



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral

***Biorremediación de suelos contaminados
con Hidrocarburos Policíclicos
Aromáticos: una visión molecular***

Lic. Sabrina Festa

Directora: Dra. Irma S. Morelli

Codirectora: Dra. Bibiana M. Coppotelli

Año 2016

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



Me hace muy feliz que haya llegado el momento de agradecer a quienes de alguna manera colaboraron para que este trabajo sea una realidad.

A Irma por ser mi guía incondicional. Por su contención, su profesionalismo, su vocación de enseñanza, su motivación inspiradora, por su mirada positiva. Me siento orgullosa que sea mi directora.

A Bibi por estar presente en todo momento. Porque su dedicación y compromiso fueron elementos claves en el desarrollo de este trabajo. Desde lo personal, su confianza y sus palabras me hicieron sentir que el esfuerzo vale la pena.

Al CINDEFI por permitirme utilizar sus instalaciones durante el desarrollo de este trabajo y a su gente, por su amabilidad y ayuda ya sea en forma de reactivo o charla de pasillo.

A CONICET por haberme otorgado las becas que me permitieron llevar a cabo este trabajo de tesis.

A mi hermano, a mi mamá y a mi papá porque es a partir de ellos que me construyo.

A Berni por su amor y compañía, por escucharme, entenderme y hacerme sentir libre. Por completarme.

A mis amigas por el empuje y por sus risas y abrazos siempre disponibles.

A mis compañeras y amigas del Laboratorio que formaron parte de mis cotidianidades y me acompañaron en todo el proceso:

A Tere por su mirada comprensiva y cómplice.

A Lau por todas las enseñanzas laborales y por sobre todo personales.

A Vero por las mañanas habladas, por su ayuda y por su objetividad.

A Marian por la paciencia, la comprensión y los consejos.

A Marti y a Mari por el apoyo, por las mil manos que tuvieron cada vez que trabajamos juntas.

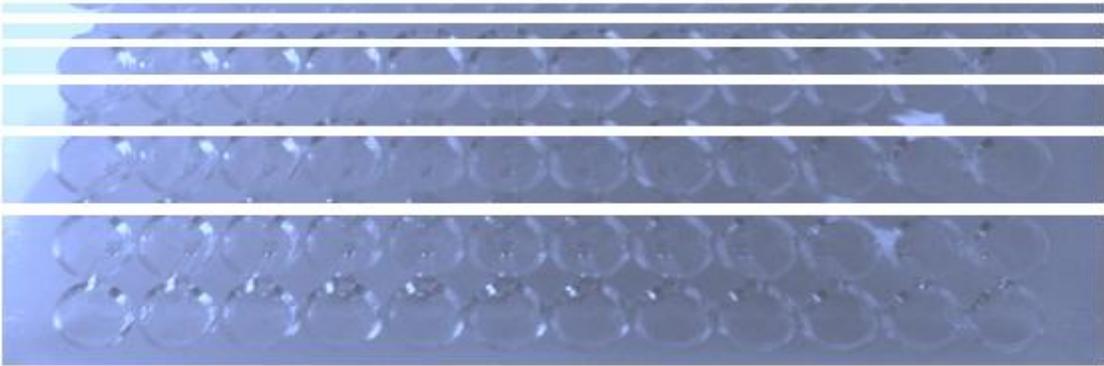
A Ro y a Pau porque cada una, a su manera, siempre me expresó su aguante.

A Clau y a Vivi por las charlas y sonrisas que siempre tuvieron conmigo

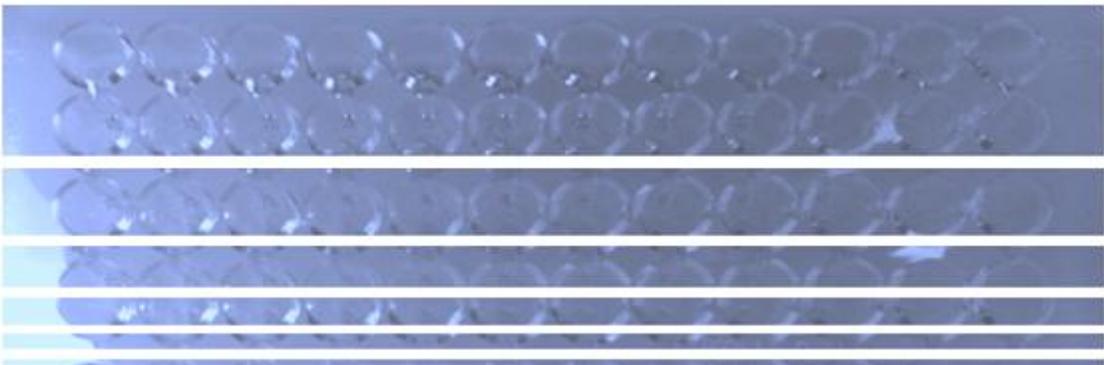
A Nati y a Lina por sus palabras alentadoras.

A mi Hermano, a mi Mamá y a mi Papá

(lero lero, ya aprendí)



Índice



I. Introducción.....	21
I.1 Los hidrocarburos policíclicos aromáticos y su presencia en el suelo	21
I.2 La degradación bacteriana de PAH	24
I.3 La utilización de microorganismos en procesos de biorremediación	25
I.4 La estrategia de bioaumentación.....	26
I.4.1 Los consocios microbianos como inoculantes	27
I.5 Inoculantes como invasores del microbioma del suelo.....	28
I.6 Biorremediación de suelos contaminados con Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos: una visión molecular	30
II. Objetivos e Hipótesis.....	39
III. Materiales y métodos	43
III.1 Materiales	43
III.1.1 Medios de cultivo.....	43
III.1.2 Buffers y soluciones para DGGE	45
III.1.3 Kits utilizados para la extracción y purificación de DNA.....	45
III.1.4 Buffers utilizados para la extracción de DNA para la construcción de la biblioteca metagenómica.....	46
III.1.5 Kits utilizados para la construcción de la biblioteca genómica y la extracción del fósmido	46
III.1.6 Medios de cultivo para pruebas bioquímicas	46
III.1.7 Buffers y soluciones para proteómica.....	47
III.2 Metodología	50
III.2.1 Características del suelo utilizado para la obtención del consorcio.....	50
III.2.2 Obtención, conservación y reactivación de un consorcio degradador de fenantreno.....	50
III.2.3 Cinética de degradación de fenantreno	50
III.2.4 Estudio de la dinámica de las poblaciones cultivables	51
III.2.4.1 Recuento de bacterias heterótrofas cultivables:	51
III.2.4.2 Recuento de bacterias degradadoras de PAH mediante técnica de NMP:	51
III.2.5 Determinación de la diversidad de CON.....	52
III.2.5.1 A nivel de cultivables.....	52
III.2.5.1.i Aislamiento de cepas bacterianas del consorcio.....	52
III.2.5.1.ii Pruebas bioquímicas	52
III.2.5.1.iii Identificación genotípica de las cepas aisladas	52

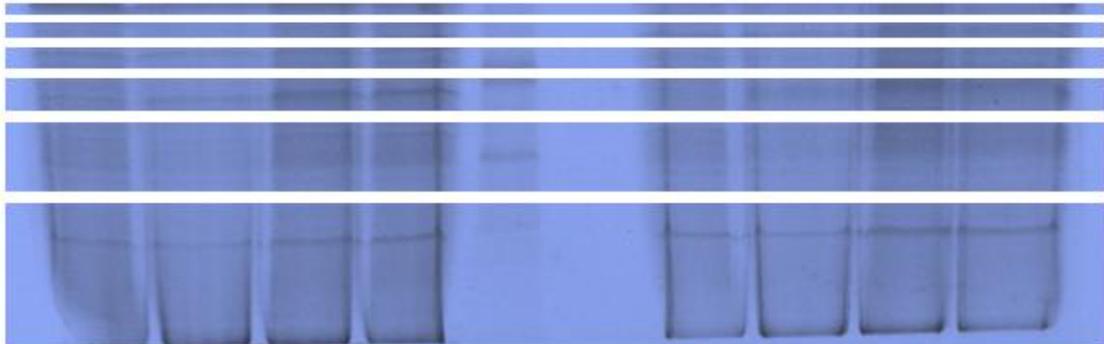
III.2.5.1.iii.1 Extracción del DNA de cada cepa	52
III.2.5.1.iii.2 PCR del gen 16S rRNA completo	52
III.2.5.2 A nivel de no cultivables.....	53
III.2.5.2.i Extracción de DNA total de CON.	53
III.2.5.2.ii Determinación de los perfiles de DGGE del gen 16S rRNA de CON y de las cepas aisladas.....	53
III.2.5.2.ii.1 Amplificación por PCR de una región conservada del gen 16S rRNA	53
III.2.5.2.ii.2 Purificación del producto de PCR de las cepas aisladas	54
III.2.5.2.ii.3 Análisis de la estructura de CON mediante PCR-DGGE.	54
III.2.5.2.iii Construcción y análisis de una biblioteca de genes 16S rRNA presentes en CON.....	54
III.2.5.2.iii.1 Preparación de muestras para clonar	54
III.2.5.2.iii.1.a Banda obtenida del perfil de DGGE del consorcio.....	54
III.2.5.2.iii.1.b Reacción de PCR.....	55
III.2.5.2.iii.1.c Purificación del producto de PCR	55
III.2.5.2.iii.2 Clonación	55
III.2.5.2.iii.3 Extracción de DNA de los clones positivos	55
III.2.5.2.iii.4 Verificación de la presencia del inserto.....	56
III.2.5.2.iii.5 Análisis filogenético	56
III.2.5.2.iv Estudio de la composición bacteriana de CON mediante 454-Pirosecuenciación	56
III.2.5.2.iv.1 Análisis del set de datos de pirosecuenciación.....	57
III.2.6 Análisis funcional de CON.....	58
III.2.6.1 Análisis fisiológico de las cepas aisladas	58
III.2.6.1.i Degradación de fenantreno en medio sólido.....	58
III.2.6.1.ii Crecimiento y degradación de fenantreno como única fuente de carbono y energía en medio líquido.....	58
III.2.6.1.iii Degradación de fenantreno en medio suplementado con factores de crecimiento.....	59
III.2.6.1.iv Crecimiento y degradación de metabolitos intermediarios de la degradación de fenantreno.....	59
III.2.6.1.v Determinación de la presencia de genes dioxigenasa	59
III.2.6.1.vi PCR con primers dirigidos a genes dioxigenasa	60
III.2.6.1.vi Ensayo de producción de biosurfactantes.....	60
III.2.6.2 Estudio de las interacciones fisiológicas entre las cepas aisladas del consorcio	60
III.2.6.2.i Dinámica de los distintos morfotipos en el consorcio	60

III.2.6.2.ii Degradación de fenantreno en medio líquido por parte de las combinaciones de cepas	61
III.2.6.3 Aplicación de estrategias ómicas al estudio de la funcionalidad de CON	61
III.2.6.3.i Análisis metagenómico funcional del consorcio	61
III.2.6.3.i.1 Extracción de DNA de alto peso molecular de CON	61
III.2.6.3.i.2 Construcción de la biblioteca metagenómica.....	61
III.2.6.3.i.3 Reparación y selección de fragmentos de DNA genómico mayores a 23 Kb	61
III.2.6.3.i.4 Ligación de los fragmentos de DNA en el vector pCC2FOS y empaquetamiento de los fósmidos en las cápsides vacías del fago Lambda	62
III.2.6.3.i.5 Infección de E. coli EPI300 T1R	62
III.2.6.3.i.6 Screening y almacenamiento de clones transformantes.....	62
III.2.6.3.i.7 Extracción del fósrido, digestión y secuenciación de los clones positivos	63
III.2.6.3.i.8 Secuenciación de los fósridos	64
III.2.6.3.ii Determinación del metaproteoma del consorcio.....	64
III.2.6.3.ii.1 Obtención de proteínas de CON.....	64
III.2.6.3.ii.2 SDSPAGE	64
III.2.6.3.ii.3 Isoelectroenfoque	65
III.2.6.3.ii.4 Segunda dimensión.....	65
III.2.6.3.ii.5 Análisis de las imágenes de los geles.	65
III.2.6.3.ii.6 Identificación de proteínas.....	65
III.2.7 Preparación de microcosmos de suelo artificialmente contaminados con fenantreno y de suelo crónicamente contaminado con PAH.....	66
III.2.7.1 Características de los suelos seleccionados	66
III.2.7.2 Preparación de los cultivos usados como inóculo.	66
III.2.7.3 Preparación de los microcosmos de suelo artificialmente contaminado con fenantreno	67
III.2.7.4 Preparación de los microcosmos de suelo crónicamente contaminado con PAH.....	68
III.2.7.5 Determinación de la concentración de hidrocarburos en suelo.	68
III.2.7.5.i Microcosmos de suelo artificialmente contaminado con fenantreno.....	68
III.2.7.5.ii Microcosmos de suelo crónicamente contaminados con PAH.	68
III.2.7.6 Determinación del contenido de humedad	69
III.2.7.7 Recuento de microorganismos viables.....	69
III.2.7.7.i Preparación de las suspensiones microbianas	69
III.2.7.7.i.1 Recuento de bacterias heterótrofas cultivables en medio R2A.....	70

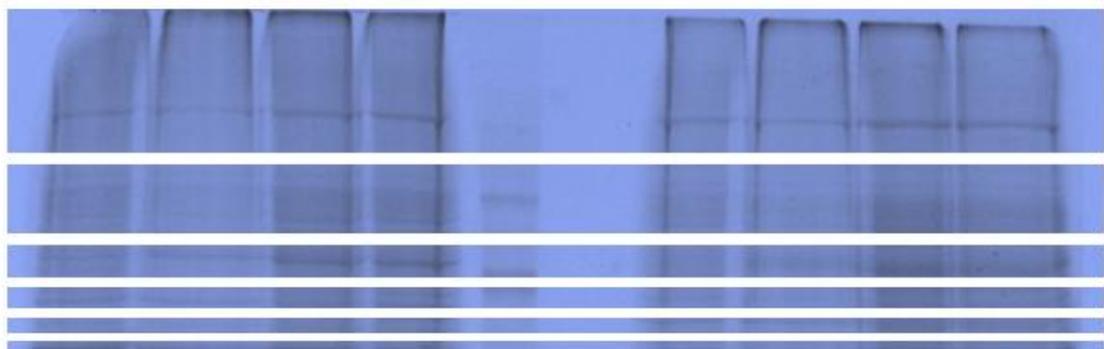
III.2.7.7.i.2 Recuento de bacterias degradadoras de PAH en MML suplementado con un mezcla de PAH	70
III.2.7.8 Medida de la actividad deshidrogenasa	70
III.2.7.9 Estrategias moleculares para la caracterización de las comunidades presentes en los microcosmos.....	71
III.2.7.9.i Extracción de DNA total de suelo	71
III.2.7.9.ii Amplificación por PCR de una región conservada del gen 16S rRNA.....	71
III.2.7.9.iii Clonación de DNA de suelo de los microcosmos	71
III.2.7.9.iii.1 Extracción de DNA de los clones positivos	71
III.2.7.9.iii.2 Verificación de la presencia del inserto	71
III.2.7.9.iii.3 Análisis filogenético	71
III.2.7.9.iv DGGE	71
III.2.7.9.v Cálculo de índices de Shannon	72
III.2.7.9.vi PCR, pirosecuenciación y análisis de datos.....	72
III.2.7.10 Análisis estadístico.....	73
IV. Obtención y caracterización de un consorcio bacteriano degradador de fenantreno.....	77
IV.1 Resultados	77
IV.1.1 Obtención de un consorcio degradador de Fenantreno.....	77
IV.1.2 Estudio de la dinámica de las poblaciones cultivables	79
IV.1.3 Determinación de la diversidad de CON	80
IV.1.3.1 A nivel de cultivables	80
IV.1.3.2 A nivel de no cultivables	82
IV.1.3.2.i Análisis de la estructura de CON mediante PCR-DGGE	82
IV.1.3.2.ii Construcción y análisis de una biblioteca de genes 16S rRNA presentes en CON.....	83
IV.1.3.2.iii Pirosecuenciación del DNA total de CON	86
IV.1.4 Análisis funcional de CON.....	88
IV.1.4.1 Análisis fisiológico de las cepas aisladas.....	88
IV.1.4.1.i Degradación de fenantreno en medio sólido	88
IV.1.4.1.ii Degradación de fenantreno en medio líquido	89
IV.1.4.1.iii Degradación de fenantreno en medio suplementado con factores de crecimiento.....	90
IV.1.4.1.iv Crecimiento en metabolitos intermediarios de la degradación de fenantreno como única fuente de carbono y energía.....	90
IV.1.4.1.v Estudio de presencia de genes que codifican para enzimas dioxigenasas	91

IV.1.4.1.vi Screening de producción de biosurfactantes	93
IV.1.4.2 Estudio de las interacciones fisiológicas entre las cepas aisladas del consorcio	94
IV.1.4.2.i Dinámica de los distintos morfotipos presentes en el consorcio	94
IV.1.4.2.ii Degradación de fenantreno en medio líquido por consorcios definidos ..	95
IV.1.4.3 Estrategias ómicas aplicadas al estudio de CON.....	97
IV.1.4.3.i Presencia de genes que codifican para enzimas dioxigenasas	97
IV.1.4.3.ii Análisis metagenómico funcional de CON	98
IV.1.4.3.ii.1 Extracción de DNA total del consorcio	98
IV.1.4.3.ii.2 Construcción de la biblioteca y screening funcional	100
IV.1.4.3.ii.3 Extracción de los fósmidos presentes en los clones positivos	103
IV.1.4.3.iii Estudio metaproteómico de CON	113
IV.1.4.3.iii.1 Análisis por SDS-PAGE	113
IV.1.4.3.iii.2 Análisis por electroforesis bidimensional	114
IV.2 Discusión.....	118
V. Ensayos de bioaumentación en microcosmos de suelo artificialmente contaminado con fenantreno	133
V.1 Resultados	134
V.1.1 Determinación de la eliminación de fenantreno	134
V.1.2 Efecto de la inoculación sobre la dinámica de las poblaciones bacterianas cultivables	135
V.1.3 Medida de actividad deshidrogenasa	137
V.1.4 Estudio de los cambios en la estructura de las comunidades bacterianas	138
V.1.5 Estudio de los cambios en la composición de las comunidades bacterianas.....	144
V.1.5.1 Secuenciación de las bandas predominantes en los perfiles DGGE.....	144
V.1.5.2 Construcción y análisis de bibliotecas de genes 16S rRNA del DNA total de los microcosmos SP, Phe, Phe+CON y Phe+CD.....	147
V.1.5.3 Análisis mediante una técnica de alto rendimiento: Pirosecuenciación del gen 16S rRNA a partir del DNA total de los microcosmos SP, Phe, Phe+CON, Phe+AM y SP+AM.	149
V.1.5.3.i Análisis de correspondencia a nivel de OTU.	155
V.1.5.3.ii Impacto de los diferentes tratamientos sobre la abundancia relativa de las poblaciones bacterianas de suelo.	155
V.1.5.3.ii.1 Análisis de las comunidades bacterianas de los microcosmos a nivel de filo y clase.....	155
V.1.5.3.ii.2 Análisis de las comunidades bacterianas de los microcosmos a nivel de orden	158

V.1.5.3.ii.3 Análisis de las comunidades bacterianas de los microcosmos a nivel de género	160
V.2 Discusión.....	163
VI. Ensayos de bioaumentación en microcosmos de suelo crónicamente contaminado con PAH	177
VI.1 Resultados.	178
VI.1.1 Determinación de la eliminación de diferentes hidrocarburos presentes en los microcosmos.....	178
VI.1.2 Efecto de la inoculación sobre la dinámica de las poblaciones bacterianas cultivables	179
VI.1.3 Medida de actividad deshidrogenasa	180
VI.1.4 Análisis de las comunidades bacterianas de los microcosmos mediante pirosecuenciación del gen 16S rRNA.....	181
VI.1.4.1 Análisis de correspondencia a nivel de OTU	184
VI.1.4.2 Impacto de la inoculación sobre la abundancia relativa de las poblaciones bacterianas de los microcosmos.....	185
VI.1.4.2.i Análisis de las comunidades bacterianas de los microcosmos a nivel de filo y clase	185
VI.1.4.2.ii Análisis de las comunidades bacterianas a nivel de orden	187
VI.1.4.2.iii Análisis de las comunidades bacterianas de los microcosmos a nivel de género.....	190
VI.2 Discusión.....	192
VII Conclusiones generales.....	199
VIII. Bibliografía.....	203
IX Material suplementario.....	231



Capítulo I
Introducción



I. Introducción

I.1 Los hidrocarburos policíclicos aromáticos y su presencia en el suelo

Los hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH) son compuestos orgánicos de dos o más anillos bencénicos en distintas configuraciones estructurales que constituyen una fracción importante del petróleo (Patel y col., 2012). En base a su alta abundancia y toxicidad, 16 PAH se incluyeron en la lista de contaminantes prioritarios de la EPA (*Environmental Protection Agency*) (Peng y col., 2008) (Figura I.1).

Los PAH son continuamente generados por la combustión incompleta de la materia orgánica, tanto por causas naturales como antropogénicas, como los incendios forestales, la calefacción del hogar, el tráfico, la incineración de residuos, etc. (Thion y col., 2013). Sin embargo, durante la mayor parte del siglo XX la contaminación masiva del suelo con PAH se originó a través de la industria petroquímica (Johnsen y col., 2005). Algunos PAH son también utilizados en la síntesis de diferentes compuestos orgánicos como pesticidas, fungicidas, detergentes, tinturas y bolas de naftalina (Samanta y col., 2002).

Los sitios contaminados con PAH u otros derivados de petróleo plantean un gran problema ambiental (Ros y col., 2010) y se encuentran comúnmente dentro o cerca de las ciudades, representando un considerable riesgo para la salud pública.

La contaminación del suelo con PAH está asociada generalmente a derrames accidentales o a la pérdida de productos derivados del petróleo refinado (Towell y col., 2011). En general los suelos contaminados con petróleo contienen mezclas complejas de hidrocarburos, incluyendo los LMW PAH (*Low Molecular Weight*, de bajo peso molecular) y los HMW (*High Molecular Weight*, de alto peso molecular) (Lafortune y col., 2009).

Los LMW PAH son relativamente más volátiles y más solubles en agua que los HMW PAH, y además son más susceptibles a la degradación (Pannu y col., 2003). Dentro de los LMW PAH, el naftaleno, antraceno y fenantreno son los mayormente distribuidos en el ambiente y son considerados como prototipo de los PAH debido a que su núcleo estructural se encuentra en varios PAH carcinogénicos de mayor peso molecular (Mallick y col., 2011).

Cuando los PAH se depositan en la superficie terrestre se unen a las partículas del suelo, dependiendo del tipo de suelo (contenido de materia orgánica, su composición y su estructura) (Tsibart y Gennadiev, 2013) y del PAH, por lo que es la adsorción la que gobierna su movilidad (Abdel-Shafy y Mansour, 2015). La reducción de la biodisponibilidad de los PAH con el tiempo representa uno de los desafíos más difíciles en la biorremediación de suelos contaminados, dado que estos compuestos aromáticos son progresivamente secuestrados y quedan menos disponibles para los microorganismos (Puglisi y col., 2007).

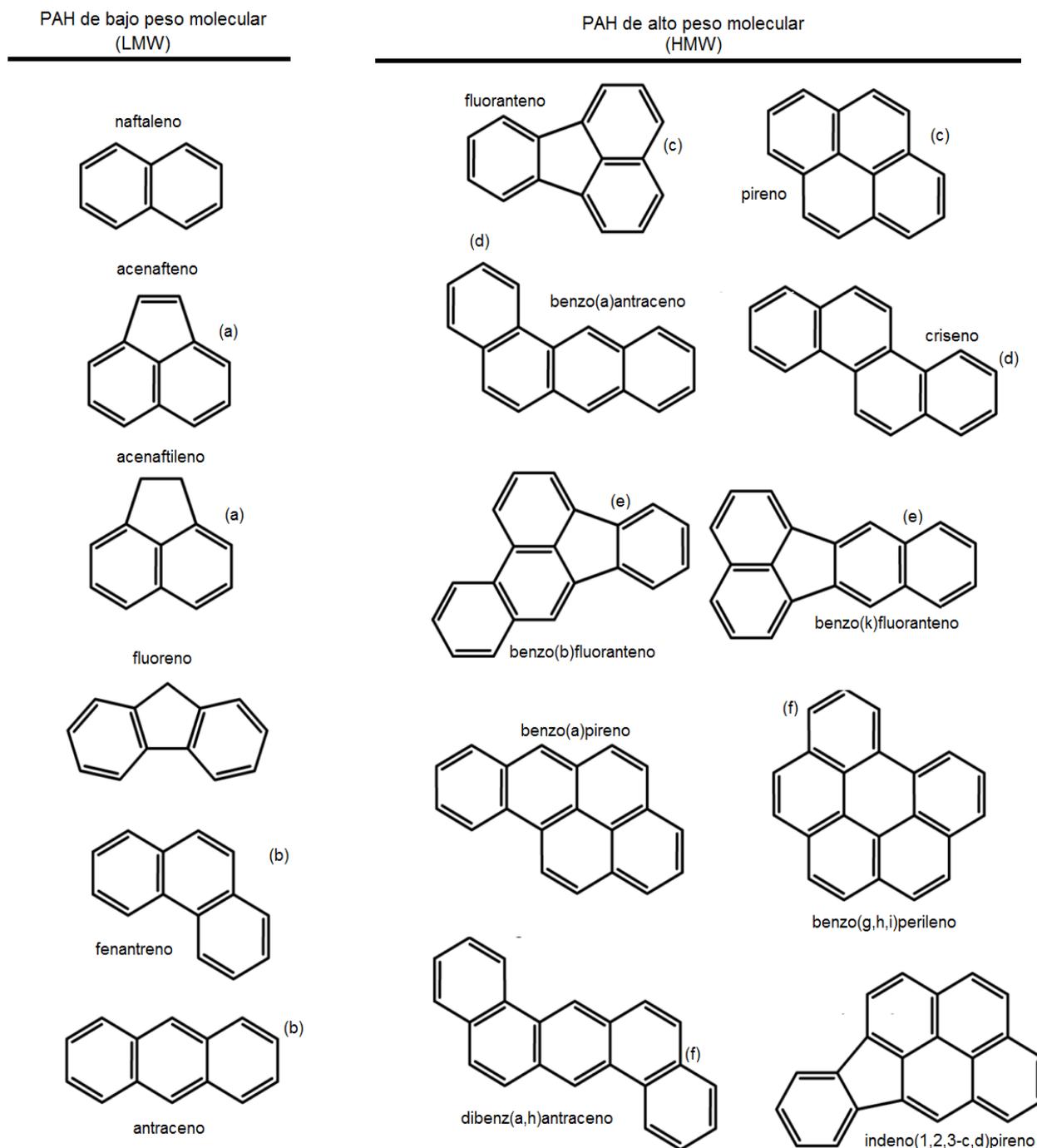


Figura I.1. Estructura química de los 16 PAH incluidos en la lista de contaminantes prioritarios de la EPA. Las letras entre paréntesis iguales indican igual peso molecular.

En particular, el fenantreno está dentro del grupo de los 16 PAH listados como contaminantes prioritarios (Janbandhu y Fulekar, 2011), si bien no presenta un riesgo para la salud humana es tóxico para peces y algas (Waigi y col., 2015). Está formado por un sistema de tres anillos aromáticos y se encuentra en altas concentraciones en sedimentos, superficie de suelos y sitios contaminados con PAH. Las propiedades físicas del fenantreno lo hacen industrialmente útil en muchos aspectos, intermediario en la síntesis de fenantrenoquinona en pesticidas, en la producción de resinas, fabricación de plástico, entre otras (Waigi y col., 2015). Dado que es el PAH de menor tamaño que posee las regiones bay y K, características de muchos PAH de alto peso molecular (Zhang y col., 2006), (Figura I.2) es generalmente utilizado como sustrato modelo para estudiar el metabolismo de otros PAH con propiedades carcinogénicas (Puglisi y col., 2007). La región Bay es una zona entre los carbonos 4 y 5 con impedimento estérico y la región K se encuentra entre los carbonos 9 y 10, un doble enlace con alta densidad electrónica (Waigi y col., 2015). Estas regiones resultan sitios de ataque de enzimas bacterianas y de mamíferos, generando epóxidos capaces de formar aductos con el DNA, con efecto carcinogénico (Pandey y col., 2016).

Parte del fenantreno liberado al ambiente es adsorbido por las partículas en suspensión en la atmósfera; sin embargo, dado que la volatilidad y solubilidad son muy bajas, su principal destino es el suelo (Ortiz Lopez, 2004). Una variedad de géneros bacterianos como *Acidovorax*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Burkholderia*, *Comamonas*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas* y *Sphingomonas* son capaces de utilizar el fenantreno como única fuente de carbono y energía (Li y col., 2009).

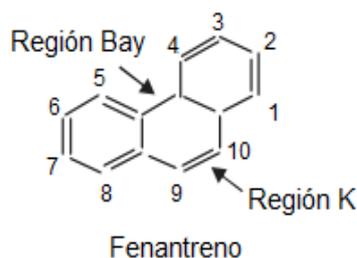


Figura I.2. Estructura química de la molécula de fenantreno y regiones bay y K (Waigi y col., 2015).

I.2 La degradación bacteriana de PAH

Si bien los PAH pueden sufrir oxidaciones químicas, fotólisis, adsorción a partículas de suelo y volatilización, la degradación microbiana es el principal proceso involucrado en la eliminación de dichos contaminantes orgánicos del suelo (Lors y col., 2010). Las bacterias son los agentes más activos en la degradación del petróleo y sus derivados y funcionan como degradadores primarios ante un derrame ambiental (Olajire y col., 2014). En vista que la degradación bacteriana sobrepasa las limitaciones asociadas a la mayoría de los procesos físico-químicos, provocando la real destrucción de muchos de los contaminantes orgánicos a bajo costo, se considera a la actividad microbiana una solución para remediar el daño que los PAH causan al ambiente y para recuperar ecológicamente un sitio contaminado (Mallick y col., 2011).

Numerosas bacterias se identificaron como degradadoras de distintos PAH incluyendo los géneros *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Cycloclasticus*, *Burkholderia*, *Rhodococcus*, *Polaromonas*, *Neptunomonas*, *Janibacter*, *Nocardia*, *Bacillus*, *Alcaligenes*, *Mycobacterium*, *Stenotrophomonas* entre otras (Lu y col., 2011).

Existen diferentes maneras de iniciar la degradación de un PAH, que dependerá del tipo de microorganismo degradador, y de la utilización o no del oxígeno. La degradación bacteriana aeróbica de PAH consiste en reacciones metabólicas de varios pasos que son separadas en dos vías principales, la vía periférica y la vía central (Figura I.3). La primera comienza con una oxidación y termina con la formación de intermediarios centrales que pueden ser compuestos como el catecol y el protocatecuato (compuesto no catecólico) (Ladino-orjuela y col., 2016). Los PAH son modificados inicialmente por dioxigenasas, enzimas multicomponente que incorporan oxígeno molecular al sustrato (Agrawal y Shahi, 2015), que catalizan la introducción de dos átomos de oxígeno al hidrocarburo aromático para formar un cis-dihidrodiol. En el metabolismo central estos intermediarios dihidroxilados son metabolizados por enzimas que rompen el anillo aromático en vías de orto- y meta-clivaje (intradiol o extradiol dioxigenasas respectivamente) y así posteriormente son transformados en intermediarios del ciclo TCA (Kim y col., 2009) (Figura I.3). En el caso del fenantreno, luego de la incorporación de dos átomos de oxígeno, los cis-dihidrodiol son subsecuentemente clivados y convertidos en ácido 1-hidroxi 2-naftoico, que es el metabolito intermediario principal (Waigi y col., 2015).

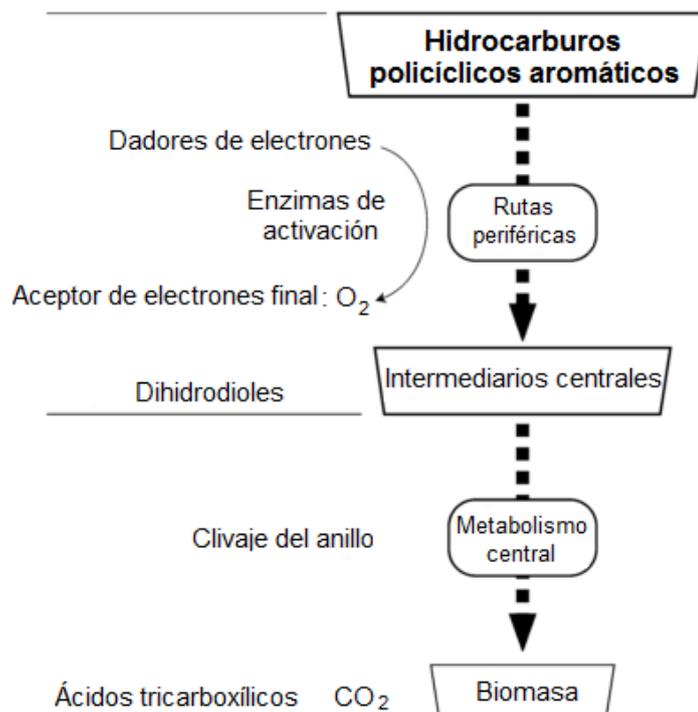


Figura I.3. Representación esquemática del metabolismo aeróbico bacteriano de hidrocarburos aromáticos. Las rutas periféricas finalizan con la formación de intermediarios centrales. El metabolismo central comienza con la desestabilización del anillo aromático de los metabolitos intermediarios hasta la formación de biomasa. Esquema adaptado de un trabajo de Ladino-orjuela y col., (2016)

I.3 La utilización de microorganismos en procesos de biorremediación

Existen diferentes métodos para detoxificar ambientes contaminados con PAH (Adetutu y col., 2013), ya sea con un enfoque fisicoquímico o biológico (Mrozik y Piotrowska-Seget, 2010). En la actualidad, una de las tecnologías más prometedoras para remover y limpiar los PAH de los ambientes naturales es la biorremediación, definida como una tecnología amigable con el medio ambiente (mínimo impacto ambiental), de bajo costo, que busca la atenuación o transformación de los compuestos contaminantes mediante el uso de comunidades microbianas (ya sea levaduras, hongos o bacterias) (Moscoso y col., 2012). La eficiencia de la biorremediación depende de varios factores como la presencia de microorganismos con el potencial catabólico apropiado en el sitio contaminado, las condiciones ambientales y nutricionales y la composición, la concentración y la biodisponibilidad del contaminante para que sea atacado por los microorganismos (Cerqueira y col., 2014).

Aún en áreas prístinas existe una porción de bacterias capaces de degradar PAH, por lo que cuando recibe de manera repentina una gran dosis de hidrocarburos (“suelo contaminado en forma aguda”), la comunidad microbiana del sitio se adapta a la nueva situación a través de un proceso de sucesión secundaria (evolución de una comunidad bacteriana originada por una perturbación). Aquellas bacterias capaces de utilizar el sustrato contaminante como fuente de nutrientes prolifera y se convierte en predominante (Kuiper y col., 2004), mientras que las poblaciones sensible al estrés causado por la contaminación tenderán a desaparecer. Generalmente el estrés por contaminación por PAH es debido principalmente a la formación de intermediarios tóxicos como el catecol y sus derivados (Fazzini y col., 2010). En consecuencia estas comunidades tienden a volverse menos diversas dependiendo de la complejidad del compuesto y el tiempo de exposición (González y col., 2011).

Si un suelo sufrió un evento de contaminación remoto o recibe un evento de contaminación constantemente, pueden considerarse como un “suelo contaminado en forma crónica”. En las comunidades microbianas crónicamente expuestas a PAH predominan los microorganismos capaces de usar el PAH como fuente de carbono y energía. La adaptación de los microorganismos al contaminante hace que los suelos crónicamente contaminados sean el sitio de elección para el *screening* de microorganismos potencialmente útiles para un proceso de biorremediación (Aitken y col., 1998). La importante presión de selección ejercida sobre estos suelos afectaría tanto la diversidad como la funcionalidad de las comunidades microbianas del suelo (Mendes y col., 2015) y podría limitar la biodegradación de los compuestos más recalcitrantes.

En estos casos la bioestimulación o el bioaumentación podrían ser una opción de tratamiento. En la primera estrategia se agregan nutrientes con el fin de estimular a las poblaciones degradadoras originales mientras que en la segunda estrategia se añaden cepas con capacidades degradativas específicas con el fin de lograr una cooperación conjunta con los microorganismos indígenas del suelo (Gojgic-Cvijovic y col., 2012)

I.4 La estrategia de bioaumentación

La premisa básica del bioaumentación es que las capacidades metabólicas de las comunidades microbianas aumentará mediante una diversidad genética exógena, que conduce a un repertorio más amplio de reacciones de biodegradación (El Fantroussi y Agathos, 2005). Existen tres enfoques para el bioaumentación, la inoculación con una cepa o un consorcio microbiano funcional para aumentar el potencial de degradación del suelo, introducir información genética transferible desde una cepa dadora a una población bacteriana

indígena establecida y competitiva o introducir un grupo inespecífico de bacterias (Patel y col., 2012).

Si bien el bioaumentación ha sido objeto de numerosos estudios (Vecchioli y col., 1990; Ronen y col., 2000; Ruberto y col., 2003; Gomes y col., 2005; Coppotelli y col., 2008; Ibarrolaza y col., 2011), continúa siendo uno de los capítulos más controversiales de la biotecnología ambiental (Thompson y col., 2005; Fernández-Luqueño y col., 2011).

El bioaumentación podría aplicarse a suelos con un número bajo de microorganismos, o que contiene contaminantes que requieren procesos múltiples de remediación, en sitios donde los costos de los métodos no biológicos excedan el costo del bioaumentación. Por otra parte, el bioaumentación está recomendado en suelos donde los compuestos contaminantes generan largos períodos de aclimatación o adaptación (Mrozik y Piotrowska-Seget, 2010).

La sobrevivencia, el establecimiento y crecimiento de un microorganismo inoculado en la matriz de suelo es un proceso difícil ya que depende de muchos factores bióticos y abióticos. Los factores limitantes podrían ser el estrés causado por el cambio de condiciones de laboratorio a condiciones de campo, el tamaño del inóculo en relación a la biomasa del suelo, la competencia con la microbiota natural del suelo, la predación (Vázquez y col., 2013), la disponibilidad de aire o agua, la temperatura y, en el caso específico de los PAH, la biodisponibilidad de la fuente de carbono y energía (Jacques y col., 2008).

Pese a la gran variedad de especies bacterianas aisladas que son capaces de degradar PAH, no es de esperar que un solo microorganismo presente la habilidad de degradar completamente todos los PAH presentes en el suelo contaminado. Los consorcios microbianos proveen una degradación más efectiva del contaminante orgánico; ya que implica la acción concertada de diferentes microorganismos sobre un sustrato, mediante la combinación de sus actividades metabólicas cooperativas (Mueller y col., 1989; Bouchez y col., 1999; Yuan y col., 2000; Desai y col., 2010; Viñas y col., 2005).

1.4.1 Los consorcios microbianos como inoculantes

Un consorcio microbiano es una asociación natural de dos o más poblaciones microbianas, de diferentes especies, que actúan conjuntamente como una comunidad, donde todos se benefician de las actividades de los demás. En estas comunidades coordinadas, la biodegradación involucra la transferencia de sustratos y productos, un proceso conocido como cooperación metabólica (Megharaj y col., 2011).

El cultivo de consorcios debe ser preferencialmente utilizado cuando el objetivo es producir una asociación microbiana para ser usada como inoculante o cuando el objetivo es comprender el mecanismo intrínseco y los niveles tróficos existentes en una comunidad cuando se degrada un contaminante (Caldwell y col., 1997)

Los consorcios microbianos se pueden clasificar como consorcios definidos y consorcios no definidos. Los primeros están constituidos por una combinación de cepas aisladas con capacidades degradativas conocidas que son complementarias entre sí. Por otra parte, los consorcios no definidos son el resultado de procesos directos de enriquecimiento a partir de muestras ambientales con historia previa de contaminación (Dejonghe y col., 2003; Auffret y col., 2014; Fuentes y col., 2016). En esto últimos la población microbiana se selecciona naturalmente por su cooperación metabólica en la degradación del contaminante, lo que ofrecería una mejor eficiencia que el consorcio definido (Viñas Canals, 2005). Sin embargo, los consorcios no definidos presentan una desventaja importante con respecto a la conservación y cultivo. La criopreservación es uno de los métodos más utilizados, en el cual se acepta que gran parte de las células bacterianas mueren si se preservan largos períodos, sin embargo en el caso de cultivos puros una concentración de células alta es suficiente para mantener el cultivo. Contrariamente, en los consorcios microbianos la variación de la viabilidad de los diferentes microorganismos durante su preservación puede afectar las abundancias relativas de los microorganismos y así comprometer las características bioquímicas del cultivo (Alam y col., 2015). Por otro lado como los consorcios naturales se definen en función de sus capacidades metabólicas, es indispensable cultivarlos en presencia de la presión de selección utilizada para su obtención.

Es importante establecer evaluaciones previas en el laboratorio para caracterizar el consorcio microbiano y determinar su capacidad de remover el contaminante y aumentar la eficiencia de la biorremediación (Molina y col., 2009).

Se han propuesto tres mecanismos involucrados en la mejora de la degradación de PAH por consorcios microbianos: i) consorcios bacterianos que pueden mitigar la inhibición causada por los PAH en el crecimiento de algunas bacterias degradadoras del mismo y por lo tanto aumentar su eliminación (Bouchez y col., 1999) ii) la cooperación entre los diferentes genotipos de bacterias en el consorcio podría dar lugar a la aparición de diversas vías de degradación de PAH y así generar una rápida degradación (Bouchez y col., 1999). iii) los consorcios podrían realizar una vía completa de degradación del hidrocarburo ya que algunas cepas constituyentes degradarían los metabolitos acumulados (Luan y col., 2006; Zhong y col., 2011).

I.5 Inoculantes como invasores del microbioma del suelo

En la actualidad poco se entiende de cómo se comportan las cepas puras aisladas o los consorcios microbianos bajo condiciones ambientales y como interactúan con el microbioma nativo. El diseño de estrategias de bioaumento requiere el conocimiento del

potencial de los microorganismos inoculados de mejorar la eficiencia de degradación de los contaminantes presentes y su influencia en la comunidad microbiana nativa del suelo.

Desde una perspectiva ecológica el bioaumentación resulta una aplicación práctica del fenómeno de invasión. La invasión es el establecimiento de un microorganismo no nativo en una comunidad, logrando ser un indicador de la composición y estabilidad de la comunidad (Shade y col., 2012). Un mecanismo importante que limita la invasión en comunidades altamente diversas es la competencia por los nutrientes, el establecimiento de la especie invasora depende de la cantidad de recursos que no son consumidos por las especies nativas, y de la tasa a la que la especies nativas e invasoras los consumen (Van Elsas y col., 2012).

Las invasiones microbianas siguen un proceso secuencial comenzando con la (a) introducción, (b) el establecimiento, (c) el crecimiento y propagación y (d) el impacto del inoculante (Figura I.4). Una vez que el invasor (inoculante) superó las barreras abióticas se considera introducido al nuevo ambiente, por otra parte, las barreras bióticas hacen que el inoculante se mantenga en su fase de establecimiento mientras que sea capaz de mantener una población viable. Una vez establecido, si logra acceder a los recursos locales comienza su crecimiento y propagación, teniendo en cuenta que en la naturaleza la adquisición de nutrientes en un nuevo ambiente no está garantizada. Como consecuencia, un crecimiento neto positivo pondría en evidencia una invasión exitosa, donde el invasor se convierte en un residente autóctono. La introducción de microorganismos a un ambiente se considera exitosa cuando la/s especie/s introducida presenta/n la capacidad de alterar las interacciones dentro de una comunidad y generar cambios en la estructura de la comunidad e impactos neutrales, benéficos o negativos en el nuevo hábitat (Mallon y col., 2015).

La diversidad de una comunidad es una función de dos componentes. El primero es el número total de especies presentes en la muestra, conocido como riqueza de especies, y el segundo la distribución de los individuos entre las especies, lo que se conoce como equitatividad (Dejonghe y col., 2001). Las comunidades microbianas con un alto nivel de equitatividad son más resistentes a la invasión dado el solapamiento de nichos ecológicos de los taxones nativos. Es por este motivo que comprender la composición de la comunidad microbiana donde se planea ejecutar la estrategia de bioaumentación es un requisito para entender su éxito potencial (Helbling, 2015).

Por otro lado, dado que el éxito del bioaumentación depende en parte de la diversidad genética del invasor, la inoculación de consorcios bacterianos presentaría una ventaja frente a la utilización de cultivos puros (Bardi y col., 2006).

