008. *Síntesis del estado de conservación del Mar Patagónico y áreas de influencia*. Puerto Madryn: Fundación Patagonia Natural. 336 págs.
- Fuhrman, J.A. 2009. Microbial community structure and its functional implications. *Nature.* 459: 193-199
- Fuhrman, J.A., Hagström, Å. 2008. Bacterial and archaeal community structure and its patterns. En *Microbial ecology of the oceans*, ed. Kirchman, D.L., págs. 45-90. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons.
- Fundación Patagonia Natural. 1999. *Prevención de la contaminación costera y gestión de la diversidad biológica marina*, Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable. Dirección de Recursos Ictícolas y Acuícolas
- Furusawa, Y., Nagarajan, V., Tanokura, M., Masai, E., Fukuda, M., Senda, T. 2004. Crystal structure of the terminal oxygenase component of biphenyl dioxygenase derived from *Rhodococcus* sp. strain RHA1. *J Mol Biol* 342: 1041-1052
- Galand, P.E., Casamayor, E.O., Kirchman, D.L., Lovejoy, C. 2009. Ecology of the rare microbial biosphere of the Arctic Ocean. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106: 22427-22432
- Galvão, T.C., Mohn, W.W., de Lorenzo, V. 2005. Exploring the microbial biodegradation and biotransformation gene pool. *Trends Biotechnol.* 23: 497-506
- Gibson, D.T., Parales, R.E. 2000. Aromatic hydrocarbon dioxygenases in environmental biotechnology. *Curr Opin Biotechnol.* 11: 236-243
- Giegerich, R., Meyer, F., Schleiermacher, C. 1996. GeneFisher - software support for the detection of postulated genes. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol.* 4: 68-77
- Gil, M.N., Torres, A.I., Amin, O., Esteves, J.L. 2011. Assessment of recent sediment influence in an urban polluted subantarctic coastal ecosystem. Beagle Channel (Southern Argentina). *Mar Pollut Bull.* 62: 201-207
- Ginzinger, D.G. 2002. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Exp Hematol.* 30: 503-512
- Golyshin, P.N., Ferrer, M., Chernikova, T.N., Golyshina, O.V., Yakimov, M.M. 2010. *Oleispira*. En *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*, ed. Timmis, K.N., págs. 1755-1763. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag

- Gomes, N.C.M., Borges, L.R., Paranhos, R., Pinto, F.N., Krögerrecklenfort, E., *et al.* 2007. Diversity of *ndo* genes in mangrove sediments exposed to different sources of polycyclic aromatic hydrocarbon pollution. *Appl Environ Microbiol.* 73: 7392-7399
- Gontang, E.A., Fenical, W., Jensen, P.R. 2007. Phylogenetic diversity of Gram-positive bacteria cultured from marine sediments. *Appl Environ Microbiol.* 73: 3272-3282
- Good, I.J. 1953. The population frequencies of species and the estimation of population parameters. *Biometrika.* 40: 237-264
- Gray, J.S., Elliott, M. 2009. *Ecology of marine sediments. From science to management.* New York: Oxford University Press
- Grundmann, H., Hori, S., Tanner, G. 2001. Determining confidence intervals when measuring genetic diversity and the discriminatory abilities of typing methods for microorganisms. *J Clin Microbiol.* 39: 4190-4192
- Guerrero, E., Svendsen, G., Pisoni, J.P., Williams, G. 2008a. *Resultados de la campaña de investigación oceanográfica Golfos NORPAT 3/2008 (Febrero de 2008), en los Golfos San Matías y San José,* Instituto de biología marina y pesquera Almirante Storni, San Antonio Oeste, Argentina
- Guerrero, E., Svendsen, G., Pisoni, J.P., Williams, G. 2008b. *Resultados de la campaña de investigación oceanográfica Golfos NORPAT 4/2008 (Junio de 2008), en los Golfos San Matías y San José,* Instituto de biología marina y pesquera Almirante Storni, San Antonio Oeste, Argentina
- Guibert, L.M., Loviso, C.L., Marcos, M.S., Commendatore, M.G., Dionisi, H.M., Lozada, M. 2012. Alkane biodegradation genes from chronically polluted Subantarctic coastal sediments and their shifts in response to oil exposure. *Microb Ecol.* DOI 10.1007/s00248-012-0051-9
- Gundlach, E.R., Hayes, M.O. 1978. Vulnerability of coastal environments to oil spill impacts. *Mar Technol Soc J.* 12: 18-27
- Gundry, C.N., Poulson, M.D. 2011. Obtaining maximum PCR sensitivity and specificity. En *PCR troubleshooting and optimization. The essential guide,* ed. Kennedy, S. y Oswald, N., págs. 79-96. Norfolk, UK: Caister Academic Press
- Gupta, R.S. 1998. Protein phylogenies and signature sequences: a reappraisal of evolutionary relationships among Archaeobacteria, Eubacteria, and Eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62: 1435-1491
- Haas, B.J., Gevers, D., Earl, A.M., Feldgarden, M., Ward, D.V., *et al.* 2011. Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons. *Genome Res.* 21: 494-504

- Habe, H., Omori, T. 2003. Genetics of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in diverse aerobic bacteria. *Biosci Biotechnol Biochem.* 67: 225-243
- Harayama, S., Kasai, Y., Hara, A. 2004. Microbial communities in oil-contaminated seawater. *Curr Opin Biotechnol.* 15: 205-214
- Harms, G., Layton, A.C., Dionisi, H.M., Gregory, I.R., Garrett, V.M., *et al.* 2003. Real-time PCR quantification of nitrifying bacteria in a municipal wastewater treatment plant. *Environ Sci Technol.* 37: 343-351
- Harrington, E.D., Singh, A.H., Doerks, T., Letunic, I., von Mering, C., *et al.* 2007. Quantitative assessment of protein function prediction from metagenomics shotgun sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104: 13913-13918
- Harris, K.A., Yunker, M.B., Dangerfield, N., Ross, P.S. 2011. Sediment-associated aliphatic and aromatic hydrocarbons in coastal British Columbia, Canada: concentrations, composition, and associated risks to protected sea otters. *Environ Pollut.* 159: 2665-2674
- Hayes, M.O., Hoff, R., Michel, J., Scholz, D., Shigenaka, G. 1992. *An introduction to coastal habitats and biological resources for oil spill response*, Hazardous materials response and assessment division, National oceanic and atmospheric administration, Seattle
- Head, I.M., Jones, D.M., Röling, W.F.M. 2006. Marine microorganisms make a meal of oil. *Nat Rev Microbiol.* 4: 173-182
- Hedlund, B.P., Staley, J.T. 2001. *Vibrio cyclotrophicus* sp. nov., a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading marine bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol.* 51: 61-66
- Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., Williams, P.M. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 6: 986-994
- Hernández, M.A. 2006. *Ecología trófica del playero rojizo (Calidris canutus rufa), el playero de rabadilla blanca (Calidris fuscicollis) y el playero blanco (Calidris alba) en Península Valdés*. Tesis de doctorado. Universidad Nacional del Comahue, Bariloche, Argentina. 111 págs.
- Hernández, M.A., Bala, L.O. 2007. Prey selection and foraging patterns of the white-rumped sandpiper (*Calidris fuscicollis*) at Península Valdés, Patagonia, Argentina. *Ornitol Neotrop.* 18: 37-46
- Hernández, M.A., Bala, L.O., Musmeci, L.R. 2008. Dieta de tres especies de aves playeras migratorias en Península Valdés, Patagonia Argentina. *Ornitol Neotrop.* 19 (Suppl.): 605-611

- Hill, T.C.J., Walsh, K.A., Harris, J.A., Moffett, B.F. 2003. Using ecological diversity measures with bacterial communities. *FEMS Microbiol Ecol.* 43: 1-11
- Hong, S.-H., Bunge, J., Jeon, S.-O., Epstein, S.S. 2006. Predicting microbial species richness. *Proc Natl Acad Sci USA.* 103: 117-122
- Horner-Devine, M.C., Carney, K.M., Bohannon, B.J.M. 2004. An ecological perspective on bacterial biodiversity. *Proc R Soc Lond B.* 271: 113-122
- Huse, S.M., Welch, D.M., Morrison, H.G., Sogin, M.L. 2010. Ironing out the wrinkles in the rare biosphere through improved OTU clustering. *Environ Microbiol.* 12: 1889-1898
- Innis, M.A., Gelfand, D.H. 1990. Optimization of PCRs. En *PCR protocols: a guide to methods and applications*, ed. Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. y White, T.J., págs. 3-12. Academic Press
- Ishii, K., Fukui, M. 2001. Optimization of annealing temperature to reduce bias caused by a primer mismatch in multitemplate PCR. *Appl Environ Microbiol.* 67: 3753-3755
- Ivanova, E.P., Flavier, S., Christen, R. 2004. Phylogenetic relationships among marine *Alteromonas*-like proteobacteria: emended description of the family *Alteromonadaceae* and proposal of *Pseudoalteromonadaceae* fam. nov., *Colwelliaceae* fam. nov., *Shewanellaceae* fam. nov., *Moritellaceae* fam. nov., *Ferrimonadaceae* fam. nov., *Idiomarinaceae* fam. nov. and *Psychromonadaceae* fam. nov. *Int J Syst Evol Micr.* 54: 1773-1788
- Iwabuchi, T., Inomata-Yamauchi, Y., Katsuta, A., Harayama, S. 1998. Isolation and characterization of marine *Nocardioides* capable of growing and degrading phenanthrene at 42°C. *J Mar Biotechnol.* 6: 86-90
- Iwai, S., Johnson, T.A., Chai, B., Hashsham, S.A., Tiedje, J.M. 2011. Comparison of the specificities and efficacies of primers for aromatic dioxygenase gene analysis of environmental samples. *Appl Environ Microbiol.* 77: 3551-3557
- Jaksic, F., Marone, L. 2007. *Ecología de comunidades*. Santiago: Ediciones Universidad Católica de Chile. 336 págs.
- Jensen, P.R., Dwight, R., Fenical, W. 1991. Distribution of actinomycetes in near-shore tropical marine sediments. *Appl Environ Microbiol.* 57: 1102-1108
- Jensen, P.R., Fenical, W. 1996. Marine bacterial diversity as a resource for novel microbial products. *J Ind Microbiol Biot.* 17: 346-351

- Jiménez, J.I., Nogales, J., García, J.L., Díaz, E. 2010. A genomic view of the catabolism of aromatic compounds in *Pseudomonas*. En *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*, ed. Timmis, K.N., págs. 1297-1325. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag
- Johnsen, A.R., Karlson, U. 2007. Diffuse PAH contamination of surface soils: environmental occurrence, bioavailability, and microbial degradation. *Appl Microbiol Biotechnol.* 76: 533-543
- Johnsen, A.R., Schmidt, S., Hybholt, T.K., Henriksen, S., Jacobsen, C.S., Andersen, O. 2007. Strong impact on the polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading community of a PAH-polluted soil but marginal effect on PAH degradation when priming with bioremediated soil dominated by mycobacteria. *Appl Environ Microbiol.* 73: 1474-1480
- Junca, H., Pieper, D.H. 2010. Functional marker gene assays for hydrocarbon degrading microbial communities: aerobic. En *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*, ed. Timmis, K.N., págs. 4289-4312. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag
- Junier, P., Molina, V., Dorador, C., Hadas, O., Kim, O.-S., *et al.* 2010. Phylogenetic and functional marker genes to study ammonia-oxidizing microorganisms (AOM) in the environment. *Appl Microbiol Biotechnol.* 85: 425-440
- Kanagawa, T. 2003. Bias and artifacts in multitemplate polymerase chain reactions (PCR). *J Biosci Bioeng.* 96: 317-323
- Kanaly, R.A., Harayama, S. 2010. Advances in the field of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation by bacteria. *Microb Biotechnol.* 3: 136-164
- Kanehisa, M., Goto, S., Hattori, M., Aoki-Kinoshita, K.F., Itoh, M., *et al.* 2006. From genomics to chemical genomics: new developments in KEGG. *Nucleic Acids Res.* 34: 354-357
- Kasai, Y., Kishira, H., Harayama, S. 2002. Bacteria belonging to the genus *Cycloclasticus* play a primary role in the degradation of aromatic hydrocarbons released in a marine environment. *Appl Environ Microbiol.* 68: 5625-5633
- Kasai, Y., Shindo, K., Harayama, S., Misawa, N. 2003. Molecular characterization and substrate preference of a polycyclic aromatic hydrocarbon dioxygenase from *Cycloclasticus* sp. strain A5. *Appl Environ Microbiol.* 69: 6688-6697
- Kauppi, B., Lee, K., Carredano, E., Parales, R.E., Gibson, D.T., *et al.* 1998. Structure of an aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase-naphthalene 1,2-dioxygenase. *Structure.* 6: 571-586