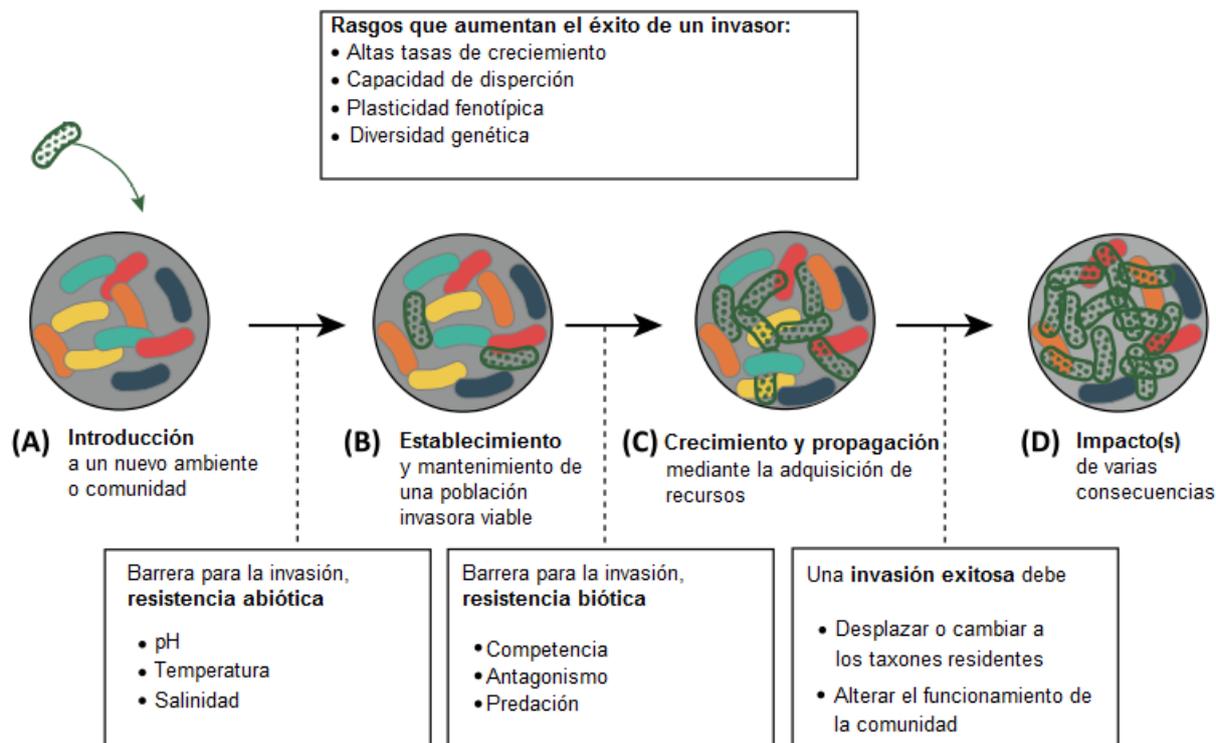


Figura I.4. Representación de una invasión exitosa de un microorganismo invasor (bacilo con puntos verdes) en una comunidad con varios taxones microbianos interpretados en distintos colores. Se muestra la transición de la misma comunidad microbiana en cada fase del proceso de invasión. Esquema adaptado de un trabajo de Mallon y col., (2015).

I.6 Biorremediación de suelos contaminados con Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos: una visión molecular

El estudio de las comunidades microbianas ha sido reconocido como un parámetro ecológico imperativo en el estudio de los procesos de biorremediación (Desai y col., 2010). La obtención de información esencial para el éxito de los procesos de biorremediación podría incluir: (1) la identificación de los microorganismos presentes en el suelo contaminado; (2) la investigación de sus capacidades metabólicas y (3) el entendimiento de los potenciales cambios en la comunidad microbiana en respuesta a los cambios en los factores ambientales, como la inoculación. (Uhlik y col., 2013).

Para lograr obtener esta información, inicialmente las muestras de ambientes contaminados se incuban en el laboratorio y se calculan las tasas de degradación o inmovilización del contaminante. Estos estudios estiman la potencial actividad metabólica de la comunidad microbiana, sin embargo brindan poca información acerca de los microorganismos que son responsables de la biorremediación (Lovley, 2003).

Para estudiar las comunidades microbianas de un ambiente puede utilizarse una estrategia secuencial en la que en el primer nivel se identifican o cuantifican los microorganismos presentes y en el segundo nivel se estudia la interacción entre cada uno de ellos y con el ambiente (influencia de factores bióticos y abióticos) (Gao y Tao, 2012). Se sabe relativamente poco acerca de los ensamblajes naturales microbianos (Ruan y col., 2006; Horner-Devine y col., 2007; Raes y Bork, 2008; Fuhrman y Steele, 2008; Fuhrman, 2009), ya que son generalmente taxonómicamente muy complejos y pueden estar compuestos de cientos de diferentes especies (Martiny y col., 2006). Además, las comunidades naturales son muy difíciles de recrear o de estudiar bajo condiciones controladas de laboratorio dado que muchos de sus componentes no logran ser cultivados (Staley y Konopka, 1985). La dificultad de cultivar estos microorganismos esta generalmente vinculada al lento crecimiento y los requerimientos nutricionales no conocidos, sin embargo puede también deberse a la existencias de relaciones sinicológicas (Chaffron y col., 2010).

Son necesarias nuevas técnicas de cultivo para aislar nuevas especies con influencia potencial en los ciclos claves de la biosfera, para evaluar las condiciones de vida de especies dominantes conocidas y por sobre todo para investigar la interacción funcional con el ambiente y el ecosistema global. (Gao y Tao, 2012).

Por otra parte, el análisis cultivo independiente de la estructura de la comunidad microbiana en sitios contaminados utilizando técnicas de perfil molecular ha sido fundamental en la comprensión de la dinámica de la comunidad, la abundancia relativa y la distribución de los microorganismos activamente involucrados en los procesos de biorremediación (Desai y col., 2010).

Desde los últimos 30 años, y especialmente en los últimos 10 años con la asistencia de la bioinformática, la exploración de las comunidades microbianas ambientales abarca un amplio rango de metodologías (más rápidas, más exactas y más sensibles) que facilita las investigaciones (Gao y Tao, 2012). El desarrollo de las herramientas de secuenciación del DNA en los últimos 30 años generó un verdadero cambio en la comprensión de las comunidades microbianas y su rol estructural en la dinámica biogeoquímica del suelo (Heidelberg y col., 2010), permitiendo acceder a los recursos genéticos de la gran mayoría de las especies microbianas presentes en el suelo, que antes escaparon al escrutinio científico.

La nueva generación de tecnologías de secuenciación masiva, NGS (*next generation sequencing*), presenta el potencial de revolucionar nuestra capacidad de entender el mundo microbiano (Liu y col., 2009). Las NGS son tecnologías muy poderosas que permiten investigar la composición de la compleja comunidad bacteriana de diferentes ambientes (van Kessel y col., 2011). No solamente focalizando el interés en la composición de la

comunidad sino también en los rasgos funcionales y la relación entre la comunidad microbiana con los factores ambientales (Langenheder y col., 2010).

Estos enfoques junto con las herramientas bioinformáticas aumentan la posibilidad de un estudio global de la ecología microbiana de los suelos contaminados, para lograr una profunda comprensión de las respuestas a cambios en el ambiente (Mendes y col., 2015).

Entre las plataformas de secuenciación más utilizadas durante los últimos años se puede mencionar a la pirosecuenciación (Roche 454) y la secuenciación por síntesis (Illumina) (Cortés-lópez y col., 2014).

Mediante pirosecuenciación se pueden analizar los heterogéneos productos de PCR provenientes de una comunidad de suelo sin la necesidad de ser clonados. Y al unir un código de barra a los *primers* es posible procesar una gran cantidad de muestras en una sola corrida (*multiplex barcoded pyrosequencing*) (Liu y col., 2008).

Si bien estas tecnologías NGS brindan mucha información sin conocer *a priori* la estructura de la comunidad, están sujetas a sesgos gracias a las limitaciones en la preparación de la muestras, en la amplificación por PCR y en la secuenciación (Bohorquez y col., 2012).

Las plataformas NGS producen millones de secuencias cortas, que varían en longitud desde decenas de pares de bases a 800 pares de bases. Si bien la longitud de las secuencias aumenta a medida que avanza la tecnología, son aún más cortas que lo deseado o que la longitud obtenida mediante Sanger (1000 bp). Consecuentemente, es necesario que posteriormente a la secuenciación se realice el ensamblado bioinformático de las secuencias obtenidas, el solapamiento de las secuencias para reconstruir secuencias completas o contiguas de DNA (contigs) (Cortés-lópez y col., 2014).

El análisis de secuencias largas y contiguas nos permite identificar marcos abiertos de lectura (ORF) y operones (Caporaso y col., 2012). Además las funciones de los genes vecinos de los genes target se puede revelar mediante el análisis de la secuencia completa del inserto. Las distancias inter-génicas tienden a ser más cortas entre genes del mismo operon que entre operones (Salgado y col., 2000) y los ORFs vecinos tienden a estar asociados funcionalmente (Overbeek y col., 1999; Suenaga, 2012).

La exploración de los genomas de la “mayoría no cultivable” se convirtió en posible gracias a la metagenómica, un método independiente de cultivo basado en la biología molecular que permite explorar el potencial metabólico de especies no cultivables mediante el clonado de grandes fragmentos de DNA aislado directamente del ambiente (Vasconcellos y col., 2010; Suenaga, 2012). La metagenómica desbloquea la “caja negra” en la que se encuentra la biomasa activa y ofrece un importante potencial para la mejora de los tratamientos de biorremediación (Jadeja y col., 2014).

Estas herramientas moleculares allanaron el camino para encontrar funciones de microorganismos dentro de las comunidades tanto en distribuciones temporales como

espaciales. La función de los microorganismos poco comunes merece especial atención debido a que especies poco dominantes en número no necesariamente son poco importantes para el sistema. Generalmente interactúan con las especies dominantes como proveedores de sustratos traza esenciales (Gao y Tao, 2012).

Considerando que se ha logrado evaluar solo el 1-2% del potencial biocatalítico de los microorganismos, los estudios metagenómicos ofrecen una herramienta de exploración de la comunidad microbiana total (Vasconcellos y col., 2010) para comprender la composición de la comunidad y asignar un rol a la microbiota no cultivable de un nicho particular (Sharma y col., 2008).

La construcción de bibliotecas metagenómicas comienza con una extracción y purificación del DNA de alta calidad dado que la concentración, la cantidad total y la calidad del DNA metagenómico suele ser un factor limitante (Cortés-lópez y col., 2014), luego se inserta el DNA purificado en vectores de clonado y se transforman las células huésped. El enfoque clásico incluye la construcción de bibliotecas con insertos de bajo peso molecular (<10 kb) en *Escherichia coli* como hospedador. Sin embargo, los insertos pequeños no permiten la detección de grandes *clusters* de genes u operones por lo que para clonar fragmentos más grandes (aproximadamente de 40 kb) se utilizan vectores de clonado como los fósmidos (Streit y Schmitz, 2004). Además, las bibliotecas de insertos grandes ofrecen una mayor posibilidad de encontrar *clusters* completos de genes funcionales y vincular una potencial función metabólica con un microorganismo específico, en el caso que genes funcionales y filogenéticos estén presentes en el mismo inserto (Stenuit y col., 2008).

El análisis de las bibliotecas metagenómicas se puede realizar a través de dos aproximaciones distintas; una se basa en el análisis de las secuencias obtenidas directamente del metagenoma mientras que la segunda se basa en la búsqueda de una actividad enzimática determinada (Handelsman y Handelsman, 2004).

La búsqueda de actividad enzimática, es probablemente la alternativa más prometedora. Las complejas bibliotecas se analizan para lograr encontrar nuevos genes o rutas metabólicas basadas en *screening* funcional, en la expresión fenotípica en las células huésped (Lorenz y Schleper, 2002).

La acumulación de set de datos de genes microbianos y genomas crece rápidamente, sin embargo la comprensión de la relevancia funcional y ecológica procede de manera muy lenta. La detección de rutas metabólicas gracias a la metagenómica abrió la puerta a los estudios post-genómicos para aumentar la comprensión de las redes genéticas y metabólicas de los microorganismos ambientales (Suenaga, 2012).

Los datos de metagenómica hablan de “quienes están en un ambiente” y de “qué son capaces de hacer”. Pero “qué es lo que efectivamente están haciendo” se revela evaluando los datos de transcripción (mRNA) y traducción (proteína). Esta correlación entre los perfiles

de expresión de genes y los cambios en la composición de la comunidad o de la propiedad funcional del ecosistema microbiano se pueden abordar de manera directa utilizando los enfoques ómicos (Suenaga, 2012). Estos enfoque podrían ayudar a definir los requerimientos nutricionales, las estrategias metabólicas y los nichos ecológicos de diversos microbiomas (Litchman y col., 2015). Las técnicas post-genómicas como la transcriptómica, la proteómica, la interactómica y la metabolómica junto con la metagenómica se pueden aplicar a estudios del proceso de biodegradación evitando el problema de la pérdida de los microorganismos no cultivables. Estas técnicas pueden además revelar cuan diferente es la respuesta de los microorganismos a los cambios ambientales dada la incorporación del contaminante (Ahmad y Ahmad, 2014).

La combinación de metagenómica y metaproteómica pueden brindar información valiosa sobre la estructura y la fisiología de diferentes grupos filogenéticos presentes en un ambiente específico (Schneider y Riedel, 2010).

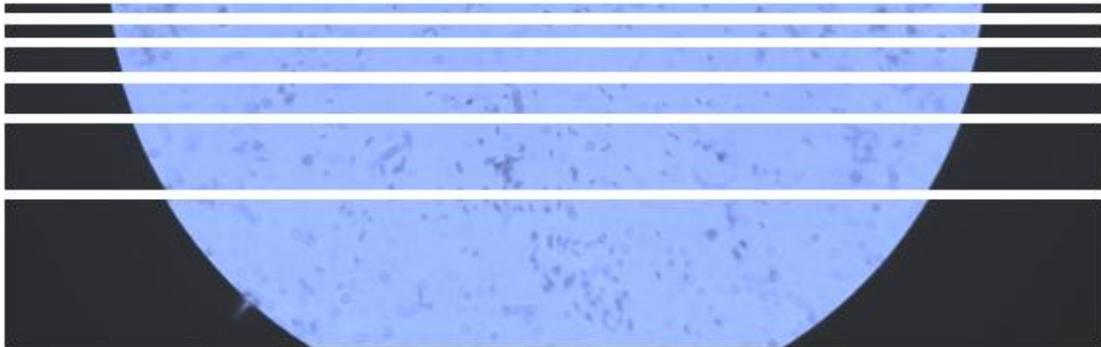
Para evaluar el potencial de degradación de un sitio contaminado, se espera que la metaproteómica represente un enfoque más poderoso que la metagenómica o la metatranscriptómica, dado que las proteínas son mejores biomarcadores de la actividad microbiana que los genes funcionales o los mensajeros (Stenuit y col., 2008). Las investigaciones basadas en proteómica son útiles para determinar cambios en la composición y la abundancia de proteínas, tanto como en la identificación de proteínas claves involucradas en la respuesta fisiológica de los microorganismos expuestos a contaminantes (Desai y col., 2010). El análisis de metaproteómica ofrecen una oportunidad única para ganar una perspectiva sin precedentes de la composición de especies y actividades biomoleculares dentro del complejo ensamblaje microbiano, de manera cultivo-independiente (Leary y col., 2014).

La proteómica se convirtió en una técnica más confiable y factible gracias a tres revoluciones técnicas: 1) el gran aumento de datos genómicos y metagenómicos que proveen una base sólida para la identificación de proteínas; 2) el progreso en la sensibilidad y exactitud de la espectrometría de masa que permite una correcta identificación de proteínas, una cuantificación absoluta y relativa y la determinación de modificaciones postraduccionales; 3) la mejora en el poder de la bioinformática que permite procesar y evaluar datos sustanciales (Schneider y Riedel, 2010).

El éxito de la este enfoque recae sobre tres factores, una correcta extracción de proteínas de un ambiente complejo, el fraccionamiento del péptido/proteína antes de su detección y su posterior identificación (Hettich y col., 2012). En metaproteómica, mezclas complejas de proteínas de una muestra se separan en un gel de electroforesis de una o de dos dimensiones (2D) o mediante cromatografía líquida de alta resolución (Stenuit y col., 2008), ambas se basan en la posterior identificación de los péptidos por espectrometría de masas.

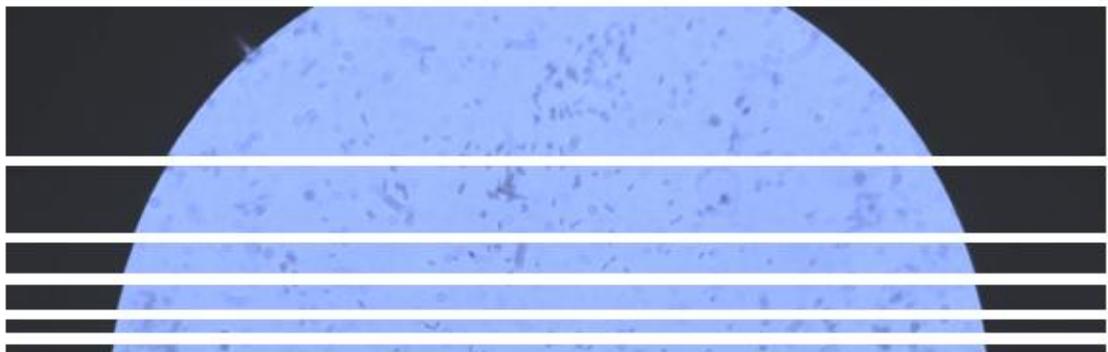
Esta predicción proteica y subsecuente identificación se facilitaron ampliamente con los datos metagenómicos disponibles (Stenuit y col., 2008).

Un enfoque metaproteómico, respaldado por la creciente disponibilidad de secuencias genómicas y el avance de las ómicas de alto rendimiento, nos permitirá obtener información acerca de la respuesta fisiológica general durante la degradación de PAH y a su vez puede mostrar los mecanismos metabólicos y regulatorios globales involucrados en el metabolismo de PAH, dando así prueba de la versatilidad de los microorganismos usados en biorremediación (Kim y col., 2009).



Capítulo II

Objetivos e Hipótesis



II. Objetivos e Hipótesis

El limitado conocimiento sobre la diversidad, dinámica y funcionalidad de las comunidades microbianas durante los procesos de biorremediación hace difícil clarificar la contribución biológica a la efectividad del proceso, considerando que los microorganismos son los mayores responsables de un proceso que sin dudas resulta útil para el manejo de problemas de contaminación.

Como consecuencia, aún en la actualidad, los procesos de biorremediación tienen resultados impredecibles y la efectividad de las estrategias de bioaumento continúa siendo discutible tanto desde el punto de vista científico como tecnológico.

Por lo antes expuesto se planteó como **objetivo general** de este trabajo:

Contribuir al mejoramiento de los conocimientos básicos relacionados con la ecología microbiana y la efectividad de estrategias de bioaumento, aplicadas a la biorremediación de suelos contaminados con PAH

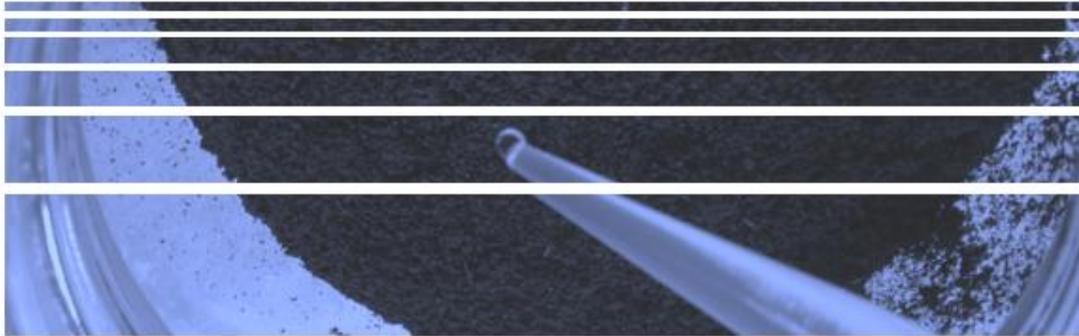
Se plantearon como **objetivos específicos**:

- I- Aplicar estrategias “ómicas”, metaproteómica y metagenómica, al estudio de la dinámica funcional de consorcios bacterianos durante la degradación de PAH en medio líquido.
- II- Estudiar el impacto de la inoculación con diferentes formulaciones bacterianas (consorcios, naturales y definidos, y cepas puras) sobre la estructura y dinámica de comunidades bacterianas de un suelo prístino contaminado con PAH.
- III- Estudiar el impacto de la inoculación con un consorcio natural y una cepa pura en la estructura y dinámica de comunidades bacterianas de un suelo crónicamente contaminado con PAH.
- IV- Correlacionar los cambios en la estructura y dinámica de las comunidades bacterianas con la efectividad del proceso de biorremediación.

Hipótesis

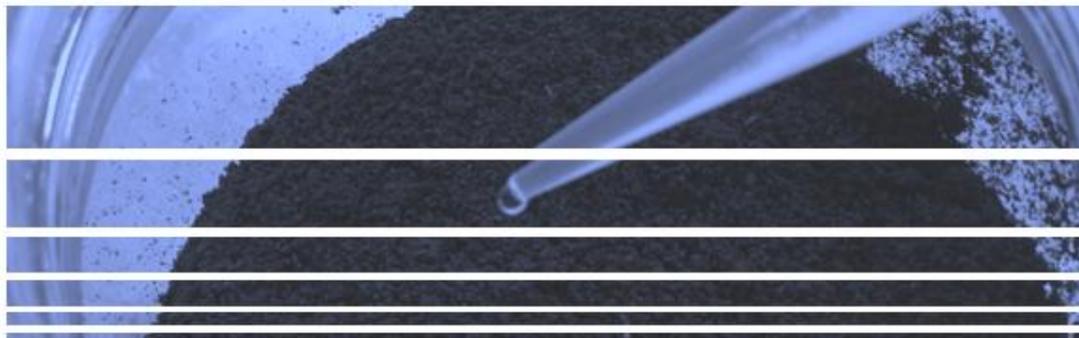
- I- La capacidad de interacción del inoculante con la población indígena del suelo receptor es un factor determinante de la efectividad del mismo.

- II- La inoculación de consorcios bacterianos es más eficiente, en término de eliminación del contaminante y recuperación de la diversidad microbiana, que la inoculación con cepas puras en ensayos de biorremediación de suelos contaminados con PAH.
- III- La aplicación de estrategias “ómicas” al estudio de la dinámica funcional de consorcios bacterianos degradadores de PAH proporcionará nuevos conocimientos sobre el potencial de los mismos
- IV- La aplicación de las nuevas técnicas de secuenciación masiva al estudio detallado de la dinámica estructural de las comunidades microbianas de suelos contaminados con PAH, durante los procesos de bioaumentación, nos permitirá dilucidar la respuesta de la comunidad microbiana a la incorporación del inoculante.



Capítulo III

Materiales y métodos



III. Materiales y métodos

III.1 Materiales

III.1.1 Medios de cultivo

Caldo R2 (Reasoner y Geldreich, 1985)

Composición en g.l⁻¹ de agua bidestilada

0,5 g Extracto de levadura

0,5 g Proteosa peptona

0,5 g Acidocasamino

0,5 g Glucosa

0,5 g Almidón

0,3 g Acido Pirúvico

0,3 g K₂HPO₄

0,05 g MgSO₄

El pH se ajusta a 7,2 con una solución de NaOH o HCl 10 % y se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

R2-Agar

Se agregan 15 g.l⁻¹ de agar (Difco) al medio de cultivo caldo R2.

Caldo R3

Composición en g.l⁻¹ de agua bidestilada

1 g Extracto de levadura

1 g Proteasa peptona

1 g Acidocasamino

1 g Glucosa

1 g Almidón

0,5 g Acido Pirúvico

0,6 g K₂HPO₄

0,1 g MgSO₄

El pH se ajusta a 7,2 con una solución de NaOH o HCl 10 % y se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

R3-Agar

Se agregan 15 g.l⁻¹ de agar (Difco) al medio de cultivo caldo R3.

Medio Mineral Líquido (MML) (Vecchioli y col., 1990)

Composición en g.l⁻¹ de agua bidestilada

5 g NaCl

1 g K₂HPO₄

1 g (NH₄)H₂PO₄

1 g (NH₄)₂SO₄

0,2 g MgSO₄

3 g KNO₃

El pH se ajusta a 7,2 con una solución de NaOH o HCl 10% y se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Medio Mineral Sólido (MMS)

Se agregan 15 g.l⁻¹ de agar (Difco) al MML.

Medio Mineral Sólido (MMS) + agarosa + PAH (Bogardt y Hemmingsen, 1992)

Se agregan 200 µl de una solución etanólica del hidrocarburo (8,5 mg.ml⁻¹) a un tubo conteniendo 3,5 ml de agarosa al 1 % previamente fundida y mantenida a 40°C y se mezcla en vortex. Inmediatamente se vuelca el contenido del tubo en una placa de Petri conteniendo una base de MMS.

Mezcla de PAH en pentano

La mezcla contiene 0,005 g de fenantreno (Carlo Erba, Milano, Italy, >99.5% pureza), 0,005 g de fluoreno (Carlo Erba, Milano, Italy, >99.5% pureza), 0,005 g de antraceno (Carlo Erba, Milano, Italy, >99.5% pureza) y 0,005 g de dibenzotiofeno (Carlo Erba, Milano, Italy, >99.5% pureza) cada 13 ml de solvente (pentano).

LB (Luria Bertani)

Composición en g.l⁻¹ l de agua bidestilada

5 g Levadura

10 g Triptona

10 g NaCl

LB agar

Se agregan 15 g.l⁻¹ de agar (Difco) al medio de cultivo caldo LB.

III.1.2 Buffers y soluciones para DGGE

Buffer TAE 40X

Composición en 0.5 l

96,8g TRIS

22,85 ml Acético Glacial

7,445g EDTA

500 ml Agua destilada

Solución de acrilamida –bisacrilamida 40%

Composición en 1 l

389,30g Acrilamida

10,70g Bisacrilamida

Solución desnaturalizante 0%

Composición en 1 l

25 ml de TAE pH 7,4 1X

150 ml de solución acril-bisacrilamida 40%

825 ml de agua destilada

Solución desnaturalizante 80%

Composición en 1 l

25 ml TAE pH 7,4 1X

150 ml Solución de acril-bisacrilamida 40 %

338 g Urea

320 ml Formamida

505 ml Agua destilada

III.1.3 Kits utilizados para la extracción y purificación de DNA

QIAGEN genomic tip 20G Cat N° 10223

QIAGEN Kit de purification Cat N° 28104

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

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

III.1.4 Buffers utilizados para la extracción de DNA para la construcción de la biblioteca metagenómica.

Buffer Tris-EDTA-Sucrosa (20%)

10 mM Tris
1 mM EDTA
20% p/v Sucrosa
Se ajusta a pH 8.

Buffer de extracción

100 mM Tris-HCl
100 mM EDTA
100 mM Na₂HPO₄
1.5 M NaCl
1% p/v SDS

III.1.5 Kits utilizados para la construcción de la biblioteca genómica y la extracción del fósido

CopyControl™ HTP Fosmid Library Production Kit with pCC2FOS™ Vector. Cat N° CCFOSO59

FosmidMAX™ DNA Purification Kit. Cat N° FMAX046

III.1.6 Medios de cultivo para pruebas bioquímicas

Coloración de Gram

Colorantes: Cristal violeta (Solución Britania) y Safranina (Solución Britania).

Soluciones diluidas: Las soluciones de colorantes se diluyeron 1 /10 en agua destilada.

Lugol: 10 g de Yodo y 20 g de ioduro de potasio (IK) en 1 l de agua destilada.

Decolorante: etanol 70%, acetona 30%.

Medio de cultivo oxidación-fermentación (OF base)

Composición en g.l⁻¹ de agua destilada

2g Peptona
5g NaCl
0,3g K₂HPO₄

0,3g Azul de bromotimol

3g Agar

pH final 7,1

Se agrega Glucosa hasta concentración final al 1%

Caldo Nitrato

Composición en g.l⁻¹de agua destilada

3g Extracto de carne

5g Peptona

1g NO₃K

Gelatina nutritiva

Composición en g.l⁻¹de agua destilada

3g Extracto de carne

5g Peptona

12g Gelatina

Medio de Simmons (Prueba de citrato de sodio)

Composición en g.l⁻¹de agua destilada

0,2g MgSO₄

0,1g (NH₄)H₂PO₄

1g K₂HPO₄

2g Citrato de Na

5g NaCl

15g Agar

0,08g Azul de Bromotimol

Agar Cetrimide

Composición en g.l⁻¹de agua destilada

20g Peptona de gelatina

1,4g MgCl₂

10g K₂SO₄

15g Agar

0,3g Cetrimida

III.1.7 Buffers y soluciones para proteómica.

Buffer de solubilización

Para un volumen final de 25 ml

10,25 g Urea (7M)

3,8 g Thiourea (2M)

1% Amberlite

0,25 g DTT

500 µl TritonX100

5 µl Phalloidin

1 pizca azul de Bromofenol

Buffer de equilibrio

Para un volumen final de 50 ml

2,5 ml Tris 1M pH:8

18 g Urea

15 ml Glicerol

10 ml SDS 10%

SDS-PAGE

Gel resolución 10%

1,67 ml Acrilamida-bisacrilamida

1,875 ml Tris-HCl pH 8,8

1,38 ml Agua bidestilada

50 µl SDS 10%

2,7µl Temed

27 µl Persulfato de Amonio (PAS)(10%)

Gel concentración 4%

325 µl Acrilamida-bisacrilamida

312,5 µl Tris-HCl pH 8,8

1875 µl Agua bidestilada

25 µl SDS 10%

2,5 µl Temed

12,5 µl PAS (10%)

Buffer de carga (2x)

1 ml Tris-HCl pH 6,8

4 ml SDS 10%

2 ml Glicerol (al 20%)
0,4 ml EDTA
2,6 ml Agua bidestilada
0,08 g Azul de bromofenol

Buffer de corrida Tris- Glicina-SDS pH: 8,3

Composición en g.l⁻¹ en agua bidestilada

15,1 g Tris (25 mM)
94 g Glicina (250mM)
50 ml de solución SDS 10 %

2° Dimensión

Gel resolución (10%)

13.88 ml Agua
11,66 ml Acrilamida-bisacrilamida (30%)
8,75 ml Tris 1,5M pH8,8
350 µl SDS 10%
350 µl PAS 10%
14µl Temed

Gel concentración

3,4 ml Agua
830 µl Acrilamida-bisacrilamida (30%)
630 µl Tris 1M pH 6,8
50 µl SDS (10%)
50 µl PAS (10%)
5µl Temed

Tinción coomasie coloidal

Solución fijadora

30% EtOH
2% ácido fosfórico

Solución de tinción

18% (v/v) MeOH
17 % (w/v) sulfato de amonio
2% (v/v) ácido fosfórico

III.2 Metodología

III.2.1 Características del suelo utilizado para la obtención del consorcio

Para la obtención de un consorcio bacteriano degradador de PAH se utilizó un suelo del barrio de Mosconi, (coordenadas S34°52'31" W57°55'10"), situado en la ciudad de Ensenada, perteneciente al polo petroquímico del partido de La Plata, Argentina. El suelo se analizó en el laboratorio de Ciencias de Suelo de la Universidad Nacional de La Plata y mostró las siguientes propiedades fisicoquímicas: una textura franco arcillosa, un pH de 6,54, 4,73% (p/p) de carbono orgánico, 8,16% (p/p) de materia orgánica, 0,32% (p/p) de nitrógeno total, 14,8 C/N, 6 mg.kg⁻¹ fósforo disponible y 643 mg.kg⁻¹ de hidrocarburos.

III.2.2 Obtención, conservación y reactivación de un consorcio degradador de fenantreno

El consorcio bacteriano se obtuvo a partir de suelo crónicamente contaminado con. Se comenzó con una suspensión de 2 g de suelo contaminado en 20 ml de MML y se incubó por 30 min a 150 rpm. Una vez que la suspensión del suelo decantó luego de la incubación, se transfirió una alícuota de 5 ml a un erlenmeyer con medio mineral líquido (MML) conteniendo 2000 mg.l⁻¹ de fenantreno y se incubó durante 7 días a 28 °C a 150 revoluciones por minuto (rpm). Posteriormente se realizaron 4 repiques sucesivos, cada uno se incubó 7 días en las condiciones mencionadas previamente. El cultivo final se preservó en glicerol 40 % a -80°C (solución stock) (Ruberto y col., 2009). Cada vez que fue necesario, se llevó a cabo la reactivación, que consistió en la inoculación del consorcio criopreservado a -80 °C, previa centrifugación a 13000 rpm durante 5 min y un lavado con solución fisiológica, en un erlenmeyer conteniendo 2000 mg.l⁻¹ de fenantreno como única fuente de carbono y energía y su incubación durante 7 días. Este cultivo se llamo CON.

III.2.3 Cinética de degradación de fenantreno

La degradación de fenantreno por parte de CON se determinó en MML con 200, 500 y 2000 mg.l⁻¹ de fenantreno como única fuente de carbono y energía. Cada sistema se inoculó con 1 ml de CON y se incubó a 28 °C y 150 rpm. El análisis se realizó por triplicado y en cada tiempo de muestreo se sacrificaron los erlenmeyers para la extracción química. El volumen total de los cultivos se mezcló con acetato de etilo (1:5 acetato de etilo/cultivo), se agitó durante 30 minutos a 150 rpm y se conservó la fase orgánica. Este procedimiento se repitió

tres veces. Se llevó a cabo además un control para evaluar la pérdida abiótica también por triplicado. El análisis de los extractos se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa utilizando un cromatógrafo Waters® con una columna SymmetryWaters® C18 (15 cm, 4.6 mm i.d., tamaño de perla 5 mm, tamaño de poro 100 Å) con un gradiente lineal metanol: ácido fosfórico (20:80 hasta los 15 minutos de corrida, 5:95 durante 2 minutos y posteriormente 20:80 hasta llegar a los 19 minutos de corrida) y un flujo de $1\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ (Coppotelli y col., 2010). Los espectros de absorción al UV (250,9 nm) se obtuvieron utilizando un detector 2996 fotodiodos (WatersR) y se analizaron con el software Empower.

Una vez seleccionada la concentración de trabajo, se determinó la cinética de degradación de fenantreno por parte de CON; para ello se prepararon erlenmeyers con 50 ml de MML suplementados con $200\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de fenantreno, se inocularon con 1 ml de CON y se incubaron a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 150 rpm. El análisis se realizó por triplicado y en cada tiempo de muestreo se sacrificaron los erlenmeyers para la extracción química. Se llevó a cabo además un control también por triplicado. La concentración de fenantreno remanente en los cultivos se determinó a los 0, 4, 7 y 15 días de incubación como se expuso previamente para los cultivos de 200, 500 y $2000\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de fenantreno como única fuente de carbono y energía.

III.2.4 Estudio de la dinámica de las poblaciones cultivables

III.2.4.1 Recuento de bacterias heterótrofas cultivables:

Las bacterias heterótrofas cultivables se determinaron por duplicado mediante diluciones seriadas 1/10 con solución fisiológica (Reasoner y Geldreich, 1985). Cada dilución se sembró en la superficie de placas con medio R2A y se esparcieron con la ayuda de una espátula de Drigalsky. Luego de una incubación de 7 días a 28°C se contaron las colonias

III.2.4.2 Recuento de bacterias degradadoras de PAH mediante técnica de NMP:

Las bacterias degradadoras de PAH se cuantificaron en microplacas estériles de 96 pocillos con MML y, como sustrato, una mezcla de PAH en pentano (Wrenn y Venosa, 1996). Una vez evaporado el pentano, dejando una fina capa de PAH en el fondo de cada pocillo, se cargaron los pocillos con $180\text{ }\mu\text{l}$ de MML y con $20\text{ }\mu\text{l}$ de las diluciones seriadas (1/10) de la muestra por octuplicado. Las placas se incubaron a $22 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 21 días.

Para enumerar las bacterias degradadoras se utilizó el método del Número Más Probable (NMP) tomando como pocillos positivos aquellos donde se observó una coloración amarilla/naranja luego del período de incubación mencionado.

III.2.5 Determinación de la diversidad de CON

III.2.5.1 A nivel de cultivables

III.2.5.1.i Aislamiento de cepas bacterianas del consorcio

A partir de las placas de R2A del recuento de bacterias heterótrofas cultivables se seleccionaron y se aislaron las bacterias cultivables predominantes según morfología y el aspecto de la colonia. Para cada uno de los cuatro tipos de colonias aisladas se realizó un repique en R3 y se las conservó en glicerol al 40% a -80°C.

III.2.5.1.ii Pruebas bioquímicas

A partir de un cultivo líquido en R3 y otro en agar inclinado R3A de 24 horas de cada una de las cepas aisladas de CON, se realizaron una serie de pruebas bioquímicas tales como: movilidad (observación de una gota de un cultivo de 24 hs entre porta y cubre), coloración de Gram, movilidad, oxidasa, reducción de nitrato y nitrito, producción de N_2 , actividad gelatinasa y catalasa, crecimiento en agar F y P, citrato, O/F (oxido/fermentación) (Hugh y Leifson, 1953), TSI y cetrimide (Gerhardt, 1981). La pureza de los cultivos fue controlada microscópica y macroscópicamente.

III.2.5.1.iii Identificación genotípica de las cepas aisladas

III.2.5.1.iii.1 Extracción del DNA de cada cepa

La extracción de DNA de las cepas aisladas se realizó mediante el método del hervor (Sambrook y col., 1989). A partir de un cultivo puro de 24 h de cada cepa en caldo R3, se centrifugó 1 ml a 13.000 rpm durante 5 minutos y se resuspendió el pellet en 1 ml de agua destilada. Esta suspensión de células se llevó a baño María 100 °C durante 10 minutos. Por último se centrifugó nuevamente a 13.000 rpm por 5 minutos y se conservó el sobrenadante. Luego se conservó a -20°C hasta su utilización.

III.2.5.1.iii.2 PCR del gen 16S rRNA completo

Para obtener el producto amplificado del gen 16S rRNA completo de las cepas aisladas se realizó una amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los

CTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') y 907R (5'-CCGTCAATTCCTTTG AGTTT) (Muyzer y col., 1998) La reacción de PCR contenía 1 µl de muestra, 1 U de GoTaq DNA Polimerasa (Promega, Madison, WI), Buffer de reacción 1x recomendado por el fabricante de la enzima, 200 mM de BSA, 0,2 mM de cada dNTPs y 5 µM de cada *primer* en un volumen final de reacción de 30 µl. La amplificación se realizó en un Eppendorf Mastercycler thermocycler (Eppendorf, Hamburg, Germany) y el programa consistió en 1 ciclo de 4 minutos a 94°C, 10 ciclos de 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 62°C y 1 minuto a 72°C; 25 ciclos de 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 57°C y 1 minuto a 72°C; una extensión final de 10 minutos a 72°C. Los productos de amplificación se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa 1,2 % con TAE como buffer de corrida, a 100 V durante 30 minutos. Posteriormente el gel se tiñó con Bromuro de Etidio (10 mg.ml⁻¹) y los productos de amplificación se visualizaron en un transiluminador UV (National Labnet Company, Modelo TM-26).

III.2.5.2.ii.2 Purificación del producto de PCR de las cepas aisladas

Los productos de amplificación provenientes de cepa pura se purificaron utilizando el kit NucleoSpin ®Extraxct II (Macherey-Nagel, GmbH & Co. KG, Alemania) según las instrucciones del fabricante.

III.2.5.2.ii.3 Análisis de la estructura de CON mediante PCR-DGGE.

La DGGE se realizó en una cuba DGGE-2000 System (C.B.S Scientific Company) a una temperatura de 60 °C, con buffer TAE 1x como buffer de corrida. Los productos de PCR purificados fueron directamente sembrados sobre un gel de poliacrilamida 6% p/v con un gradiente lineal de 40-70% de desnaturante (100% desnaturante corresponde a la mezcla de urea 7 M y formamida 40% v/v). La electroforesis se realizó a un voltaje constante y de 100 V durante 16 horas. Luego de la electroforesis, el gel se tiñó durante 30 minutos con SybrGold® (1X) (Invitrogen) a fin de evidenciar los resultados obtenidos. El gel fue documentado por GelDoc EQ (Bio-Rad, Hercules, CA).

III.2.5.2.iii Construcción y análisis de una biblioteca de genes 16S rRNA presentes en CON.

III.2.5.2.iii.1 Preparación de muestras para clonar

III.2.5.2.iii.1.a Banda obtenida del perfil de DGGE del consorcio

Del perfil de DGGE de CON se decidió cortar la banda dominante (B8). Se cortó bajo luz UV utilizando una espátula estéril y se incubó en 0,1 ml de agua destilada estéril a -80°C por media hora y luego a 4°C por 24 hs. Luego se conservó a -20°C hasta su utilización.

III.2.5.2.iii.1.b Reacción de PCR

Tanto el DNA de CON como el DNA eluído de la banda obtenida de DGGE se amplificaron con los *primers* 341F (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3') y 907R (5'-CCGTCAATTCCTTTGAGTTT-3') (Muyzer y col., 1998). Las concentraciones utilizadas de cada reactivo y el programa de amplificación coinciden con las concentraciones y el programa detallados en el inciso *III.2.5.2.ii.1* al igual que la metodología para la visualización de los productos de amplificación.

III.2.5.2.iii.1.c Purificación del producto de PCR

Los amplicones se purificaron con NucleoSpin® Extract II kit (Macherey-Nagel, GmbH & Co. KG, Alemania) según instrucciones del fabricante.

III.2.5.2.iii.2 Clonación

La biblioteca de clones de DNA del consorcio se construyó a partir del DNA de un cultivo de CON en MML con 200 mg.l⁻¹ de fenantreno como única fuente de carbono y energía, a los 4 días de incubación.

Una vez obtenido los amplicones se clonaron en el vector de clonado pGEM®-T (Promega) según las instrucciones del fabricante. La cepa utilizada fue *E.Coli* DH5α. Se utilizaron bacterias competentes químicas preparadas al momento de realizar el experimento y se transformaron mediante choque térmico. Una vez transformada las bacterias se plaquearon con la ayuda de una espátula de Drigalsky sobre la superficie de una placa de petri conteniendo medio LB con ampicilina (MP Biomedicals LLC) (100 µg.ml⁻¹), IPTG (Invitrogen) y X-gal (Fermentas) (0.1M y 50 mg.ml⁻¹ respectivamente) y se incubaron *overnight* (ON, durante la noche) a 37°C. Para la muestra correspondiente a la banda de DGGE se seleccionaron 5 clones positivos mientras que para CON se seleccionaron todos los clones conteniendo el vector recombinante. De cada clon positivo se realizó un repique en medio solido LB con ampicilina y se incubó ON a 37°C.

III.2.5.2.iii.3 Extracción de DNA de los clones positivos

A partir del repique de cada clon positivo se tomó una fracción de la estría y se realizó la extracción de DNA mediante el método del hervor (inciso *III.2.5.1.iii.1*)

III.2.5.2.iii.4 Verificación de la presencia del inserto

Se verificó el tamaño correcto del inserto de cada clon positivo mediante una reacción de PCR con los *primers* SP6 (5'TATTTAGGTGACACTATAG'3) y T7 (5'TAATACGACTCACTA TAGGG'3) que se encuentran flanqueando al inserto sobre el vector de clonado. La reacción de PCR consistió en 1 µl del DNA de cada clon, 1 U de GoTaq DNA Polimerasa, el buffer recomendado por el fabricante de la enzima, 200 mM de BSA, 0,2 mM dNTPs y 5 µM de cada *primer* en un volumen de reacción total de 30 µl. La amplificación se realizó en un termociclador Eppendorf® Mastercycler® (Eppendorf, Hamburg, Germany). El programa incluyó un paso inicial de desnaturalización de 1 ciclo de 5 min a 95°C; 30 ciclos de 40 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C y 1 minutos a 72°C y una extensión final de 10 minutos a 72°C. El producto PCR fue analizado por electroforesis en gel de agarosa 1,2% a 90 V por media hora, utilizando TAE como buffer de corrida. La metodología para la visualización de los productos de amplificación se describió en el inciso *III.2.5.2.ii.1*.

Aquellos clones que presentaron el inserto del tamaño buscado se enviaron a secuenciar a Macrogen, Korea. Las secuencias de nucleótidos obtenidas se compararon con aquellas en la base de datos del NCBI GenBank utilizando el software BLAST.

III.2.5.2.iii.5 Análisis filogenético

Para estudiar la relación filogenética entre las secuencias de gen 16S rRNA de la banda predominante en el perfil de DGGE de CON, de las cepas aisladas, de los clones de la biblioteca de CON y de secuencias seleccionadas disponibles en la base de datos GenBank se construyó un árbol utilizando el método Neighbor-Joining y el algoritmo p-distance basándose en la matriz de distancia obtenida en base al alineamiento de todas las secuencias, obtenido con Clustalw. Tanto el alineamiento como el árbol se realizaron utilizando el programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA version 4.0) (Tamura y col., 2007). La robustez del árbol fue testada mediante el análisis de 500 iteraciones (bootstrap).

III.2.5.2.iv Estudio de la composición bacteriana de CON mediante 454-Pirosecuenciación

Todo el proceso de pirosecuenciación, basado en protocolos establecidos y validados, se llevó a cabo en el laboratorio de investigación molecular MrDNA (Shallowater, TX) (<http://www.mrdnalab.com/>).

Se realizó una amplificación por PCR sobre la muestra de DNA total de CON extraído a los 4 días de incubación para obtener un fragmento de 568 pb del gen 16S rRNA conteniendo las regiones V3 y V4. Se utilizaron *primers* universales para bacterias, modificados con un código de barras. Los *primers* utilizados fueron 341Fbac (CCTACGGGAGGCAGCAG) (Muyzer y col., 1993) y 909R (CCCCGYCAATTCMTTTRAGT) (Tamaki y col., 2011). La reacción de PCR se llevo a cabo utilizando HotStarTaq Plus Master Mix Kit (Qiagen, Valencia, CA) bajo las siguientes condiciones: 1 ciclo de 94°C por 3 minutos, seguido de 28 ciclos a 94°C por 30 segundos; 53°C por 40 segundos y 72°C por 1 minuto; una extensión final a 72°C durante 5 minutos. La muestra se secuenció utilizando los instrumentos y reactivos de Roche 454 FLX titanium siguiendo las instrucciones del fabricante.

III.2.5.2.iv.1 Análisis del set de datos de pirosecuenciación.

Los datos de secuenciación generados por el procesamiento de alto rendimiento se analizaron utilizando un *pipeline* desarrollado en el laboratorio de investigación molecular MrDNA. Se eliminaron en primer lugar los códigos de barras y los *primers* de las secuencias obtenidas. Posteriormente se eliminaron aquellas secuencias cortas <200 pb con bases ambiguas y las secuencias con homopolímeros mayores a 6 pb. Se eliminó el ruido de las secuencias y las quimeras utilizando un software personalizado (Dowd y col., 2008a, 2008b) y el software B2C2 Black Box Chimera Check (disponible en <http://www.researchandtesting.com/B2C2.html>). Se chequeó la alta calidad de las secuencias basándose en el criterio utilizado por RDP versión 9 (Cole y col., 2009).

Los datos de secuenciación se agruparon en Unidades Taxonómicas Operacionales (OTU) con un 3% de divergencia utilizando uClust. Los OTUs se clasificaron taxonómicamente utilizando el algoritmo BLASTn.NET (Dowd y col., 2005) contra una base de datos de alta calidad de secuencias del gen 16S rRNA derivada de GreenGenes (10-2011 version) (Edgar, 2010). Los resultados se compilaron y se validaron utilizando métodos taxonómicos basados en distancias (Dowd y col., 2008b, 2008c).

La taxonomía se definió en base a los siguientes porcentajes: >97%, especie; entre 97% y 95%, género sin clasificar; entre 95% y 90%, familia sin clasificar ; entre 90% y 85%, orden sin clasificar; entre 85% y 80%, clase sin clasificar; entre 80% y 77%, filo sin clasificar; <77%, sin clasificar.

Para el análisis estadístico de los datos, se calcularon los números de Hill. Los números de Hill se definen por el orden “q” (^qD), donde el parámetro “q” indica el peso dado a especies

raras o comunes. Estos números comprenden la riqueza de especies [0D], el exponencial de la entropía de Shannon [1D] y la inversa del índice de Simpson [2D] (Hill, 1973). 0D es insensible a las frecuencias relativas, y por lo tanto se pondera hacia especies raras. 1D se pondera hacia especies comunes, y 2D se pondera hacia especies abundantes. La riqueza de especies (0D) se estimó mediante Chao1-bc, una forma corregida de Chao1 (Chao, 2004). Las curvas de rarefacción y las medidas riqueza y la diversidad se calcularon utilizando el programa EstimateS (versión 9) (Colwell, 2013). El índice de Good estima el porcentaje total de OTUs bacterianos representados en la muestra, da información sobre la cobertura del análisis. Cuando su valor se acerca a 1.0 indica que las secuencias obtenidas representan la mayoría de las secuencias bacterianas presentes en la muestra (Rungrasamee y col., 2013).

III.2.6 Análisis funcional de CON

III.2.6.1 Análisis fisiológico de las cepas aisladas

III.2.6.1.i Degradación de fenantreno en medio sólido

Se sembró una estría de cada cepa sobre una placa conteniendo medio mineral sólido (MMS) con una doble capa de agarosa suplementada con fenantreno según Bogardt y Hemmingsen (1992). Las placas se incubaron a 28 °C durante 21 días. Se consideró que el cultivo aislado presentó la capacidad de degradar o solubilizar el PAH en el caso que sea posible observar un halo claro de solubilización alrededor de la estría de siembra.

III.2.6.1.ii Crecimiento y degradación de fenantreno como única fuente de carbono y energía en medio líquido.

Se realizaron cultivos de cada cepa (10^7 células. ml^{-1} provenientes de un cultivo líquido en R3 de 24 h) por triplicado en 10 ml de MML suplementado con 200 mg.l^{-1} de fenantreno como única fuente de carbono y energía y se incubaron durante 7 días a 28 °C y 150 rpm. Previo a ser inoculadas en el medio con fenantreno se les realizó un lavado con solución fisiológica.

El análisis de degradación se realizó por triplicado y en cada tiempo de muestreo se sacrificaron erlenmeyers para la extracción química. Se llevó a cabo además un control para evaluar la pérdida abiótica también por triplicado. Se realizaron una serie de tres extracciones químicas utilizando acetato de etilo como solvente (tal como se describió en el

inciso *III.2.3*). El análisis de los extractos se realizó por HPLC utilizando un gradiente metanol: ácido fosfórico (inciso *III.2.3*).

III.2.6.1.iii Degradación de fenantreno en medio suplementado con factores de crecimiento

El ensayo se llevó a cabo por triplicado, de la misma manera que el inciso *III.2.6.1.ii*, solo que además de fenantreno se suplementó al medio $0,05 \text{ g.l}^{-1}$ de extracto de levadura. La degradación se analizó a los 15 días de incubación.

III.2.6.1.iv Crecimiento y degradación de metabolitos intermediarios de la degradación de fenantreno

Se realizaron cultivos de las cepas en MML y 100 mg.l^{-1} de ácido 1-hidroxi-2-naftoico (7 días de incubación) como única fuente de carbono y energía por una parte y 100 mg.l^{-1} de ácido salicílico (2 días de incubación) como única fuente de carbono y energía por otra.

El ensayo se realizó por triplicado de igual manera que en el inciso *III.2.6.1.ii*. Para los cultivos con ácido salicílico se realizó una acidificación a pH 2,5 con HCl concentrado y se realizó una serie de extracciones con acetato de etilo (Coppotelli y col., 2010) (inciso *III.2.3*). El análisis de los extractos se realizó por HPLC utilizando un gradiente metanol: ácido fosfórico (inciso *III.2.3*).

III.2.6.1.v Determinación de la presencia de genes dioxigenasa

Las dioxigenasas catalizan el primer paso de la ruta de degradación de PAH (Jurelevicius y col., 2012) incorporando oxígeno molecular al anillo aromático. Para determinar la actividad inicial de la enzimas dioxigenasa se utilizó el método descrito por Zocca y col., (2004). El método se basa en la conversión de indol a índigo catalizada por enzimas dioxigenasa. Se realizaron aislamientos de cada cepa en placas de petri con medio R2A y una vez crecidos los aislamientos se adicionaron cristales de indol sobre las tapas de las placas de petri y se incubaron a 28°C hasta observar la aparición de coloración azul gracias a la formación de índigo.

III.2.6.1.vi PCR con primers dirigidos a genes dioxigenasa

Se determinó la presencia de genes dioxigenasa en CON y en las cepas aisladas utilizando un set de *primers* diseñados por Cébron y col., (2008); PAH-RHD α GN-F 610 (GAGATG-CATACCACGTKGGTTGGA) y PAH-RHD α GN-R 916 (AGCTGTTGTTCCGGGAAGAYWGTGCMGTT). La reacción de PCR se llevó a cabo en 30 μ l y contenía 2 μ l de DNA, 0.2 mM de dNTPs, 0.2 mM de cada *primer*, 1.25 U de GoTaq DNA Polimerasa (Promega, Madison, WI) y su Buffer de reacción 1x. La amplificación se llevó a cabo en un Eppendorf Mastercycler thermocycler (Eppendorf, Hamburg, Germany) y el programa consistió en un paso de destanuralización inicial de 5 min a 94°C, seguido de 5 ciclos a 94°C durante 1 minuto; 46°C durante 2 minutos; y 1 min at 72°C; posteriormente 30 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 55°C; y 72°C durante 1 minuto. La extensión final se llevo a cabo a 72°C durante 10 min. El producto PCR fue analizado por electroforesis en gel de agarosa 1,2% a 90 V por media hora, utilizando TAE como buffer de corrida. La metodología para la visualización de los productos de amplificación se describió en el inciso *III.2.5.2.ii.1*.

Además se testearon otros sets de *primers*, sin embargo no se obtuvieron resultados positivos (Wilson y col., 1999; Lloyd-Jones y col., 1999; Baldwin y col., 2003; Chadhain y col., 2006; Zhou y col., 2006; Leigh y col., 2007; Ding y col., 2010)

III.2.6.1.vi Ensayo de producción de biosurfactantes

El método de agar sangre es un método de *screening* preliminar de microorganismos con la habilidad de producir biosurfactantes en un medio hidrofílico (Mulligany col., 1984). Se cree que cepas que presentan capacidad hemolítica podrían ser productoras de biosurfactantes (Thavasi y col., 2011). Se realizó un repique de cada una de las cepas en placas de petri conteniendo Agar Bordet Gengou base con la incorporación de 1% de glicerol y 15% de sangre de carnero y se incubó a 25°C de 2 a 7 días.

III.2.6.2 Estudio de las interacciones fisiológicas entre las cepas aisladas del consorcio

III.2.6.2.i Dinámica de los distintos morfotipos en el consorcio

Se realizó de la misma manera que en el inciso *III.2.4.1* a los 0,4, 7 y 15 días de incubación. Para cada tiempo se registró el número de los distintos morfotipos de colonias.

III.2.6.2.ii Degradación de fenantreno en medio líquido por parte de las combinaciones de cepas

Se realizó de la misma manera que la cinética de degradación de fenantreno de las cepas individuales (inciso *III.2.6.1.ii*). Se analizó la degradación de fenantreno y la producción de ácido 1-hidroxi-2-naftoico y ácido salicílico luego de 2 y 7 días de incubación.

La serie de extracciones químicas y el análisis de los extractos se realizaron de igual manera que en los incisos *III.2.6.1.ii* y *III.2.6.1.iv*.

III.2.6.3 Aplicación de estrategias ómicas al estudio de la funcionalidad de CON

III.2.6.3.i Análisis metagenómico funcional del consorcio

III.2.6.3.i.1 Extracción de DNA de alto peso molecular de CON

Se preparó un cultivo de CON en MML y 200 mg.l⁻¹ de fenantreno y se incubó a 28 °C y 150 rpm. Al día 2 de incubación se realizó la extracción de DNA metagenómico del consorcio con el fin de obtener fragmentos mayores a 23 kb. El protocolo utilizado fue el descrito por Entcheva y col., (2001). La calidad del DNA extraído se corroboró mediante electroforesis en gel de 20 cm de agarosa 1% en TAE 1X a 30 v durante 20 horas. La corrida se realizó a bajas temperaturas para evitar evaporaciones del buffer.

III.2.6.3.i.2 Construcción de la biblioteca metagenómica

La construcción de la biblioteca metagenómica se realizó utilizando como vector de clonado el fósido pCC2FOS™ y el kit CopyControl™ HTP Fosmid Library Production Kit with pCC2FOS™ Vector de Epicentre® según las instrucciones del fabricante. La biblioteca se construyó en cinco etapas: 1) Reparación y selección de fragmentos de DNA genómico bacteriano mayores a 23 Kb, 2) Ligación de los fragmentos de DNA en el vector pCC2FOS y empaquetamiento de los fósidos en las cápsidas vacías del fago Lambda, 3) Infección de *E. coli* EPI300 T1R 4) Screening y almacenamiento de clones transformantes, 5) Extracción del fósido, digestión y secuenciación cada clon positivo.

Todos los reactivos utilizados (salvo especificación) fueron proporcionados por el Kit empleado.

III.2.6.3.i.3 Reparación y selección de fragmentos de DNA genómico mayores a 23 Kb

Luego de corroborar la buena calidad del DNA se realizó la reparación a extremos romos y la fosforilación de los extremos del DNA para su posterior clonación según las instrucciones del fabricante del kit. Se utilizó una concentración de aproximadamente $155.4 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ de DNA. Posteriormente se realizó una electroforesis en gel de 20 cm de agarosa de bajo punto de fusión (USB, Affymetrix) 1% en Buffer TAE 1X durante 20 horas a 30V. La corrida se realizó a bajas temperaturas para evitar evaporaciones del buffer. Con el fin de extraer del gel los fragmentos del tamaño buscado se realizó una división del gel, donde la parte conteniendo la muestra de DNA no fue ni teñida ni expuesta a luz UV. Como guía para la selección de fragmentos superiores a 23 kb se utilizó otra sección del mismo gel teñida con Bromuro de Etidio ($10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) conteniendo un marcador de peso molecular (Lambda DNA/Hind III) y el fósido control de 42 kb. Se purificó el DNA seleccionado a partir del taco de agarosa mediante una reacción enzimática con gelasa ($1 \text{ U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$) de acuerdo a las instrucciones del fabricante del kit.

III.2.6.3.i.4 Ligación de los fragmentos de DNA en el vector pCC2FOS y empaquetamiento de los fósidos en las cápsidas vacías del fago Lambda

Aproximadamente 148 ng de DNA reparado y fosforilado se utilizaron en la reacción de ligación al vector de clonado pCC2FOSTM. Los fósidos generados se incubaron con el extracto de empaquetado del fago Lambda tal como se especifica en las instrucciones del fabricante del kit. Se realizó lo mismo pero con un fósido control, para luego titular las partículas de fago con el fin de determinar el número de placas necesarias y las diluciones requeridas para realizar la biblioteca con el DNA de CON.

III.2.6.3.i.5 Infección de E. coli EPI300 T1R

Se realizó la infección de *E. coli* EPI300 T1R como indican las instrucciones del fabricante. Se plaquearon las células infectadas en LB con $12.5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ de cloranfenicol. Se realizó una dilución de las células infectadas con el objetivo de lograr manipular el número de colonias resultantes (aproximadamente 200 colonias por placa). Como resultado se obtuvieron aproximadamente 8000 clones.

III.2.6.3.i.6 Screening y almacenamiento de clones transformantes

Con cada clon se sembró un agar LB conteniendo $12.5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ de cloranfenicol y se los conservó a 4°C. Una vez finalizado el repique total de los clones, en cada placa se realizó un

lavado con LB para levantar las células y se lo conservó en glicerol al 30% a -80°C (suspensión de clones).

Se llevaron a cabo distintas estrategias para el *screening* funcional para la identificación de clones conteniendo genes codificantes para enzimas involucradas en la degradación de hidrocarburos aromáticos. Una de ellas consistió en repicar cada suspensión de clones en una placa de 96 pocillos con MML y una mezcla de PAH (inciso III.2.4.2). Como segunda estrategia se realizó un análisis molecular. Se llevó a cabo una PCR con los *primers* diseñados por Cébron y col., (2008) (inciso III.2.6.1.vi). Para ello se comenzó con una extracción de DNA de la suspensión de clones por el método del hervor (inciso III.2.5.1.iii.1). Otra estrategia consistió en realizar un repique (con el método del manguito y terciopelo) de cada uno de los aproximadamente 8000 clones en LB con $12.5\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ cloranfenicol y crecerlos ON a 37°C . Una vez crecido el repique se incubaron durante 6 horas con cristales de fenol y luego se realizó el método del *spray* con una solución acuosa de catecol como sustrato (Nelson y col., 1987). La enzima catecol 2-3 dioxigenasa es la responsable de romper el anillo aromático del catecol generando 2-hidroximucónico semialdehído, un compuesto amarillo que puede ser sencillamente detectado a simple vista en la colonia luego de 30 minutos de incubación (Nelson y col., 1987).

Además sobre estos clones positivos se realizó un segundo *screening* con una solución de $20\ \text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ de 2,3-dihidroxibifenilo en acetona, donde, como en el caso del *spray* de catecol, la colonia mostró a una color amarilla luego de 30 minutos de incubación.

Ambos métodos de *screening* se realizaron en placas de LB diluido 1/10 con $12.5\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ cloranfenicol (Dr. Howard Junca, comunicación personal).

III.2.6.3.i.7 Extracción del fósido, digestión y secuenciación de los clones positivos

Para la secuenciación de los clones positivos se realizó una extracción del fósido de cada clon positivo a partir de un cultivo en LB con $12.5\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de cloranfenicol y una solución de autoinducción del kit. La extracción del fósido se realizó con el FosmidMAX™ DNA Purification Kit siguiendo las instrucciones del fabricante. La calidad del fósido extraído se corroboró mediante una electroforesis en un gel de agarosa 0,8%. La corrida se realizó a 70 V durante 2 horas.

La digestión se realizó con algunos fósidos a modo de control. Se llevó a cabo con $1\ \mu\text{g}$ de DNA con las enzimas Not1 y EcoR1 según las instrucciones del fabricante. Se incubaron las digestiones 24 h a 37°C y los fragmentos obtenidos se analizaron en una electroforesis en gel de 20 cm de largo de agarosa 0,8% durante 16 hs a 30V. La corrida se realizó a bajas temperaturas para evitar evaporaciones del buffer.

Los clones positivos fueron secuenciados en 3 pools mediante la plataforma de secuenciación Illumina en el Instituto de Agrobiotecnología Rosario (INDEAR, Rosario, Argentina).

III.2.6.3.i.8 Secuenciación de los fósmidos

Se chequeó la calidad de las lecturas crudas utilizando el protocolo de Illumina Nextera® XT 90. El ensamblaje *De-novo* de las lecturas generadas se realizó utilizando el *pipeline* de la plataforma A5-miseq (V.2.0) (Tritt y col., 2012). A partir del DNA ensamblado se eliminó manualmente la secuencia del vector.

III.2.6.3.ii Determinación del metaproteoma del consorcio.

III.2.6.3.ii.1 Obtención de proteínas de CON

Se prepararon 14 erlenmeyers con 500 ml de MML suplementado con 200 mg.l⁻¹ de fenantreno y se inocularon con 10 ml de CON. Se incubaron a 28 °C a 150 rpm. Los cultivos se cosecharon para obtener las proteínas de CON a dos tiempos, a los 4 y 15 días de incubación. Sobre los cultivos se efectuó una centrifugación suave para obtener las células (10 minutos a 6.000 rpm). Se lavó dos veces el *pellet* y se resuspendió con agua bidestilada, llevando a una DO_{580 nm} de 20 aproximadamente. A la muestra se le agregaron 2,5 µl (cada 4 ml de muestra) del cóctel de inhibidores de proteasas y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF). Las células se rompieron con un agitador mecánico hasta clarificación. Luego la muestra se centrifugó dos veces 20 minutos a 8.000 rpm, reteniendo el sobrenadante. Se le adicionaron 3 volúmenes del buffer de solubilización y se sometieron a agitación suave durante 60 minutos. Se centrifugó 10 minutos a 13.000 rpm. Para realizar la determinación de la concentración de proteínas en la muestra se utilizó el Qubit fluorometer (Invitrogen) para proteínas. El ensayo se realizó por duplicado.

III.2.6.3.ii.2 SDSPAGE

Luego de la preparación de los geles de acrilamida concentración y separación se utilizó un Mini-PROTEAN Tetra Cell, 4 gel System (BIO-RAD) para llevar a cabo la electroforesis durante 2h a 100V (se aumenta el voltaje de 50V a 100V una vez que las muestras hayan llegado al final del gel concentración). Las proteínas se visualizaron por tinción con Coomassie blue G 250 y el gel fue documentado por GelDoc EQ (Bio-Rad, Hercules, CA).

III.2.6.3.ii.3 Isoelectroenfoque

Se utilizaron tiras de IPG de 18 cm en el rango de pH 4-7 (Immobiline Dry Strips, Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia). Las proteínas solubilizadas fueron cargadas en la tira de gradiente de pH 4-7 tal como se describió en Sanchez y col., (1999). El isoelectroenfoque (IEF) se realizó en una unidad Multiphor II de electroforesis (Amersham Biosciences). Se utilizó el siguiente programa: 500 V de 0.01 h (1 Vh), 3500 V de 1,30 h (gradiente, 3000 Vh), 3500 V de 5,40 h (20 kVh), lo que resulta en una tensión total de 23 kVh. Las tiras focalizadas fueron almacenadas a -80 °C hasta su posterior uso. Para su preparación para la segunda dimensión, las tiras IPG fueron incubadas 15 minutos en 10 ml de buffer de equilibrio (50 mM Tris-Cl, pH 8,8; 6M de urea, 30% (v / v) de glicerol, 2% (p / v) SDS, y 0.002% (p / v) de azul de bromofenol), luego 15 minutos en la misma solución adicionada con 20 mM DTT y por último se realizó una incubación de 15 minutos en buffer de equilibrio suplementado con 300 mM de acrilamida para su reducción y alquilación.

III.2.6.3.ii.4 Segunda dimensión

Después del paso de reducción/alquilación, las tiras IPG se colocaron en la parte superior de un gel al 12% de acrilamida SDS-PAGE y se selló con un solución 0,5% de agarosa en buffer de electroforesis. La electroforesis se realizó a corriente constante (25 mAmp por gel) a 20°C hasta que la migración frontal en el gel llegara al final del mismo, utilizando una unidad de electroforesis PROTEAN II xi 2-D (Bio-Rad, Hercules, CA) conectada a un baño de refrigeración II Multitemp (GE Healthcare). Las proteínas se visualizaron por tinción con Coomassie blue G 250 y el gel fue documentado por GelDoc EQ (Bio-Rad, Hercules, CA).

III.2.6.3.ii.5 Análisis de las imágenes de los geles.

El análisis de imágenes se realizó con el software ProteomeWeaver (Definiens, Munich, Alemania). Cada condición de crecimiento (día 4 y día 15) se evaluó al menos por dos réplicas independientes de geles.

III.2.6.3.ii.6 Identificación de proteínas

Los spots seleccionados para análisis fueron cortados del gel con un tip de micropipeta y se colocaron en un eppendorf con 50 µl de agua bidestilada. Se analizaron en la Unidad de Proteómica de la Universidad Complutense de Madrid (Madrid, España) y en la Universidad de Buenos Aires (CEQUIBIEM). El análisis de las proteínas se realizó por MALDI TOF/TOF

MS/MS y como motor de búsqueda para lograr identificar las distintas proteínas de las muestras se utilizó MASCOT (Matrix Science, London, U.K.).

III.2.7 Preparación de microcosmos de suelo artificialmente contaminados con fenantreno y de suelo crónicamente contaminado con PAH.

III.2.7.1 Características de los suelos seleccionados

Se utilizaron dos tipos de suelo para los ensayo de bioaumentación en microcosmos, un suelo no contaminado proveniente de un parque ubicado en un área cerca de la ciudad de La Plata, Argentina (para la preparación de los microcosmos artificialmente contaminados) y un suelo proveniente de una planta de tratamiento por *landfarming* de un residuo petroquímico con altas concentraciones de PAH (para la preparación de los microcosmos crónicamente contaminados). Ambos suelos se analizaron en el laboratorio de Ciencias de Suelo de la Universidad Nacional de La Plata y mostraron las propiedades fisicoquímicas que se muestran en la tabla III.1.

	Suelo prístino	IPK
Coordenadas	34°51'24.6"S 58°06'54.2"W	34° 53' 19" S 57° 55' 38"W
Textura	franco arcilloso	franco
pH	5,8-5,9	7,71
Carbono (%)	3,60	2,2
Materia orgánica (%)	6.21	3,78
Nitrógeno (%)	0,30	0,2
Fósforo (mg.kg ⁻¹)	4,20	8,33
C/N	12,16	11
CE (mS.cm ⁻¹)	1,1	2,72
Hidrocarburos alifáticos (mg.kg ⁻¹)	nd	199,70
PAH (mg.kg ⁻¹)	nd	885,96
Hidrocarburos totales (mg.kg ⁻¹)	50	nd

Tabla III.1 Propiedades fisicoquímicas de los dos suelos utilizados en los ensayos de bioaumentación en microcosmos. CE: conductividad eléctrica

III.2.7.2 Preparación de los cultivos usados como inóculo.

El consorcio se cultivó en MML (Vecchioli y *col.*, 1990) suplementado con 2000 mg l⁻¹ de fenantreno (Carlo Erba, Milan, Italy, >99.5% pureza) por 7 días a 28°C y 150 rpm y se filtró posteriormente para eliminar los cristales de fenantreno, se centrifugó, se lavó con agua

destilada y se resuspendió en 0,85% de solución fisiológica. Para el caso de las cepas AM y Bc se preparó un cultivo en R2 (Reasoner y Geldreich, 1985) por 24 hs a 28°C y 150 rpm, luego las células se centrifugaron, se lavaron (para eliminar fuentes de carbono) y se resuspendieron en 0,85% de solución fisiológica.

III.2.7.3 Preparación de los microcosmos de suelo artificialmente contaminado con fenantreno

Los microcosmos de suelo consistieron en 0,5 Kg de suelo tamizado (2 mm de poro) en un contenedor de vidrio con una capacidad de 1 Kg. Los microcosmos se contaminaron artificialmente con 2000 mg de fenantreno (Carlo Erba, Milan, Italy, >99.5% pureza) por Kg de suelo seco. El fenantreno fue agregado al suelo en una solución de acetona y luego mezclado manualmente con una espátula.

Se llevaron a cabo cinco tratamientos, cada uno por triplicado:

- (1) Phe: Suelo contaminado y no inoculado.
- (2) Phe+CON: Suelo contaminado con fenantreno e inoculado con 1×10^8 ufc de CON por gramo de suelo seco
- (3) Phe+CD: Suelo contaminado con fenantreno e inoculado con $0,5 \times 10^8$ ufc de la cepa *Sphingobium* sp. AM y $0,5 \times 10^8$ ufc de la cepa *Pseudomonas* sp. Bc por gramo de suelo seco
- (4) Phe+AM: Suelo contaminado con fenantreno e inoculado con 1×10^8 ufc de la cepa *Sphingobium* sp. AM por gramo de suelo seco
- (5) Phe+Bc: Suelo contaminado con fenantreno e inoculado con 1×10^8 ufc de la cepa *Pseudomonas* sp. Bc por gramo de suelo seco

Los inoculantes fueron agregados un día después de agregar el fenantreno al suelo.

Se llevaron a cabo dos controles, cada uno por triplicado:

- (1) SP: Suelo prístino, sin agregado de fenantreno
- (2) SP+AM: Suelo prístino, sin agregado de fenantreno e inoculado con 1×10^8 ufc de la cepa *Sphingobium* sp. AM por gramo de suelo seco

Para estandarizar el contenido de humedad de todos los microcosmos se agregó el mismo volumen de agua agregado a los microcosmos inoculados (adicionada con el inóculo) a Phe y a SP. Todos los microcosmos fueron incubados a $24 \pm 2^\circ\text{C}$ en oscuridad durante 63 días y se mezclaron semanalmente para airearlos. El contenido de humedad se corrigió cuando fue necesario a $20 \pm 2\%$ adicionando agua destilada.

III.2.7.4 Preparación de los microcosmos de suelo crónicamente contaminado con PAH.

Se realizó de igual manera que para el caso de la preparación de los microcosmos de suelo contaminado artificialmente con fenantreno. Se llevaron a cabo dos tratamientos, cada uno por triplicado:

- (1) IPK-CON: Los microcosmos se inocularon con 1×10^8 ufc de CON por gramo de suelo seco.
- (2) IPK-AM: Los microcosmos se inocularon con 1×10^8 ufc de la cepa *Sphingobium* sp. AM por gramo de suelo seco.

Se llevo a cabo un control por triplicado (IPK-Control).

Todos los microcosmos fueron incubados a $24 \pm 2^\circ\text{C}$ en oscuridad durante 63 días y se mezclaron semanalmente para airearlos. El contenido de humedad se corrigió cuando fue necesario a $20 \pm 2\%$ adicionando agua destilada.

El suelo IPK recientemente tamizado se llamó Suelo Inicial.

III.2.7.5 Determinación de la concentración de hidrocarburos en suelo.

III.2.7.5.i Microcosmos de suelo artificialmente contaminado con fenantreno

El fenantreno se extrajo a partir de una muestra de suelo (25 g) mezclada con Na_2SO_4 anhidro (25 g), utilizando como solvente acetato de etilo, durante 6 hs en un Soxhlet. La concentración de fenantreno en los extractos de acetato de etilo se determinó por HPLC (Coppotelli y col., 2010) utilizando un cromatógrafo Waters con una columna SymmetryWaters® C18 (15 cm, 4,6 mm ,5 mm, tamaño de poro 100 Å). y un detector 2996 photodiodearray (Waters®). Los espectros de absorción al UV (250,9 nm) obtenidos se analizaron con el software Empower.

III.2.7.5.ii Microcosmos de suelo crónicamente contaminados con PAH.

Para la extracción de hidrocarburos totales presentes en las muestra de suelo de los microcosmos se mezclaron 2 g de suelo con 4 g de Na_2SO_4 anhidro y se colocó la muestra en un tubo falcon de 50 ml con 6 ml de una mezcla de solventes 1:1 acetona/diclorometano, se sonicó durante una hora, se centrifugó a 2000 rpm durante 10 minutos, se retiró el solvente y se lo colocó en un frasco color caramelo para su evaporación. Este procedimiento se repitió 3 veces para extraer todos los hidrocarburos de la muestra, colocando cada vez el solvente en el mismo frasco caramelo hasta evaporación. Una vez evaporada la muestra se

resuspendió en un volumen de 2 ml de diclorometano, se sónico durante 10-15 minutos y se filtró en una jeringa de vidrio con un filtro de nylon 0.45 µm.

Posteriormente se colocaron en un vial 180 µl de muestra con 20 µl de estándar interno (dibenzotiofeno) y se procedió a la inyección de 5 µl de muestra en el cromatógrafo de forma manual con una jeringa Hamilton de 10 µl.

Las muestras se analizaron en un cromatógrafo gaseoso Perkin Elmer con un detector de ionización de llama (GC-FID) utilizando nitrógeno como gas *carrier*. El puerto de inyección se mantuvo a una temperatura de 280°C y el detector a 300°C. La temperatura del horno se seteó inicialmente a 50°C (4 minutos). Luego como primer paso se aumentó la temperatura a 150°C a una tasa de 4°C por minuto y como segundo paso a 280°C a una tasa de 10°C por minuto (tiempo final de 15 minutos). La columna utilizada fue una columna PE-5HT (30 m x 0.25 mm x 0.10 µm). La adquisición y manejo de datos se realizó con un asistente de computadora, PE NELSON Model 1022 (Del Panno y col., 2005). Para determinar la concentración de PAH e hidrocarburos alifáticos se realizaron curvas de calibración a partir de patrones comerciales marca RESTEK (NJEPA Aromatic Frac. CheckMix y 610 PAH Calibration Mix A).

III.2.7.6 Determinación del contenido de humedad

Se determinó el peso luego del calentamiento de la muestra de suelo a 105°C durante 24 h, y la diferencia se expresó como porcentaje de humedad.

III.2.7.7 Recuento de microorganismos viables.

III.2.7.7.i Preparación de las suspensiones microbianas

Para determinar bacterias heterótrofas cultivables y degradadoras de PAH se suspendieron 10 g de suelo húmedo de cada microcosmo en 90 ml de 0,85% NaCl, se homogenizaron por 30 minutos a 250 rpm. Luego de dejar decantar durante 5-10 minutos las partículas en suspensión, el sobrenadante obtenido se considera representativo del total de la comunidad microbiana incluyendo las células adsorbidas sobre las pequeñas partículas de la suspensión de tierra.

Se realizaron diluciones seriadas (1/10) de la suspensión de tierra en solución fisiológica y a partir de ellas se determinó el número de microorganismos cultivables de las diferentes poblaciones.

III.2.7.7.i.1 Recuento de bacterias heterótrofas cultivables en medio R2A

Se sembraron 0,1 ml de cada dilución en la superficie del medio de cultivo, por triplicado y se esparcieron con espátula de Drigalsky. Las placas se incubaron durante 10 días a 22 ± 2 °C. El resultado se expresó como número de UFC.g⁻¹ de suelo seco (Reasoner y Geldreich, 1985)

III.2.7.7.i.2 Recuento de bacterias degradadoras de PAH en MML suplementado con un mezcla de PAH

El número de bacterias degradadoras de PAH se determinó en placas de 96 pocillos. Para enumerar las bacterias degradadoras se utilizó el método del Número Más Probable (NMP) tomando como pocillos positivos aquellos donde se observó una coloración amarilla/naranja luego del período de incubación mencionado (Wrenn y Venosa, 1996). Se realizó de igual manera que se describió en el inciso *III.2.4.2*

El resultado se expresó como NMP de bacterias degradadoras de PAH.g⁻¹ de suelo seco.

III.2.7.8 Medida de la actividad deshidrogenasa

El método mide la actividad deshidrogenasa de células intactas. El Tricloruro de 2,3,5-trifenil-2H-tetrazolium, TTC (sustrato) es reducido a Trifenilformazan (TPF) que es detectado colorimétricamente a 546 nm (Thalmann, 1968). En el procedimiento se pesan 5 g de tierra húmeda en frascos de 50 ml de capacidad y se agregan 5 ml de una solución de TTC preparada al 1% en buffer Tris (100 mM). El pH del buffer utilizado varía según el pH de la muestra, en nuestro caso 7,7. La determinación se realiza por triplicado. Como blanco de reacción se incuba la muestra con buffer sin el agregado de la solución de TTC. Los frascos cerrados son incubados a 30°C durante 24 h. Luego de transcurrido el tiempo de incubación se frena la reacción con 40 ml de acetona. Se dejan en la oscuridad durante 2 h agitándose cada 30 minutos. Posteriormente una porción del extracto de la muestra de tierra se filtró y se leyó su absorbancia a 546 nm contra el extracto correspondiente al blanco. Debido a la sensibilidad frente a la luz de las soluciones de TTC el procedimiento se realiza bajo luz difusa.

Los resultados son expresados como µg de TPF producido por gramo de suelo seco utilizando una curva de calibración.

Para la curva de calibración se preparó una solución estándar de 50 mg de TPF disuelto en 100 ml de acetona. A partir de esta solución se transfirieron 0,5-1,0- 2,0- 3,0 y 4,0 ml a los respectivos matraces de 50 ml de capacidad. Se le agregó a todos 8,3 ml de buffer pH 7,6 y

se enrasaron a volumen con acetona. A continuación se midió la absorbancia de las soluciones a 546 nm, correspondiendo a 5, 10, 20, 30 y 40 µg de TPF/ml respectivamente.

III.2.7.9 Estrategias moleculares para la caracterización de las comunidades presentes en los microcosmos.

III.2.7.9.i Extracción de DNA total de suelo

El DNA total de las muestras de suelo fue extraído y purificado a partir de 1 g de suelo utilizando el Kit comercial E.Z.N.ATM Soil DNA (Omega Bio-tek, Norcross, GA, USA) a los 2, 7, 14, 21, 28 y 63 días de tratamiento. En el caso de los microcosmos de suelo crónicamente contraminados se realizó una modificación del protocolo del kit: El primer paso de ruptura de células se repitió 3 veces.

III.2.7.9.ii Amplificación por PCR de una región conservada del gen 16S rRNA

Solo se realizó para los microcosmos de suelo artificialmente contaminado (inciso III.2.5.2.ii.1).

III.2.7.9.iii Clonación de DNA de suelo de los microcosmos

Solo se realizó para los microcosmos de suelo artificialmente contaminado (III.2.5.2.iii.2).

III.2.7.9.iii.1 Extracción de DNA de los clones positivos

Inciso III.2.5.2.iii.3

III.2.7.9.iii.2 Verificación de la presencia del inserto

Inciso III.2.5.2.iii.4

III.2.7.9.iii.3 Análisis filogenético

Inciso III.2.5.2.iii.5

III.2.7.9.iv DGGE

Solo se realizó para los microcosmos de suelo artificialmente contaminado (inciso *III.2.5.2.ii.3*).

Una vez obtenido el gel de DGGE con las muestras de cada microcosmo, el gel se digitalizó en una cámara-CCD y se analizó utilizando el software GelComparII (AppliedMaths, Kortrijk, Belgium). Se determinaron las densidades ópticas de las bandas. Estos perfiles de densidad sirvieron como base para calcular la matriz de similitud usando el coeficiente de Jaccard y la posterior construcción del dendrograma (UPGMA) (Sokal y Michener, 1958). Los números de cada rama representan las correlaciones cofenéticas, las cuales nos muestran cuán bien la estructura jerárquica del dendrograma representa a las verdaderas distancias.

La matriz de similitud obtenida utilizando el GelComparII (AppliedMaths, Kortrijk, Belgium) se analizó posteriormente con el paquete estadístico Primer 6 (version 6.1.13; Primer-E Ltd., United Kingdom). El escalamiento multidimensional (MDS) es un método de ordenamiento que puede reducir un complejo perfil de DGGE a escala bidimensional (Fromin y col., 2002). Mayor es la distancia entre los puntos, mayores las diferencias en la composición de la comunidad.

III.2.7.9.v Cálculo de índices de Shannon

Los datos obtenidos del perfil de bandas a través del GelCompar II (curva densitométrica), fueron utilizados para calcular los índices de diversidad de Shannon y CHAO1 utilizando el programa Paleontological Statistics, PAST (Hammer y col., 2001).

III.2.7.9.vi PCR, pirosecuenciación y análisis de datos

El estudio de la composición bacteriana de los microcosmos de los suelos artificialmente y crónicamente contaminados se realizó mediante pirosecuenciación de un fragmento del gen 16S rRNA a dos tiempos de incubación distintos, a los 14 y a los 63 días. Además, se realizó el análisis al día 2 de incubación para el microcosmo SP y para el Suelo Inicial (SI).

La pirosecuenciación se realizó por duplicado para las muestras del día 14 de los microcosmos de suelo artificialmente contaminados.

El procedimiento utilizado fue el mismo que el descrito en los incisos *III.2.5.2.iv* y *III.2.5.2.iv.1* La única diferencia fue que posteriormente a la realización de la reacción de PCR, los amplicones obtenidos de todas las muestras se mezclaron en concentraciones iguales y luego se purificaron utilizando Agencourt Ampure beads (Agencourt Bioscience Corporation, MA, USA).

Por otra parte, dado que las medidas de riqueza y diversidad son influenciadas por la profundidad de secuenciación, la normalización se realizó a través de re-muestreo y la

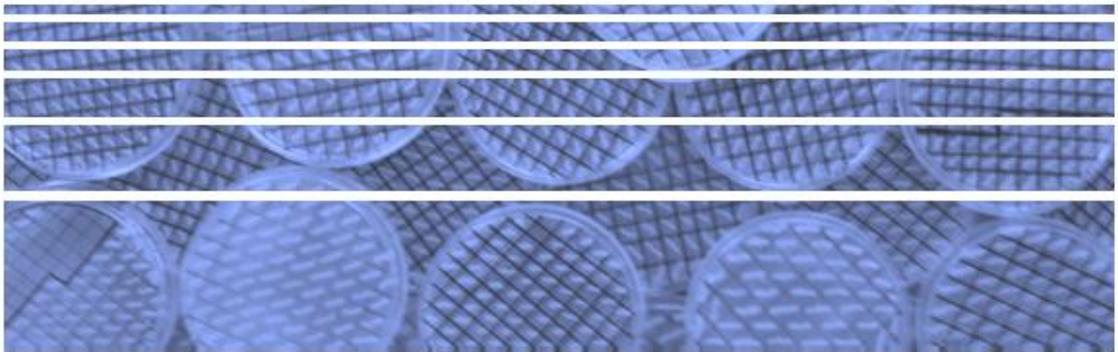
diversidad estimada se calcula a partir de 905 secuencias para los microcosmos de suelo prístino y 906 para los microcosmos de suelo crónicamente contaminado (correspondientes al número de lecturas en la comunidad más superficialmente muestreada) que fueron seleccionados al azar en cada muestra.

El análisis de correspondencia se realizó utilizando los valores de frecuencia de cada OTU en el software NTSySpc (Versión 2.11W). Por otra parte, para estudiar el número de OTUs que compartieron las distintas muestras se llevó a cabo un diagrama de Venn. Por último para el análisis de las comunidades a nivel de género se construyó un doble dendrograma jerárquico con un mapa de intensidades de color. Tanto el diagrama de Venn como el doble dendrograma jerárquico se construyeron en el software estadístico R, versión 3.1.2 (R Core Team 2014) utilizando el paquete “VennDiagram” (Chen, 2014) y “Vegan” (Oksanen y col., 2015) respectivamente.

III.2.7.10 Análisis estadístico

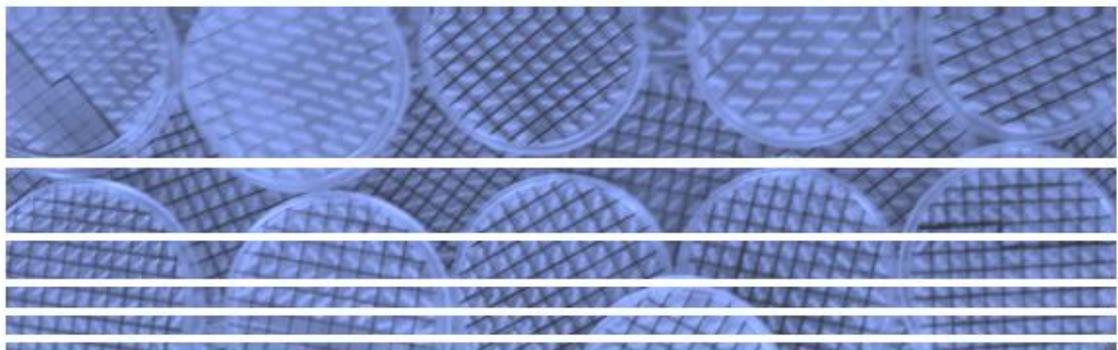
Se calcularon los valores promedios y las desviaciones estándar de tres réplicas en los valores de la degradación de PAH, el tamaño de las poblaciones de bacterias heterótrofas y degradadoras y del análisis de la actividad biológica.

Los valores promedio fueron comparados por el test de análisis de varianza (ANOVA) $P < 0,05$. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software del programa SigmaPlot/SigmaStat (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). Se realizó un análisis de one-way ANOVA post-hoc test Tukey (HSD) utilizando el paquete estadístico XLStat-Pro versión 7.5.2 (Addinsoft SARL, France).



Capítulo IV

*Obtención y caracterización de un
consorcio bacteriano degradador
de fenantreno*



IV. Obtención y caracterización de un consorcio bacteriano degradador de fenantreno

Cuando se deben realizar trabajos complejos es más inteligente dividir el trabajo en tareas más simples e incluir especialistas, para asegurar resultados positivos para todos los miembros del equipo. Este principio laboral se aplica también a los microorganismos responsables de la degradación de compuestos orgánicos complejos, como los PAH (Morris y col., 2013). En comparación con los monocultivos, los consorcios microbianos serían una mejor alternativa para la degradación de estas moléculas (Ahmad y Ahmad, 2014). Los microorganismos en la naturaleza existen en consorcios que les proveen robustez y una amplia capacidad metabólica (Hays y col., 2015). Las interacciones microbianas son la primera ventaja de los consorcios y determinan su estructura y función (Escalante y col., 2015). Los consorcios probablemente no constituyen una simbiosis en su sentido clásico pero están típicamente interpretadas como asociaciones sintróficas (Chaffron S y col., 2010). Sintrofia significa “alimentarse juntos” y puede ser definida específicamente como un proceso metabólico que ocurre entre organismos termodinámicamente interdependientes, mutuamente beneficiados, donde el metabolismo de un compuesto mediado por un solo microorganismo genera un producto final que se mantiene en bajas concentraciones por el consumo vía un segundo microorganismo (Gieg y col., 2014).

El primer objetivo de este trabajo de tesis fue obtener y caracterizar un consorcio bacteriano degradador de PAH para ser utilizado como inoculante en estrategias de bioaumentación de suelos contaminados con PAH. La obtención de dicho consorcio se llevó cabo a partir de un suelo crónicamente contaminado con hidrocarburos debido a que un suelo con estas características, con una larga historia de contaminación, permite la selección de microorganismos adaptados (Ruberto y col., 2003), esperando que la respuesta de estas comunidades previamente expuestas a compuestos del petróleo sea más rápida y específica (Païssé y col., 2010).