- Kavanagh, I., Jones, G., Nayab, S.N. 2011. Significance of controls and standard curves in PCR. En *PCR troubleshooting and optimization. The essential guide*, ed. Kennedy, S. y Oswald, N., págs. 67-78. Norfolk, UK: Caister Academic Press
- Kemp, W.M., Sampou, P., Caffrey, J., Mayer, M., Henriksen, K., Boynton, W.R. 1990. Ammonium recycling versus denitrification in Chesapeake Bay sediments. *Limnol Oceanogr.* 35: 1545-1563
- Kent, A.D., Yannarell, A.C., Rusak, J.A., Triplett, E.W., McMahon, K.D. 2007. Synchrony in aquatic microbial community dynamics. *ISME J.* 1: 38-47
- Kiyohara, H., Nagao, K., Kouno, K., Yano, K. 1982. Phenanthrene-degrading phenotype of *Alcaligenes faecalis* AFK2. *Appl Environ Microbiol.* 43: 458-461
- Kleinstuber, S., Riis, V., Fetzer, I., Harms, H., Müller, S. 2006. Population dynamics within a microbial consortium during growth on diesel fuel in saline environments. *Appl Environ Microbiol.* 72: 3531-3542
- Konopka, A. 2009. What is microbial community ecology? *ISME J.* 3: 1223-1230
- Kostka, J.E., Prakash, O., Overholt, W.A., Green, S.J., Freyer, G., *et al.* 2011. Hydrocarbon-degrading bacteria and the bacterial community response in Gulf of Mexico beach sands impacted by the Deepwater Horizon oil spill. *Appl Environ Microbiol.* 77: 7962-7974
- Krebs, C.J. 1999. *Ecological methodology*. Menlo Park, California: Benjamin Cummings. 620 págs.
- Krishnamurthy, N., Vallinayagam, P., Madhavan, D. 2007. *Engineering chemistry*. New Delhi: Rajkamal Electric Press. 276 págs.
- Kruskal, W.H., Wallis, W.A. 1952. Use of ranks in one-criterion variance analysis. *J Am Stat Assoc.* 47: 583-621
- Kurata, S., Kanagawa, T., Magariyama, Y., Takatsu, K., Yamada, K., *et al.* 2004. Reevaluation and reduction of a PCR bias caused by reannealing of templates. *Appl Environ Microbiol.* 70: 7545-7549
- Kvenvolden, K.A., Cooper, C.K. 2003. Natural seepage of crude oil into the marine environment. *Geo-Mar Lett.* 23: 140-146
- Kweon, O., Kim, S.-J., Baek, S., Chae, J.-C., Adjei, M.D., *et al.* 2008. A new classification system for bacterial Rieske non-heme iron aromatic ring-hydroxylating oxygenases. *BMC Biochem.* 9: 11

- Lane, D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. En *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, ed. Stackebrandt, E. y Goodfellow, M., págs. 115-148: John Wiley & Sons
- Lanfranconi, M.P., Alvarez, H.M., Studdert, C.A. 2003. A strain isolated from gas oil-contaminated soil displays chemotaxis towards gas oil and hexadecane. *Environ Microbiol.* 5: 1002-1008
- Latimer, J.S., Zheng, J. 2003. The sources, transport, and fate of PAHs in the marine environment. En *PAHs: an ecotoxicological perspective*, ed. Douben, P.E.T., págs. 9-33. Bedford, UK: Wiley
- Lau, S.C.K., Liu, W.-T. 2007. Recent advances in molecular techniques for the detection of phylogenetic markers and functional genes in microbial communities. *FEMS Microbiol Lett.* 275: 183-190
- Laurie, A.D., Lloyd-Jones, G. 2000. Quantification of *phnAc* and *nahAc* in contaminated New Zealand soils by competitive PCR. *Appl Environ Microbiol.* 66: 1814-1817
- Layton, A.C., Dionisi, H., Kuo, H.-W., Robinson, K.G., Garrett, V.M., *et al.* 2005. Emergence of competitive dominant ammonia-oxidizing bacterial populations in a full-scale industrial wastewater treatment plant. *Appl Environ Microbiol.* 71: 1105-1108
- Lebrón, C.A., Petrovskis, E., Löffler, F., Henn, K. 2011. *Application of nucleic acid-based tools for monitoring monitored natural attenuation (MNA), biostimulation and bioaugmentation at chlorinated solvent sites*, Naval Facilities Engineering Command (NAVFAC), Port Hueneme, California
- Leys, N.M., Ryngaert, A., Bastiaens, L., Wattiau, P., Top, E.M., *et al.* 2005. Occurrence and community composition of fast-growing *Mycobacterium* in soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiol Ecol.* 51: 375-388
- Little, A.E.F., Robinson, C.J., Peterson, S.B., Raffa, K.F., Handelsman, J. 2008. Rules of engagement: interspecies interactions that regulate microbial communities. *Annu Rev Microbiol.* 62: 375-401
- Lohrer, A.M., Thrush, S.F., Hewitt, J.E., Berkenbusch, K., Ahrens, M., Cummings, V.J. 2004. Terrestrially derived sediment: response of marine macrobenthic communities to thin terrigenous deposits. *Mar Ecol Prog Ser.* 273: 121-138
- Lozada, M., Riva Mercadal, J.P., Guerrero, L.D., Di Marzio, W.D., Ferrero, M.A., Dionisi, H.M. 2008. Novel aromatic ring-hydroxylating dioxygenase genes from coastal marine sediments of Patagonia. *BMC Microbiol.* 8: 50

- Lueders, T., Friedrich, M.W. 2003. Evaluation of PCR amplification bias by terminal restriction fragment length polymorphism analysis of small-subunit rRNA and *mcrA* genes by using defined template mixtures of methanogenic pure cultures and soil DNA extracts. *Appl Environ Microbiol.* 69: 320-326
- Luna, G.M., Dell'Anno, A., Danovaro, R. 2006. DNA extraction procedure: a critical issue for bacterial diversity assessment in marine sediments. *Environ Microbiol.* 8: 308-320
- Ma, Y., Wang, L., Shao, Z. 2006. *Pseudomonas*, the dominant polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from Antarctic soils and the role of large plasmids in horizontal gene transfer. *Environ Microbiol.* 8: 455-465
- Maarit Niemi, R., Heiskanen, I., Wallenius, K., Lindström, K. 2001. Extraction and purification of DNA in rhizosphere soil samples for PCR-DGGE analysis of bacterial consortia. *J Microbiol Meth.* 45: 155-165
- Mackay, I.M., Arden, K.E., Nitsche, A. 2002. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res.* 30: 1292-1305
- Madueño, L., Coppotelli, B.M., Álvarez, H.M., Morelli, I.S. 2011. Isolation and characterization of indigenous soil bacteria for bioaugmentation of PAH contaminated soil of semiarid Patagonia, Argentina. *Int Biodeter Biodegr.* 65: 345-351
- Magurran, A.E. 2004. *Measuring biological diversity*. Malden, Massachusetts, USA: Blackwell Science Ltd. 256 págs.
- Malik, S., Beer, M., Megharaj, M., Naidu, R. 2008. The use of molecular techniques to characterize the microbial communities in contaminated soil and water. *Environ Int.* 34: 265-276
- Mao, F., Leung, W.Y., Xin, X. 2007. Characterization of EvaGreen and the implication of its physicochemical properties for qPCR applications. *BMC Biotechnol.* 7: 76
- Marcos, M.S., Lozada, M., Di Marzio, W.D., Dionisi, H.M. 2012. Abundance, dynamics, and biogeographic distribution of seven polycyclic aromatic hydrocarbon dioxygenase gene variants in coastal sediments of Patagonia. *Appl Environ Microbiol.* 78: 1589-1592
- Marcos, M.S., Lozada, M., Dionisi, H.M. 2009. Aromatic hydrocarbon degradation genes from chronically polluted Subantarctic marine sediments. *Lett Appl Microbiol.* 49: 602-608
- Mardis, E.R. 2008a. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends Genet.* 24: 133-141