IV.1 Resultados

IV.1.1 Obtención de un consorcio degradador de Fenantreno

Para la obtención de un consorcio bacteriano natural degradador de fenantreno, se utilizó la técnica de enriquecimientos sucesivos en cultivos batch. A partir de 2 g de suelo crónicamente contaminado con hidrocarburos, proveniente del barrio Mosconi de la ciudad de Ensenada, La Plata, Argentina. Se realizaron cuatro repiques sucesivos en medio mineral

líquido (MML) suplementado con 2000 mg.l^{-1} de fenantreno como única fuente de carbono y energía. Luego del último repique, al consorcio obtenido, que se denominó CON, fue conservado a -80°C con glicerol. Cada vez que fue necesaria su utilización, se lo reactivó a partir del stock criopreservado.

La degradación de fenantreno se evidenció por la aparición de un color ocre de variada intensidad, tanto en el cultivo inicial como en los cultivos de enriquecimiento y en cada cultivo de reactivación, debido a la acumulación de productos de degradación (Figura IV.1).

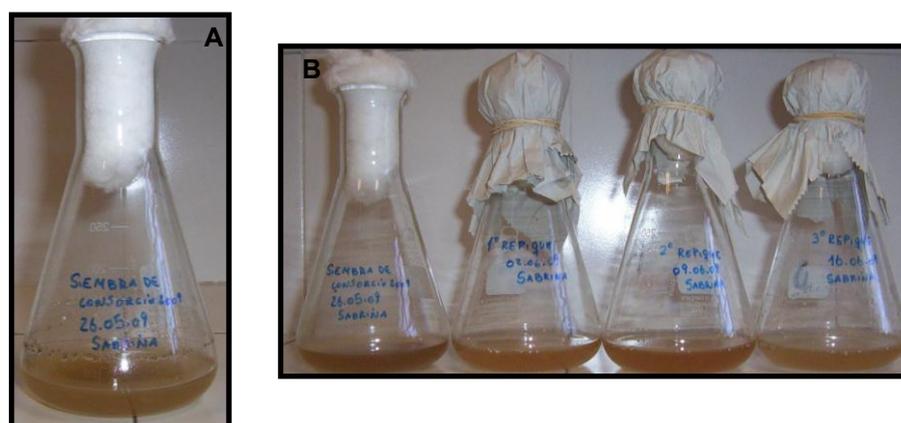


Figura IV.1. (A). Cultivo inicial a partir del suelo crónicamente contaminado (B). Tres de los repiques sucesivos.

Se estudió la capacidad de CON de degradar fenantreno a distintas concentraciones (2000, 500 y 200 mg.l^{-1}) en MML durante 15 días de incubación. La concentración a la cual se obtuvo el mayor porcentaje de degradación fue 200 mg.l^{-1} , dicho valor fue 59% y se alcanzó luego de 7 días de incubación (Figura IV.2). Por este motivo en los futuros ensayos se utilizó esta concentración de fenantreno.

Concomitantemente con la degradación de fenantreno se observó la acumulación de ácido 1-hidroxi-2-naftoico, uno de los intermediarios metabólicos de la ruta de degradación del fenantreno. La concentración del ácido 1-hidroxi-2-naftoico en cultivos de CON en MML creciendo en fenantreno como única fuente de carbono y energía, se incrementó durante los primeros 7 días de incubación llegando a un valor aproximado de $28,16 \pm 10,1 \text{ mg.l}^{-1}$ (Figura IV.2), que luego se mantuvo constante hasta el día 15 de incubación.

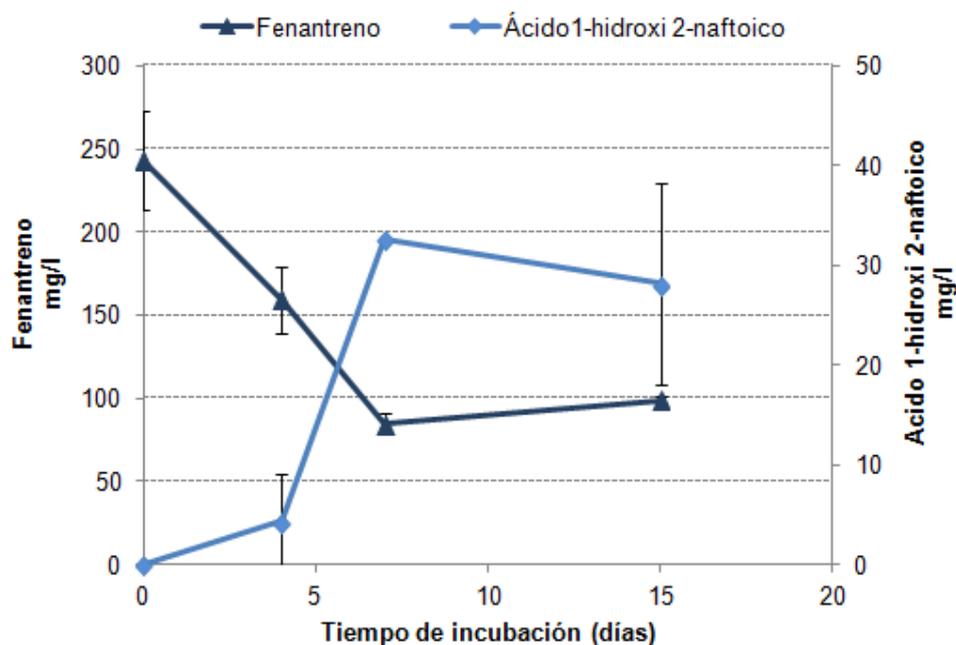


Figura IV.2. Cinética de degradación de CON en MML suplementado con 200 mg.l^{-1} de fenantreno durante 15 días de incubación. Se determinó la concentración de fenantreno y la concentración del ácido 1-hidroxi-2-naftoico. Se grafica el valor promedio de tres ensayos independientes con su respectiva desviación estándar.

V.1.2 Estudio de la dinámica de las poblaciones cultivables

Se estudió la dinámica de distintas poblaciones cultivables presentes en CON, durante la degradación de fenantreno en MML. Se realizaron recuentos de bacterias heterótrofas cultivables (en medio R2A) y de bacterias degradadoras de PAH (en placas de 96 wells conteniendo una mezcla de PAH). En la figura IV.3 se puede observar un aumento en el número de bacterias heterótrofas cultivables durante los primeros 5 días de incubación, para luego disminuir, alcanzando a los 15 días de incubación un número de heterótrofas cultivables similar al inicial. Por otra parte, el número de bacterias degradadoras de PAH aumentó hasta el día 7 de incubación y luego disminuyó bruscamente (4 órdenes de magnitud), alcanzando valores significativamente menores a los obtenidos al comienzo del ensayo. Esta disminución fue coincidente en el tiempo con la interrupción de la degradación de fenantreno.

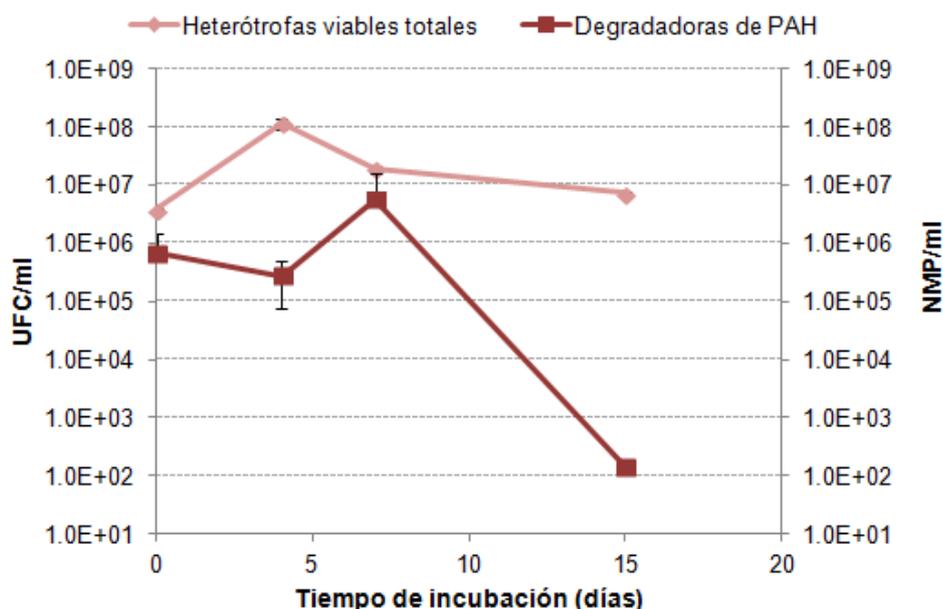


Figura IV.3. Recuento de bacterias heterótrofas cultivables y bacterias degradadoras de PAH en cultivos de CON en MML con 200 mg.l⁻¹ de fenantreno como única fuente de carbono y energía, durante 15 días. Se grafica el valor promedio de tres ensayos independientes con su respectiva desviación estándar.

IV.1.3 Determinación de la diversidad de CON

IV.1.3.1 A nivel de cultivables

La primer apreciación acerca de la diversidad de CON se realizó a partir de los recuentos de bacterias heterótrofas cultivables en R2A, en base al análisis morfológico de las colonias. Se lograron distinguir 3 morfotipos distintos: colonias blancas, colonias amarillas y colonias transparentes. Dentro del morfotipo de colonia blanca se observaron dos tipos de colonias distintas, unas más grandes y mucosas y otras más chicas y con bordes definidos. A partir de dicha distinción se obtuvieron cinco aislados distintos (AM, T, Bc, B y B1), que se caracterizaron en primer lugar según sus características morfológicas y bioquímicas (Tabla IV.1).

La secuenciación de gen 16S rRNA de los distintos aislados y su posterior comparación con la secuencias depositadas en la base de datos del National Center for Biothecnology Information (NCBI) utilizando el programa BLAST, permitió la afiliación taxonómica de los mismos. Los resultados que se detallan en la tabla IV.2 muestran que la cepa AM se clasificó como *Sphingobium* sp., las cepas T y Bc fueron asociadas con *Pseudomonas* sp., y las cepas B y B1 con *Enterobacter* sp.

Las características bioquímicas reforzaron los resultados obtenidos mediante la afiliación taxonómica a partir de la caracterización genética.

Características	AM	T	Bc	B	B1
Color de la colonia	Amarilla	Transparente	Blanca	Blanca	Blanca
Morfología microscópica	Bacilos	Bacilos	Bacilos	Bacilos	Bacilos
Tinción de Gram	-	-	-	-	-
Reductoras de nitrato	-	+	+	+	+
Reductoras de nitrito	-	+	+	+	+
Producción de N ₂	-	+	-	+	+
Oxidasa (Kovacs)	+	+	+	-	-
OF glucosa	N	O	O	F	F
Citrato (Simmons)	-	+	+	+	+
Hidrólisis de gelatina	-	-	-	-	-
Crecimiento en Agar Cetrimide	-	+	+	-	-

Tabla IV.1. Características morfológicas y bioquímicas de las cepas AM, T, Bc, B y B1 aisladas del CON

Cepas	Número de acceso ^a	Secuencia del gen 16S rRNA más cercanamente relacionada	Similitud	Número de acceso
AM	JQ886663	<i>Sphingobium sp.</i>	98%	EU159274.1
T	JQ886664	<i>Pseudomonas sp.</i>	100%	AY520572.1
Bc	JQ886665	<i>Pseudomonas sp.</i>	98%	DQ127532.1
B	JQ886666	<i>Enterobacter sp.</i>	99%	AB244467.1
B1	JQ886667	<i>Enterobacter sp.</i>	99%	AB244467.1

Tabla IV.2. Resultados de la secuenciación del gen 16S rRNA y afiliaciones taxonómicas de las cepas AM, T, Bc, B y B1 aisladas del consorcio. ^a Número de acceso a GenBank de las secuencia perteneciente a la cepa aislada. ^b Número de acceso a GenBank de la secuencia bacteriana más cercanamente relacionada.

IV.1.3.2 A nivel de no cultivables

IV.1.3.2.i Análisis de la estructura de CON mediante PCR-DGGE

Con el objetivo de estudiar la diversidad genética bacteriana del consorcio se realizó la extracción de DNA total a partir de un cultivo de CON en MML con 200 mg.l^{-1} de fenantreno, a los 4 días de incubación (período de mayor actividad degradadora) y posteriormente se realizó una análisis por PCR-DGGE con *primers* específicos para una porción el gen 16S rRNA.

Tal como se puede observar en la figura IV.4, el perfil de bandas obtenido de CON presentó 10 bandas. Este perfil de bandas se comparó con la posición de las bandas obtenidas a partir de los aislados. No fue posible asignar a ninguna de las cepas aisladas alguna de las bandas presentes en CON ya que, como se puede observar en la figura IV.4, se encontró que las bandas pertenecientes a las cepas aisladas no corrieron en la misma posición que las bandas presentes en la calle del perfil de CON.

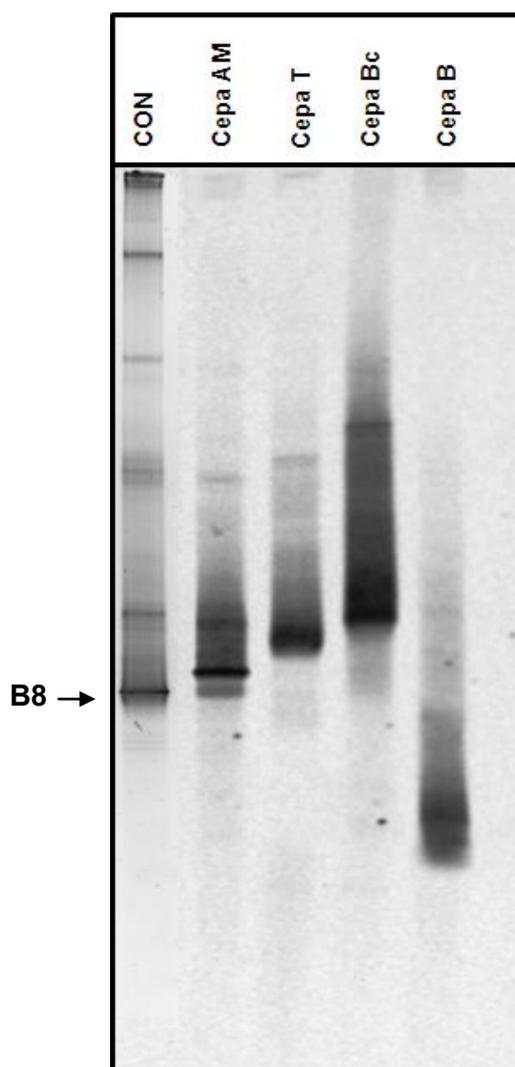


Figura IV.4 Fotografía del análisis por PCR-DGGE de las poblaciones bacterianas de CON y las cepas aisladas de CON.

Con el objetivo de obtener la identidad de la banda predominante en los perfiles de DGGE de CON (B8) se realizó una incisión de la banda, una posterior re-amplificación por PCR y clonación. Como resultado se obtuvieron 3 clones (clon 18, 19 y 20), los cuales se asociaron filogenéticamente a la familia *Sphingomonadaceae*. La secuencia del gen 16S rRNA de los tres clones de B8 mostraron una identidad entre el 99% y 100% con el género *Sphingobium* (Tabla IV.3) y una similitud del 96% con la secuencia del gen 16S rRNA de la cepa AM, identificada como *Sphingobium* sp., pese a que migran en diferentes posiciones en el análisis de DGGE.

IV.1.3.2.ii Construcción y análisis de una biblioteca de genes 16S rRNA presentes en CON.

Se realizó una biblioteca de productos de amplificación a partir del DNA de CON creciendo en MML con 200 mg.l^{-1} de fenantreno a los 4 días de incubación.

Para el análisis se llevó a cabo una PCR con *primers* específicos dirigidos a una porción del gen 16S rRNA. Posteriormente, se realizó la clonación de los fragmentos de amplificación obtenidos en el vector de clonado pGEM-T en células de *E.Coli* DH5 α y como resultado se obtuvieron 13 clones. Con el análisis taxonómico de las secuencias se encontraron 4 filotipos distintos a nivel de orden, tres de los cuales (representados por 11 clones) se afiliaron con *Alphaproteobacteria* y el filotipo restante (representado por 2 clones) se afilió a *Betaproteobacteria*. Los tres órdenes pertenecientes a la clase *Alphaproteobacteria* fueron *Rhodospirillales* (2 clones, cada uno con 100% de identidad con el género *Inquilinus*), *Rhizobiales* (1 clon con 100% de identidad con *Ochrobactrum*) y *Sphingomonadales*, (8 clones, con entre un 99%-100% de identidad con los géneros *Sphingobium* y *Sphingomonas*) siendo este último predominante con el 61,5% de las secuencias (Tabla IV.3).

De la clase *Betaproteobacteria*, el orden *Burkholderiales* se representó por dos clones, uno con un 95% de identidad con el género *Alcaligenes* y el otro con un 100% de identidad con el género *Achromobacter* (Tabla IV.3).

Con las secuencias de los clones, la secuencia de la banda predominante de CON (B8) y las secuencias de las cepas aisladas del consorcio se realizó un árbol filogenético mediante el método de Neighbor-Joinig y el algoritmo p-distance con el programa MEGA. El dendrograma resultante se muestra en la figura IV.5. En la misma se puede observar que las secuencias que se afiliaron a la familia *Sphingomonadaceae* se separan formando dos *clusters*. Por un lado, la cepa *Sphingobium* sp. AM y por el otro los clones de CON, incluyendo a los clones obtenidos a partir de la banda predominante en los perfiles DGGE de CON. Estos resultados podrían sugerir que la cepa *Sphingobium* sp. AM no resulta ser mayoritaria en el consorcio.

Ninguno de los clones obtenidos se relacionó filogenéticamente con las cepas aisladas pertenecientes a la clase *Gammaproteobacteria*.

Clon	Número de acceso ^a	Secuencia del gen 16S rRNA más cercanamente relacionada	Similitud	Número de acceso ^b
6	JQ886683	<i>Alcaligenes faecalis</i> strain SRR-11	95%	EF446888.1
7	JQ886672	<i>Sphingobium chungbukense</i> strain Ndbn-13	100%	KP090373.1
8	JQ886674	<i>Sphingobium chungbukense</i> strain Ndbn-13	99%	KP090373.1
9	JQ886675	<i>Sphingobium chungbukense</i> strain Ndbn-13	99%	KP090373.1
10	JQ886680	<i>Inquilinus ginsengisoli</i> strain Mq-10	100%	GU201848.1
11	JQ886681	<i>Inquilinus ginsengisoli</i> strain Mq-10	100%	GU201848.1
12	JQ886673	<i>Sphingobium chungbukense</i> strain Ndbn-13	100%	KP090373.1
13	JQ886670	<i>Sphingomonas agrestis</i> strain DP682	100%	AY227699.2
14	JQ886671	<i>Sphingomonas agrestis</i> strain DP682	100%	AY227699.2
15	JQ886677	<i>Sphingobium chungbukense</i> strain Ndbn-13	99%	KP090373.1
16	JQ886668	<i>Sphingobium chungbukense</i> strain Ndbn-13	100%	KP090373.1
17	JQ886682	<i>Achromobacter xylosoxidans</i> strain C2	100%	KP967463.1
21	JQ886679	<i>Ochrobactrum</i> sp. TSH83	100%	AB508871.1
18	JQ886676	<i>Sphingobium chungbukense</i> strain Ndbn-13	100%	KP090373.1
19	JQ886669	<i>Sphingobium chungbukense</i> strain Ndbn-13	100%	KP090373.1
20	JQ886678	<i>Sphingobium chungbukense</i> strain Ndbn-13	99%	KP090373.1

Tabla IV.3. Resultados de la secuencia parcial del gen 16S rRNA y afiliaciones taxonómicas de los clones obtenidos de la clonación de fragmentos del gen 16S rRNA del consorcio. ^a Número de acceso a GenBank de la secuencia perteneciente al clon. ^b Número de acceso a GenBank de la secuencia bacteriana más cercanamente relacionada.

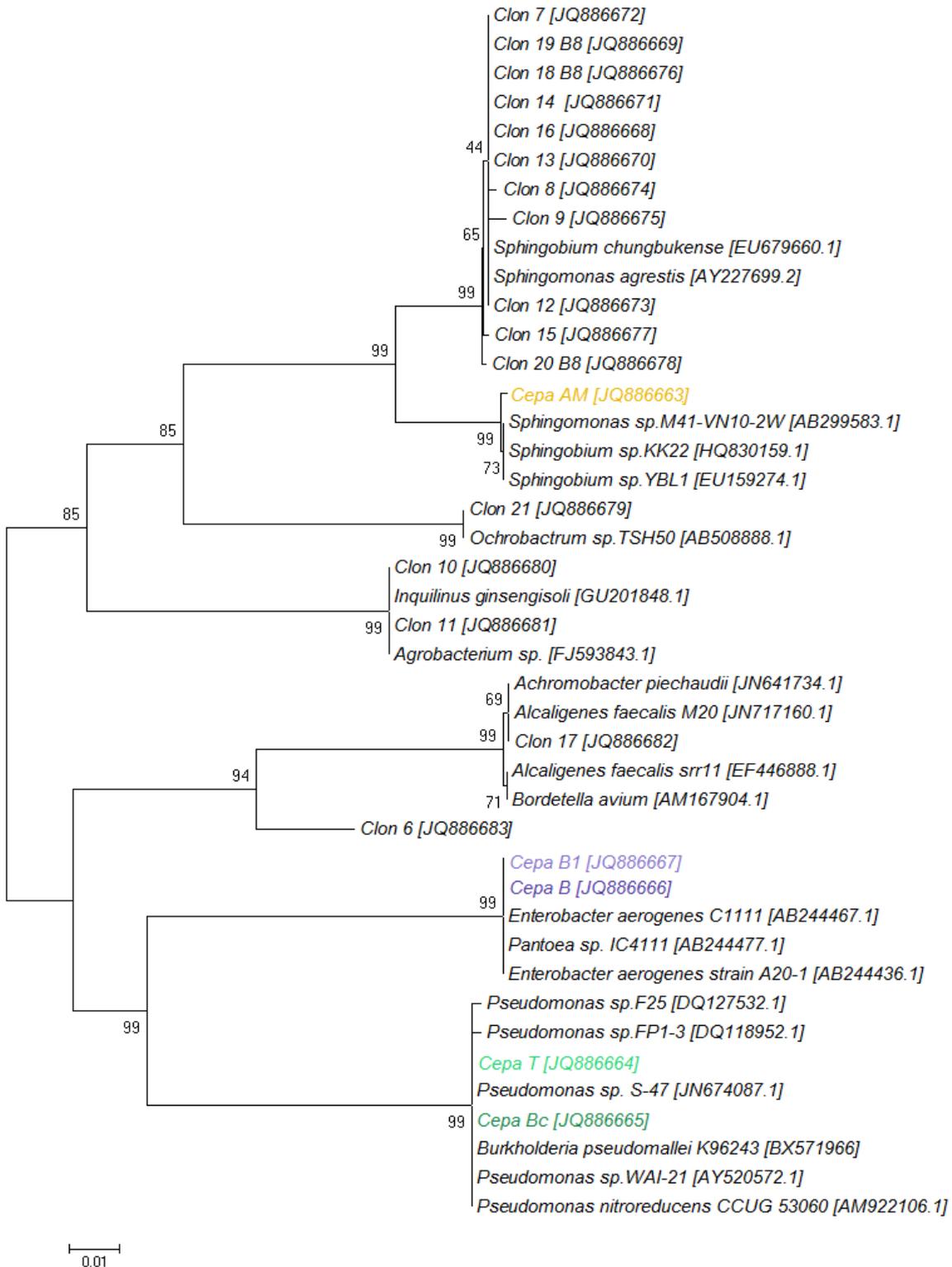


Figura IV.5. Árbol Neighbor-joining basado en el análisis de distancia matricial de las secuencias parciales 16S rDNA de las bandas de DGGE, de las cepas aisladas, de los clones y de secuencias seleccionadas disponibles en GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>) construido utilizando el software MEGA version 4 (Tamura y col., 2007). Los números en cada nodo corresponden a los valores porcentuales de bootstrap. La barra inferior indica una variación de 0.01 de la secuencia. Se indican entre corchetes el número de acceso a GenBank de las cepas aisladas, de los clones y de las secuencias seleccionadas.

IV.1.3.2.iii Pirosecuenciación del DNA total de CON

Con el objetivo de conocer la composición detallada y las abundancias relativas de las distintas poblaciones presentes en CON se utilizó una tecnología de secuenciación de alto rendimiento que presenta las potenciales ventajas de ser más exacta, flexible y fácilmente automatizable (Fakruddin y col., 2013). Se llevó a cabo la pirosecuenciación de los fragmentos de PCR del gen 16S rRNA a partir del DNA total de CON extraído al día 4 de incubación. La pirosecuenciación generó un total de 996 secuencias filtradas que se agruparon en 21 OTUs (*operational taxonomic units*) considerando un mínimo de 97% de similitud. Todas las secuencias representativas de cada OTU se clasificaron dentro del dominio Bacteria y filo *Proteobacteria* (*Alpha*, *Gamma* y *Beta* con 89.4%, 7.7% y 2.9% de las lecturas respectivamente). La curva de rarefacción obtenida (Figura IV.6) muestra que el número de secuencias recuperadas fue suficiente para cubrir la diversidad presente en CON. Dicho resultado se confirma mediante el valor del índice de Good, que informa sobre la cobertura del análisis (Tabla IV.4). Cuando su valor se acerca a 1.0 indica que las secuencias obtenidas para cada biblioteca representa a la mayoría de las secuencias bacterianas presentes en la muestra (Rungrassamee y col., 2012).

Para evaluar la diversidad del consorcio se utilizó una familia de índices de diversidad desarrollada por Mark Hill (Hill, 1973), llamada Números de Hill. Los números de Hill (qD) están definidos por un orden “q” (Gotelli y Chao, 2013), este parámetro determina la sensibilidad de la medida a las abundancias relativas de las especies (Chiu y Chao, 2014). Los números de Hill más utilizados son; la riqueza de especie (0D), el exponencial de entropía de Shannon (1D) y la inversa del índice de Simpson (2D).

Los números que se muestran en la tabla IV.4 presentan valores correspondientes a comunidades con una baja de riqueza de especies (0D) y con pocas especies muy dominantes (2D).

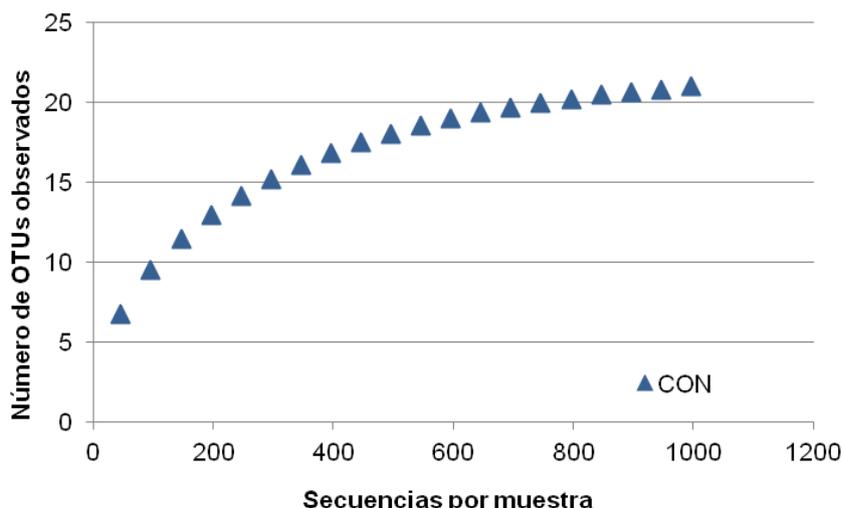


Figura IV.6. Análisis de rarefacción indicando el número de OTUs observados en la muestra del DNA de CON. .

	Número de secuencias	Número de OTUs	Números de Hill			Índice de Good
			⁰ D	¹ D	² D	
CON	996	21	21.75	2.77	1.63	0.99

Tabla IV.4. Parámetros de diversidad obtenidas por el análisis de los datos de pirosecuenciación del consorcio y valor de índice de Good.

La frecuencia relativa de filotipos reveló la presencia de 7 órdenes bacterianos (Figura IV.7) *Sphingomonadales* (87,9%), *Rhodospirillales* (1,2%), *Rhizobiales* (0,3%) (pertenecientes a la clase *Alphaproteobacteria*), *Xanthomonadales* (0,6%), *Pseudomonadales* (0,4%) *Enterobacteriales* (6,7%) (pertenecientes a la clase *Gammaproteobacteria*) y *Burkholderiales* (2,9%) (pertenecientes a la clase *Betaproteobacteria*). A nivel de género se observaron las siguientes abundancias relativas en orden decreciente: *Sphingobium* 87.4%, *Enterobacter* 6.6%, *Achromobacter* 1.9%, *Inquilinus* 1.1%, *Bordetella* 1.0%, *Luteibacter* 0.6%, *Sphingomonas* 0.5%, *Pseudomonas* 0.4%, y *Bradyrhizobium* 0,3%. De todos los géneros, *Sphingobium* es quien presentó la mayor abundancia relativa.

Si bien con la biblioteca de clones realizada anteriormente solo se detectaron las clases *Alpha-* y *Betaproteobacteria*, con la pirosecuenciación se logró confirmar la presencia de *Gammaproteobacteria*. Esta clase también se encontró mediante técnicas dependientes de cultivo ya que dos de las cepas aisladas pertenecieron a los órdenes *Pseudomonadales* y *Enterobacteriales* (Tabla IV.2).

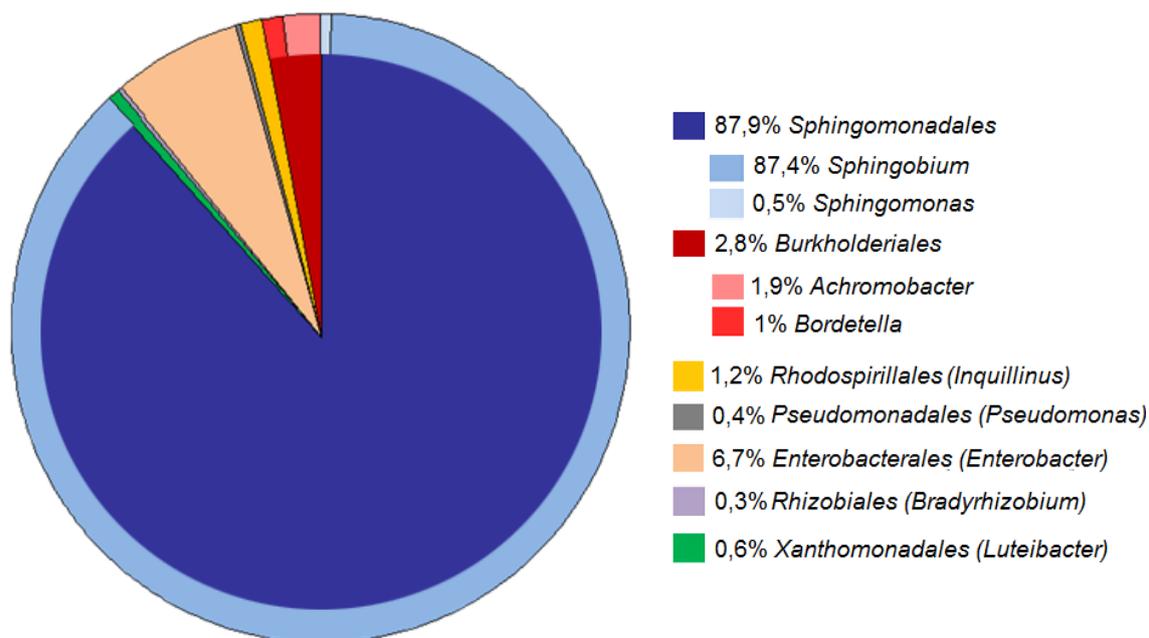


Figura IV.7. Ordenes y géneros bacterianos encontrados en CON mediante pirosecuenciación. El Círculo interior indica los órdenes y el exterior los géneros. Entre paréntesis aparecen los géneros únicos dentro de los respectivos órdenes.

IV.1.4 Análisis funcional de CON

IV.1.4.1 Análisis fisiológico de las cepas aisladas

IV.1.4.1.i Degradación de fenantreno en medio sólido

Para comenzar a discriminar el rol de cada una de las cepas aisladas en el consorcio, se realizó una estría de cada una de las cepas en Medio Mineral Sólido (MMS) con una doble capa de agarosa suplementada con fenantreno. La cepa *Sphingobium* sp. AM presentó un halo claro de solubilización (Figura IV.8), mientras que la cepa T mostró un halo pequeño de solubilización. La presencia de un halo claro alrededor de la estría se puede deber a la degradación del sustrato demostrando una actividad enzimática específica, o a la solubilización del PAH por la producción de biosurfactantes.



Figura IV.8. Fotografía del halo de solubilización de la cepa AM observado en MMS suplementado con fenantreno.

IV.1.4.1.ii Degradación de fenantreno en medio líquido

Con el objetivo de determinar la capacidad de las cepas aisladas de utilizar fenantreno como única fuente de carbono y energía se realizaron cultivos de las cepas en MML y 200 mg.l⁻¹ de fenantreno. Luego de 7 días de incubación se determinó la concentración de fenantreno remanente (HPLC) y el crecimiento por aparición de turbidez.

Como se expresa en la tabla IV.5 los cultivos de las cepas AM, T y Bc mostraron turbidez luego a los 7 días de incubación. Sin embargo la cepa AM fue la única que mostró valores de degradación de fenantreno significativamente diferente al control (87% aproximadamente).

Fuente de carbono	Crecimiento / % de degradación de la fuente de carbono (mg.l ⁻¹)					
	AM	T	Bc	B	B1	Control
Fenantreno	(+)/87.4±4.0*	(+)/9.7 ±4.0	(+)/12.1 ±5.9	(-)/9.1±1.4	(-)/1.0±1.9	- /10.9±2.3

Tabla IV.5. Crecimiento en MML suplementado con fenantreno como única fuente de carbono y energía de las cepas AM, T, Bc, B y B1. Se añadió un sistema control sin inocular como medida de eliminación abiótica. (+) Corresponde a la aparición de turbidez. Los datos correspondientes a la degradación de fenantreno son el promedio de tres experimentos diferentes ± la desviación estándar. * indica diferencias significativas con el control abiótico (p<0.05).

IV.1.4.1.iii Degradación de fenantreno en medio suplementado con factores de crecimiento

Se evaluó si la degradación de fenantreno en las cepas T, Bc, B y B1 estaba limitada por requerimientos de factores de crecimiento, para ello se realizaron cultivos de las cepas aisladas en MML con 200 mg.l⁻¹ de fenantreno suplementado con extracto de levadura. Por otro lado se aumentó el tiempo de incubación a 15 días.

Como se observa en la tabla IV.6, ninguna de las cepas presentó diferencias significativas en la concentración residual de fenantreno con respecto al control.

Fuente de carbono	Concentración residual de la fuente de carbono (mg.l ⁻¹)				
	T	Bc	B	B1	Control
Fenantreno + Extracto de levadura	136.9±3.4	115.3 ±5.4	131.4±6.8	130.7±14.5	121.7±6.4

Tabla IV.6. Concentración residual en cultivos de las cepas aisladas de CON en MML suplementado con 200 mg.l⁻¹ de fenantreno y 0.05 g.l⁻¹ de extracto de levadura a los 15 días de incubación. Los datos son el promedio de triplicados independientes ± la desviación estándar

IV.1.4.1.iv Crecimiento en metabolitos intermediarios de la degradación de fenantreno como única fuente de carbono y energía

Se estudió el crecimiento y la capacidad de cada una de las cepas aisladas de utilizar dos de los metabolitos intermediarios de la ruta de degradación de fenantreno. Para ello se realizaron cultivos de las cepas en MML y 100 mg.l⁻¹ de ácido 1-hidroxi-2-naftoico como única fuente de carbono y energía o con 100 mg.l⁻¹ de ácido salicílico como única fuente de carbono y energía.

Tal como se observa en la tabla IV.7, las cepas afiliadas a *Pseudomonas* sp, T y Bc, fueron capaces de crecer en los dos metabolitos estudiados (ácido 1-hidroxi-2-naftoico y ácido salicílico). Cabe destacar que la cepa AM no mostró crecimiento en ácido 1-hidroxi-2-naftoico en cambio sí fue capaz de crecer en ácido salicílico. Sin embargo, no se evidenció degradación de ninguno de los intermediarios estudiados, siendo importante remarcar que la pérdida abiótica en el caso del ensayo con ácido salicílico fue muy alta, lo que podría enmascarar los procesos de biodegradación.

Fuente de carbono	Crecimiento / % de degradación de la fuente de carbono (mg.l ⁻¹)					
	AM	T	Bc	B	B1	Control
Ácido 1-hidroxi-2-naftoico	(-)/ 15.6 ±3.2	(+)/ 14.2±7.0	(+)/ 10.8±0.8	(-)/ 13.9±10.7	(-)/ 5.7±4.1	-/ 10.7±9.5
Ácido salicílico	(+)/nd	(+)/ 92.3 ±0.3	(+)/nd	(-)/nd	(-)/nd	-/ 92.9 ±0.8

Tabla IV.7. Utilización de intermediarios metabólicos del fenantreno como única fuente de carbono y energía por parte de las cepas AM, T, Bc, B y B1. Se añadió un sistema control como medida de eliminación abiótica. (+) Corresponde a la aparición de turbidez. Los datos correspondientes a la degradación de las dos fuentes de carbono son el promedio de tres experimentos independientes ± la desviación estándar. nd: no detectado. -: no determinado. ^b Los resultados de la degradación de ácido salicílico corresponden a los 2 días de incubación y los de ácido 1-hidroxi-2-naftoico corresponden a 7 días de incubación.

IV.1.4.1.v Estudio de presencia de genes que codifican para enzimas dioxigenasas

La degradación bacteriana de los PAH se inicia mediante la acción de enzimas dioxigenasas intracelulares que lo oxidan al correspondiente cis-dihidrodiol, mediante la incorporación de dos átomos de oxígeno (Johnsen y Karlson, 2005). Estos intermediarios dihidroxilados pueden continuar siendo oxidados ya sea por intradiol o extradiol dioxigenasas, según sigan la ruta de orto o meta clivaje, dando intermediarios centrales como el protocatecuato o catecol que son luego convertidos en intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbónicos (TCA) (Peng y col., 2008).

Se utilizaron dos metodologías para detectar la presencia de genes dioxigenasa. Por un lado se puso en evidencia la actividad dioxigenasa y por otro lado se realizó la amplificación por PCR con *primers* específicos dirigidos a la subunidad alfa de la enzima dioxigenasa de anillos aromáticos (RHD) para bacterias Gram negativas. Esta subunidad alfa contiene dos regiones conservadas, el centro Rieske y el dominio catalítico conteniendo el átomo de hierro mononuclear (Cébron y col., 2008).

Para detectar la actividad de enzimas dioxigenasas se realizó la prueba de indol sobre una estría ya crecida de cada cepa en R2A. La aparición de coloración azul, debido a la oxidación del indol, sobre la estría de la cepa indica la presencia de enzimas dioxigenasa. La única cepa capaz de formar azul-índigo fue la cepa *Sphingobium* sp. AM (Figura IV.9), indicando actividad de clivaje del anillo aromático. Debido a que la prueba de indol se realizó en un medio complejo como lo es el R2A, se sugiere que las enzimas involucradas en la conversión del indol en *Sphingobium* sp. AM serían constitutivas.

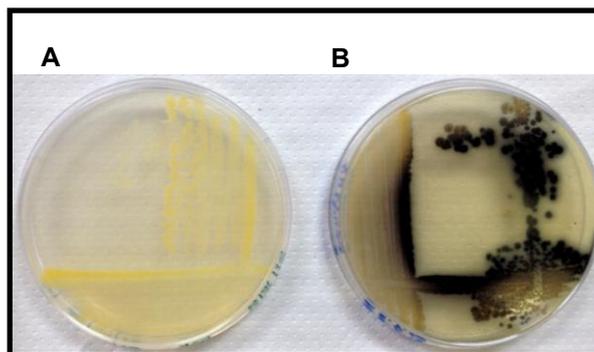


Figura IV.9. Fotografía del aislamiento de la cepa AM creciendo en R2A (A) y en R2A en presencia de cristales de indol (B)

La detección de la presencia del gen dioxigenasa en las cepas aisladas se realizó mediante una PCR con *primers* específicos dirigidos a dicho gen (Cébron y col., 2008). Como control positivo se utilizó una cepa de *Pseudomonas* sp., degradadora de PAH aislada y caracterizada previamente en nuestro laboratorio. Como se observa en la figura IV.10 una sola banda del tamaño esperado (306 pb) está presente en la cepa degradadora AM y la cepa B, esta última afiliada a *Enterobacter* sp. La cepa T presentó un producto de amplificación levemente mayor al esperado. Debido a que la cepa B no presentó actividad dioxigenasa en el test del indol ni actividad degradadora de fenantreno en medio líquido se clonó el fragmento de PCR obtenido en este ensayo y se envió a secuenciar. Luego del análisis taxonómico en BLAST de las secuencias de dos de los clones obtenidos se encontró que un clon presentó una afiliación con un 97% de similitud con fragmento proveniente de una muestra ambiental, obtenido con *primers* dirigidos a genes *nahAC*, asignado a un gen de dioxigenasa (Número de acceso a GenBank: AM930924.1) y el segundo clon se afilió con un 99% de similitud a una porción del genoma de la cepa *Enterobacter aerogenes* CAV1320 (Número de acceso a GenBank: CP011574.1), que no correspondía a un gen codificante de una enzima dioxigenasa. Se testearon otros *primers* dirigidos a genes de dioxigenasas pero no se obtuvieron resultados positivos, en algunos casos se observó amplificación pero no del peso molecular esperado (Tabla IV.8).

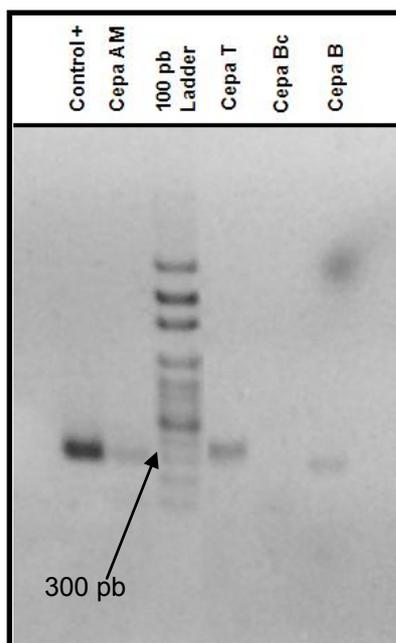


Figura IV.10. Fotografía del gel de agarosa de los productos de amplificación de la PCR con *primers* dirigidos al gen dioxigenasa.

Referencia	Primer	Target
Wilson y col., (1999)	Ac114F y Ac596R	genes nahAC
Ding y col.,(2010)	PAH-RHD α -396F y PAH-RHD α -696R	
Chadhaian y col., (2006)	Rieske_f y Rieske_r	
Leigh y col., (2007)	ARHD1F y ARHD2R	
	NAH F y NAH R	Naftaleno dioxigenasa
	TOD F y TOD R	Tolueno dioxigenasa
Baldwin y col., (2003)	BPH1 F y BPH1 R	Bifenilo dioxigenasa
	BPH2 F y BPH2 R	Bifenilo dioxigenasa
	BPH3 F y BPH3d R	Bifenilo dioxigenasa
	BPH4 F y BPH3d R	Bifenilo dioxigenasa
Lloyds Jones y col., (1999)	nahAcfor y nahAcrev	Subunidad alfa.
	P8073 y P9047	Específicamente genes nahAc
		Subunidad alfa.
		Específicamente genes phnAc
Zhou y col., (2006)	Nah-for y Nah-rev1	Genes nidA y nahAc

Tabla IV.8. Listado de *primers* dirigidos al gen dioxigenasa testeados en CON y en las cepas aisladas.

IV.1.4.1.vi Screening de producción de biosurfactantes

Una manera de aumentar biológicamente la difusión efectiva de las moléculas de PAH es la excreción de biosurfactantes como *carriers*, donde las micelas del tensioactivo ayudan la

transferencia del PAH a la fase acuosa (Mohan y col., 2006a). Se demostró que cultivos puros de bacterias producen surfactantes aumentando la solubilidad de estos compuestos (Achten y col., 2011), resultando una estrategia muy útil en casos donde la limitada biodisponibilidad de compuestos orgánicos contaminantes es un obstáculo para una efectiva degradación (Rayu y col., 2012).

Se realizó un ensayo rápido para evidenciar la posible producción por parte de las cepas aisladas de productos con actividad surfactante. Las cepas se sembraron en agar sangre, donde la lisis de los eritrocitos sugiere una producción de los mismos. Se observó un halo color verdoso, indicando alfa hemolisis para dos de las cuatro cepas analizadas, la cepa T y la cepa B (Figura IV.11).