- Mardis, E.R. 2008b. Next-generation DNA sequencing methods. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 9: 387-402
- Margulies, M., Egholm, M., Altman, W.E., Attiya, S., Bader, J.S., *et al.* 2005. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature.* 437: 376-380
- Maruyama, A., Ishiwata, H., Kitamura, K., Sunamura, M., Fujita, T., *et al.* 2003. Dynamics of microbial populations and strong selection for *Cycloclasticus pugetii* following the Nakhodka oil spill. *Microb Ecol.* 46: 442-453
- Mathieu-Daudé, F., Welsh, J., Vogt, T., McClelland, M. 1996. DNA rehybridization during PCR: the 'C₀t effect' and its consequences. *Nucleic Acids Res.* 24: 2080-2086
- McGinnis, S., Madden, T.L. 2004. BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 32: W20-W25
- McKew, B.A., Coulon, F., Osborn, A.M., Timmis, K.N., McGenlty, T.J. 2007. Determining the identity and roles of oil-metabolizing marine bacteria from the Thames estuary, UK. *Environ Microbiol.* 9: 165-176
- McMahon, K.D., Garcia Martin, H., Hugenholtz, P. 2007. Integrating ecology into biotechnology. *Curr Opin Biotechnol.* 18: 287-292
- Metzker, M.L. 2010. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet.* 11: 31-46
- Miloslavich, P., Klein, E., Díaz, J.M., Hernández, C.E., Bigatti, G., *et al.* 2011. Marine biodiversity in the Atlantic and Pacific coasts of South America: knowledge and gaps. *PLoS One.* 6: e14631
- Morán, A.C., Olivera, N.L., Commendatore, M., Esteves, J.L., Siñeriz, F. 2000. Enhancement of hydrocarbon waste biodegradation by addition of a biosurfactant from *Bacillus subtilis* O9. *Biodegradation.* 11: 65-71
- Morin, P.J. 2011. *Community ecology.* Wiley-Blackwell. 424 págs.
- Mou, X., Sun, S., Edwards, R.A., Hodson, R.E., Moran, M.A. 2008. Bacterial carbon processing by generalist species in the coastal ocean. *Nature.* 451: 708-711
- Mountfort, D.O., Rainey, F.A., Burghardt, J., Kaspar, H.F., Stackebrandt, E. 1998. *Psychromonas antarcticus* gen. nov., sp. nov., a new aerotolerant anaerobic, halophilic psychrophile isolated from pond sediment of the McMurdo ice shelf, Antarctica. *Arch Microbiol.* 169: 231-238

- Musat, N., Werner, U., Knittel, K., Kolb, S., Dodenhof, T., *et al.* 2006. Microbial community structure of sandy intertidal sediments in the North Sea, Sylt-Rømø Basin, Wadden Sea. *Syst Appl Microbiol.* 29: 333-348
- Nam, J.-W., Nojiri, H., Yoshida, T., Habe, H., Yamane, H., Omori, T. 2001. New classification system for oxygenase components involved in ring-hydroxylating oxygenations. *Biosci Biotechnol Biochem.* 65: 254-263
- National Research Council of the National Academies. 2003. *Oil in the sea III: inputs, fates, and effects*, Washington, D.C.
- Niepceron, M., Portet-Koltalo, F., Merlin, C., Motelay-Massei, A., Barray, S., Bodilis, J. 2010. Both *Cycloclasticus* spp. and *Pseudomonas* spp. as PAH-degrading bacteria in the Seine estuary (France). *FEMS Microbiol Ecol.* 71: 137-147
- Nievas, M.L., Commendatore, M.G., Esteves, J.L., Bucalá, V. 2008. Biodegradation pattern of hydrocarbons from a fuel oil-type complex residue by an emulsifier-producing microbial consortium. *J Hazard Mater.* 154: 96-104
- Nievas, M.L., Commendatore, M.G., Estéves, J.L., Bucalá, V. 2005. Effect of pH modification on bilge waste biodegradation by a native microbial community. *Int Biodeter Biodegr.* 56: 151-157
- Nievas, M.L., Commendatore, M.G., Olivera, N.L., Esteves, J.L., Bucalá, V. 2006. Biodegradation of bilge waste from Patagonia with an indigenous microbial community. *Bioresour Technol.* 97: 2280-2290
- Nievas, M.L., Esteves, J.L. 2007. *Relevamiento de actividades relacionadas con la explotación de petróleo en zona costera patagónica y datos preliminares sobre residuos de hidrocarburos en puertos*, Fundación Patagonia Natural, Puerto Madryn
- Nikolaou, A., Kostopoulou, M., Lofrano, G., Meric, S. 2009. Determination of PAHs in marine sediments: analytical methods and environmental concerns. *Global NEST Journal.* 11: 391-405
- Nolan, T., Hands, R.E., Ogunkolade, W., Bustin, S.A. 2006. SPUD: a quantitative PCR assay for the detection of inhibitors in nucleic acid preparations. *Anal Biochem.* 351: 308-310
- Nyysönen, M., Piskonen, R., Itävaara, M. 2006. A targeted real-time PCR assay for studying naphthalene degradation in the environment. *Microb Ecol.* 52: 533-543
- O'Sullivan, A.J., Jacques, T.G. 2001. *Impact reference system - effects of oil in the marine environment: impact of hydrocarbons on fauna and flora*, European Commission, Bruselas

- Ogata, H., Goto, S., Sato, K., Fujibuchi, W., Bono, H., Kanehisa, M. 1999. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res.* 27: 29-34
- Olivera, N.L., Commendatore, M.G., Delgado, O., Esteves, J.L. 2003. Microbial characterization and hydrocarbon biodegradation potential of natural bilge waste microflora. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 30: 542-548
- Olivera, N.L., Commendatore, M.G., Morán, A.C., Estéves, J.L. 2000. Biosurfactant-enhanced degradation of residual hydrocarbons from ship bilge wastes. *J Ind Microbiol Biot.* 25: 70-73
- Olivera, N.L., Nievas, M.L., Lozada, M., del Prado, G., Dionisi, H.M., Sineriz, F. 2009. Isolation and characterization of biosurfactant-producing *Alcanivorax* strains: hydrocarbon accession strategies and alkane hydroxylase gene analysis. *Res Microbiol.* 160: 19-26
- Orengo, C. 2003. Sequence comparison methods. En *Bioinformatics. Genes, proteins & computers*, ed. Orengo, C.A., Jones, D.T. y Thornton, J.M., págs. 29-48. Oxon, UK: BIOS Scientific Publishers
- Ornitz, B.E., Champ, M.A. 2002. *Oil spills first principles: prevention & best response*. Kidlington, UK: Elsevier Science. 653 págs.
- Ortega-Morales, B.O., Chan-Bacab, M.J., De la Rosa-García, S.C., Camacho-Chab, J.C. 2010a. Valuable processes and products from marine intertidal microbial communities. *Curr Opin Biotechnol.* 21: 346-352
- Palatinszky, M., Nikolausz, M., Sváb, D., Márialigeti, K. 2011. Preferential ligation during TA-cloning of multitemplate PCR products - A factor causing bias in microbial community structure analysis. *J Microbiol Methods.* 85: 131-136
- Parales, R.E., Resnick, S.M. 2004. Aromatic hydrocarbon dioxygenases. En *Biodegradation and bioremediation*, ed. Singh, A. y Ward, O.P., págs. 175-195. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag
- Parales, R.E., Resnick, S.M. 2006. Aromatic ring hydroxylating dioxygenases. En *Pseudomonas*, ed. Ramos, J.L. y Levesque, R.C. Nueva York, USA: Springer
- Park, J.W., Crowley, D.E. 2006. Dynamic changes in *nahAc* gene copy numbers during degradation of naphthalene in PAH-contaminated soils. *Appl Microbiol Biotechnol.* 72: 1322-1329
- Parsley, L.C., Wu, C., Mead, D., Goodman, R.M., Mark, R.L. 2011. Soil microbial DNA purification strategies for multiple metagenomic applications. En *Handbook of molecular microbial ecology II: metagenomics in different habitats*, ed. de Bruijn, F.J. Hoboken, New Jersey: Wiley-Blackwell

- Patil, G.P. 2002. Composite sampling. En *Encyclopedia of environmetrics*, ed. El-Shaarawi, A.H. y Piegorisch, W.W., págs. 387-391. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd.
- Peng, R.-H., Xiong, A.-S., Xue, Y., Fu, X.-Y., Gao, F., *et al.* 2008. Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiol Rev.* 32: 927-955
- Perelo, L.W. 2010. Review: in situ and bioremediation of organic pollutants in aquatic sediments. *J Hazard Mater.* 177: 81-89
- Peressutti, S.R., Alvarez, H.M., Pucci, O.H. 2003. Dynamics of hydrocarbon-degrading bacteriocenosis of an experimental oil pollution in Patagonian soil. *Int Biodeter Biodegr.* 52: 21-30
- Pérez-Pantoja, D., González, B., Pieper, D.H. 2010. Aerobic degradation of aromatic hydrocarbons. En *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*, ed. Timmis, K.N., págs. 799-837. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag
- Pesce, K. 2008. *Molecular analysis of phenanthrene degradation by Comamonas testosteroni GZ38 and Acidovorax sp. GZ39*. Tesis de doctorado. The State University of New Jersey, New Brunswick, New Jersey, USA. 140 págs.
- Peterson, C.H., Rice, S.D., Short, J.W., Esler, D., Bodkin, J.L., *et al.* 2003. Long-term ecosystem response to the Exxon Valdez oil spill. *Science.* 302: 2082-2086
- Petrosino, J.F., Highlander, S., Luna, R.A., Gibbs, R.A., Versalovic, J. 2009. Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. *Clin Chem.* 55: 856-866
- Pfaffl, M.W. 2004. Quantification strategies in real-time PCR. En *A-Z of quantitative PCR*, ed. Bustin, S.A., págs. 89-120. La Jolla, California: IUL Biotechnology Series
- Philp, J.C., Bamforth, S.M., Singleton, I., Atlas, R.M. 2005. Environmental pollution and restoration: a role for bioremediation. En *Bioremediation: applied microbial solutions for real-world environmental cleanup*, ed. Atlas, R.M. y Philp, J., págs. 1-48. Washington, D.C.: ASM Press
- Polymenakou, P.N., Lampadariou, N., Mandalakis, M., Tselepides, A. 2009. Phylogenetic diversity of sediment bacteria from the southern Cretan margin, Eastern Mediterranean Sea. *Syst Appl Microbiol.* 32: 17-26
- Polz, M.F., Cavanaugh, C.M. 1998. Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR. *Appl Environ Microbiol.* 64: 3724-3730
- Prabakaran, S.R., Manorama, R., Delille, D., Shivaji, S. 2007. Predominance of *Roseobacter*, *Sulfitobacter*, *Glaciecola* and *Psychrobacter* in seawater collected off Ushuaia, Argentina, Sub-Antarctica. *FEMS Microbiol Ecol.* 59: 342-355

- Prefectura Naval Argentina. 1998. *Designación de zonas de protección especial en el litoral Argentino. Ordenanza N° 12/98 (DPMA). Tomo 6: Régimen para la protección del medio ambiente*, Prefectura Naval Argentina, Buenos Aires
- Prefectura Naval Argentina. 2007. *Trabajamos para la preservación del ambiente acuático*. En *BIP 115*, págs. 4-5. Prefectura Naval Argentina, Buenos Aires
- Prince, R., Atlas, R.M. 2005. Bioremediation of marine oil spills. En *Bioremediation: Applied microbial solutions for real-world environmental cleanup*, ed. Atlas, R.M. y Philp, J., págs. 269-292. Washington, D.C.: ASM Press
- Prosser, J.I. 2002. Molecular and functional diversity in soil micro-organisms. *Plant Soil*. 244: 9-17
- Prosser, J.I., Bohannan, B.J.M., Curtis, T.P., Ellis, R.J., Firestone, M.K., *et al.* 2007. The role of ecological theory in microbial ecology. *Nat Rev Microbiol*. 5: 384-392
- Pruesse, E., Quast, C., Knittel, K., Fuchs, B.M., Ludwig, W., *et al.* 2007. SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Res*. 35: 7188-7196
- Pucci, G., Tiedemann, M.C., Acuña, A., Pucci, O. 2011. Change in bacterial diversity after oil spill in Argentina. En *The importance of biological interactions in the study of biodiversity*, ed. López-Pujol, J. Rijeka, Croacia: InTech
- Pucci, G.N., Acuña, A.J., Llanes, M.L., Tiedemann, M.C., Pucci, O.H. 2009. Identificación de bacterias marinas cultivables de la ciudad costera Comodoro Rivadavia, Argentina. *Rev Biol Mar Oceanog*. 44: 49-58
- Rådström, P., Knutsson, R., Wolffs, P., Lövenklev, M., Löfström, C. 2004. Pre-PCR processing. Strategies to generate PCR-compatible samples. *Mol Biotechnol*. 26: 133-146
- Raes, J., Bork, P. 2008. Molecular eco-systems biology: towards an understanding of community function. *Nat Rev Microbiol*. 6: 693-699
- Rainey, F.A., Ward, N., Sly, L.I., Stackebrandt, E. 1994. Dependence on the taxon composition of clone libraries for PCR amplified, naturally occurring 16S rDNA, on the primer pair and the cloning system used. *Experientia*. 50: 796-797
- Rajendhran, J., Gunasekaran, P. 2011. Microbial phylogeny and diversity: small subunit ribosomal RNA sequence analysis and beyond. *Microbiol Res*. 166: 99-110