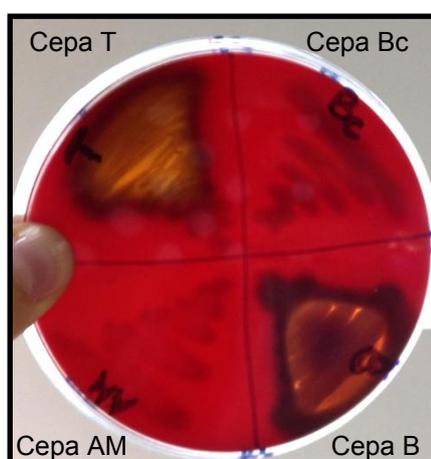


Figura IV.11. Fotografía de una placa de agar sangre con una estría de las cepas aisladas de CON

IV.1.4.2 Estudio de las interacciones fisiológicas entre las cepas aisladas del consorcio

IV.1.4.2.i Dinámica de los distintos morfotipos presentes en el consorcio

Se estudió la dinámica de CON a nivel de cultivables mediante recuento diferencial considerando la diferentes morfologías de las colonias de cada cepa.

Como se muestra en la figura IV.12, al comienzo del ensayo las placas de R2A mostraron un claro dominio de colonias blancas (96%), que se mantuvieron en valores absolutos similares durante todo el ensayo. Después de dos días de incubación se observó un aumento importante, de más de dos órdenes de magnitud, de las colonias amarillas, alcanzando el 76% de las bacterias heterótrofas cultivable. Hacia el final del tiempo de incubación, el número de colonias amarillas disminuyó significativamente coincidiendo con lo observado en los recuentos de las bacterias degradadoras de PAH (Figura IV.3), representando al día 15 de incubación sólo el 1% de las poblaciones cultivables. Contrariamente al comportamiento de las colonias amarillas, las colonias transparentes

mostraron un aumento progresivo durante el ensayo, convirtiéndose en la población predominante (68%) al día 15 de incubación. Estos resultados son coincidentes con lo observado anteriormente, sugiriendo que la cepa AM sería la encargada de iniciar la degradación mientras que la cepa T crecería a partir de los productos de degradación.

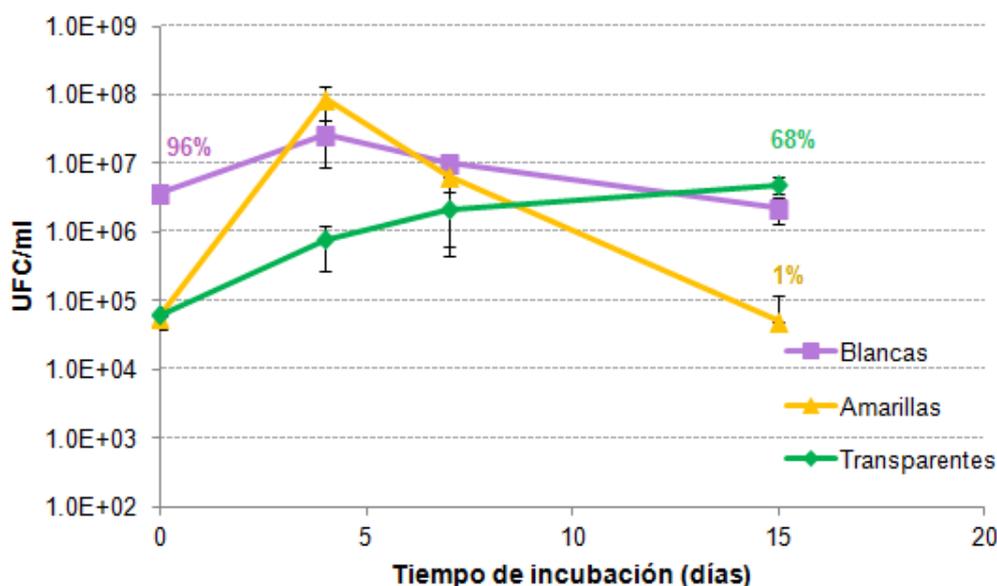


Figura IV.12. Recuento diferencial para los distintos morfotipos encontrados. Los resultados son el promedio de triplicados independientes y las barras representan la desviación estándar.

IV.1.4.2.ii Degradación de fenantreno en medio líquido por consorcios definidos

Con el fin de estudiar la posible cooperación en la degradación de fenantreno de las cepas aisladas de CON se decidió combinarlas de a pares y analizar la degradación de dicho compuesto. La cepa *Sphingobium* sp. AM se seleccionó como cepa común para las tres combinaciones debido a su comprobada capacidad para iniciar la degradación de fenantreno. Por lo tanto los consorcios definidos fueron los siguientes: AM+T, AM+Bc y AM+B.

Para obtener información acerca de la degradación de fenantreno en los cultivos mixtos se decidió analizar tanto la degradación de fenantreno como la aparición de ácido 1-hidroxi-2-naftoico y de ácido salicílico. Para ello se realizaron cultivos de los consorcios definidos y se incubaron durante 2 y 7 días.

En la tabla IV.9 se muestra que al día 2 de incubación los porcentajes residuales de fenantreno en los consorcios definidos no mostraron diferencias significativas con los cultivos de la cepa *Sphingobium* sp. AM ($P < 0.05$), llegando a porcentajes de eliminación de fenantreno entre el 56 y 66%. Tampoco fue posible encontrar diferencias significativas en la acumulación de los metabolitos intermediarios para los cultivos estudiados. Sin embargo,

luego de 7 días de incubación los consorcios definidos mostraron una degradación superior al 97% y significativamente mayor a la eliminación alcanzada por la cepa *Sphingobium* sp. AM (87,5%). Cabe destacar que, en la misma condición la cepa AM y los consorcios definidos presentaron una concentración de fenantreno residual significativamente menor que CON (Figura IV.2) a los 7 días de incubación. Por otra parte, no se logró detectar acumulación de los metabolitos intermediarios ni en AM ni en los consorcios definidos, contrariamente a lo que se observó en CON.

Concentración (mg.l ⁻¹)	Día de incubación	AM	AM+T	AM+Bc	AM+B	Control
Fenantreno	2	87.3 ^a ±7.4	67.9 ^a ±30.6	76.1 ^a ±29.5	77.2 ^a ±35.2	-
	7	25.1 ^b ±8.0	2.9 ^c ±1.8	5.8 ^c ±4.3	2.8 ^c ±0.5	166.8 ^d ±7.3
Ácido1- hidroxi-2- naftoico	2	64.6 ^a ±13.9	50.5 ^a ±12.5	56.5 ^a ±36.6	51.3 ^a ±9.5	-
	7	nd	0.7 ^b ±0.2	0.6 ^b ±0.1	0.4 ^b ±0.1	-
Ácido salicílico	2	0.5 ^a ±0.4	12.0 ^a ±21.6	21.1 ^a ±27.9	12.3 ^a ±13.3	-
	7	nd	nd	nd	nd	-

Tabla IV.9. Concentración de fenantreno, ácido1-hidroxi-2-naftoico y ácido salicílico durante la degradación de fenantreno en medio mineral líquido por la cepa AM, y los consorcios definidos AM+T, AM+Bc y AM+B. Se realizó un sistema control para medir la eliminación abiótica. Los valores son el promedio de sextuplicados independientes con sus respectivas desviaciones estándar. En la misma fila, aquellos valores que posean la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0,05$). nd: no detectado. -: no determinado

IV.1.4.3 Estrategias ómicas aplicadas al estudio de CON

Las estrategias ómicas, como la metagenómica, la metatranscriptómica y la metaproteómica, permitirían estudiar los procesos de biodegradación, superando el problema de la pérdida de la información presente en los microorganismos difíciles de cultivar (Ahmad y Ahmad, 2014). En la actualidad se utilizan las estrategias ómicas no solo para identificar la diversidad microbiana sino también para entender la composición de la comunidad y asignar un rol ecológico a la microbiota no cultivable de un nicho particular (Sharma y col., 2008). En este trabajo se realizaron dos enfoques ómicos sobre el consorcio degradador de fenantreno, un enfoque metagenómico funcional y otro metaproteómico.

IV.1.4.3.i Presencia de genes que codifican para enzimas dioxigenasas

Con el objetivo de conocer la presencia de genes dioxigenasa de alguno de los microorganismos no cultivables presentes en el consorcio se llevó a cabo una PCR con *primers* diseñados por Cebrón y col., (2008) sobre el DNA total del consorcio a distintos tiempos de incubación, tal como se utilizaron para el estudio realizado en las cepas aisladas. Como se observa en la figura IV.13, al comienzo la incubación, se encontraron una multiplicidad de bandas, incluyendo una banda débil del tamaño esperado (306pb) y las otras cuatro de mayor tamaño, de las cuales 2 fueron bandas intensas que migraron a la altura de 1000 y 1500 pb. Luego de 4 días de incubación solo se visualizaron dos bandas intensas de mayor tamaño que el esperado, mientras que para el día 7 y 15 del ensayo no se detectaron bandas.

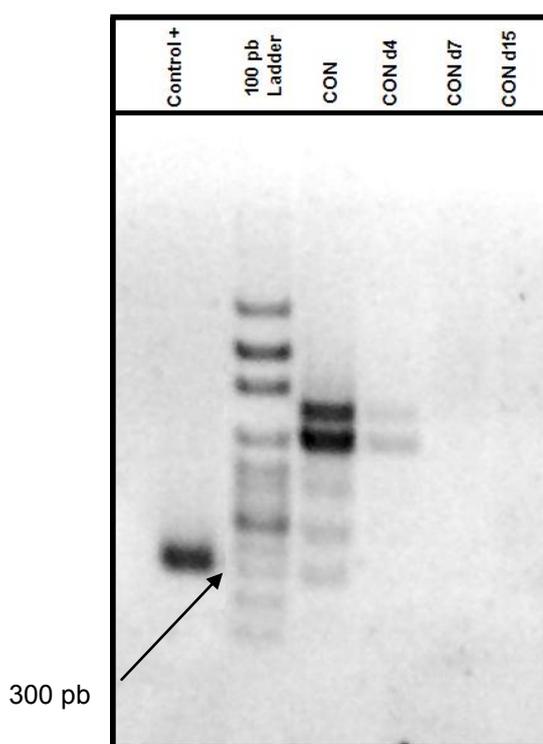


Figura IV.13. Fotografía de gel de agarosa con los productos de PCR con *primers* de Cébrón y col., (2008).

IV.1.4.3.ii Análisis metagenómico funcional de CON

Se realizó una biblioteca metagenómica a partir del DNA total de CON (Figura IV.14) utilizando el vector de clonado pCC2FOS™. En la figura IV.14 se muestra un esquema del diseño experimental utilizado.

IV.1.4.3.ii.1 Extracción de DNA total del consorcio

Se realizó la extracción del DNA total de CON a los 2 días de incubación en 200 mg.l^{-1} de fenantreno como única fuente de carbono y energía. Se llevó a cabo un protocolo de extracción de DNA para la obtención de fragmentos de más de 23 kpb (Entcheva y col., 2001) y de buena calidad. La calidad del DNA extraído se corroboró en un gel de agarosa 0.8%, el resultado se muestra en la figura IV.15. Se midió la concentración y la pureza (relación 260/280), utilizando un NanoDrop 2000 (Thermo-Scientific™), obteniéndose valores de $155.4 \text{ ng.}\mu\text{l}^{-1}$ y 1.87 respectivamente

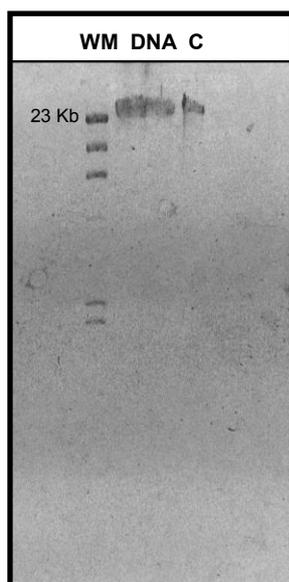


Figura IV.15. Fotografía del gel de agarosa del DNA de alto peso molecular extraído de CON a los dos días de estar creciendo en MML y 200 mg.l^{-1} de fenantreno.

Posteriormente, una vez corroborada la calidad del DNA, se reparó el DNA con el objetivo de obtener insertos romos y fosforilados en el extremo 5', se realizó un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 0.8%, se seleccionó el sector del gel donde se encontraban presentes los fragmentos de DNA deseado (Figura IV.16) y se extrajeron mediante una reacción enzimática con la enzima gelasa.

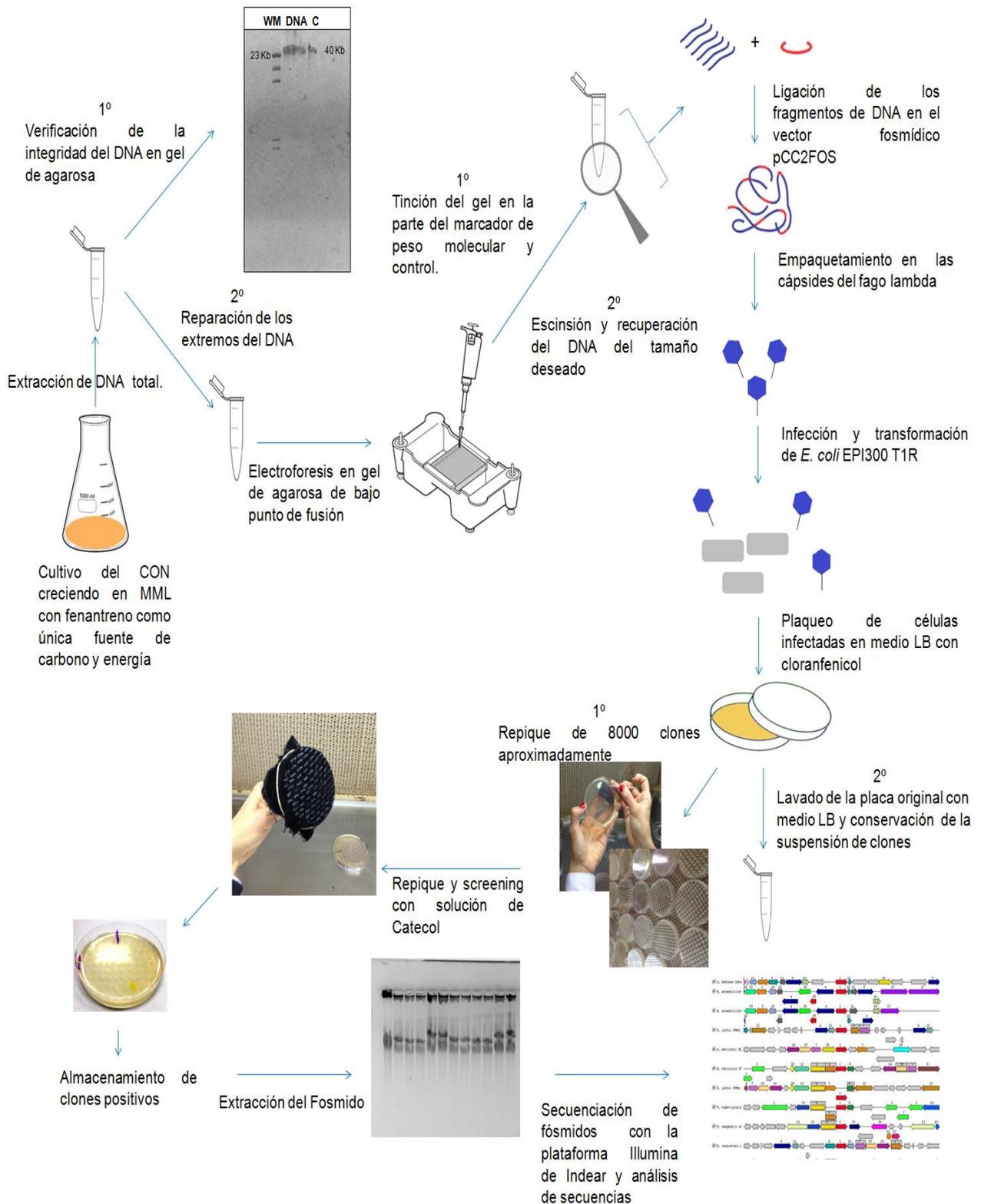


Figura IV.14. Esquema de la construcción de la biblioteca desde la extracción de DNA total de CON hasta el análisis de las secuencias.

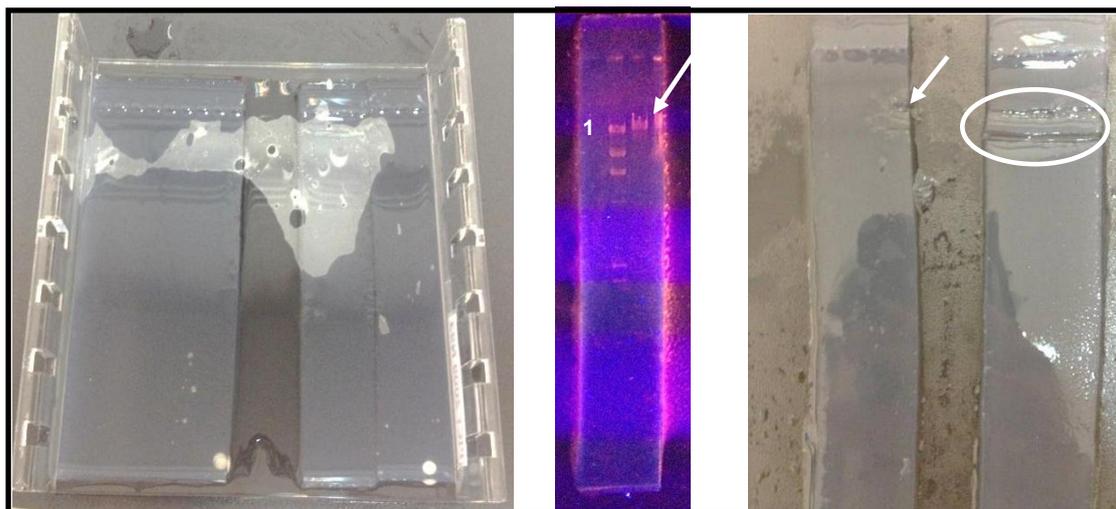


Figura IV.16. Fotografía donde se muestra el fragmento de gel que se tiñó con bromuro de etidio. Las flechas indican el lugar donde se ubicó el DNA y el círculo indica el sector de gel sin teñir de donde se obtuvo el DNA con insertos romos y fosforilado en el extremo 5'. Con el número 1 se indica la banda del marcador de peso molecular (λ Hind III) de 23130 pb.

IV.1.4.3.ii.2 Construcción de la biblioteca y screening funcional

Para controlar las etapas críticas de la realización de la biblioteca metagenómica se llevaron a cabo los controles de ligación y eficiencia de empaquetado. El DNA recuperado del gel (20% aproximadamente) se ligó al vector de clonado pCC2FOS y posteriormente el producto de ligación se empaquetó y se utilizó para la infección de células de *E. coli* EPI300-T1.

Una vez obtenidos los clones, se plaquearon las células transformadas y se seleccionaron por su capacidad de crecer en medio agar LB con cloranfenicol. Se obtuvieron un total de 8000 clones aproximadamente. A cada uno de esos 8000 clones se lo repicó en una nueva placa con medio agar LB y cloranfenicol. A la placa original de clones (luego de repicar los clones) se le realizó un lavado con medio LB líquido obteniendo una suspensión de todos los clones (SC) a la que se la criopreservó con glicerol.

Se comenzó con el *screening* funcional para la identificación de clones conteniendo genes codificantes de enzimas involucradas en la degradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos. Se llevaron a cabo cuatro estrategias, la primera de ellas consistió en inocular cada suspensión de clones en una placa de 96 wells con MML y una mezcla de PAH. Como resultado se observó, luego de la incubación, la aparición de una coloración amarilla, causada por la acumulación de productos de degradación, en los wells correspondiente a la placa de clones número 10 y 25 (Figura IV.17).

En segundo lugar, se realizó una extracción de DNA de la SC de cada placa y se realizó una PCR con *primers* dirigidos a la subunidad alfa de las enzimas dioxigenasa (Cébron y col., 2008), con el objetivo de determinar en qué suspensión/es podrían encontrarse clones con genes de la ruta de degradación de PAH. Como se muestra en la figura IV.18, muchas de las muestras resultaron positivas, mostrando una banda cercana al peso molecular esperado (306 pb).

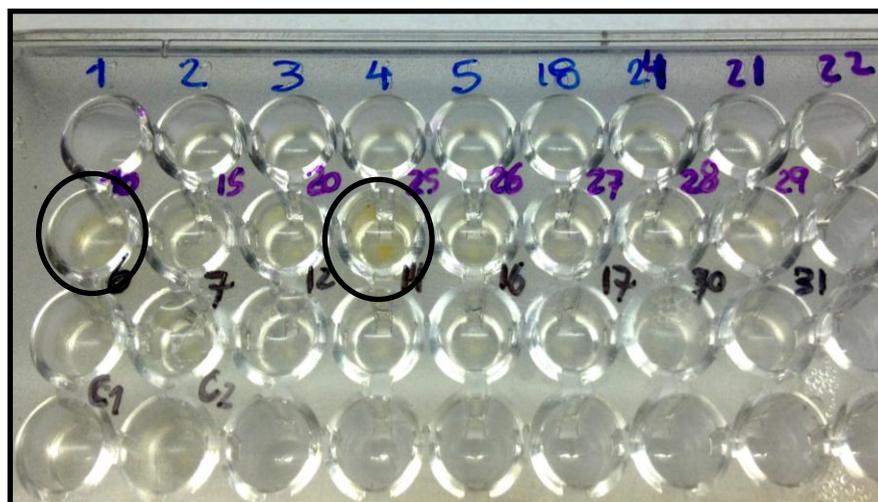


Figura IV.17. Fotografía de una placa de 96 wells con MML y una mezcla de PAH donde se inocularon las suspensiones de clones. Se indican con un círculo los wells correspondientes a la placa de clones número 10 y 25 que presentaron coloración amarilla.

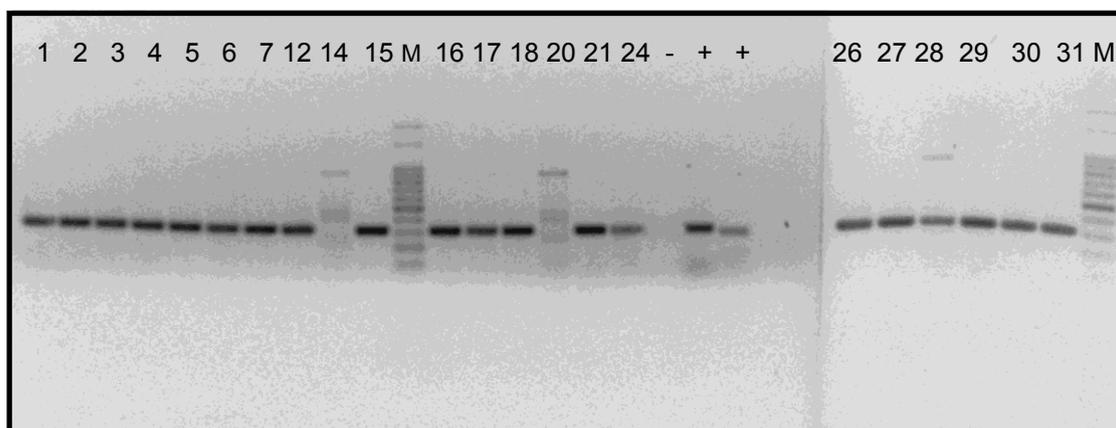


Figura 18. Fotografía de la electroforesis en gel de agarosa con los productos de amplificación de PCR con primers diseñados por Cébron y col., (2008) M: calle del marcador de peso molecular.

En tercer lugar, mediante el método del mango con terciopelo se realizó un repique de cada placa de clones en LB con cloranfenicol diluido 1/10, ya que existen evidencias de que el estrés nutricional favorecería la inducción de genes exógenos (Dr. Howard Junca, comunicación personal). Una vez crecidos los clones y luego de la inducción con cristales de fenol se llevó a cabo un *spray* sobre los clones con una solución de catecol, con el fin de

observar la aparición de una coloración amarilla debida a la generación del ácido 2-hidroxi-mucónico semialdehído, por la actividad de la enzima catecol 2,3-dioxigenasa, una enzima clave de la ruta central de degradación de hidrocarburos aromáticos. Como resultado se obtuvieron un total de 18 colonias amarillas (clones), en la tabla IV.10 se indica a partir de qué placa se aislaron y qué cantidad se obtuvo. En la figura IV.19 se muestra una placa con un clon positivo (colonia de color amarillo). Además se muestra una placa con estrías de clones positivos como el 8.4, 21.1, 23.1 y 25.1 (confirmación) y clones que resultaron negativos como el 8.1, 8.2 y 8.3.

Como cuarta estrategia y para corroborar los resultados obtenidos con el *spray* con una solución de catecol, se realizó además, sobre esos 18 clones, un *screening* con una solución de 2,3-dihidroxibifenilo en acetona y se identificaron 9 clones positivos. El sustrato utilizado es clivado por la 2,3-dihidroxibifenilo 1,2-dioxigenasa, que forma parte de la vía alta o periférica de degradación de los PAH, formando un compuesto meta clivado con coloración amarilla. En la figura IV.20 se muestran los clones positivos que presentaron una coloración amarilla, en el extremo interno de la estría tratada con la solución de 2,3-dihidroxibifenilo.

Placa	Nº de clones positivos
1	1
2	1
4	1
8	1
9	1
12	2
15	1
18	1
20	2
21	3
23	1
25	1
28	1
31	1

Tabla IV.10. Número de clones aislados de cada placa. No se enumeran las placas en las que no se obtuvieron clones positivos.

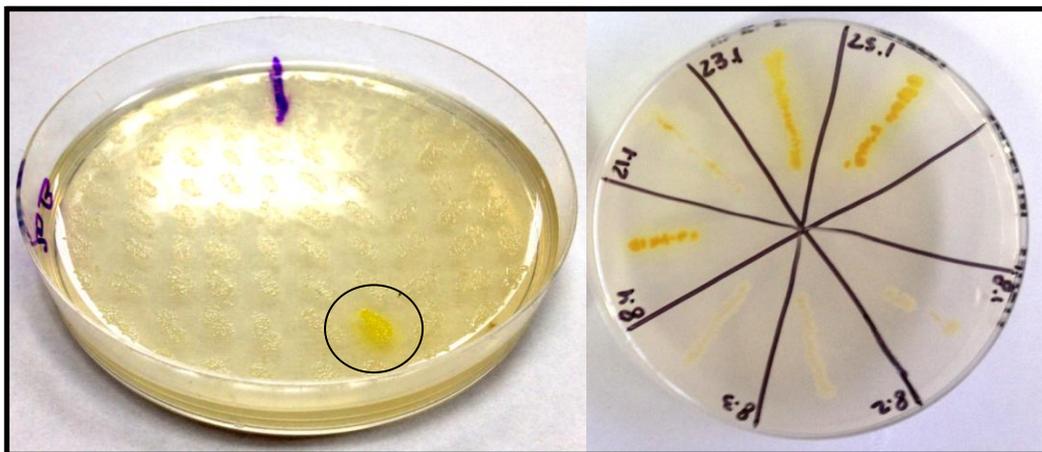


Figura IV.19. A. Fotografía del clon positivo (coloración amarilla de la estría) obtenido mediante el método del spray con una solución de catecol en una de placa de petri con LB con cloranfenicol diluido 1/10. B. Fotografía de estrías de clones positivos (8.4, 21.1, 23.1 y 25.1) y de clones negativos (8.1, 8.2 y 8.3).

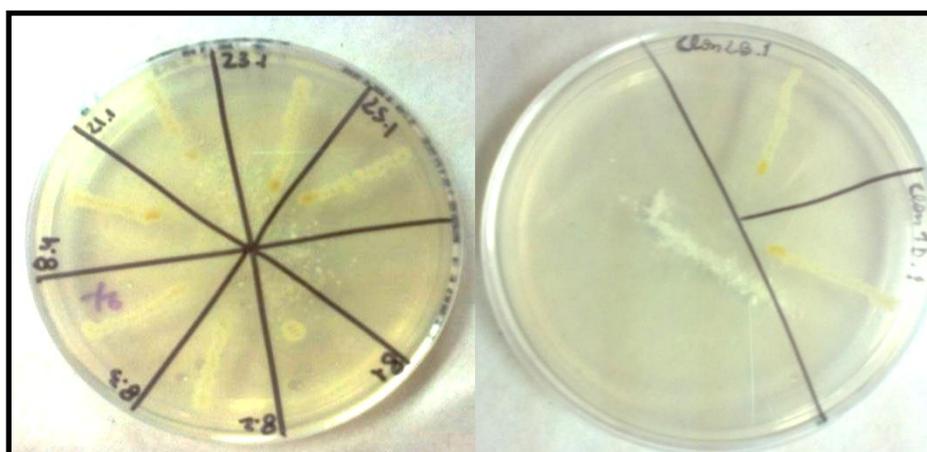


Figura IV.20. Fotografías de clones positivos (coloración amarilla en el extremo interno de la estría) obtenido mediante el *screening* con 2,3-dihidroxibifenilo en acetona en una de placa de petri con LB con cloranfenicol diluido 1/10.

IV.1.4.3.ii.3 Extracción de los fósmidos presentes en los clones positivos

Luego de identificar y aislar lo clones de interés se utilizó un kit comercial para la extracción de los fósmidos, para llevar a cabo su análisis por secuenciación. Si bien utilizando la cuarta estrategia se obtuvo un número menor de clones positivos que en el *screening* con catecol, se decidió analizar por secuenciación los 18 clones obtenidos del primer *screening*. Se realizaron cultivos de cada clon y se indujeron (solución de autoinducción) para aumentar el número de copias del fósrido con el fin de obtener un mayor rendimiento de extracción de DNA para secuenciar.

Con la extracción de DNA realizada se obtuvieron altos valores de DNA (entre 8 y 13 μg) de mediana pureza (relación de absorbancia 260/280 promedio de aproximadamente 2.0.). Por otra parte, para comprobar la integridad de los fósmidos se realizó una electroforesis en gel de agarosa 0,8% de los fósmidos extraídos (Figura IV.21). Fue posible observar dos bandas de alto peso molecular que podrían adjudicarse a distintas conformaciones de los fósmidos extraídos (Loviso 2015)

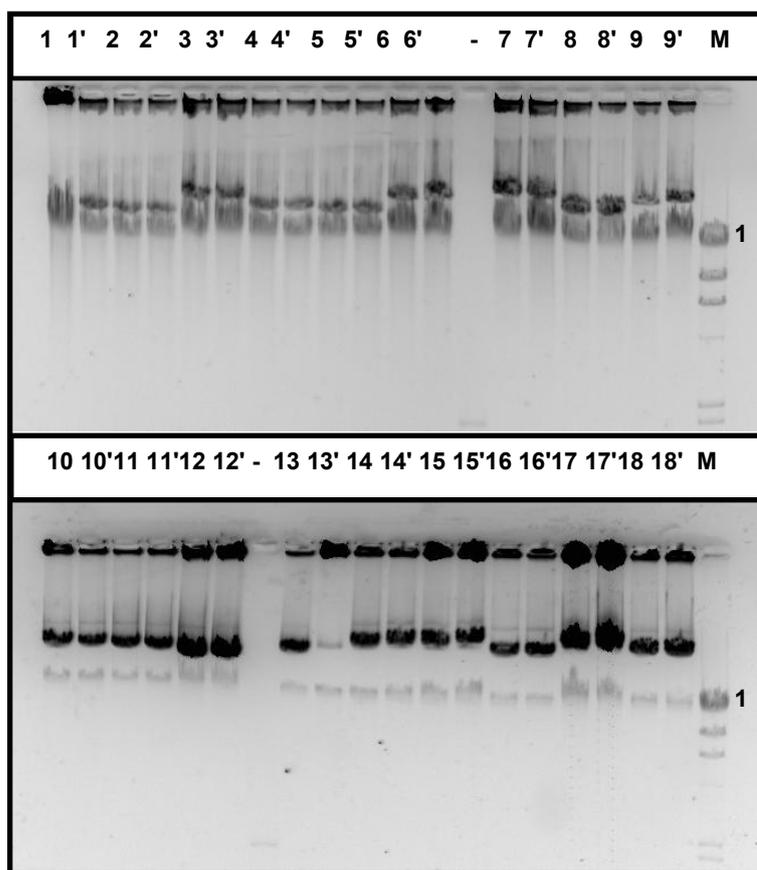


Figura IV.21. Fotografía del gel de agarosa 0,8% de los fósmidos de los clones positivos obtenidos. Los fósmidos se extrajeron por duplicado. El marcador de peso molecular (M) es el λ Hind III y con el número 1 se indica la banda de 23130 pb.

IV.1.4.3.ii.4 Secuenciación de los fósmidos y análisis de los scaffolds

La secuenciación completa de los fósmidos se realizó utilizando la plataforma Illumina en el Instituto de Agrobiotecnología Rosario (INDEAR). Se generaron 3 pools de 6 clones positivos cada uno. Como control del tamaño de los fósmidos se llevó a cabo una digestión con dos enzimas de restricción, EcoRI y NotI, de los clones que conformaban uno de tres pools de clones (Figura IV.22). Como resultado se obtuvieron distintos patrones de digestión, lo que demostraría que los fósmidos de ese pool presentan insertos distintos de DNA. Para encontrar el tamaño de cada inserto se utilizó solo la digestión con la enzima NotI. Los insertos presentaron un tamaño promedio de 32846 pb (rango de 20637-50065). Luego de la limpieza y el ensamblado de las secuencias se generaron 10 scaffolds. El vector de clonado se eliminó de forma manual sobre cada uno de los scaffolds. En la tabla IV.11 se detallan los scaffolds generados y su longitud una vez eliminado el vector.

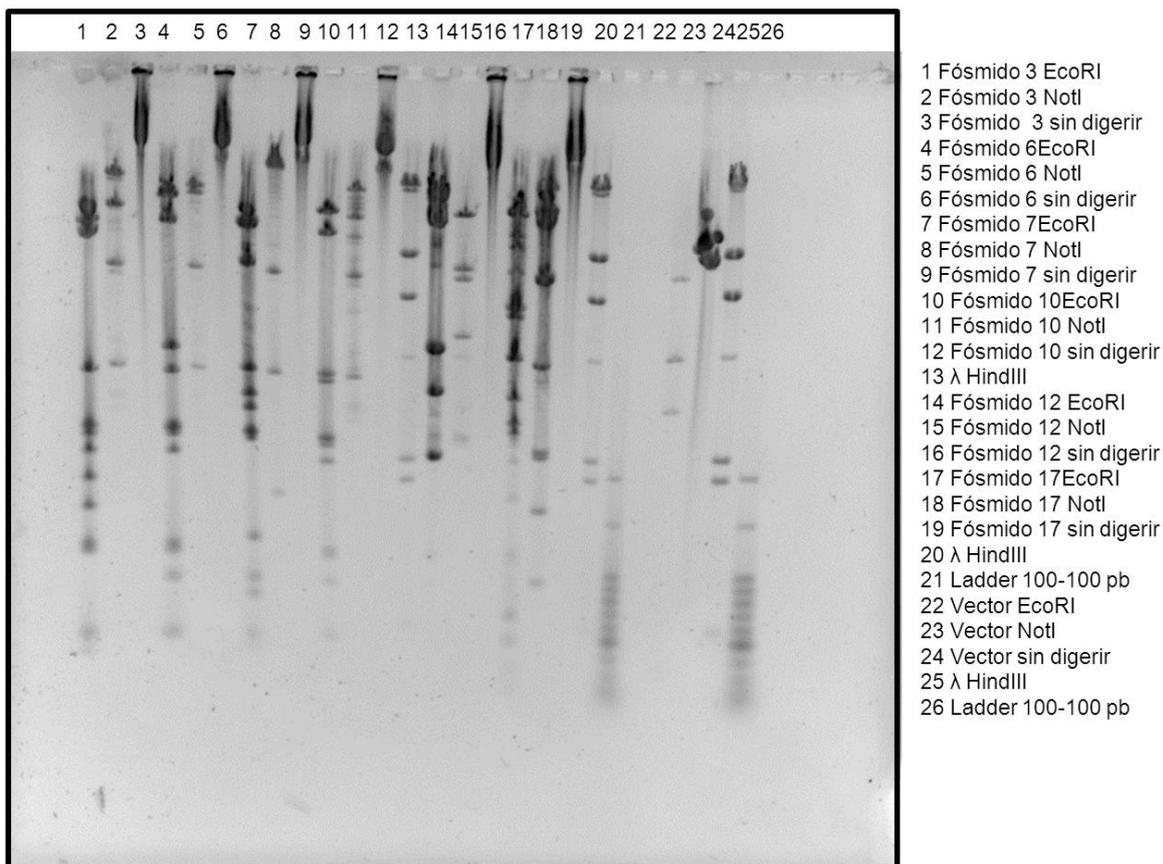


Figura IV.22. Fotografía del gel de agarosa 0,8% de la digestión de los fósmidos de uno de los pools armados para la secuenciación. El marcador de peso molecular es el λ Hind III y con el número 1 se indica la banda de 23130 pb.

	Scaffold	Longitud (pb)	%GC	CDS
Pool 1	1	65287	55,2	78
	2	29938	65,9	25
	3	25907	54,3	27
	4	37459	61,7	38
	5	13767	55,4	9
	6	3568	57,9	3
Pool 2	1	52837	54,9	61
	2	41546	62	44
	3	37341	54,4	37
Pool 3	1	57312	54,8	69

Tabla IV.11. Scaffolds generados por el ensamblado de las secuencias de los insertos en cada pool de clones. Se presenta el valor correspondiente a la longitud de cada scaffold sin el vector.

Se llevó a cabo una primera afiliación taxonómica utilizando el software BLASTn contra la base de datos de genomas de NCBI (Tabla IV.12). La afiliación taxonómica asignada a cada scaffold concuerda con los resultados obtenidos mediante pirosecuenciación del DNA total de CON, ya que se observa la presencia de genes pertenecientes a los órdenes *Burkholderiales*, *Enterobacteriales* y *Pseudomonadales*. La similitud en todos los *scaffolds* con el primer alineamiento obtenido supera el 86% (Tabla IV.12).

Pool	Scaffold	Afiliación taxonómica (BLAST)	% cobertura	% similitud	Nº acceso ^a
1	1	<i>Burkholderia</i> sp.HB1	80%	99%	NZ_CP012192.1
	2	<i>Pseudomonas denitrificans</i> ATCC 13867	87%	94%	NC_020829.1
	3	<i>Enterobacter aerogenes</i> cepa UCI97	99%	99%	NZ_KQ087587.1
	4	<i>Burkholderia</i> sp. CCGE1001	75%	87%	NC_015136.1
	5	<i>Enterobacter aerogenes</i> cepa UCI89	100%	99%	NZ_KQ087571.1
	6	<i>Enterobacter aerogenes</i> MGH 61	100%	99%	NZ_KK736187.1
2	1	<i>Burkholderia</i> sp. HB1	78%	99%	NZ_CP012192.1
	2	<i>Burkholderia</i> sp. CCGE1001	92%	86%	NC_015136.1
	3	<i>Enterobacter aerogenes</i> cepa CDC UA0804-01	100%	99%	NZ_KN150798.1
3	1	<i>Burkholderia</i> sp. HB1	80%	99%	NZ_CP012192.1

Tabla IV.12. Asignación taxonómica de los *scaffolds*, generados por el ensamblado de las secuencias de los insertos en cada pool de clones, mediante la herramienta BLASTn del NCBI. ^a Número de acceso a GenBank de la secuencia bacteriana relacionada más cercana.

Una segunda asignación taxonómica de los *scaffolds* obtenidos se llevó a cabo mediante la utilización del software PhylopythiaS, un método para caracterizar filogenéticamente fragmentos de secuencias en base a la composición de dicha secuencia. La asignación se realizó con la secuencia completa y con fragmentos más pequeños de la secuencia, teniendo en cuenta que la sensibilidad del método disminuye en secuencias menores a 5kb. Como se puede observar en la tabla IV.13 todos los *scaffolds* pertenecieron al filo *Proteobacteria* y se clasificaron a nivel de clase en *Beta* y *Gammaproteobacteria*. La asignación a nivel de orden mostró la presencia de los órdenes *Burkholderiales*, *Enterobacterales* y *Pseudomonadales*. Con ambas asignaciones taxonómicas logramos encontrar los mismos órdenes bacterianos en cada uno de los *scaffolds*.

	Scaffold	Dominio	Filo	Clase	Orden
Pool 1	1	<i>Bacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>
	2	<i>Bacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonadales</i>
	3	<i>Bacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Enterobacteriales</i>
	4	<i>Bacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>
	5	<i>Bacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Enterobacteriales</i>
	6	<i>Bacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Enterobacteriales</i>
Pool 2	1	<i>Bacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>
	2	<i>Bacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>
	3	<i>Bacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Enterobacteriales</i>
Pool 3	1	<i>Bacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>

Tabla IV.13. Asignación taxonómica de los scaffolds mediante el Software PhylopythiaS.

La predicción y anotación funcional de los genes identificados en cada *scaffold* se realizó utilizando un sistema de anotación rápida y automática llamado RAST (en inglés *Rapid Annotation using Subsystem Technology*). En la tabla IV.12 se muestra el número de secuencias codificantes encontradas en cada *scaffold* mediante la anotación en RAST (CDS: *Coding sequence*). Se identificaron entre 3 y 78 secuencias codificantes de proteínas en cada uno de los scaffolds, dando un total de 391 de CDSs. De los 10 scaffolds 3 (scaffold 1 del pool 1, el 1 del pool 2 y el 1 del pool 3) presentaron un alto número de genes codificantes de proteínas con dominios pertenecientes a familias de extradiol dioxigenasas así como también mono y dioxigenasas, entre otros dominios vinculados con la degradación de PAH (Tabla IV.S1 en material suplementario). En la figura IV.23 se muestra la organización génica del scaffold 1 del pool 1 y los productos génicos encontrados. Se puede observar la presencia tanto de genes codificantes de enzimas involucradas en la degradación de compuestos aromáticos, genes de enzimas vinculadas a la respuesta de las bacterias a los hidrocarburos y elementos móviles y proteínas asociadas (Tabla IV.1 en material suplementario).

Los tres scaffolds que presentaron alto número de genes involucrados en la degradación de compuestos aromáticos se compararon entre sí (con la herramienta comparación en base a secuencia del software RAST, que compara secuencia proteica mediante BLASTp). En los tres scaffolds se encontraron con un 100% de similitud las enzimas 2,3-dihidroxlifenilo 1,2-dioxigenasa (EC 1.13.11.39) y catecol 2,3-dioxigenasa (EC 1.13.11.2), ambas enzimas actuantes sobre los sustratos utilizados en el *screening* funcional de la biblioteca. Como se observa en la tabla IV.S1 (en material suplementario), la anotación de los tres *scaffolds* fue muy similar.

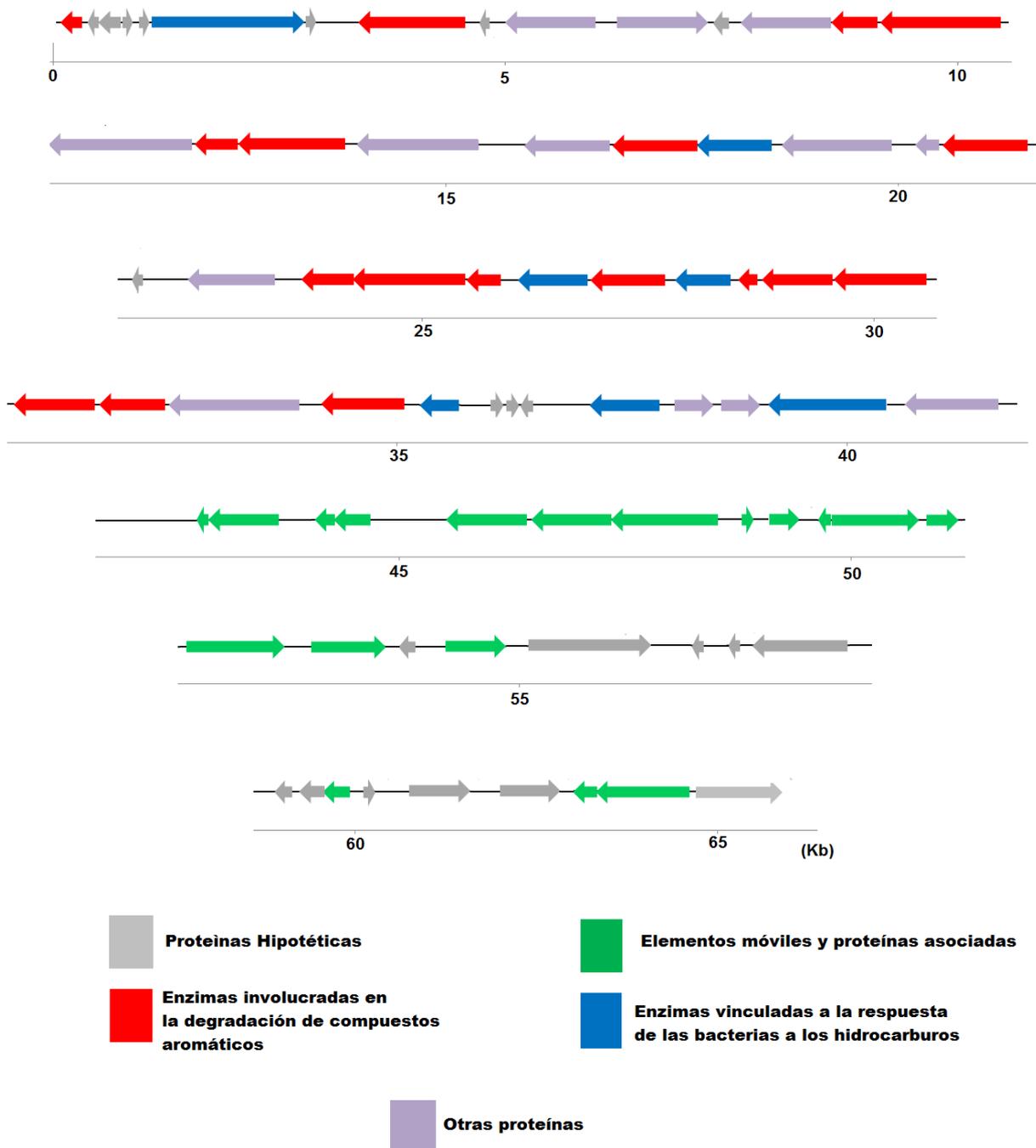


Figura IV.23. Organización génica encontrada en el scaffold 1 del pool 1. Cada secuencia codificante (CDS) se muestra con flechas y se separan en colores dependiendo de la función de sus productos génicos.