- Rechimont, M.E. 2011. *Patrón de distribución y abundancia de invertebrados bentónicos en costas del Golfo Nuevo*. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco (UNPSJB), Puerto Madryn. 69 págs.
- Rentzsch, R., Orengo, C.A. 2009. Protein function prediction - the power of multiplicity. *Trends Biotechnol.* 27: 210-219
- Reysenbach, A.-L., Giver, L.J., Wickham, G.S., Pace, N.R. 1992. Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol.* 58: 3417-3418
- Røberg, S., Østerhus, J.I., Landfald, B. 2011. Dynamics of bacterial community exposed to hydrocarbons and oleophilic fertilizer in high-Arctic intertidal beach. *Polar Biol.* 34: 1455-1465
- Rittmann, B.E., Hausner, M., Löffler, F., Love, N.G., Muyzer, G., *et al.* 2006. A vista for microbial ecology and environmental biotechnology. *Environ Sci Technol.* 40: 1096-1103
- Rockne, K.J., Chee-Sanford, J.C., Sanford, R.A., Hedlund, B.P., Staley, J.T., Strand, S.E. 2000. Anaerobic naphthalene degradation by microbial pure cultures under nitrate-reducing conditions. *Appl Environ Microbiol.* 66: 1595-1601
- Rojo, F. 2009. Degradation of alkanes by bacteria. *Environ Microbiol.* 11: 2477-2490
- Ronaghi, M. 2001. Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome Res.* 11: 3-11
- Rosselló-Mora, R., Amann, R. 2001. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev.* 25: 39-67
- Rothberg, J.M., Leamon, J.H. 2008. The development and impact of 454 sequencing. *Nat Biotechnol.* 26: 1117-1124
- Rozzi, R., Massardo, F., Mansilla, A., Anderson, C.B., Berghöfer, A., *et al.* 2007. La Reserva de Biosfera Cabo de Hornos: un desafío para la conservación de la biodiversidad e implementación del desarrollo sustentable en el extremo austral de América. *Anales Instituto Patagonia (Chile).* 35: 55-70
- Sabin, L.D., Maruya, K.A., Lao, W., Diehl, D., Tsukada, D., *et al.* 2010. Exchange of polycyclic aromatic hydrocarbons among the atmosphere, water, and sediment in coastal embayments of southern California, USA. *Environ Toxicol Chem.* 29: 265-274
- Salminen, J.M., Tuomi, P.M., Jørgensen, K.S. 2008. Functional gene abundances (*nahAc*, *alkB*, *xylE*) in the assessment of the efficacy of bioremediation. *Appl Biochem Biotechnol.* 151: 638-652

- Samanta, S.K., Singh, O.V., Jain, R.K. 2002. Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *Trends Biotechnol.* 20: 243-248
- Sambrook, J., Russell, D.W. 2001. *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Santos Pontes, D., Lima-Bittencourt, C.I., Chartone-Souza, E., Amaral Nascimento, A.M. 2007. Molecular approaches: advantages and artifacts in assessing bacterial diversity. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 34: 463-473
- Schloss, P.D. 2010. The effects of alignment quality, distance calculation method, sequence filtering, and region on the analysis of 16S rRNA gene-based studies. *PLoS Comput Biol.* 6: e1000844
- Schloss, P.D., Gevers, D., Westcott, S.L. 2011. Reducing the effects of PCR amplification and sequencing artifacts on 16S rRNA-based studies. *PLoS One.* 6: e27310
- Schloss, P.D., Handelsman, J. 2005. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Appl Environ Microbiol.* 71: 1501-1506
- Schloss, P.D., Westcott, S.L. 2011. Assessing and improving methods used in operational taxonomic unit-based approaches for 16S rRNA gene sequence analysis. *Appl Environ Microbiol.* 77: 3219-3226
- Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., *et al.* 2009. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol.* 75: 7537-7541
- Seo, J.S., Keum, Y.S., Li, Q.X. 2009. Bacterial degradation of aromatic compounds. *Int J Environ Res Public Health.* 6: 278-309
- Seo, S.B., Lee, H.Y., Zhang, A.H., Kim, H.Y., Shin, D.H., Lee, S.D. 2011. Effects of humic acid on DNA quantification with Quantifiler[®] Human DNA Quantification kit and short tandem repeat amplification efficiency. *Int J Legal Med.* DOI: 10.1007/s00414-011-0616-z
- Seshadri, R., Kravitz, S.A., Smarr, L., Gilna, P., Frazier, M. 2007. CAMERA: a community resource for metagenomics. *PLoS Biol.* 5: e75
- Shannon, C.E., Weaver, W. 1949. *The mathematical theory of communication*. University of Illinois Press. 117 págs.