Con el objetivo de confirmar la anotación llevada a cabo en RAST y para analizar la asignación taxonómica de cada CDS se llevó a cabo con el scaffold 1 del pool 1 un análisis en BLASTp de cada secuencia de proteína (obtenida en RAST) de dicho scaffold. Tal como se muestra en la tabla IV.S2 (en material suplementario), la mayor parte de las proteínas se alinean, con un alto porcentaje de identidad, a proteínas de la cepa *Burkholderia* sp K24 (25% de las CDSs), seguida de *Burkholderia* sp HB1 (17%).

Dentro de las enzimas involucradas en el metabolismo de compuestos aromáticos se encuentran las enzimas oxigenasas, que pueden ser clasificadas según la parte de la ruta en la que participen. Las enzimas codificadas por los genes encontrados en los scaffolds 1 de los pools 1, 2 y 3 se separaron en dos categorías, aquellas que actúan en la ruta periférica del catabolismo de compuestos aromáticos y las que están involucradas en el metabolismo de los intermediarios provenientes de compuestos aromáticos (Tabla IV.14). Se encontraron un mayor número de oxigenasas del metabolismo periférico, como por ejemplo ambas subunidades de la enzima benzoato 1,2-dioxigenasa, que de las pertenecientes al metabolismo de los intermediarios donde solo se evidenció la presencia de la enzima catecol 2,3-dioxigenasa (enzima que actúa sobre uno de los sustratos utilizados). Se llevó a cabo además, un análisis sobre los genes anotados por RAST que no se relacionaron a oxigenasas y se observó la presencia de enzimas vinculadas a la ruta de degradación de compuestos aromáticos como la 4-oxalocrotonato decarboxilasa (EC 4.1.1.77), la 2-hidroximucónico semialdehído hidrolasa (EC 3.7.1.9), la 4-hidroxi-2-oxovalerato aldolasa (EC 4.1.3.39), la acetaldéhidó deshidrogenasa (EC 1.2.1.10) y la 4-oxalocrotonato tautomerasa (EC 5.3.2.-) (Figura IV.24). Es importante destacar la presencia de una ruta casi completa del meta-clivaje de compuestos aromáticos.

Como se marcó en la figura IV.23, otro de los grupos de genes encontrados fueron los vinculados con la respuesta de los microorganismos a la presencia de hidrocarburos y dentro de este grupo se evidenció una glutatión S-transferasa, una NADPH:Quinona reductasa, un transportador de 4-hidroxibenzoato, un regulador positivo de la enzima fenol hidroxilasa y subunidades ferredoxina. Además se encontraron otras enzimas de rutas alternativas (Figura IV.25).

División	Subdivisión	Oxigenasa
Metabolismo de intermediarios aromáticos centrales	Ruta central de metaclivaje de compuestos aromáticos	catecol 2,3-dioxigenasa
	Degradación de benzoato	benzoato 1,2- dioxigenasa subunidad beta
benzoato 1,2- dioxigenasa subunidad alfa		
subunidad grande de la toluato/benzoato dioxigenasa		
subunidades ferredoxina de la nitrato reductasa y de dioxigenasas de anillos aromáticos		
Ruta periférica de catabolismo de compuestos aromáticos	Degradación de Bifenilo	2,3-dihidroxlbfenilo 1,2- dioxigenasa
		subunidad grande de la naph/bph dioxigenasa
	Degradación de Tolueno	tolueno-4-monooxigenasa, subunidad TmoF
	Degradación de aminobenzoato	orto-halobenzoato 1,2- dioxigenasa
	Degradación de 2,4-dichlorobenzoate o 2-diclorobenzoato	orto -halobenzoato 1,2- dioxigenasa
	Metabolismo de Fenilalanina	3-fenilpropionato dioxigenasa, subunidad alfa

Tabla IV.14. Tabla de oxigenasas encontradas en los scaffolds de la biblioteca metagenómica de CON, que participan de la ruta periférica o central del metabolismo de compuestos aromáticos.

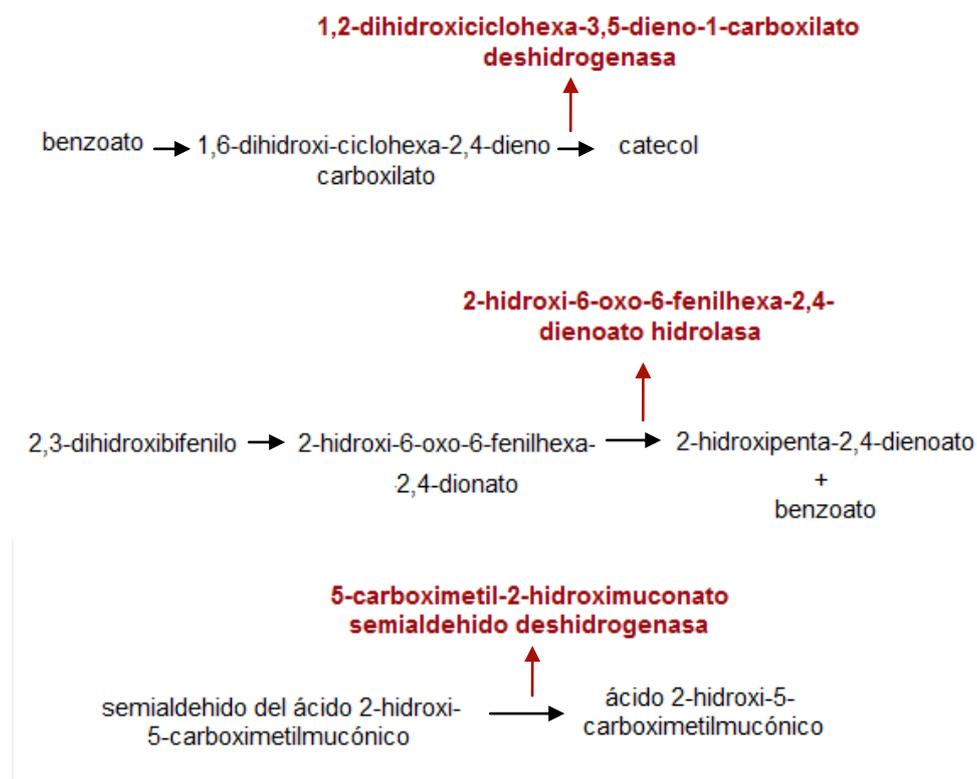


Figura IV.25. Esquemas de reacciones enzimáticas de la degradación de compuestos aromáticos de rutas alternativas al meta-clivaje. Con flechas se muestra el lugar donde actúan las enzimas encontradas en los scaffolds analizados.

IV.1.4.3.iii Estudio metaproteómico de CON

Para avanzar en el estudio de la diversidad funcional del consorcio se estudió su proteoma, a distintos tiempos durante el proceso de biodegradación de fenantreno a través de geles SDS-PAGE y 2-DE. Se sembraron las fracciones solubles de proteínas del consorcio obtenidas después de 4 y 15 días de incubación en cultivos con fenantreno.

IV.1.4.3.iii.1 Análisis por SDS-PAGE

Las proteínas obtenidas a los 4 y 15 días de incubación del consorcio a partir de cultivos en 200 mg.l⁻¹ de fenantreno como única fuente de carbono y energía (concentración de proteínas en la muestra sembradas: 2,12 mg.ml⁻¹ y 2,27 mg.ml⁻¹ respectivamente) se sembraron en un SDS-PAGE para una primera caracterización del perfil proteico. Con la técnica utilizada no se observaron diferencias significativas entre los perfiles de los cultivos cosechados a distintos tiempos durante la degradación de fenantreno (Figura IV.26).

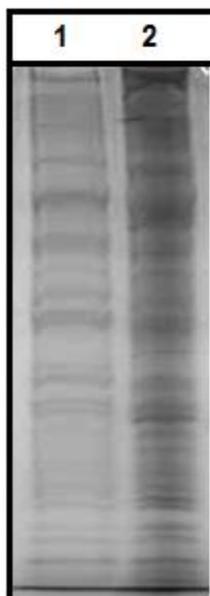


Figura IV.26. Fotografía del análisis por SDS PAGE Calle 1: CON 15 días; calle 2: CON 4 días.

IV.1.4.3.iii.2 Análisis por electroforesis bidimensional

Se continuó con el estudio del proteoma del consorcio, separando proteínas no solo por su masa molecular sino también en función de su carga neta. Se realizó una electroforesis bidimensional (por duplicado, Figura IV.S1 en material suplementario) para las muestras obtenidas los 4 y a los 15 días de incubación. Las fracciones solubles de proteínas fueron analizadas en geles bidimensionales (2-DE) en el rango de pH 4-7 y en el rango de peso molecular de 6.5 a 200 kDa. Aproximadamente 200 *spots* de proteínas se detectaron en cada gel 2-DE. (Figura IV.27).

Las muestras se analizaron por duplicado, en la figura IV.15 se muestra uno de los duplicados del set de geles a ambos tiempos de incubación estudiados. Al realizar una comparación cualitativa se observó que el gel de la muestra de los 15 días presentó mayor número de *spots* y de mayor intensidad que el gel correspondiente al día 4 de incubación, esta aparición proporciona información sobre la expresión diferencial de proteínas en el consorcio. En el gel correspondiente al día 4 de incubación se detectaron 199 proteínas, de las cuales 62 estaban sobre-expresadas con respecto al gel del día 15 de incubación, en el cual se detectaron 231 proteínas de las cuales 94 se encontraron sobre-expresadas con respecto al día 4.

De las proteínas con expresión diferencial de los días 4 y 15, se seleccionaron las que mostraron mayor discrepancia en la expresión y se analizaron por Maldi-TOF para obtener el perfil de masas de péptidos y así permitir su identificación. Algunos *spots* se analizaron por duplicado (el spot 2, 4 y 13) y se seleccionaron *spots* encontrados en la misma posición

del gel 2-DE en ambos tiempos de incubación (spots 5, 14, 15, 19 y 30) con el objetivo de confirmar que pertenecían a la misma proteína (spot compartido). Todas las proteínas identificadas se marcan en la figura IV.27 con círculo rojo.

En la tabla IV.16 se enumeran los spots cortados en cada gel correspondiente a cada tiempo de incubación, se indica si son diferenciales o compartidos y además si se identificaron o no. Tal como se observa, el 46% de los spots no lograron identificarse significativamente con una proteína.

Del análisis por MALDI TOF/TOF MS/MS se lograron identificar 21 proteínas (Tabla IV.17), 14 de las cuales pertenecían a la clase *Alphaproteobacteria*, familia *Sphingomonadaceae* (género *Sphingobium* y *Sphingomonas*) y 7 pertenecían la clase *Betaproteobacterias*, familia *Burkholderiaceae* (género *Burkholderia* y *Achromobacter*), ambas clases encontradas en el consorcio a través del análisis de su composición por pirosecuenciación (Figura IV.7). Proteínas de la familia *Burkholderiaceae* solo se encontraron al día 15 de incubación. Tanto al día 4 como al día 15 de incubación se encontraron las proteínas glutatión S-transferasa, Chaperona GroEL y GroES y la Aconitato Hidratasa 1. Por otra parte se identificaron dos enzimas dioxigenasa, la subunidad pequeña de antranilato 1,2-dioxigenasa (spot 19 compartido en ambos tiempos de incubación) y la subunidad pequeña de la enzima benzeno dioxigenasa (XylY) (spot 108), siendo esta última encontrada solo al día 15 de incubación.

Spot número	Día 4			Día 15			
	D o C	igual al spot	identificada	Spot número	D o C	igual al spot	identificada
16	D		NS	2	D		Sí
17	D		NS	3	C		NS
18	D		NS	4	D		Sí
19	C		Sí	5	C		Sí
21	D		NS	6	D		NS
22	D		NS	11	D		NS
23	D		NS	13	D		Sí
24	D		NS	14	C		Sí
25	D		NS	15	C	30	Sí
27	D		NS	32	D		NS
28	D		NS	33	D		NS
29	D		NS	34	D		NS
30	C	15	Sí	102	D		Sí
31	C	14	NS	103	D		Sí
201	C	110	Sí	105	D		Sí
202	D		Sí	106	D		Sí
203	D		Sí	107	D		Sí
				108	D		Sí
				110	C	201	Sí

Tabla IV.16. Listado de todos los spots cortados de ambas condiciones estudiadas. D (Diferencial), C (Compartido). NS (No se logró obtener un valor de score significativo).

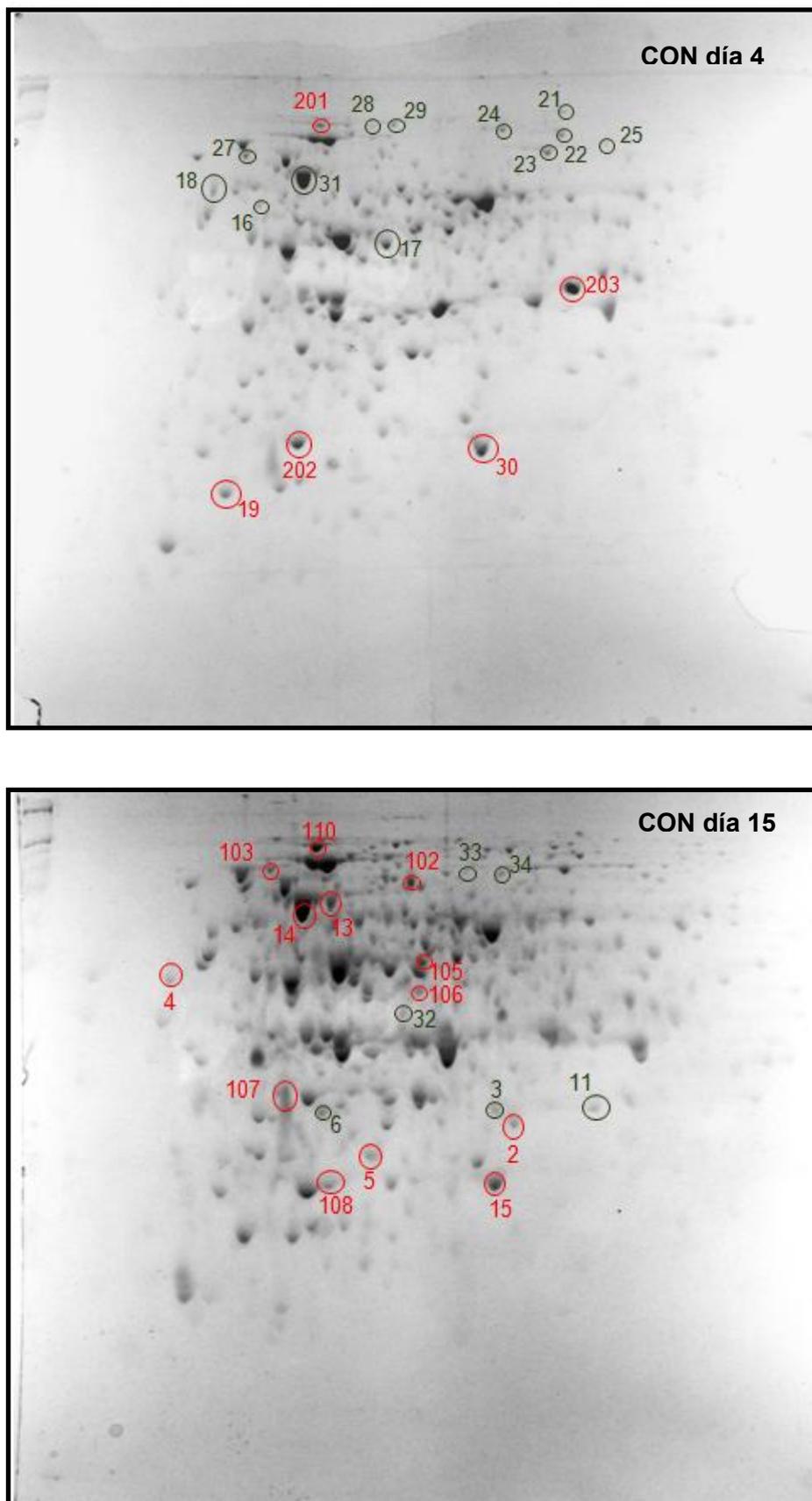


Figura IV.27. Fotografía del análisis por electroforesis bidimensional de dos condiciones distintas de CON. Se indican con círculos rojos los spots de proteínas que se identificaron y con verde aquellos para los que no se logró obtener un valor de score significativo.

Spot	Proteína	Número de Acceso al NCBI	Microorganismo
Día 4			
19	subunidad pequeña de la antranilato 1,2-dioxigenasa	AGZ63463.1	Familia <i>Sphingomonadaceae</i>
30	glutación S-transferasa	AAB66314.1	Familia <i>Sphingomonadaceae</i>
201	aconitase hidratasa 1	WP_013847097.1	<i>Sphingobium chlorophenolicum</i> L-1
202	10 kDa chaperonina, GroES	WP_009821400.1	<i>Sphingomonas</i> sp. SKA58
203	proteína hipotética SJA_C1-23830	WP_013040608.1	<i>Sphingobium japonicum</i> UT26S
Día 15			
2	peroxidasa	EFF76491.1	<i>Achromobacter piechaudii</i>
4	proteína flagelar MotB	AEG47917.1	<i>Sphingobium chlorophenolicum</i>
5	hemeritina	EQA99294.1	<i>Sphingobium quisquiliarum</i>
13	chaperona molecular GroEL	EFV85752.1	<i>Achromobacter</i>
14	chaperona molecular GroEL	AEG50141.1	<i>Sphingobium chlorophenolicum</i>
15	glutación S-transferasa	AAB66314.1	Familia <i>Sphingomonadaceae</i>
4*	OmpA/MotB	WP_013846190.1	<i>Sphingobium chlorophenolicum</i> L-1
102	2-aminobenzoato-CoA ligasa	WP_006388560.1	<i>Achromobacter xylooxidans</i>
103	chaperona DnaK	WP_013391863.1	<i>Achromobacter xylooxidans</i> A8
105	Seril-tRNA sintetasa	WP_013846217.1	<i>Sphingobium chlorophenolicum</i> L-1
106	factor de elongación Tu 1	WP_013397021.1	<i>Achromobacter xylooxidans</i> A8
107	10 kDa chaperonina, GroES	WP_009821400.1	<i>Sphingomonas</i> sp. SKA58
108	XylY	WP_008828130.1	<i>Sphingomonas</i> sp. LH128
110	aconitato hidratasa 1	WP_013847097.1	<i>Sphingobium chlorophenolicum</i> L-1
13*	chaperonina	WP_006385976.1	<i>Achromobacter xylooxidans</i> C54
2*	posible oxidoreductasa	WP_004186345.1	<i>Burkholderia pseudomallei</i> K96243

Tabla IV.17. Listado de proteínas identificadas en los Spots analizados por MALDI TOF/TOF MS/MS. Se indica con un (*) los spots que se analizaron por duplicado.

Mediante la utilización de los enfoques ómicos se logró conocer la importancia funcional dentro de CON de las poblaciones pertenecientes al orden *Burkholderiales*, que no pudieron ser obtenidas por medios dependientes de cultivo.

IV.2 Discusión

Desde un punto de vista ambiental, se postula que la utilización de consorcios microbianos presenta un alto potencial para el desarrollo de estrategias de biorremediación de suelos contaminados, brindando la diversidad metabólica y la robustez necesaria para la estabilidad del ecosistema (Kuppusamy y col., 2016).

En el presente trabajo de tesis, con el objetivo de obtener distintas formulaciones bacterianas para llevar a cabo estrategias de bioaumentación en suelos contaminados con PAH, se obtuvo, en primer lugar, un consorcio bacteriano degradador de fenantreno a partir de un suelo crónicamente contaminado con hidrocarburos, al que se llamó CON. Se estudió la diversidad, estructura y funcionalidad de CON durante la degradación de fenantreno en medio líquido por métodos dependientes e independientes de cultivo.

Por métodos dependientes de cultivo se lograron aislar cinco cepas a partir del consorcio y se estudió la degradación del hidrocarburo tanto en cultivos puros de las mismas como en consorcios definidos (cultivos mixtos). Sin embargo, las características de un consorcio no se logran conocer a través de las características de sus microorganismos aislados, la habilidad de un consorcio de degradar un contaminante no resulta generalmente en la suma de las capacidades degradadoras de sus cepas aisladas, debido a la posible presencia de relaciones antagónicas o de competencia o por la superposición de nichos ecológicos durante la degradación (Jacques y col., 2008). Por este motivo, para profundizar en el conocimiento de las características y el comportamiento de CON en cultivos de MML con fenantreno como única fuente de carbono y energía, se llevaron a cabo enfoques del tipo metagenómico y metaproteómico.

La composición de CON se estudió por métodos independientes de cultivo (Tabla IV.2), mediante la construcción de una biblioteca de genes de 16S rRNA (Tabla IV.3), por PCR-DGGE (Figura IV.4) y por pirosecuenciación del gen 16S rRNA (Figura IV.7). Este último estudio nos permitió conocer la composición de CON en términos de abundancia relativa de cada uno de los miembros, mientras que los tres estudios previos solo nos brindaron información parcial acerca de la diversidad presente en CON.

Según el estudio de pirosecuenciación los miembros del consorcio y sus abundancias relativas son, a nivel de género: *Sphingobium*, *Enterobacter*, *Achromobacter*, *Inquilinus*, *Bordetella*, *Luteibacter*, *Sphingomonas*, *Pseudomonas* y *Bradyrhizobium* (Figura IV.7).

Por métodos dependientes de cultivo se lograron aislar cinco cepas bacterianas, pertenecientes a las clases *Alpha* y *Gammaproteobacteria*, de las cuales una se afilió a nivel de género a *Sphingobium* sp., dos al género *Pseudomonas* sp., y dos a *Enterobacter* sp. (Tabla IV.2).

Por otra parte, mediante la construcción de la biblioteca genómica se identificaron en CON géneros bacterianos pertenecientes a las clases *Alphaproteobacteria* (*Inquillinus*, *Ochrobactrum*, *Sphingobium* y *Sphingomonas*) y *Betaproteobacteria*, (*Alcaligenes* y *Achromobacter*) (Tabla IV.3). Cabe destacar que la presencia de las *Gammaproteobacteria* (*Pseudomonas*, *Luteibacter* y *Enterobacter*) no se logró identificar mediante la biblioteca genómica pese a que el género *Enterobacter* resultó el segundo en abundancia relativa en CON según los resultados de pirosecuenciación (Figura IV.7).

La estructura del consorcio degradador de fenantreno se estudió además por PCR-DGGE (Figura IV.4). Un hecho a remarcar es que las secuencias del gen 16S rRNA de las cepas aisladas, no estuvieron cercanamente relacionadas con las secuencias obtenidas a partir de la pequeña biblioteca de CON (Figura IV.5) y tampoco mostraron co-migración con alguna de las bandas de los perfiles de CON obtenidos por DGGE (Figura IV.4). Sin embargo, la secuencia de la banda dominante de los perfiles de DGGE (B8), asociada filogenéticamente a la familia *Sphingomonadaceae*, fue también la que se encontró con mayor frecuencia en la biblioteca genes de 16S rRNA (Tabla IV.3). Las diferencias encontradas entre las técnicas dependientes de cultivo y las técnicas convencionales independientes de cultivo (biblioteca genómica y DGGE), se han reportado también en otros estudios (Vainio y col., 1997; Viñas y col., 2005b; Molina y col., 2009). Estas diferencias se podrían adjudicar por un lado a la diferente factibilidad de cultivar a las bacterias presentes en CON en las condiciones utilizadas (medio de cultivo, temperatura, etc), y por el otro lado al sesgo que presenta la amplificación por PCR de la secuencia del gen 16S rRNA, lo que hace que el gen 16S rRNA de algunas especies sea preferencialmente amplificado (Hansen y col., 1998). Esto último se atribuye a las diferencias del tamaño del genoma y la cantidad de copias del gen 16S rRNA en las especies presentes en la muestra (Farrelly y col., 1995), la interferencia por parte de la secuencia que flaquea a la región blanco (Hansen y col., 1998) y la diferencia de apareamiento entre los *primers* y la región de unión en el genoma (Sipos y col., 2004).

La composición de CON se logró confirmar por pirosecuenciación, dando un cierre al estudio de su composición y las respectivas abundancias relativas. Si bien las estrategias cultivo independiente utilizadas comparten pasos metodológicos como la PCR, la pirosecuenciación provee mayor profundidad y cobertura de la muestra.

La pirosecuenciación provee información de la estructura y diversidad de una comunidad con una resolución de 10 a 100 veces mayor que la construcción de una biblioteca de clones y posterior secuenciación por Sanger o DGGE (Simon y Daniel, 2011; Tamaki y col., 2011), revelando la presencia de los miembros presentes en baja abundancia (Bohorquez y col., 2012). La curva de rarefacción obtenida (Figura IV.6) y el índice de Good (Tabla IV.4) confirman que el número de secuencias recuperadas fue suficiente para cubrir la diversidad presente en CON.

Todos los géneros presentes en el consorcio se han vinculado previamente a la degradación de hidrocarburos, ya sea degradándolos activamente o mediante la producción de biosurfactantes. En primer lugar, el género mayoritario de CON, *Sphingobium* (87,4%), y el género *Sphingomonas*, forman parte de las *Sphingomonads*, un grupo comúnmente hallado en procesos de degradación de contaminantes orgánicos, y caracterizados por ser catabólicamente versátiles y genéticamente adaptados a diferentes condiciones ambientales (Madueño y col., 2011; Waigi y col., 2015). El segundo género en orden de abundancia relativa es *Enterobacter*, que ha sido ampliamente reportado por su capacidad para degradar hidrocarburos (Lors y col., 2010; Toledo y col., 2006).

Dentro del orden *Burkholderiales* (*Bordetella* y *Achromobacter*), los microorganismos del género *Bordetella* fueron detectados previamente en tratamientos en biorreactores de suelo contaminado con bifenilos policlorados (Mercier y col., 2015). Zhong y col., (2010) aislaron una cepa del género *Bordetella* capaz de degradar el 80% del fenantreno suplementado en medio mineral líquido. Por otra parte una cepa de *Achromobacter* sp. se aisló de suelos contaminados con petróleo, presentando la capacidad de degradar bifenilo (Hong y col., 2009), y otra cepa de *Achromobacter xylosoxidans* degradadora de criseno, se aisló de un sitio salino contaminado con petróleo (Ghevariya y col., 2011).

Dentro de los géneros con baja abundancia relativa, se reportó que *Inquilinus limosus* KB3 sería capaz de formar emulsiones con varios hidrocarburos, aumentando la solubilidad de los PAH y mejorando la recuperación del petróleo (Kiran y col., 2015). Por otra parte, dentro del orden *Xanthomonadales*, generalmente relacionado a enfermedades de las plantas (Núñez y col., 2012), se ha aislado una cepa del género *Luteibacter* capaz de degradar PAH, a partir de microcosmos de sedimento contaminados con acenafteno, fenantreno y pireno (Muangchinda y col., 2013).

La familia *Pseudomonadaceae* se asocia a la degradación de PAH de bajo peso molecular y sus rutas metabólicas de degradación de fenantreno y naftaleno junto con sus enzimas han sido ampliamente estudiadas (Tauler y col., 2015). El género *Pseudomonas* incluye cepas degradadoras de antraceno, fenantreno y naftaleno, adaptadas a ambientes extremos (Ma y col., 2006; Janbandhu y Fulekar, 2011).

Por último, si bien el género *Bradyrhizobium* no está comúnmente asociado a la utilización de hidrocarburos, se identificaron recientemente secuencias asociadas a este género mediante estrategias SIP (*Stable Isotope Probing*) en bioreactores de suelo, utilizando antraceno marcado con ^{13}C (Singleton y col., 2013). Además microorganismos pertenecientes a este género han mostrado actividad emulsificante y se ha demostrado la potencial aplicación de miembros del orden *Rhizobiales* en procesos de biorremediación de hidrocarburos (Ruggeri y col., 2009).

Otros consorcios con una composición bacteriana similar a la encontrada en CON han sido reportados en la literatura, tal como el consorcio bacteriano degradador de naftaleno DV-AL (Patel y col., 2012), un consorcio capaz de degradar eficientemente hidrocarburos en lodos de petróleo y suelo arenoso contaminado (Gojgic-Cvijovic y col., 2012), un consorcio degradador de PAH (González y col., 2011) y el consorcio UBHP, obtenido a partir de un suelo contaminado con creosota (Tauler y col., 2015). Resulta evidente que los géneros *Achromobacter* sp., *Pseudomonas* sp., *Enterobacter* sp. y *Sphingobium* sp. muestran una asociación habitual de naturaleza aún desconocida.

Bajo las condiciones estudiadas, luego de 7 días de incubación el consorcio mostró una degradación de fenantreno del 59% (Figura IV.2), con una concomitante acumulación de ácido 1-hidroxi-2-naftoico (Figura IV.2) y acompañado de un aumento de bacterias degradadoras de PAH (Figura IV.3). A partir de los 7 días de incubación, la degradación de fenantreno se frenó, aumentó la acumulación de ácido 1-hidroxi-2-naftoico y disminuyó abruptamente el número de bacterias degradadores de PAH.

De las cinco cepas aisladas de CON, solo la cepa AM, afiliada al género *Sphingobium* sp. (Tabla IV.2), fue capaz de degradar fenantreno (Tabla IV.5), el resto no mostró dicha capacidad ni siquiera al suplementar el medio con factores de crecimiento (extracto de levadura) (Tabla IV.6). Además en la cepa AM se demostró la presencia del gen de la subunidad alfa de la enzima dioxigenasa (Figura IV.10), se evidenció actividad dioxigenasa en estrías de la misma (demostrando que estas enzimas claves son constitutivas en la cepa *Sphingobium* sp. AM) (Figura IV.9), y la curva de los recuentos diferenciales según su morfología de colonia (Figura IV.12) coincide con la curva obtenida de los recuentos de bacterias degradadoras de CON (Figura IV.3). Cabe destacar que la cepa *Sphingobium* sp. AM en cultivo puro, bajo las mismas condiciones de cultivo y al mismo tiempo de incubación que CON, presentó un mayor porcentaje de degradación de fenantreno (87%) (Tabla IV.9), no detectándose acumulación de metabolitos intermediarios (Tabla IV.9). Wang y col., (2008) desarrollaron un consorcio (W4) capaz de degradar fenantreno compuesto por *Sphingomonas*, *Rhizobium*, *Pseudomonas* y *Achromobacter*. Contrariamente a lo encontrado en este trabajo de tesis, el consorcio bacteriano W4 presentó una mayor degradación de fenantreno, ya sea en cultivo estático o en agitación, que la cepa W4-1 afiliada a *Sphingomonas cloacae*, que presentó un rol predominante en la degradación del contaminante dentro de W4, siendo la única cepa capaz de metabolizar dicho compuesto.

El género *Sphingobium* se ha reportado previamente por su capacidad de mineralizar fenantreno (Roy y col., 2012; Fu y col., 2014). La cepa *Sphingobium* sp. AM no mostró ni crecimiento ni degradación en cultivos con ácido 1-hidroxi-2-naftoico (Tabla IV.7), considerado uno de los metabolitos clave en la degradación de fenantreno. Sin embargo, en cultivos con fenantreno como única fuente de carbono y energía luego de 2 días de

incubación se evidenció la acumulación de ácido 1-hidroxi-2-naftoico y ácido salicílico que luego de 7 días de incubación no se lograron detectar (Tabla IV.9), sugiriendo la existencia de una ruta completa de mineralización del PAH. Wang y col., (2008) observaron que *Cycloclasticus sp.* P1 no era capaz de utilizar ni salicilato ni catecol como fuentes de carbono; sin embargo se confirmó la existencia de la vía del catecol mediante un ensayo de actividad enzimática llevada a cabo con lisados de células de P1 creciendo en pireno, naftaleno o fenantreno. Se postuló que esta vía podría ser activada por pireno, naftaleno y fenantreno pero no por el catecol. En base a la predicción de la regulación de los operones, Khara y col., (2014) sugirieron que la expresión de enzimas catabólicas de compuestos aromáticos requiere múltiples inductores. van Herwijnen y col., (2006) observaron una mejora en la degradación de fenantreno al adicionar ácido salicílico, sugiriéndolo como un inductor de las enzimas de la degradación de fenantreno.

Los resultados encontrados en el presente trabajo sugerirían o que en la cepa AM la inducción de las enzimas necesarias para la degradación de ácido 1-hidroxi-2-naftoico podría atribuirse al fenantreno o que la incapacidad de la cepa de degradar ácido 1-hidroxi-2-naftoico es debido a que el sustrato exógeno no puede ingresar a la célula (Balashova y col., 1999).

Dos de las cepas aisladas de CON (cepa T y cepa Bc) se afiliaron al género *Pseudomonas sp.* (Tabla IV.2). Pese a no poder determinar la capacidad de estas cepas de degradar ninguno de los compuestos estudiados, fenantreno (Tabla IV.5 y Tabla IV.6), ácido 1-hidroxi-2-naftoico y ácido salicílico (Tabla IV.7), se observó su capacidad de crecer en cultivos independientes de los 3 sustratos mencionados (Tabla IV.5 y IV.7). Por otra parte, la dinámica de las colonias características de la cepa T (Figura IV.12), que mostró una clara predominancia hacia el final del período de incubación, cuando la degradación de fenantreno se había detenido (Figura IV.2), podría estar indicando que la cepa T jugaría un rol funcional relacionado a la degradación de los metabolitos de fenantreno. Además, la cepa *Pseudomonas sp.* T presentó alfa hemólisis en agar sangre (Figura IV.11), sugiriendo la producción de compuestos con actividad surfactante, lo que ayudaría a aumentar la solubilidad, movilidad y biodisponibilidad y la subsecuente degradación de compuestos orgánicos hidrofóbicos como los hidrocarburos (Bezza y Nkhalambayausi Chirwa, 2016). El género *Pseudomonas* fue previamente reportado por su capacidad de producir biosurfactantes en medios con hidrocarburos (Deziel y col., 1996; Prabhu and Phale, 2003; Thavasi y col., 2011).

Las dos cepas restantes, B y B1, se identificaron con el género *Enterobacter sp.* (Tabla IV.2). Ambas cepas no mostraron ni crecimiento ni degradación de fenantreno, (Tabla IV.5; Tabla IV.6), ni de ácido 1-hidroxi-2-naftoico ni de ácido salicílico (Tabla IV.7). Sin embargo, la cepa B presentó evidencias de la presencia un gen que codificaría para la subunidad alfa

de la enzima dioxigenasa (Figura IV.10). La posterior clonación del fragmento de PCR logró confirmar que el fragmento clonado provenía de *Enterobacter*, sin embargo, no se logró afirmar que ese fragmento amplificado pertenezca a un gen codificante de una enzima dioxigenasa. Si bien no se logró establecer el rol de la cepa *Enterobacter* se observó, como sucedió con la cepa T, alfa hemolisis en agar sangre. Hua y col., (2010) demostraron que los exopolisacáridos excretados por *Enterobacter cloacae* TU presentaban actividad bioemulsificadora, aumentando la solubilidad en agua del hexadecano. Por otra parte, Toledo y col., (2008) reportaron que una cepa de *Enterobacter* sp., aislada de residuos de petróleo crudo, fue capaz de crecer y generar bioemulsificadores en cultivo líquido con hidrocarburos.

Si la caracterización taxonómica de un consorcio microbiano presenta un alto nivel de complejidad, la caracterización catabólica es aún más difícil (Dejonghe y col., 2003). Cada miembro en una comunidad microbiana posee un rol significativo y podría depender de la presencia de otra especie o cepa para sobrevivir cuando la fuente de energía se trata de una molécula compleja (Ghazali y col., 2004).

Una primera estrategia para encarar la caracterización catabólica es a nivel de cultivables, comparando el comportamiento del consorcio con las cepas aisladas y mezclas de las mismas. Bouchez y col., (1999) compararon el comportamiento de cultivos mixtos de cepas degradadoras de PAH con un consorcio natural degradador de PAH, encontrando que el consorcio natural fue quien logró la mayor degradación de una mezcla de cinco PAH. Contrariamente, el consorcio natural obtenido en este trabajo de tesis mostró una menor eficiencia en la degradación de fenantreno (Figura IV.2) que la cepa AM y que los consorcios definidos (Tabla IV.9). Sin embargo, los consorcios definidos mostraron un mayor porcentaje de degradación de fenantreno en confrontación al cultivo puro de la cepa *Sphingobium* sp. AM luego de 7 días de incubación. Estos resultados sugerirían la existencia de relaciones tanto positivas como negativas dentro de CON.

Las actividades de cooperación metabólica en los consorcios bacterianos durante la degradación de contaminantes orgánicos generalmente involucran dos mecanismos conocidos. El primero de ellos está basado en las deficiencias metabólicas, donde las bacterias degradadoras son fastidiosas y dependen de que cepas secundarias les provean factores de crecimiento o nutrientes (Sorensen y col., 2002). El segundo es el metabolismo asociado, donde ocurre la alimentación cruzada con metabolitos de la vía de degradación dentro del consorcio (Bouchez y col., 1999; Dejonghe y col., 2003).

La competencia ocurre cuando dos especies utilizan el mismo recurso, fuentes de carbono, nitrógeno, fósforo, oxígeno entre otros. El principio de exclusión competitiva está en contra de la idea de que dos poblaciones puedan ocupar el mismo nicho ecológico si utilizan el mismo recurso, ya que uno ganará la competencia y el otro será eliminado. Esta eliminación

ocurre rápidamente en ambientes espacialmente homogéneos como son los cultivos en batch (Jiang y col., 2007). Por otra parte, existen evidencias de que la competencia por los recursos sería un importante mecanismo ecológico que determinaría la evolución de la cooperación entre especies (Celiker y Gore, 2012).

Como segunda estrategia para profundizar en la caracterización catabólica de CON se incursionó en la utilización de una aproximación metagenómica con *screening* funcional (Figura IV.14). Los estudios de metagenómica funcional mediante la construcción de bibliotecas genómicas con insertos de DNA de gran tamaño, utilizan la capacidad de las enzimas de producir coloración a partir de un sustrato durante su expresión en *E.coli*, y nos brindan un catálogo de la información genómica que puede ser traducida en una lista de posibles proteínas (Hettich y col., 2012). Estos estudios han logrado revelar la gran diversidad de rutas del meta-clivaje y la excepcional densidad de genes involucrados en el metabolismo de los PAH (El Amrani y col., 2015). Una de las ventajas más importantes de este enfoque ómico es brindar la posibilidad de identificar bacterias degradadoras de PAH difíciles de cultivar en medios artificiales (Desai y col., 2010), ya que a diferencia de las técnicas que requieren PCR, como la utilizada en este capítulo para detectar la presencia de genes codificantes de enzimas dioxigenasa (Figura IV.13), no requiere conocimiento previo de la secuencia del genoma.

Mediante un *screening* funcional sobre la biblioteca obtenida a partir del DNA total de CON, se lograron identificar clones que contenían genes de la ruta de degradación de fenantreno, lográndose evidenciar la presencia en el consorcio de por lo menos otra especie con capacidad de degradar PAH, distinta de la cepa de *Sphingobium* sp. AM (Tabla IV.5) obtenida por métodos de cultivo (Tabla IV.2). Las secuencias provenientes de la biblioteca metagenómica que se asociaron a genes vinculados con la degradación de PAH presentaron afiliación taxonómica al orden *Burkholderiales* (Tabla IV.12 y IV.13).

La capacidad de las *Betaproteobacteria* del orden *Burkholderiales* de degradar compuestos aromáticos ha sido previamente estudiada (Kang y col., 2003; Coenye y Vandamme, 2006; Seo y col., 2007; Tiwari y col., 2010; Ghevariya y col., 2011). Por otro lado, su versatilidad nutricional que contribuye con su capacidad de competir y colonizar distintos ambientes (Salles y col., 2002) y la distribución heterogénea de sus genes catabólicos que demuestra la diversidad ecológica de este grupo bacteriano, ha consolidado al orden *Burkholderiales* como un grupo clave en la ecología microbiana de los procesos de biorremediación de ambientes contaminados con compuestos aromáticos (Pérez-Pantoja y col., 2012).

La caracterización taxonómica de los fragmentos metagenómicos resulta necesaria para una mayor comprensión de la comunidad estudiada (McHardy y col., 2007). Cabe destacar que ninguno de los *scaffolds* obtenidos se afilió con la clase *Alphaproteobacteria*, más específicamente al orden *Sphingomonadales* (87,9% de abundancia relativa de CON)

(Figura IV.7), mientras que sí lo hicieron con la clase *Beta* y *Gammaproteobacteria* (Tabla IV.13), ambas presentes en el consorcio. Una hipótesis que podría explicar los resultados encontrados se basa en que se ha determinado que sólo el 40% de las actividades enzimáticas pueden ser recuperadas por clonado en *E. coli* (Gabor y col., 2004). La actividad de enzimas heterólogas no sólo requiere la expresión de las proteínas, sino también el correcto plegamiento, su incorporación en la membrana celular o secreción, y en algunos casos la presencia de cofactores específicos o enzimas modificadoras (Gabor y col., 2004). Sin embargo, Suenaga y col., (2007) encontraron, si bien con bajo porcentaje de identidad de aminoácidos con respecto a secuencias de microorganismos cultivados, genes codificantes de la enzima catecol 2,3-dioxigenasa perteneciente al género *Sphingomonas* sp. A8AN3 en una biblioteca metagenómica proveniente de lodo activado. Por otra parte, recientemente Loviso, (2015) encontró por asignación taxonómica que la mitad de los clones positivos (*screening* funcional con catecol e indol), obtenidos de una biblioteca genómica de sedimentos marinos subantárticos se afiliaban con un bajo % de cobertura (rango entre 8-48%) y de identidad (rango entre 72-80%) al orden *Sphingomonadales*, tanto al género *Sphingobium* como *Sphingomonas*. Ambos trabajos presentan indicios de que la utilización de la cepa *E. coli* y el *screening* funcional con los sustratos elegidos no representarían un obstáculo para la expresión de las proteínas de este orden y la posterior identificación de los clones. Además, no se ha encontrado bibliografía que concluya lo contrario.

Por otro lado, muchos de los genes involucrados en el catabolismo de PAH están agrupados en operones, rango de 10 a 30 Kb (Suenaga y col., 2007), y situados en plásmidos bacterianos, además de estar flanqueados por transposones o secuencias similares sugiriendo que dichos genes pueden ser transferidos a otros miembros de la comunidad bacteriana por transferencia horizontal (El Amrani y col., 2015). Por lo tanto utilizando como blanco de *screening* funcional enzimas centrales o esenciales dentro del metabolismo de aromáticos, como es el caso de la enzima catecol 2,3-dioxigenasa se podría encontrar el conjunto de genes de interés (Suenaga, 2012). Sin embargo, se podría sugerir que el *screening* funcional con catecol no logró poner en evidencia todos los clones con insertos que contenían genes de la ruta de degradación de PAH, ya que el *screening* realizado a través de PCR para genes específicos de enzimas dioxigenasas dio resultados positivos para placas en las que luego no se expresaron clones positivos (Figura IV.18, Tabla IV.10). En las *Sphingomonads* los genes catabólicos están organizados de manera compleja, diseminados en varios *clusters*, ya sea en megaplásmidos o en el cromosoma bacteriano, contrariamente a lo que ocurre en otros microorganismos como *Burkholderia*, *Pseudomonas* y *Rhodococcus* donde los genes degradadores que participan en el meta-clivaje están organizados en operones y regulados coordinadamente. Este mecanismo de adaptación, organización flexible de genes, es lo que le permite a las *Sphingomonads* una respuesta

rápida y eficiente a nuevos contaminantes aromáticos presentes en el suelo (Khara y col., 2014; Waigi y col., 2015).

En este trabajo de tesis se encontraron mediante el *screening* con catecol y 2,3-dihidroxibifenilo, además de las enzimas actuantes sobre los sustratos utilizados, otras enzimas involucradas en la degradación de compuestos aromáticos (Tabla IV.14, Figura IV.24 y IV.25). Muchas de las enzimas encontradas forman parte de la ruta del meta-clivaje del catecol (Figura IV.24). En microorganismos de los órdenes *Pseudomonadales* y *Burkholderiales* esta ruta se encuentra codificada en plásmidos, incluyendo el plásmido promiscuo TOL pWWO (Khomenkov y col., 2005), organizada en operones y regulada de manera coordinada (Waigi y col., 2015); lo que explicaría la presencia en el *scaffold* de elementos móviles, de genes codificantes de integrasas, recombinasas, trasposasas y de proteínas de conjugación del plásmido.

Tal como ha sido descrito previamente para el orden *Burkholderiales* (Perez-Pantoja y col 2012), se encontró que el cluster de genes que contiene el gen de la catecol 2,3-dioxigenasa contiene también el gen de la enzima 2-hidroximucónicosemialdehído hidrolasa y las enzimas de la rama deshidrogenasas, junto a genes codificantes de enzimas de la ruta central de degradación de aromáticos (Tabla IV.14, Figura IV.24 y Tabla IV.S1 en material suplementario). Así como también, genes codificantes de las enzimas benceno/tolueno monooxigenasa, acetaldehído deshidrogenasa y una ferredoxina (Tabla IV.S1 en material suplementario).

Si bien en este trabajo no se logró identificar la enzima fenol monooxigenasa, que generalmente se encuentra dentro del mismo cluster que la enzima catecol 2,3-dioxigenasa (Perez-Pantoja y col., 2012), sí se logró identificar un regulador positivo de dicha enzima.

En las secuencias analizadas no se identificó el gen de la enzima que cataliza la conversión del ácido 1-hidroxi-2-naftoico a 1,2-dihidroxi naftaleno. Balashova y col., (2001) postularon que durante la degradación de fenantreno en *Pseudomonas putida* BS202-P1, la enzima encargada de dicha conversión sería la salicilato 1-monooxigenasa (salicilato 1-hidroxilasa), concluyendo que las enzimas de la ruta de degradación de naftaleno serían suficientes para catalizar la mineralización de fenantreno. En el orden *Burkholderiales* el gen de la enzima salicilato 1-hidroxilasa se encuentra, en la mayoría de las cepas estudiadas, en un replicón que presenta una composición nucleotídica similar al cromosoma bacteriano y que tiene un sistema de replicación y mantenimiento típico de plásmidos (*Chromid*), mientras que el gen la enzima catecol 2,3-dioxigenasa está predominantemente en plásmidos (Pérez-Pantoja y col., 2012), lo que podría explicar los resultados obtenidos en el presente trabajo. A pesar de que en el presente estudio no fue posible aislar la/s cepa/s pertenecientes al orden *Burkholderiales*, se ha demostrado que cepas de *Burkholderia* sp. no son capaces de crecer a partir de ácido 1-hidroxi-2-naftoico exógeno, y producen la acumulación de ácido 1-hidroxi-

2-naftoico cuando crecen en presencia de fenantreno, tanto en cultivo puro como en suelo (Balashova y col., 1999; Puntus y col., 2008), lo que podría indicar la ausencia de las enzimas encargadas de la degradación o la existencia de mecanismos regulatorios no conocidos.

La combinación de la metagenómica funcional y la metaproteómica proveerían una visión muy valiosa sobre la estructura y la fisiología de diferentes grupos filogenéticos presentes en un ambiente y momento específico (Schneider y Riedel, 2010). Una de las ventajas principales de la metaproteómica sería brindar la posibilidad de establecer un vínculo entre la función de una proteína con un taxón y relacionar su presencia con una actividad metabólica (Heyer y col., 2015).

De los 39 spots analizados a partir de la electroforesis bidimensional, sólo se logró la identificación de 21. Gran parte de las proteínas analizadas no lograron ser identificadas (Tabla IV.16), no se encontraron secuencias de proteínas con score significativo, probablemente gracias a que, en parte, su identificación depende fuertemente del tamaño y de la calidad de la base de datos de proteínas de referencia (Schneider y Riedel, 2010).

El 33,33% de las proteínas identificadas se adjudicaron al orden *Burkholderiales* y el 66,67% al orden *Sphingomonadales* (Tabla IV.17). Confirmando que los órdenes *Sphingomonadales* y *Burkholderiales* se encontraban metabólicamente activos dentro de la comunidad estudiada.

De las proteínas identificadas, las chaperonas GroEL y GroES y la aconitato hidratase 1 fueron previamente encontradas en trabajos de proteómica de suelos en presencia de compuestos aromáticos (Benndorf y col., 2007; Williams y col., 2010).

Las chaperoninas GroEL y GroES se encontraron reguladas positivamente en suelos expuestos a tolueno y son interesantes por su rol en el plegado de proteínas ya que tolueno y otros solventes disuelven la membrana celular e interrumpen la función de las proteínas (Williams y col., 2010). GroEL se identificó también en presencia de 4-clorobifenilo y bifenilo, indicando el estrés que genera a la bacteria este compuesto (Martínez y col., 2007). Además, en el mismo trabajo, el autor sugiere que la inducción de algunas de las enzimas del ciclo de Krebs, en nuestro caso la aconitato hidratase 1, sería en respuesta a los requerimientos energéticos de la célula. Se identificó además la enzima glutatión-S-transferasa que es otro de los grupos de enzimas que participan de la adaptación al estrés oxidativo generado por las altas concentraciones de especies reactivas de oxígeno en presencia de compuestos orgánicos tóxicos (Chauhan y Jain, 2010).

La complejidad de los metaproteomas y la dinámica de la abundancia relativa de proteínas dentro o entre poblaciones genera un verdadero desafío, siendo el primer paso limitante la realización de la lisis celular y posterior extracción proteica (Wilmes y col., 2015). Las proteínas están presentes en la naturaleza en conformaciones físicas y biológicas muy diferentes, por lo que no existe la aplicación de un protocolo universal de extracción (Wilmes

y Bond, 2006). Leary y col., (2014) sugirieron que el sesgo producido por la extracción de proteínas de comunidades complejas es la regla y no la excepción. En el presente trabajo se logró una buena extracción de proteínas, alcanzando una concentración de 2 mg.l⁻¹ y con una cantidad promedio de spots en la electroforesis bidimensional de 215 en los días de incubación estudiados.

La búsqueda en las bases de datos de proteínas representa un segundo paso crítico especialmente cuando se trabaja con microbiomas poco caracterizados, muchas especies no cultivadas no están disponibles en la base de datos, lo que podría causar una identificación cruzada con secuencias de microorganismos cercanamente relacionados. Una pequeña diferencia en la secuencia de aminoácidos lleva a una variación en la masa peptídica que genera enorme dificultad en la identificación para organismos cuyos genomas no se han secuenciado (Tanca y col., 2013). Además, la anotación de proteínas es insuficiente en comparación con la información genómica.

La metaproteómica ambiental se encuentra aún en su infancia y enfrenta un gran desafío en términos de extracción, separación e identificación proteica, junto al desarrollo de herramientas de bioinformática que permitan trabajar con la gran cantidad de datos que este enfoque genera (Stenuit y col., 2008). Por otro lado es necesario considerar en los análisis metaproteómicos la distribución desigual de especies, el amplio rango de expresión proteica de los microorganismos y la heterogeneidad genética de las comunidades microbianas (Simon y Daniel, 2011). Resolver los problemas que enfrenta este enfoque es crucial para estudiar el proteoma microbiano y entender los cambios y las respuestas frente a distintas situaciones ambientales (Nannipieri, 2006).

Las técnicas moleculares utilizadas en el presente trabajo de tesis, biblioteca genómica (Tabla IV.3) y pirosecuenciación de genes 16S rRNA (Figura IV.7), análisis metagenómico (Tabla IV.12, IV.13 y IV.S2 en material suplementario) y metaproteómico (Tabla IV.17), permitieron determinar la presencia en el consorcio de microorganismos del orden *Burkholderiales*, cuya obtención no fue posible a través de técnicas de cultivo. Las secuencias de 16S rRNA encontradas, tanto por biblioteca genómica como pirosecuenciación, mostraron estar taxonómicamente relacionadas con los géneros *Achromobacter*, *Alcaligenes* y *Bordetella*, pertenecientes a la familia *Alcaligenaceae*; sin embargo, los fragmentos metagenómicos fueron afiliados con la familia *Burkholderiaceae*, y a través del análisis metaproteómico se identificaron proteínas pertenecientes a ambas familias. Es importante considerar que la obtención de información a partir de estrategias ómicas está fuertemente influenciada por el número de genomas secuenciados de cada familia (Perez-pantoja y col., 2012).

Los resultados de metagenómica funcional demostraron que por lo menos uno de los microorganismos presentes en CON tiene la capacidad potencial de degradar PAH a través

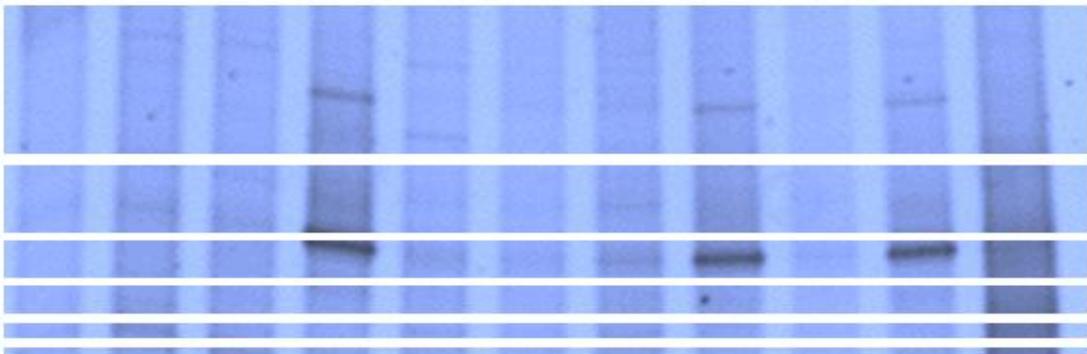
de la ruta del meta-clivaje, al igual que la mayoría de las especies del orden *Sphingomonadales* (Coppotelli y col., 2010); por otro lado los resultados de metaproteómica muestran la expresión de proteínas del orden *Burkholderiales* luego de 15 días de incubación (Tabla IV.17). Estos resultados nos permiten hipotetizar que la causa de la menor degradación de fenantreno y la acumulación de ácido 1-hidroxi-2-naftoico en los cultivos de CON (Figura IV.2), en comparación a la cepa *Sphingobium* sp. AM (Tabla IV.5) y a los consorcios definidos (Tabla IV.9), y la disminución observada en los cultivos de CON luego de 7 días de incubación de los recuentos de bacterias degradadoras de PAH (Figura IV.3) y en las colonias con morfologías típicas de la familia Sphingomonadaceae (Figura IV.12), podría ser atribuida a la presencia de microorganismos del orden *Burkholderiales* y su interacción con la cepa degradadora AM u otro miembro del orden *Sphingomonadales* presentes en CON.

Si bien se han reportado evidencias de relaciones sinérgicas entre géneros de los órdenes *Sphingomonadales* y *Burkholderiales* (Huang y col., 2008; Tauler y col., 2015), durante la degradación de PAH en medio líquido, Joshi y col., (2015) reportaron que la inoculación de un cultivo mixto de *Sphingobium chlorophenolicum* y *Burkholderia cepacia* no fue tan efectiva como lo fue la inoculación con cultivos puros de las mismas cepas en ensayos de bioaumentación de agua contaminada con pentaclorofenol, sugiriendo la posibilidad de efectos antagónicos o de competencia. Los fenómenos de antagonismo y competencia podrían ser eventos usuales en comunidades microbianas mixtas y su presencia, tal como ocurrió en este trabajo, causa a veces un impacto negativo sobre la capacidad degradadora de un contaminante (Fuentes y col., 2013).



Capítulo V

*Ensayos de bioaumento en
microcosmos de suelo
artificialmente contaminado con
fenantreno*



V. Ensayos de bioaumentación en microcosmos de suelo artificialmente contaminado con fenantreno

La biorremediación es una tecnología aplicable a la recuperación de suelos contaminados con hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH). El bioaumentación definido como la adición de bacterias o consorcios degradadores alóctonos, es todavía considerado como una estrategia compleja, debido a que su efectividad depende de procesos secuenciales que involucran tanto al inóculo como a la comunidad microbiana indígena (Figura I.4, Capítulo I) (Mallon y col., 2015).

Los consorcios microbianos naturales se proponen como inoculantes más efectivos, en comparación con la utilización de cepas puras, en procesos de biorremediación donde ocurre biodegradación de PAH (Mao y col., 2012). La mayor efectividad de los consorcios se debería a la existencia de capacidades metabólicas múltiples que podrían aumentar el número de rutas metabólicas disponibles para una degradación cooperativa, y por otro lado la diversidad microbiana del consorcio podría resultar en una ventaja que le permitiría superar la competencia frente a la comunidad indígena (Patel y col., 2013). Adicionalmente la inoculación de consorcios podría permitir la incorporación de microorganismos degradadores difíciles de cultivar en forma aislada (Singer y col., 2005). Un ejemplo de esto último sería el consorcio obtenido en este trabajo de tesis, estudiado en profundidad en el capítulo IV, donde se determinó la existencia de poblaciones con capacidad de degradar fenantreno que no fue posible obtener en forma aislada.

En el presente capítulo se presentan los resultados correspondientes a la determinación del impacto de la inoculación con diferentes formulaciones bacterianas (consorcio natural, definido y cepas puras) sobre la eliminación del contaminante y sobre la estructura y dinámica de las comunidades bacterianas de un suelo prístino contaminado con fenantreno. Se inocularon, el consorcio degradador de fenantreno (CON) que fue ampliamente caracterizado (Capítulo IV) y uno de los consorcios definidos estudiados en el capítulo IV, formado por dos cepas aisladas de CON, la cepa degradadora *Sphingobium* sp. AM, y la cepa *Pseudomonas* sp Bc. Por otro lado se inocularon en forma aislada las cepas AM y Bc. Con el fin de estudiar en qué medida el establecimiento en suelo de una cepa degradadora dependería de la presión de selección ejercida por el fenantreno, se inoculó la cepa AM en microcosmos de suelo prístino.

Se realizaron 5 tratamientos: **(1)** suelo contaminado con fenantreno (Phe) **(2)** suelo contaminado con fenantreno e inoculado con 1×10^8 ufc del consorcio natural CON por gramo de suelo seco (Phe+CON) **(3)** suelo contaminado con fenantreno e inoculado con $0,5 \times 10^8$ ufc de la cepa *Sphingobium* sp. AM y $0,5 \times 10^8$ ufc de la cepa *Pseudomonas* sp. Bc por gramo

de suelo seco (Phe+CD) **(4)** suelo contaminado con fenantreno e inoculado con 1×10^8 ufc de la cepa *Sphingobium* sp. AM por gramo de suelo seco (Phe+AM) **(5)** suelo contaminado con fenantreno e inoculado con 1×10^8 ufc de la cepa *Pseudomonas* sp. Bc por gramo de suelo seco (Phe+Bc). Las inoculaciones se realizaron un día después de agregar el fenantreno al suelo.

Los controles realizados fueron: **(1)** suelo prístino, sin agregado de fenantreno (SP) **(2)** suelo prístino inoculado con 1×10^8 ufc de la cepa *Sphingobium* sp. AM por gramo de suelo seco (SP+AM).

Todos los microcosmos fueron preparados por triplicado e incubados a $24 \pm 2^\circ\text{C}$ y 20% de humedad en oscuridad durante 63 días y se mezclaron semanalmente para asegurar la aeración.

V.1 Resultados

V.1.1 Determinación de la eliminación de fenantreno

La figura V.1 muestra los valores de fenantreno remanente en los microcosmos contaminados a distintos tiempos durante la incubación. En esta figura se muestra que durante los primeros 7 días de incubación en el microcosmo Phe no se observó una reducción significativa en la concentración de fenantreno. Sin embargo, en los microcosmos Phe+CON, Phe+CD y Phe+AM la inoculación produjo un efecto estimulador sobre la eliminación de fenantreno desde el día 0 de incubación, provocando que la concentración de fenantreno en estos microcosmos sea significativamente menor ($p < 0,05$) a la concentración en el microcosmo Phe durante los primeros 7 días de incubación.

Este efecto estimulador inicial en la degradación del contaminante no se observó en el microcosmo inoculado con la cepa *Pseudomonas* sp. Bc, por el contrario este microcosmo mostró un notable retraso en la eliminación de fenantreno, que se prolongó durante 15 días.

Al finalizar el período de incubación (63 días) todos los microcosmos mostraron una significativa eliminación del hidrocarburo (>95% del suplementado inicialmente). Sin embargo la concentración residual de fenantreno en los microcosmos inoculados ($23,65 \pm 1,34$ mg de fenantreno por Kg de suelo seco Phe+CON, $31,08 \pm 7,10$ Phe+CD y $5,81 \pm 5,06$ Phe+AM), a excepción del microcosmo inoculado con la cepa Bc ($63,17 \pm 38,38$ mg de fenantreno por Kg de suelo seco), fue significativamente menor ($p < 0,05$) a la encontrada en el microcosmo Phe ($73,05 \pm 3,16$ mg de fenantreno por Kg de suelo seco). Como resultado sólo los microcosmos inoculados con los consorcios y la cepa AM alcanzaron concentraciones de fenantreno por debajo de los estándares de limpieza para suelos (50 mg kg^{-1}) según el decreto reglamentario N° 831 de la Ley Nacional Argentina 24051.

Al comparar los microcosmos inoculados, se observó que el microcosmo inoculado con la cepa AM fue el que presentó menor concentración de fenantreno a lo largo de todo el ensayo, siendo la concentración residual de fenantreno del microcosmo Phe+AM entre los 14 y 63 días de incubación significativamente menor ($p < 0,05$) a la del resto de los microcosmos inoculados.

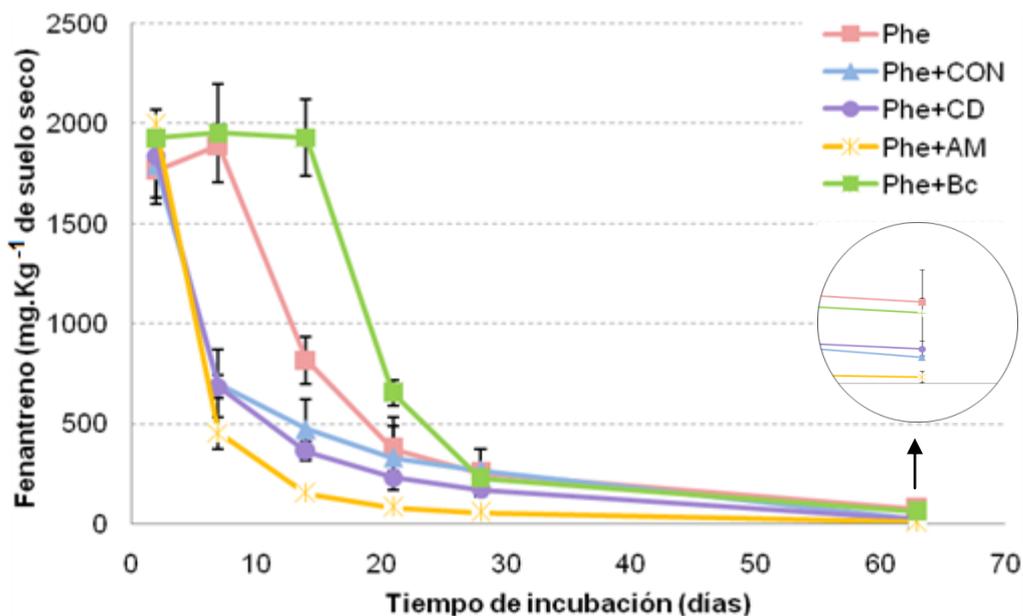


Figura V.1. Concentración de fenantreno en los microcosmos Phe, Phe+CON, Phe+CD, Phe+AM y Phe+Bc durante los 63 días de incubación. Se grafican los valores promedio y las desviaciones estándar de 3 ensayos independientes por microcosmo.

V.1.2 Efecto de la inoculación sobre la dinámica de las poblaciones bacterianas cultivables

Para determinar el efecto producido por el contaminante y por la inoculación sobre las poblaciones bacterianas cultivables del suelo se analizaron los cambios en la densidad de las poblaciones bacterianas heterótrofas cultivables en R2A y la población bacteriana cultivable degradadora de PAH. Los resultados se muestran en la figura V.2.

En la figura V.2a se pudo observar que la contaminación con fenantreno produjo un aumento significativo en el número de bacterias heterótrofas cultivables en el microcosmo Phe desde el día 14 de incubación, que se mantuvo por encima del microcosmo SP hasta el final del experimento.

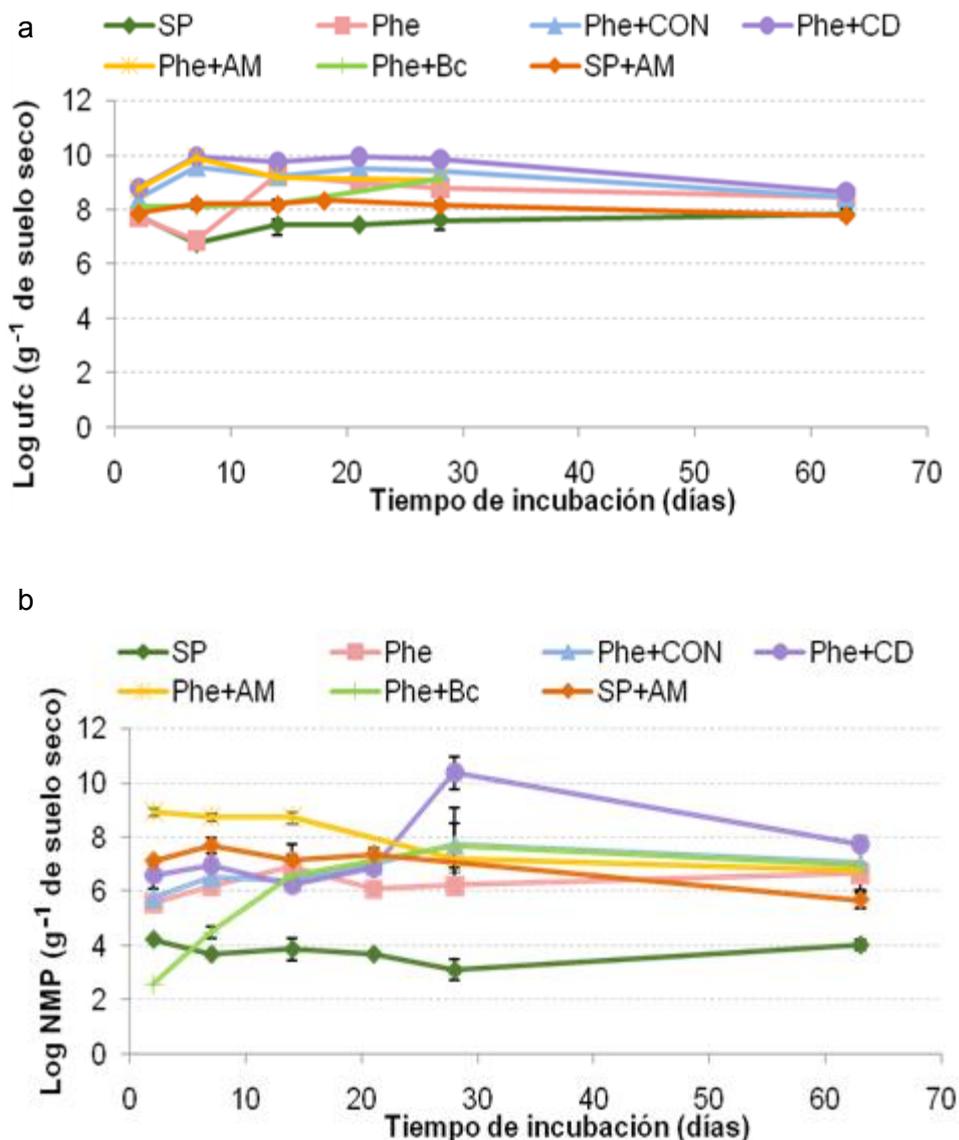


Figura V.2. Evaluación de la concentración de las poblaciones de bacterias cultivables en SP, Phe, Phe+CON, Phe+CD, Phe+AM, Phe+Bc y SP+AM durante 63 días incubación. (a) Bacterias heterótrofas cultivables (log UFC g⁻¹ por gramo de suelo seco). (b) Bacterias degradadoras de PAH (log NMP g⁻¹ por gramo de suelo seco). Se grafican los valores promedio y las desviaciones estándar de 3 ensayos independientes por microcosmo.

La inoculación de CON, CD y la cepa *Spingobium* sp. AM, produjo un incremento en los recuentos de bacterias heterótrofas cultivables desde el día 2 de incubación. En consecuencia estos microcosmos presentaron recuentos de bacterias heterótrofas cultivables significativamente mayores ($p < 0,05$) a los encontrados en el microcosmos Phe durante los primeros 14 días de incubación, y mayores a los encontrados en Phe+Bc hasta el día 28 de incubación. Por otra parte, aunque la inoculación de la cepa AM en suelo

prístino (SP+AM) produjo un incremento inicial en los valores de bacterias heterótrofas, el microcosmo Phe+AM presentó recuentos de bacterias heterótrofas significativamente superiores a los encontrados en el SP y SP +AM durante todo el ensayo.

Al analizar los recuentos de bacterias degradadoras de PAH (Figura V.2b) se observó que tanto los microcosmos contaminados como el microcosmo de suelo prístino inoculado con AM, presentaron valores de bacterias degradadoras significativamente mayores a la encontrada en el microcosmo SP durante todo el tiempo de tratamiento. El microcosmo inoculado con la cepa Bc mostró un comportamiento distinto, observándose inicialmente una disminución significativa en los recuentos de bacterias degradadoras con respecto a SP, para luego aumentar en forma gradual hacia el día 28 de incubación.

Entre los microcosmos inoculados, el microcosmo Phe+AM presentó recuentos de bacterias degradadoras significativamente superiores ($p < 0,05$) a los encontrados en los otros microcosmos inoculados hasta los 14 días de incubación. A partir de ese día y hasta el final del ensayo, fue el microcosmo inoculado con el consorcio definido (Phe+CD) quien muestra los mayores valores de bacterias degradadoras y se diferenció significativamente del resto de los microcosmos.

V.1.3 Medida de actividad deshidrogenasa

Las deshidrogenasas intracelulares pertenecen a las oxidoreductasas y catalizan la oxidación de los compuestos orgánicos. La actividad deshidrogenasa total del suelo depende de la actividad de varias deshidrogenasas fundamentales de los microorganismos presentes y es considerada una medida de las actividades oxidativas microbianas que están ocurriendo en el suelo (Mersi y Sehinner, 1991). Es por este motivo que la medida de actividad deshidrogenasa se propuso como un parámetro valioso que refleje el progreso de la degradación del hidrocarburo en los microcosmos (Brzeszcz y col., 2016).

La determinación de la actividad deshidrogenasa de la comunidad de los microcosmos se realizó según el protocolo de Thalmann (1968), en el cual se mide la reducción de cloruro de trifenil tetrazolium (TTC) a trifenil formazan (TPF). Se determinó la actividad a distintos tiempos en todos los tratamientos y en el microcosmo SP.

Los resultados se muestran en la figura V.3, donde se observa que en el microcosmo Phe el agregado de fenantreno produjo un efecto inhibitorio sobre actividad deshidrogenasa durante los primeros 7 días de incubación, obteniendo valores de actividad deshidrogenasa significativamente menores a los encontrados en el microcosmo SP. Posteriormente se observó un incremento de la actividad deshidrogenasa en el microcosmo Phe, manteniendo valores significativamente superiores a los del microcosmo de suelo limpio (SP) hasta el día 21 de tratamiento.

En el caso de los microcosmos contaminados e inoculados (Phe+CON, Phe+CD, Phe+AM y Phe+Bc), se observó un marcado aumento de la actividad deshidrogenasa durante los primeros 14 días de incubación, siendo este efecto significativamente mayor al microcosmo contaminado (Phe). La actividad deshidrogenasa de estos microcosmos contaminados e inoculados luego disminuyó hasta alcanzar valores menores a Phe al día 21 de incubación. Cabe destacar la diferencia significativa entre el SP+AM y Phe+AM durante los primeros 21 días de incubación. Mientras que la inoculación con la cepa AM en el microcosmo de suelo contaminado con fenantreno (Phe+AM) mostró valores de actividad deshidrogenasa significativamente superiores al microcosmo SP, la inoculación de la cepa AM en suelo prístino (SP+AM) produjo un fuerte efecto inhibitorio sobre la actividad deshidrogenasa. Al final del ensayo todos los microcosmos inoculados con cepas aisladas, tanto en suelo prístino como en suelo contaminado (Phe+AM, Phe+Bc y SP+AM), presentaron valores de actividad deshidrogenasa significativamente menores al resto de los microcosmos.

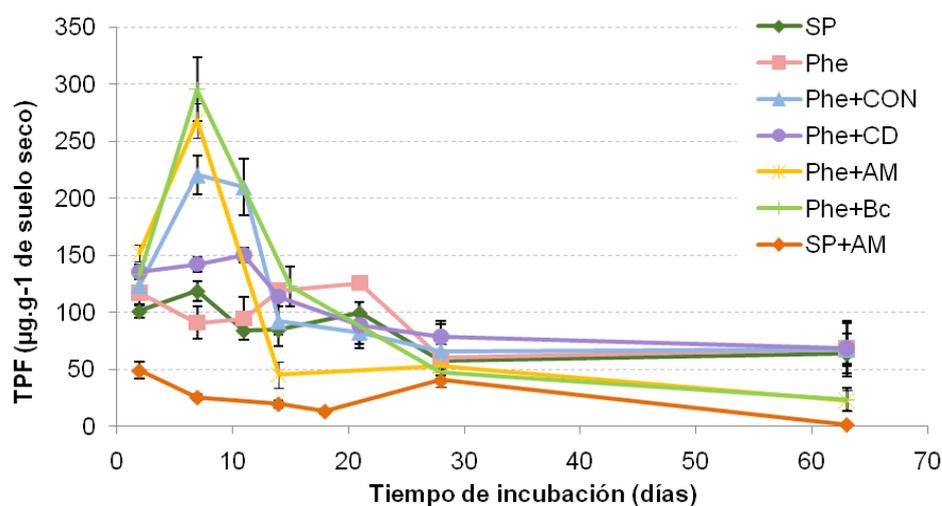


Figura V.3. Actividad deshidrogenasa (μg de trifenil formazán (TPF) por gramo de suelo seco) en los microcosmos SP, Phe, Phe+CON, Phe+CD, Phe+AM, Phe+Bc y SP+AM durante los 63 días de incubación. Se grafican los valores promedio y las desviaciones estándar de 3 ensayos independientes por microcosmo

V.1.4 Estudio de los cambios en la estructura de las comunidades bacterianas

Con el objetivo de conocer la dinámica temporal de las comunidades microbianas del suelo producida por la contaminación con fenantreno y los tratamientos de inoculación, se realizó la extracción del DNA total del suelo, la amplificación con *primers* dirigidos al gen 16S rRNA y la posterior separación de los fragmentos por DGGE. Se obtuvieron los perfiles de DGGE a distintos tiempos durante el período de incubación (2, 7, 14, 21, 28 y 63 días) para los 7

microcosmos y se analizaron dos replicas independientes para cada tratamiento y para cada tiempo. No se observaron diferencias entre las replicas en los perfiles de DGGE, por lo que se presenta solo un set de resultados (Figura. V.4).

Al comparar los perfiles obtenidos para el microcosmo Phe se observaron cambios en la estructura de la comunidad bacteriana luego de 14 días de incubación, con la aparición de tres bandas predominantes que permanecieron hasta el día 63. Por otra parte, en SP no se observaron cambios significativos en los perfiles de DGGE durante el período de incubación estudiado.

Entre los perfiles del microcosmo Phe y los microcosmos inoculados se observaron claras diferencias. Todos los inoculantes utilizados provocaron un fuerte impacto sobre la estructura de la comunidad bacteriana del suelo. En los perfiles de los microcosmos inoculados con CON se observó la presencia de una banda dominante durante todo el período de incubación, marcada como 2 en la figura V.4. Esta banda migró en la misma posición que la banda predominante de CON (Banda 8, Figura IV.4 Capítulo IV), la cual se relacionó filogenéticamente con la familia *Sphingomonadaceae*. En los perfiles correspondientes a los microcosmos inoculados con la cepa *Sphingobium* sp. AM, ya sea como cepa pura o en combinación con la cepa Bc, se pudo observar, a todos los tiempos estudiados, la presencia de una banda (marcada como 4 en la figura V.4) que migró en la misma posición que la banda perteneciente a la cepa AM. Por el contrario en los perfiles de bandas de los microcosmos Phe+CD y Phe+Bc no resultó detectable la banda correspondiente a la cepa Bc, sin embargo se debe tener en cuenta que la presencia de la cepa Bc tampoco pudo ser detectada en los perfiles de bandas de DGGE obtenidos a partir del DNA del consorcio (Figura IV.4, Capítulo IV).

En el caso del microcosmo SP+AM se observó una dinámica distinta a las ocurridas para los otros microcosmos, la banda correspondiente al inoculante, que fue claramente visible al comienzo (día 7) posteriormente no se pudo detectar.

A partir de la digitalización de los perfiles de DGGE se determinó la riqueza y diversidad de bandas para cada microcosmo a los 2, 14 y 63 días de incubación. Para ello utilizando el software PAST se calcularon los índices de CHAO1 (riqueza) y Shannon-Wieber (diversidad), los valores obtenidos se muestran en la tabla V.1.

Mientras que en el microcosmo SP se obtuvo un valor máximo de diversidad y de riqueza al día 14 de incubación, en el microcosmo Phe se observaron cambios importantes, con una disminución en la diversidad bacteriana acompañada de una disminución en la riqueza de especies, que se acentuó hacia el final del período de incubación (día 63).

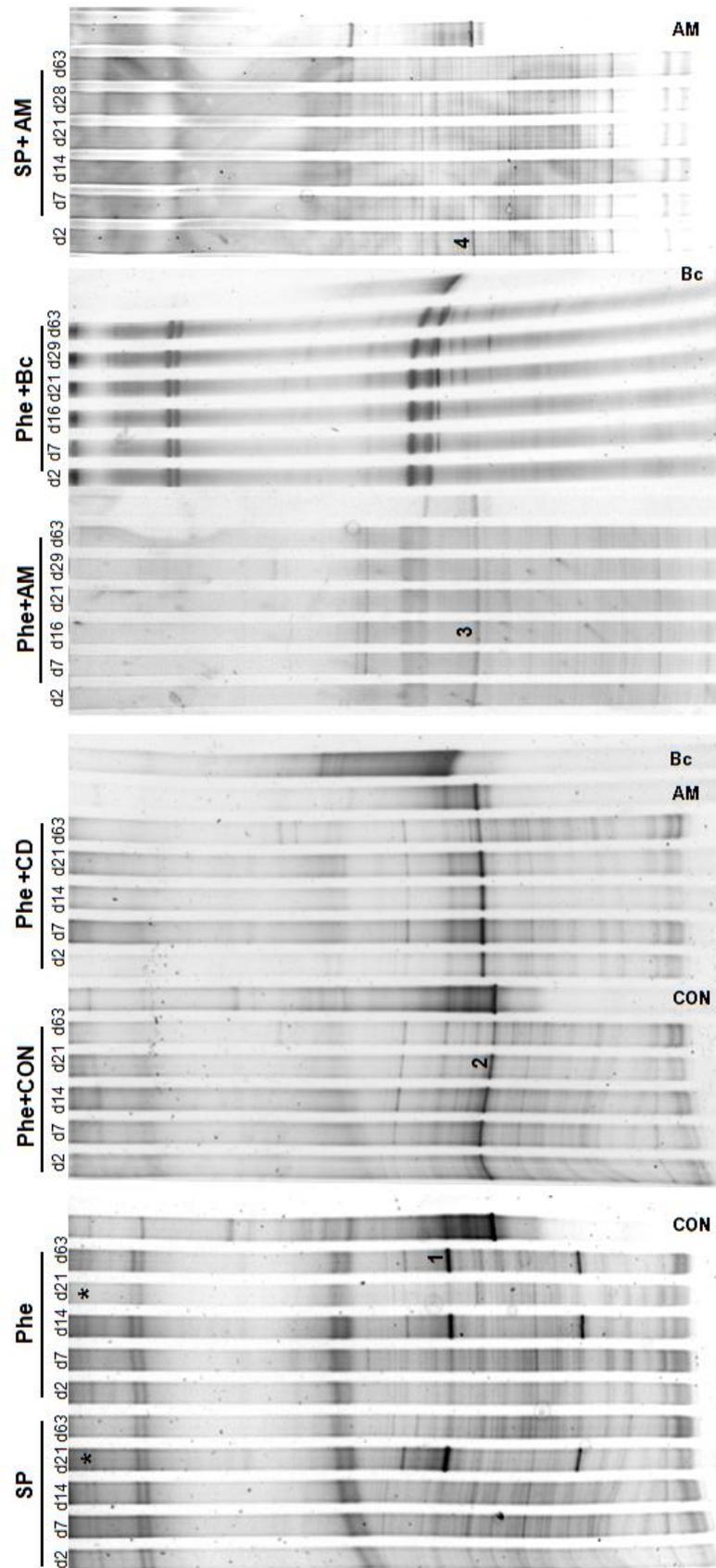


Figura V.4. Análisis por PCR-DGGE de las poblaciones bacterianas de suelo de los microcosmos SP, Phe, Phe+CON, Phe+CD, Phe+AM, Phe+Bc y SP+AM a distintos tiempos durante 63 días de incubación. Las calles marcadas con (*) están invertidas.

Por otro lado los resultados de DGGE muestran que la inoculación con la cepa AM produce una recuperación de la diversidad y de la riqueza de especies bacterianas en el microcosmo contaminado (Phe+AM), y un efecto contrario cuando es inoculada en suelo prístino. Por otro lado la inoculación con la cepa *Pseudomonas* sp. Bc, tanto en forma aislada (Phe+Bc) como en el consorcio definido (Phe+CD), produjo un impacto negativo sobre la diversidad y riqueza de la comunidad bacteriana del suelo.

Microcosmo	Índice	
	Shannon H	Chao1
SP d2	2,81	18
SPd14	3,24	28
SP 63	3,06	24
Phe d2	3,11	24
Phe d14	2,29	21
Phe d63	2,01	16
Phe + CON d2	2,12	16
Phe + CON d14	2,32	19
Phe + CON d63	2,42	14
Phe + AM d2	2,97	23
Phe + AM d14	3,04	25
Phe + AM d63	2,94	22
Phe +CD d2	1,64	9
Phe + CDd14	1,12	7
Phe + CD d63	2,05	10
Phe + Bc d2	0,88	3
Phe + Bc d15	1,41	5
Phe + Bc d63	1,51	6
SP+ AM d2	2,55	14
SP+ AM d14	2,38	12
SP+ AM d63	2,41	12

Tabla V.1. Valores de los índices de diversidad (Shannon H) y riqueza (Chao 1) obtenidos a partir de los perfiles de DGGE en los microcosmos SP, Phe, Phe+CON, Phe+AM, Phe+CD, Phe+Bc y SP+AM a tres tiempos de incubación (2, 14 y 63 días).

Con el fin de evaluar la similitud entre las comunidades bacterianas de los distintos microcosmos se construyó un dendrograma a partir de las imágenes digitalizadas de los geles de DGGE (Figura V.5). El dendrograma muestra que los distintos tratamientos produjeron importantes disimilitudes en la estructura de las comunidades bacterianas. En la figura V.5 se observa la formación de dos *clusters* con sólo 12,1% de similitud, uno de los cuales está conformado solamente por los perfiles correspondientes al microcosmo inoculado con la cepa Bc; el segundo *cluster* incluye todos los otros microcosmos a todos

los tiempos ensayados. Este segundo *cluster* presenta dos *subclusters* (21,4% de similitud). En el *subcluster* de menor tamaño se agrupan con baja similitud (24,1%) los perfiles del microcosmo SP+AM y aquellos correspondientes al microcosmo contaminado e inoculado con el consorcio definido (Phe+CD); mientras que en el *subcluster* de mayor tamaño se agrupan los perfiles de los microcosmo SP, Phe y Phe+CON (34,8% de similitud), que se separan de los perfiles del microcosmo contaminado e inoculado con la cepa *Spingobium* sp. AM (Phe+AM).

También se realizó la comparación entre los perfiles de la comunidad bacteriana mediante el método de ordenación de Escalamiento Multidimensional (MDS). Dicha ordenación en dos dimensiones se evaluó mediante el valor del “stress”, que indica la calidad de la representación (buena representación: $\text{stress} < 0,2$). El MDS realizado (Figura V.6) muestra de una forma más gráfica que, independientemente de que se encuentren evidencias de que las cepas se hayan establecido o no en los perfiles de DGGE (Figura V.4), los perfiles de los microcosmos inoculados con una cepa y con el consorcio definido, presentan una mayor distancia espacial con respecto a los microcosmos SP, Phe y Phe+CON.

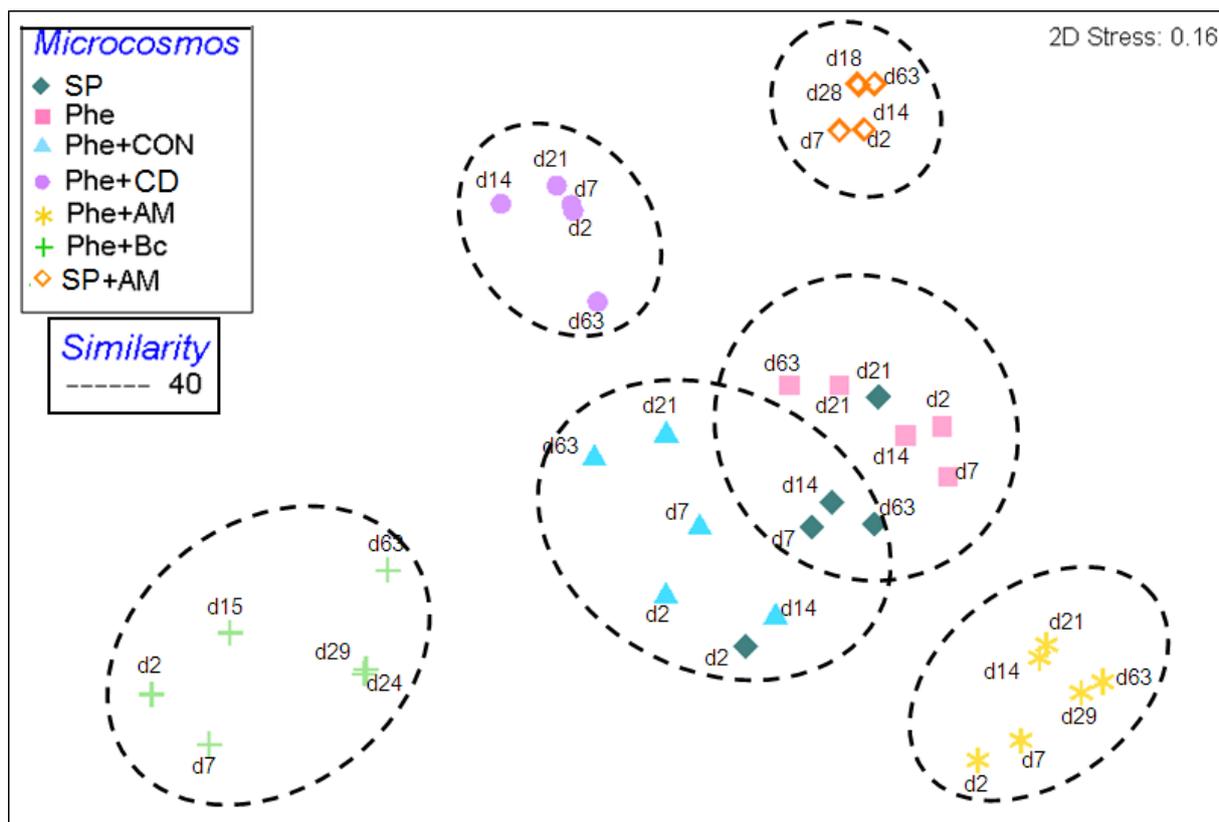


Figura V.6. MDS de los perfiles de bandas derivados del análisis por PCR-DGGE realizada con los *primers* 341F-GC y 907R, que muestra los cambios en la estructura de las comunidades de los microcosmos SP, Phe, Phe+CON, Phe+CD, Phe+AM, Phe+Bc y SP+AM a distintos tiempos de incubación. Mayor proximidad en las muestras indica mayor similitud entre la comunidad.