- Sharma, S., Radl, V., Hai, B., Kloos, K., Mrkonjic Fuka, M., *et al.* 2007. Quantification of functional genes from procaryotes in soil by PCR. *J Microbio. Meth.* 68: 445-452
- Silva, R.A., Grossi, V., Olivera, N.L., Alvarez, H.M. 2010. Characterization of indigenous *Rhodococcus* sp. 602, a strain able to accumulate triacylglycerides from naphthyl compounds under nitrogen-starved conditions. *Res Microbiol.* 161: 198-207
- Simon, M.J., Osslund, T.D., Saunders, R., Ensley, B.D., Suggs, S., *et al.* 1993. Sequences of genes encoding naphthalene dioxygenase in *Pseudomonas putida* strains G7 and NCIB 9816-4. *Gene.* 127: 31-37
- Simpson, E.H. 1949. Measurement of diversity. *Nature.* 163: 688-688
- Singh, A., Kuhad, R.C., Shareefdeen, Z., Ward, O.P. 2004. Methods for monitoring and assessment of bioremediation processes. En *Biodegradation and bioremediation*, ed. Singh, A. y Ward, O.P., págs. 279-304. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag
- Singleton, D.R., Guzmán Ramirez, L., Aitken, M.D. 2009. Characterization of a polycyclic aromatic hydrocarbon degradation gene cluster in a phenanthrene-degrading *Acidovorax* strain. *Appl Environ Microbiol.* 75: 2613-2620
- Siqueira, J.F., Fouad, A.F., Rôças, I.N. 2012. Pyrosequencing as a tool for better understanding of human microbiomes. *J Oral Microbiol.* 4: 10743-10757
- Sjöstedt, J., Koch-Schmidt, P., Pontarp, M., Canbäck, B., Tunlid, A., *et al.* 2012. Recruitment of members from the rare biosphere of marine bacterioplankton communities after environmental disturbance. *Appl Environ Microbiol.* 78: 1361-1369
- Sloan, C.A., Brown, D.W., Pearce, R.W., Boyer, R.H., Bolton, J.L., *et al.* 2005. Determining aromatic hydrocarbons and chlorinated hydrocarbons in sediments and tissues using accelerated solvent extraction and gas chromatography/mass spectrometry. En *Techniques in aquatic toxicology*, ed. Ostrander, G.K., págs. 631-651. Florida, USA: CRC Press Boca Raton
- Smith, C.J., Nedwell, D.B., Dong, L.F., Osborn, A.M. 2006. Evaluation of quantitative polymerase chain reaction-based approaches for determining gene copy and gene transcript numbers in environmental samples. *Environ Microbiol.* 8: 804-815
- Smith, C.J., Osborn, A.M. 2009. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiol Ecol.* 67: 6-20
- Sogin, M.L., Morrison, H.G., Huber, J.A., Welch, D.M., Huse, S.M., *et al.* 2006. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". *Proc Natl Acad Sci USA.* 103: 12115-12120

- Solís, M. 2007. *Monitoreo de calidad de agua costera en la Provincia del Chubut. Agosto 2005-Agosto 2006*, Centro Nacional Patagónico, Puerto Madryn, Argentina
- Spalding, M.D., Fox, H.E., Allen, G.R., Davidson, N., Ferdaña, Z.A., *et al.* 2007. Marine ecoregions of the world: a bioregionalization of coastal and shelf areas. *BioScience*. 57: 573-583
- Stahl, D.A., Lane, D.J., Olsen, G.J., Pace, N.R. 1984. Analysis of hydrothermal vent-associated symbionts by ribosomal RNA sequences. *Science*. 224: 409-411
- Stahl, D.A., Lane, D.J., Olsen, G.J., Pace, N.R. 1985. Characterization of a Yellowstone hot spring microbial community by 5S rRNA sequences. *Appl Environ Microbiol*. 49: 1379-1384
- Staley, J.T. 2010. *Cycloclasticus*: a genus of marine polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacteria. En *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*, ed. Timmis, K.N., págs. 1781-1786. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag
- Stenuit, B., Eyers, L., Schuler, L., Agathos, S.N., George, I. 2008. Emerging high-throughput approaches to analyze bioremediation of sites contaminated with hazardous and/or recalcitrant wastes. *Biotechnol Adv*. 26: 561-575
- Strategic Environmental Research and Development Program (SERDP). 2005. *SERDP and ESTP expert panel workshop on research and development needs for the environmental remediation application of molecular biological tools*, Strategic Environmental Research and Development Program y Environmental Security Technology Certification Program, Charlottesville, Virginia
- Strickland, J.D.H., Parsons, T.R. 1972. *A practical handbook of seawater analysis*. Bulletin 167. Fisheries Research Board of Canada
- Stroo, H.F. 2010. Bioremediation of chlorinated solvent plumes. En *In situ remediation of chlorinated solvent plumes*, ed. Stroo, H.F. y Ward, C.H., págs. 309-324. Nueva York: Springer
- Suzuki, M.T., Giovannoni, S.J. 1996. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl Environ Microbiol*. 62: 625-630
- SW-846. 2007. Test methods for evaluating solid waste. Method 8100. United States Environmental Protection Agency (EPA)
- Takizawa, N., Iida, T., Sawada, T., Yamauchi, K., Wang, Y.W., *et al.* 1999. Nucleotide sequences and characterization of genes encoding naphthalene upper pathway of *Pseudomonas aeruginosa* PaK1 and *Pseudomonas putida* OUS82. *J Biosci Bioeng*. 87: 721-731

- Tamaki, H., Wright, C.L., Li, X., Lin, Q., Hwang, C., *et al.* 2011. Analysis of 16S rRNA amplicon sequencing options on the Roche/454 next-generation titanium sequencing platform. *PLoS One*. 6: e25263
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*. 24: 1596-1599
- Tatusov, R.L., Galperin, M.Y., Natale, D.A., Koonin, E.V. 2000. The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution. *Nucleic Acids Res*. 28: 33-36
- Tatusov, R.L., Koonin, E.V., Lipman, D.J. 1997. A genomic perspective on protein families. *Science*. 278: 631-637
- Teira, E., Lekunberri, I., Gasol, J.M., Nieto-Cid, M., Álvarez-Salgado, X.A., Figueiras, F.G. 2007. Dynamics of the hydrocarbon-degrading *Cycloclasticus* bacteria during mesocosm-simulated oil spills. *Environ Microbiol*. 9: 2551-2562
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G. 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*. 25: 4876-4882
- Torres, A.I., Gil, M.N., Amín, O.A., Esteves, J.L. 2009. Environmental characterization of a eutrophicated semi-enclosed system: nutrient budget (Encerrada Bay, Tierra del Fuego Island, Patagonia, Argentina). *Water Air Soil Pollut*. 204: 259-270
- Tortell, P. 1992. Coastal zone sensitivity mapping and its role in marine environmental management. *Mar Pollut Bull*. 25: 88-93
- Tringe, S.G., von Mering, C., Kobayashi, A., Salamov, A.A., Chen, K., *et al.* 2005. Comparative metagenomics of microbial communities. *Science*. 308: 554-557
- Tukey, J.W. 1949. Comparing individual means in the analysis of variance. *Biometrics*. 5: 99-114
- Tuomi, P.M., Salminen, J.M., Jørgensen, K.S. 2004. The abundance of *nahAc* genes correlates with the ¹⁴C-naphthalene mineralization potential in petroleum hydrocarbon-contaminated oxic soil layers. *FEMS Microbiol Ecol*. 51: 99-107
- Uad, I., Silva-Castro, G.A., Pozo, C., González-López, J., Calvo, C. 2010. Biodegradative potential and characterization of bioemulsifiers of marine bacteria isolated from samples of seawater, sediment and fuel extracted at 4000 m of depth (Prestige wreck). *Int Biodeter Biodegr*. 64: 511-518

- UNEP, IOC, IAEA. 1992. *Determination of petroleum hydrocarbons in sediments. Reference Methods for Marine Pollution Studies N°20*
- United States Environmental Protection Agency (EPA). 2002. *Guidance on choosing a sampling design for environmental data collection*. United States Environmental Protection Agency (EPA), Washington, DC
- Uyttebroek, M., Breugelmanns, P., Janssen, M., Wattiau, P., Joffe, B., *et al.* 2006. Distribution of the *Mycobacterium* community and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) among different size fractions of a long-term PAH-contaminated soil. *Environ Microbiol.* 8: 836-847
- Vacca, D.J., Blean, W.F., Hickey, W.J. 2005. Isolation of soil bacteria adapted to degrade humic acid-sorbed phenanthrene. *Appl Environ Microbiol.* 71: 3797-3805
- Vilchez-Vargas, R., Junca, H., Pieper, D.H. 2010. Metabolic networks, microbial ecology and 'omics' technologies: towards understanding *in situ* biodegradation processes. *Environ Microbiol.* 12: 3089-3104
- Volkman, J.K., Holdsworth, D.G., Neill, G.P., Bavor, H.J. 1992. Identification of natural, anthropogenic and petroleum hydrocarbons in aquatic sediments. *Sci Total Environ.* 112: 203-219
- Wang, B., Lai, Q., Cui, Z., Tan, T., Shao, Z. 2008. A pyrene-degrading consortium from deep-sea sediment of the West Pacific and its key member *Cycloclasticus* sp. P1. *Environ Microbiol.* 10: 1948-1963
- Wang, Q., Garrity, G.M., Tiedje, J.M., Cole, J.R. 2007a. Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol.* 73: 5261-5267
- Wang, W., Chen, K., Xu, C. 2006. DNA quantification using EvaGreen and a real-time PCR instrument. *Anal Biochem.* 356: 303-305
- Wang, Y., Qian, P.-Y. 2009. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. *PLoS One.* 4: e7401
- Wang, Z., Li, J., Hesham A.E.-L., He, S., Zhang, Y., Wang, Z., Yang, M. 2007b. Co-variations of bacterial composition and catabolic genes related to PAH degradation in a produced water treatment system consisting of successive anoxic and aerobic units. *Sci Total Environ.* 373: 356-362
- Werbrouck, H., Botteldoorn, N., Uyttendaele, M., Herman, L., Van Coillie, E. 2007. Quantification of gene expression of *Listeria monocytogenes* by real-time reverse

- transcription PCR: optimization, evaluation and pitfalls. *J Microbiol Methods*. 69: 306-314
- Werlen, C., Kohler, H.-P.E., van der Meer, J.R. 1996. The broad substrate chlorobenzene dioxygenase and *cis*-chlorobenzene dihydrodiol dehydrogenase of *Pseudomonas* sp. strain P51 are linked evolutionarily to the enzymes for benzene and toluene degradation. *J Biol Chem*. 271: 4009-4016
- Wilkes, H., Schwarzbauer, J. 2010. Hydrocarbons: an introduction to structure, physico-chemical properties and natural occurrence. En *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*, ed. Timmis, K.N., págs. 3-48. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag
- Wilmes, P., Bond, P.L. 2006. Metaproteomics: studying functional gene expression in microbial ecosystems. *Trends Microbiol*. 14: 92-97
- Wilson, M.S., Bakermans, C., Madsen, E.L. 1999. In situ, real-time catabolic gene expression: extraction and characterization of naphthalene dioxygenase mRNA transcripts from groundwater. *Appl Environ Microbiol*. 65: 80-87
- Winter, C., Moeseneder, M.M., Herndl, G.J. 2001. Impact of UV radiation on bacterioplankton community composition. *Appl Environ Microbiol*. 67: 665-672
- Wintzingerode, F.v., Göbel, U.B., Stackebrandt, E. 1997. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol Rev*. 21: 213-229
- Wolffs, P., Grage, H., Hagberg, O., Rådström, P. 2004. Impact of DNA polymerases and their buffer systems on quantitative real-time PCR. *J Clin Microbiol*. 42: 408-411
- Yagi, J.M., Madsen, E.L. 2009. Diversity, abundance, and consistency of microbial oxygenase expression and biodegradation in a shallow contaminated aquifer. *Appl Environ Microbiol*. 75: 6478-6487
- Yakimov, M.M., Timmis, K.N., Golyshin, P.N. 2007. Obligate oil-degrading marine bacteria. *Curr Opin Biotechnol*. 18: 257-266
- Yorio, P., Tagliorette, A., Harris, G., Giaccardi, M. 1998. *Áreas protegidas costeras de la Patagonia: síntesis de información, diagnosis sobre su estado actual de protección y recomendaciones preliminares*, Informes Técnicos del Plan de Manejo Integrado de la Zona Costera Patagónica - Fundación Patagonia Natural, Puerto Madryn
- Youssef, N., Sheik, C.S., Krumholz, L.R., Najar, F.Z., Roe, B.A., Elshahed, M.S. 2009. Comparison of species richness estimates obtained using nearly complete fragments and simulated pyrosequencing-generated fragments in 16S rRNA gen-based environmental surveys. *Appl Environ Microbiol*. 75: 5227-5236

- Zengler, K., Toledo, G., Rappé, M., Elkins, J., Mathur, E.J., *et al.* 2002. Cultivating the uncultured. *Proc Natl Acad Sci USA*. 99: 15681-15686
- Zhang, T., Fang, H.H.P. 2006. Applications of real-time polymerase chain reaction for quantification of microorganisms in environmental samples. *Appl Microbiol Biotechnol*. 70: 281-289
- Zhao, J. 2009. *Characterization of phenanthrene degradation pathways in Burkholderia sp. and Delftia sp.* Tesis de doctorado. University of Wisconsin-Madison, Madison. 118 págs.
- Zhuang, W.-Q., Tay, J.-H., Maszenan, A.M., Krumholz, L.R., Tay, S.T.-L. 2003. Importance of Gram-positive naphthalene-degrading bacteria in oil-contaminated tropical marine sediments. *Lett Appl Microbiol*. 36: 251-257
- Zhuang, W.-Q., Tay, J.-H., Maszenan, A.M., Tay, S.T.-L. 2002. *Bacillus naphthovorans* sp. nov. from oil-contaminated tropical marine sediments and its role in naphthalene biodegradation. *Appl Microbiol Biotechnol*. 58: 547-553
- Zinger, L., Amaral-Zettler, L.A., Fuhrman, J.A., Horner-Devine, M.C., Huse, S.M., *et al.* 2011. Global patterns of bacterial beta-diversity in seafloor and seawater ecosystems. *PLoS One*. 6: e24570