Este análisis demuestra que la estructura de la comunidad bacteriana se vio afectada por la contaminación con fenantreno, y en mayor grado por las estrategias de bioaumentación (en presencia o ausencia de contaminantes), siendo dependiente de la naturaleza del inóculo. Los cambios observados en el MDS se podrían adjudicar a la aparición o desaparición de bandas en los perfiles de DGGE, ya que para la construcción de la matriz de similitud se utilizó el coeficiente de Jaccard, que considera presencia/ausencia de bandas.

V.1.5 Estudio de los cambios en la composición de las comunidades bacterianas

Para lograr identificar los cambios en la composición bacteriana de la comunidad del suelo producidos por la contaminación con fenantreno y los distintos tratamientos se utilizaron distintas metodologías:

- i- Escisión de las bandas predominantes en los perfiles de DGGE y re-amplificación por PCR y su posterior clonación y secuenciación.
- ii- Construcción de bibliotecas genómicas a partir del DNA total obtenido de los microcosmos SP, Phe, Phe+CON y Phe+CD.
- iii- Análisis mediante una técnica de alto rendimiento: Pirosecuenciación del gen 16S rRNA a partir del DNA total de los microcosmos SP, Phe, Phe+CON, Phe+AM y SP+AM.

V.1.5.1 Secuenciación de las bandas predominantes en los perfiles DGGE

Como primer estrategia se realizó la escisión de las bandas y la posterior re-amplificación por PCR. Los productos de PCR fueron clonados utilizando el vector de clonado pGEM-T en la cepa de *E. coli* DH5 α para su posterior secuenciación

Si bien se escindieron más de 19 bandas, se encontraron dificultades para obtener productos PCR de las mismas (Figura V.7 a). Además, luego de la clonación en muchos casos no fue posible confirmar la presencia del inserto a través de PCR tal como se muestra en la figura V.7 b donde sólo las calles 1, 2 y 3 presentaron la banda del tamaño de interés. Se logró obtener las secuencias sólo de las bandas marcadas en la figura V.4 con los números 1, 2 y 4. La comparación de las secuencias con la base de datos GenBank del NCBI utilizando el software BLAST reveló que la secuencia de la banda 1 mostró un 99% de similitud con *Novosphingobium* sp., mientras que las bandas 2 y 4 mostraron un 99% de similitud con *Sphingobium* sp. (Tabla V.2)

Banda	Número de acceso ^a	Secuencia del gen 16S rRNA más cercanamente relacionada	Similitud	Número de acceso ^b
1	KM213518	<i>Novosphingobium</i> sp.	99%	KC410866.1
2	KM213519.	<i>Sphingobium</i> sp.	99%	KM925003.2
4	KU714712	<i>Sphingobium</i> sp.	99%	CP010954.1

Tabla V.2. Resultados de la secuencia parcial del gen 16S rRNA y afiliación taxonómica relacionada de las bandas cortadas del gel de DGGE. ^a Número de acceso a GenBank de las secuencia perteneciente a la banda clonada ^b Número de acceso a GenBank de la secuencia de la secuencia bacteriana más cercanamente relacionada.

La figura V.8 muestra el árbol filogenético obtenido a partir de las secuencias de las bandas cortadas de la DGGE, las secuencias relacionadas obtenidas a partir de la base de datos del NCBI, las secuencia de la banda 8 cortada del gel de DGGE del consorcio (Figura IV.4, Capítulo IV) y la secuencia de la cepa AM. En el mismo se pudo ver que si bien la banda 2 y la banda 4 se afiliaron con el género *Sphingobium*., la banda 2, perteneciente al microcosmo Phe+CON, mostró estar filogenéticamente relacionada con la secuencia obtenida a partir de la banda predominante de CON (banda 8), mientras que la banda 4, perteneciente al microcosmo SP+AM, mostró mayor relación filogenética con la cepa AM.

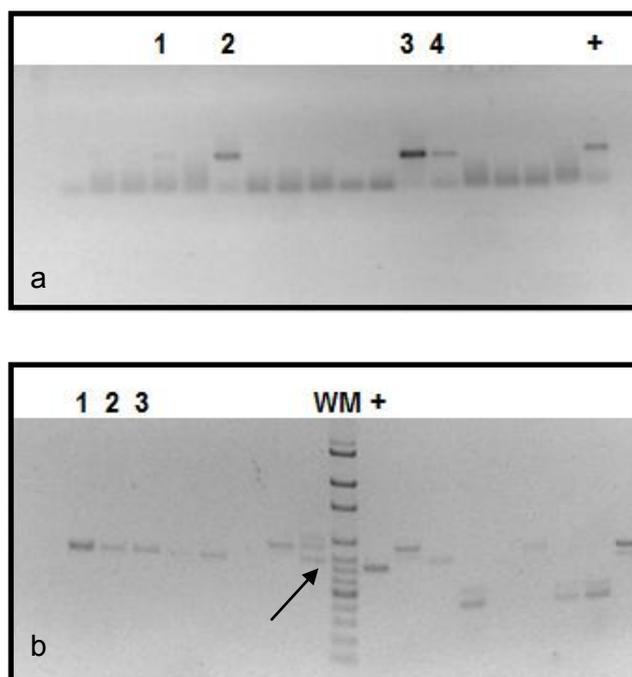


Figura V.7. Electroforesis en gel de agarosa 1% de a) la los productos de amplificación obtenidos de la PCR de las bandas escindidas de la DGGE; b) los productos de PCR utilizando los *primers* SP6 y T7 realizada sobre los clones positivos obtenidos para corroborar la presencia del inserto de interés en el vector de clonado pGem-T.

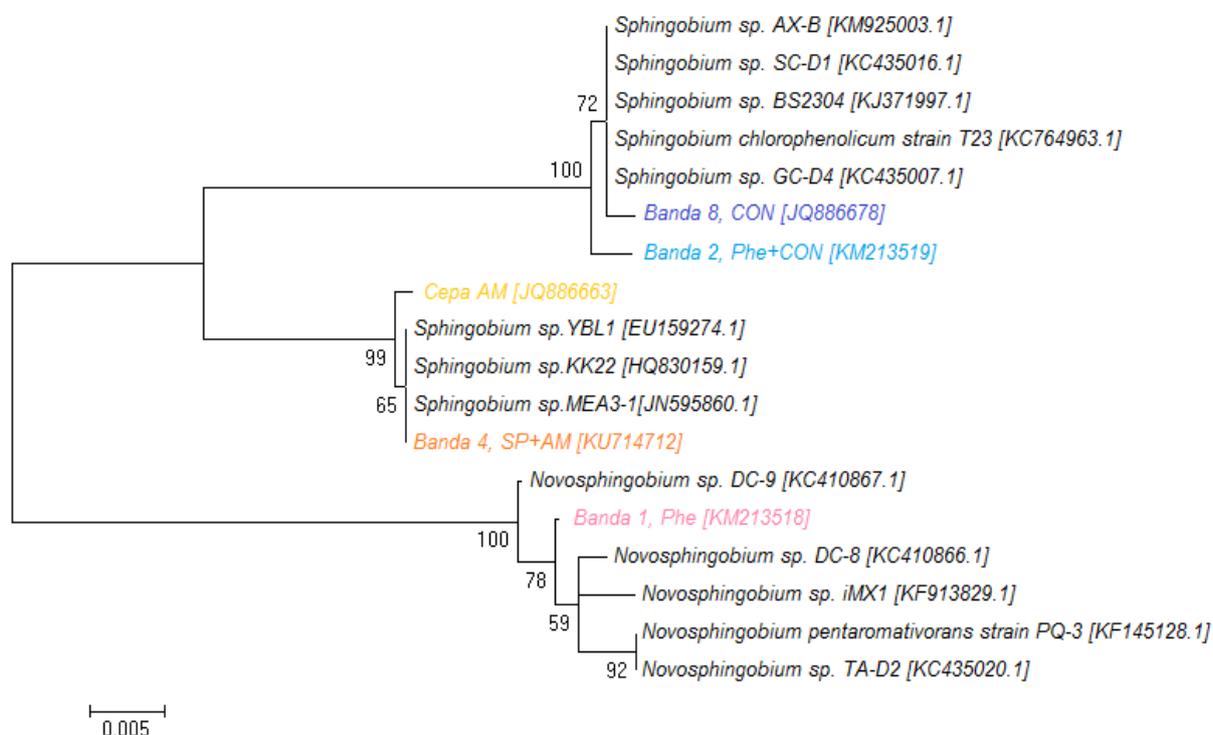


Figura V.8.Árbol filogenético obtenido con el algoritmo de Neighbor-joining basado en la matriz de distancia del análisis de las secuencias parciales de 16S rDNA de las bandas de DGGE, de la cepa AM y de secuencias seleccionadas disponibles en GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>). Se construyó utilizando el software MEGA versión 4. El número de cada nodo corresponde al valor porcentual de bootstrap y la barra indica un 0.005 de variación de secuencia.

V.1.5.2 Construcción y análisis de bibliotecas de genes 16S rRNA del DNA total de los microcosmos SP, Phe, Phe+CON y Phe+CD

Se construyeron 4 bibliotecas genómicas a partir del DNA total obtenido de los microcosmos SP, Phe, Phe+CON y Phe+CD a los 14 días de incubación. Para la construcción de estas bibliotecas se obtuvieron amplicones del gen 16s rRNA, los que fueron clonados utilizando el vector de clonado pGEM-T en la cepa de *E. coli* DH5 α .

El análisis de la composición de las comunidades bacterianas se realizó por duplicado para cada tratamiento y se obtuvieron 188 clones. La presencia del inserto de tamaño deseado fue estudiada mediante PCR (Figura V.8). Los clones de interés se analizaron mediante PCR-DGGE, con el fin de realizar un filtrado que nos permitiera secuenciar clones con secuencias distintas (Figura V.9).



Figura V.8. Electroforesis en gel de agarosa 1% de los productos de amplificación obtenidos por PCR utilizando los *primers* SP6 y T7, realizada sobre los clones obtenidos para corroborar la presencia del inserto de interés en el vector de clonado pGEM-T (750 pb aproximadamente es el tamaño esperado). Solo se muestra parte del análisis (de los 188 clones) a modo de ejemplo.

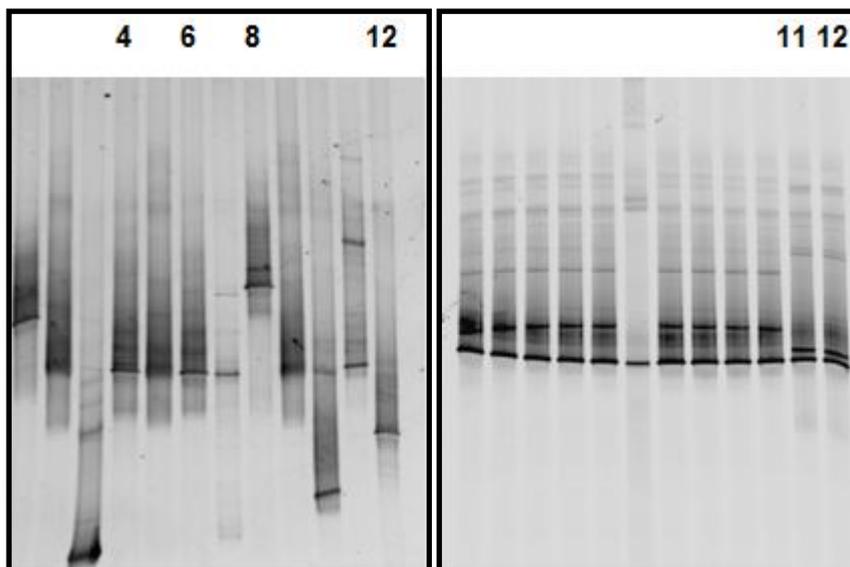


Figura V.9. Análisis por PCR-DGGE de los clones que presentaron el inserto de interés. Solo se muestra parte del análisis (de los 188 clones) a modo de ejemplo.

Los 188 clones estudiados se clasificaron en 97 grupos según la posición en los geles de DGGE, se mandó a secuenciar por lo menos un clon de cada grupo y las secuencias se compararon con las depositadas en la base de datos GenBank de NCBI utilizando el programa BLAST.

De los 97 grupos de secuencias bacterianas 17 no presentaron asociación filogenética con ninguna división taxonómica conocida, mientras que 80 estuvieron filogenéticamente asociadas a los filos *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Gemmatimonadetes*, *Proteobacteria* y *Thermotogae* (Tabla V.S1 en material suplementario). La figura V.10 muestra la distribución relativa de los filotipos encontrados en cada uno de los microcosmos analizados. Si bien el número de clones secuenciados es limitado, se pudo observar que el microcosmo SP fue el que presentó mayor diversidad bacteriana, con predominio de los filos *Proteobacteria* (31,5%) y *Acidobacteria* (21%). Tanto la contaminación como la inoculación causaron un importante incremento del filo *Proteobacteria*, alcanzando una abundancia relativa de 63,6% en el microcosmos Phe y 70% en el microcosmos Phe+CD, mientras que el microcosmos Phe+CON mostró una menor abundancia relativa de este filo (46,1%) (Figura V.10).

Por otro lado en la biblioteca de clones del microcosmo Phe+CON se logró evidenciar una predominancia de clones afiliados a la familia *Sphingomonadaceae* y secuencias correspondiente al género *Achromobacter* sp., en concordancia con la composición de CON (Capítulo IV, Figura IV.7). En el caso del microcosmo inoculado con el consorcio definido (Phe+CD) se encontraron numerosos clones que se afiliaron con *Sphingobium* sp., coincidente con la cepa AM, sin embargo la cepa Bc no se encontró en los ensayos de clonación (Tabla V.S1 material suplementario).

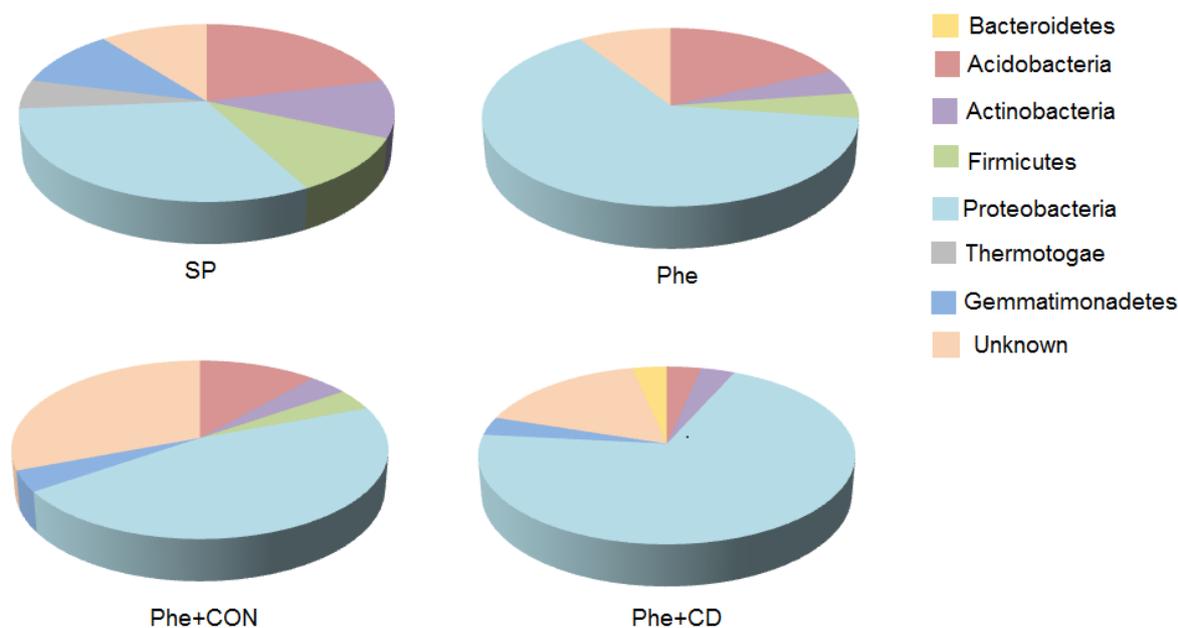


Figura V.10. Distribución relativa de los filos bacterianos basada en la secuencia del gen 16S rDNA de las comunidades del suelo de los microcosmos SP, Phe, Phe+CON y Phe+CD a los 14 días de incubación.

V.1.5.3 Análisis mediante una técnica de alto rendimiento: Pirosecuenciación del gen 16S rRNA a partir del DNA total de los microcosmos SP, Phe, Phe+CON, Phe+AM y SP+AM.

Con el objetivo de estudiar la estructura detallada de las comunidades microbianas presentes en algunos de los tratamientos de suelo ensayados, mediante una técnica más exacta y sensible, se llevó a cabo el análisis por pirosecuenciación de fragmentos del gen 16S rRNA. Se seleccionaron 5 microcosmos para analizar los cambios generados en las comunidades microbianas por dos tipos de inoculantes distintos, utilizando un consorcio o una cepa pura. Se eligieron los microcosmos SP, Phe, Phe+CON, Phe+AM y SP+AM. El análisis se realizó a los 14 y 63 de incubación dado que, en todos los microcosmos, representan momentos distintos de la cinética de degradación de fenantreno en todos los microcosmos. Adicionalmente para comprender y comparar la situación inicial de los microcosmos se analizó una muestra del día 2 de incubación del microcosmo SP. El estudio se realizó por duplicado para el día 14 de incubación (a excepción de SP+AM).

Del análisis por pirosecuenciación se obtuvieron un promedio de 6976 secuencias filtradas (rango de 3245-11599) que se agruparon en un total de 3037 OTUs utilizando el 97% de similitud.

Para estimar si el número de secuencias obtenidas representan una fracción significativa de la diversidad presente en las muestras estudiadas, se realizó el análisis de rarefacción para

cada set de datos obtenidos. El resultado del análisis se muestra en la figura V.11. Como se puede observar, si bien ninguna de las muestras alcanza totalmente la fase *plateau* el número de secuencias recuperadas de cada muestra fue suficiente para cubrir la mayor parte de la diversidad.

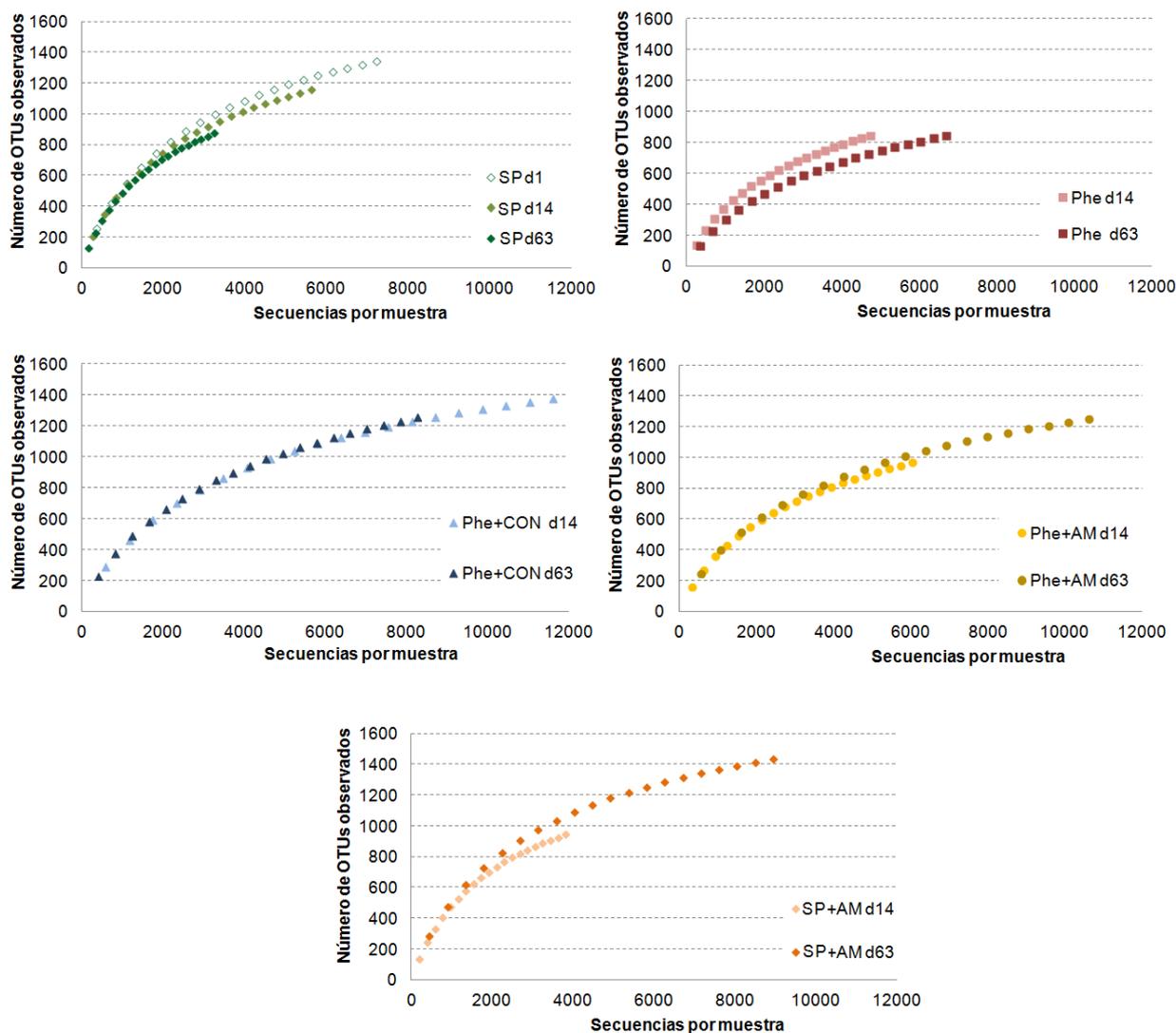


Figura V.11. Análisis de rarefacción construido mediante los datos de pirosecuenciación con el software EstimateS. Las curvas de rarefacción indican el número observado de OTUs (eje y) en función del número de lecturas (eje x) para los microcosmos SP, Phe, Phe+CON, Phe+AM y SP+AM.

Además se calculó la cobertura de secuencias para cada una de las muestras con el fin de analizar la representatividad de la comunidad bacteriana en los microcosmos analizados mediante los datos obtenidos. La tabla V.4 muestra los valores del índice de Good, que informan sobre la cobertura del análisis. Se obtuvieron valores de cobertura entre 0,89 y 0,97, indicando que si bien las curvas de rarefacción no alcanzaron un *plateau*, que indica que se ha analizado un número suficiente de secuencias para describir a la muestra, la cobertura alcanzada en todas las muestras fue suficiente para describir fidedignamente al sistema.

Microcosmo	Índice de Good
SP d2	0.94
SPd14	0.93
SPd63	0.89
Phe d14	0.93
Phe d63	0.95
Phe+CON d14	0.97
Phe+CON d63	0.95
Phe+AM d14	0.94
Phe+AM d63	0.96
SP+AM D14	0.91
SP+AM d63	0.95

Tabla V.4. Valores del índice de Good para los microcosmos SP, Phe, Phe+CON, Phe+AM y SP+AM.

Por otra parte, para evaluar la diversidad de los microcosmos se utilizó la familia de índices de Hill (1973). Se realizó una normalización y se estimó la diversidad a las 3245 secuencias, que corresponde a la profundidad del análisis de la muestra con menor número de secuencias obtenidas. Los resultados se muestran en la tabla V.3.

Los números de Hill 0D , 1D y 2D para el microcosmo SP resultaron similares en los tres tiempos de incubación analizados. Los valores de 0D , 1D y 2D para el microcosmo SP+AM a los 14 días de incubación son algo menores a los encontrados en SP, recuperando valores 0D y 1D semejantes al microcosmo SP luego de 63 días de incubación. Estos resultados sugieren que la inoculación con AM en ausencia de presión de selección no generó cambios importantes en la riqueza de especies, manteniéndose una leve disminución en los valores de diversidad (2D).

Los números de Hill para el microcosmo Phe al día 14 de incubación son considerablemente menores a los obtenidos para el microcosmo SP, lo que indicaría una reducción en la riqueza bacteriana y la diversidad, causada por la contaminación. Este efecto fue todavía mayor luego de 63 de incubación, obteniéndose valores de 2D marcadamente disminuidos, indicando la presencia en el microcosmos Phe de una comunidad con una menor equitatividad, con la presencia de algunas especies marcadamente dominantes.

Con respecto a los microcosmos contaminados e inoculados, la inoculación con CON produciría un efecto positivo sobre la riqueza y diversidad de la comunidad microbiana, siendo el sistema contaminado que mostró los mayores valores para los tres índices de Hill (TablaV.3). Por otro lado, si bien la inoculación con AM produciría un mayor impacto inicial (a los 14 días de incubación) sobre la diversidad (1D y 2D), al finalizar el tratamiento mostró un aumento en los índices de diversidad, alcanzando valores superiores a los obtenidos para Phe a los 63 días de incubación.

	Número de secuencias	Número de OTUs	Números de Hill		
			⁰ D	¹ D	² D
SP d2	7226	1346	1452,09	567,9	306,89
SP d14	5624	1164	1366,5	546,75	300,08
SP d63	3245	881	1262,26	516,14	292,12
Phe d14	4740	847	1075,45	216,56	39,56
Phe d63	6691	847	983,5	86,31	16,15
Phe+CON d14	11599	1381	1320,31	304,03	79,49
Phe+CON d63	8263	1258	1375,46	276,65	60,24
Phe+AM d14	6026	973	1155,6	154,74	14,84
Phe+AM d63	10598	1252	1244,9	205,33	40,49
SP+AM d14	3790	950	1200,18	483,72	216,4
SP+AM d63	8934	1440	1423,88	528,49	220,75

Tabla V.3. Parámetros de diversidad obtenidos a partir del análisis de los datos de pirosecuenciación de los microcosmos SP, Phe, Phe+CON, Phe+AM y SP+AM.

Con el objetivo de estudiar cuantas OTUs comparten las comunidades bacterianas presentes en los distintos microcosmos, se realizó un diagrama de Venn (Figura V.12). Por la dificultad para comprender diagramas de Venn complejos de 11 muestras (todos los microcosmos a los distintos tiempos analizados) se sumaron las secuencias correspondientes a los tiempos analizados en cada uno de los microcosmos, incluyendo al día 2 de incubación para el microcosmo SP.

V.1.5.3.i Análisis de correspondencia a nivel de OTU.

Para conocer la distribución de los microcosmos en el plano en relación a la presencia de los OTUs, se realizó un análisis de correspondencia que se muestra en la figura V.13.

En base a la frecuencia relativa de los OTUs se observó que los microcosmos de suelo prístino (SP y SP+AM) se encuentran espacialmente próximos durante todo el ensayo, a la derecha del cero en el eje C1 (eje x). De los microcosmos contaminados es Phe el que más se separa de los microcosmos de suelo prístino, observándose la mayor distancia al día 14 de incubación. Por el contrario, el microcosmo contaminado que más cercano se sitúa con respecto al suelo prístino es el inoculado con CON (Phe+CON). A su vez se observó que el microcosmo Phe+AM se acerca a SP y SP+AM con la incubación.

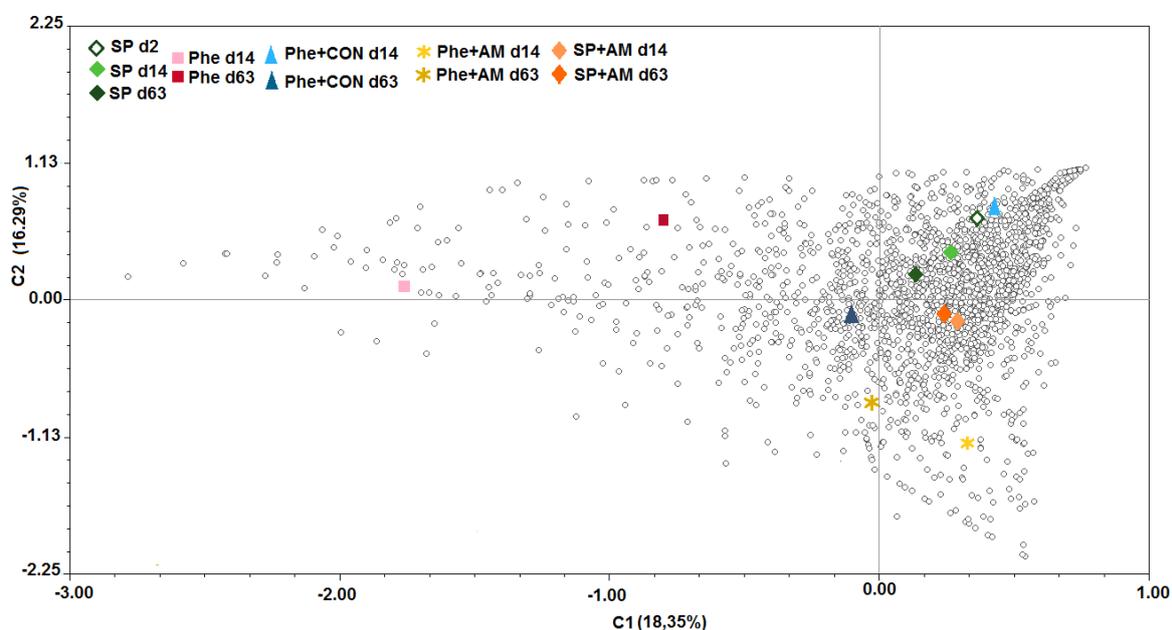


Figura V.13. Análisis de correspondencia realizado a partir de una tabla de frecuencia de OTUs de los microcosmos SP, Phe, Phe+CON, Phe+AM y SP+AM a los tiempos de incubación estudiados

V.1.5.3.ii Impacto de los diferentes tratamientos sobre la abundancia relativa de las poblaciones bacterianas de suelo.

V.1.5. 3.ii.1 Análisis de las comunidades bacterianas de los microcosmos a nivel de filo y clase

Todas las secuencias representativas de cada OTU se clasificaron dentro del dominio *Bacteria* en 20 filos distintos. Los principales filos microbianos encontrados y sus

abundancias relativas fueron *Proteobacteria* (19,18%-53,22% de las lecturas), *Acidobacteria* (6,15%-36,91%), *Actinobacteria* (7,44%-15,39%), *Verrucomicrobia* (1,40%-24,03%), *Chloroflexi* (3,93%-10,70%), *Firmicutes* (1,13%-6,77%), *Gemmatimonadetes* (1,46%-7,29%) y *Bacteroidetes* (0,38%-3,07%) (Tabla V.S2 en material suplementario) (Figura V.12). En la figura V.14 se muestran los cambios a nivel de filo en SP, Phe, Phe+CON, Phe+AM y SP+AM a los días de incubación estudiados.

El filo predominante en el microcosmos SP al día 2 y 14 de incubación fue *Acidobacteria* (36,07% y 36,91% respectivamente) mientras que la incubación luego de 63 días generó una disminución de este filo, acompañado por un aumento en *Proteobacteria*, cuyo valor de abundancia relativa se incrementó de un 19,18% al día 2 a un 25,16% al día 63, seguido del filo *Actinobacteria* (25,19% al día 63 de incubación) (Tabla V.S2 en material suplementario). La adición de fenantreno al suelo generó una disminución progresiva en el filo *Acidobacteria* (24,46% a 6,15%), y un importante aumento de los filios *Actinobacteria* (15,39% a 33,98%) y *Proteobacteria*, siendo este último el filo predominante en ambos tiempos de incubación estudiados (35,19% al día 14 y 48,22% al día 63 de incubación).

Los microcosmos inoculados mostraron un claro predominio del filo *Proteobacteria* (más del 33% de todas las secuencias), lo cual se corresponde con la filiación de las bacterias inoculadas (Figura IV.7, capítulo IV), a expensas de una disminución en la proporción de secuencias asignadas al filo *Actinobacteria*.

Tanto en el sistema contaminado, como en los microcosmos inoculados (en presencia o no del contaminante), el aumento del filo *Proteobacteria* se debió principalmente al incremento de secuencias de *Alphaproteobacteria* (Figura V.12 y Tabla V.S3 en material suplementario). Por otra parte, los filios restantes sufrieron distintas variaciones dependiendo del tratamiento y del tiempo de incubación.

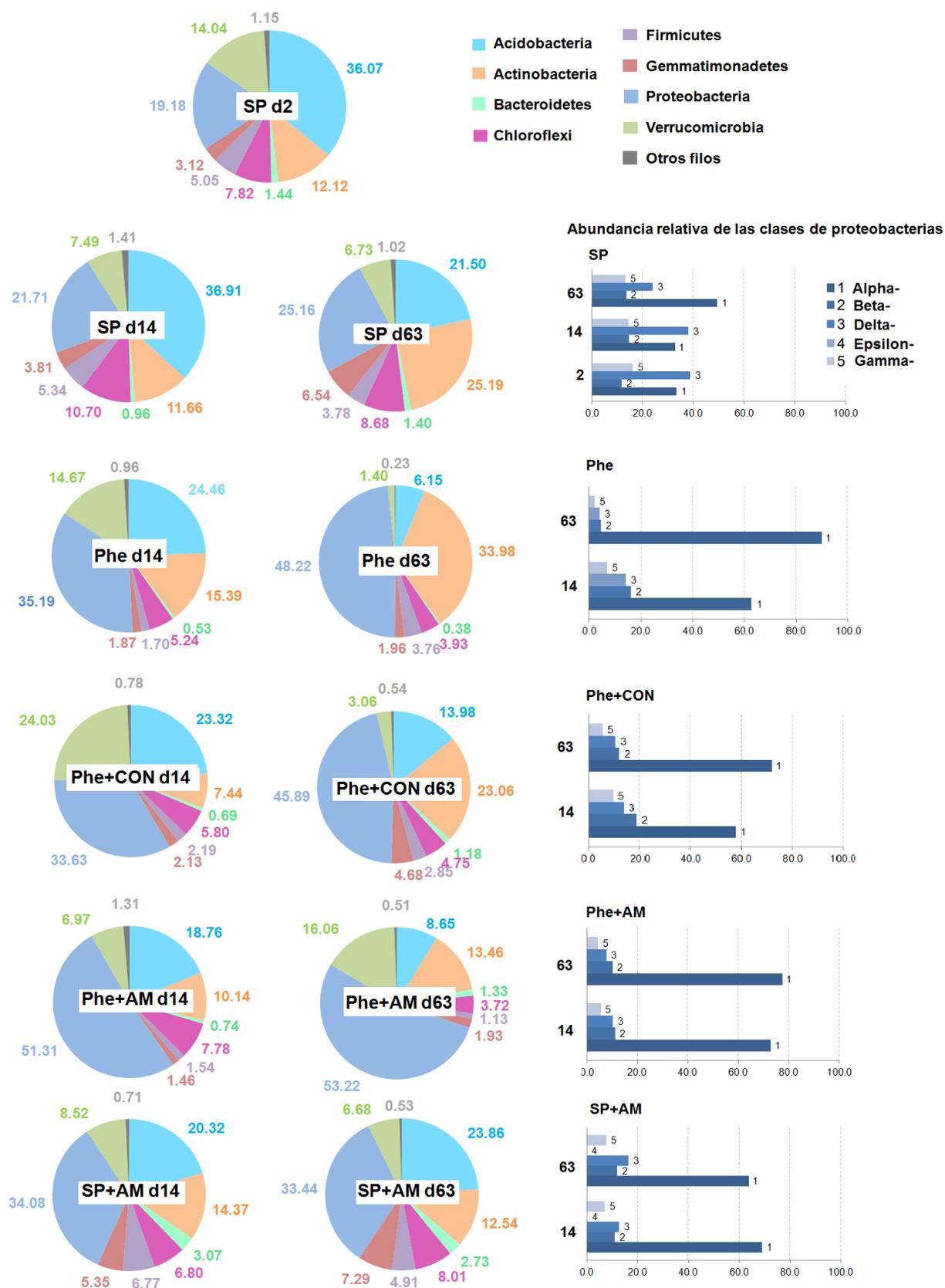


Figura V.14. Gráfico circular mostrando las abundancias relativas de los principales filos bacterianos y gráfico de barras mostrando distintas clases de *Proteobacteria* encontradas en los microcosmos SP, Phe, Phe+CON, Phe+AM y SP+AM a los tiempos de incubación estudiados.

V.1.5.3.ii.2 Análisis de las comunidades bacterianas de los microcosmos a nivel de orden

Muchas poblaciones bacterianas del suelo aumentaron o disminuyeron significativamente por efecto de la incubación, la contaminación con fenantreno, la inoculación o por combinación de factores. Se analizaron las diferencias en la abundancia relativa a nivel de orden en los microcosmos tratados en comparación con los valores encontrados en el microcosmo SP al día 2 de incubación. En la figura V.15 se muestran los órdenes bacterianos que presentaron un delta mayor o igual al 2,5% en sus abundancias relativas. Las condiciones de incubación en todos los microcosmos (tamizado, humedad, temperatura y aireación controlada) causaron una significativa disminución en la abundancia relativa de *Acidobacteriales* (9,43%), *Holophagales* (5,33%) y *Verrucomicrobiales* (7,14%). La contaminación con fenantreno, la inoculación con CON y la cepa AM en presencia del contaminante, causaron una disminución aún mayor en la abundancia relativa de los órdenes *Acidobacteriales* (18,26%, 13,44% y 16,52% respectivamente) y *Holophagales* (11,67%, 8,86% y 11,50% respectivamente) (Figura V.15). En el caso del orden *Verrucomicrobiales* se observaron distintos comportamientos, a los 14 días de incubación no se observó disminución de su abundancia relativa en el microcosmo Phe, mientras que la inoculación de CON produjo un aumento significativo de las secuencias correspondientes a dicho orden (9,96%). En el microcosmo Phe+AM se observó un aumento relativo en el orden *Verrucomicrobiales* después de 63 días de incubación. En cambio la inoculación de AM en ausencia de la presión de selección del fenantreno, no causó cambios significativos en los órdenes *Acidobacteriales*, *Holophagales* y *Verrucomicrobiales* con respecto al microcosmo SP.

Por otra parte, las condiciones de incubación (microcosmo SP) produjeron un significativo aumento en la abundancia relativa de los órdenes *Actinomycetales*, *Solirubrobacterales*, *Rhizobiales* y *Gemmatimonadales*.

Los órdenes notablemente estimulados por la contaminación con fenantreno fueron *Actinomycetales* y *Sphingomonadales*, que alcanzaron su mayor abundancia relativa, 26,21% y 39,42% % respectivamente, al final del período de incubación (Tabla V.S3 en material suplementario). Adicionalmente se observó un incremento de menor importancia y de corta duración en el orden *Burkholderiales* (4,20%) (Tabla V.S3 en material suplementario).

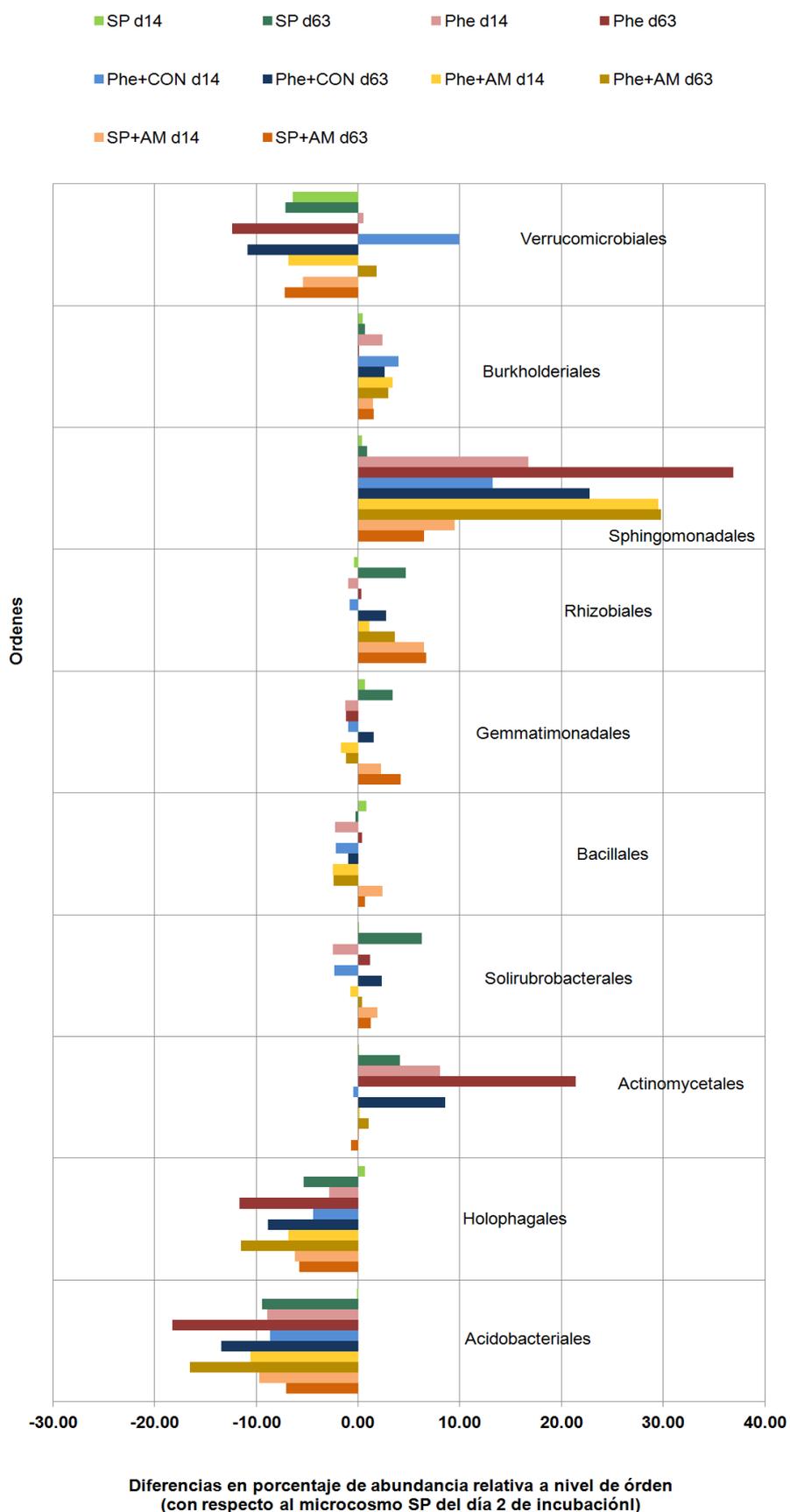


Figura V.15. Diferencias en abundancias relativas a nivel de orden en los microcosmos de suelo prístino, contaminado y contaminados e inoculados al día 14 y 63 de incubación con respecto a los valores del día 2 de incubación del microcosmos SP. Se muestran solo los órdenes que variaron en más de un 2,5% con respecto a SP.

Algunas de las poblaciones significativamente afectadas por la presencia de fenantreno, tanto en los microcosmos inoculados como en el microcosmo Phe, fueron *Bacillales* y *Solirubrobacterales*. Sin embargo, los *Solirubrobacterales* aumentaron significativamente su abundancia relativa luego de 63 días de incubación.

La inoculación de la cepa *Sphingobium* sp. AM solo produjo un incremento en la abundancia relativa del orden *Sphingomonadales* (32,08% de abundancia relativa) superior al alcanzado en el microcosmo Phe (19,31% de abundancia relativa) a los 14 días de incubación. La causa del aumento en el caso de los *Sphingomonadales* no es sorprendente, dado que la cepa AM se afilia a ese orden. Sin embargo, al día 63 de incubación el aumento de *Sphingomonadales* en los microcosmos contaminados e inoculados (Phe+CON y Phe+AM) no logró superar al valor obtenido en Phe (39,42% de abundancia relativa) (Tabla V.S3 material suplementario).

Aunque menos significativo, la inoculación de la cepa AM en suelo prístino también produjo un aumento en la abundancia relativa del orden *Sphingomonadales*, que se mantuvo hasta el final del tratamiento.

Tanto la inoculación de CON como de la cepa AM, y en este último caso tanto en presencia del contaminante como en ausencia del mismo, produjeron un aumento en la abundancia relativa de los órdenes *Burkholderiales* y *Rhizobiales* (también presentes en el consorcio, Figura IV.7, Capítulo IV), y una disminución en los *Actinomycetales*, cuando se los compara con su respectivo control sin inocular.

V.1.5.3.ii.3 Análisis de las comunidades bacterianas de los microcosmos a nivel de género

Para llevar a cabo el análisis de los cambios en la comunidad de los microcosmos a nivel de género se construyó un doble dendrograma jerárquico junto a un mapa de intensidades de color (Figura V.16), que permite obtener una partición de los datos en grupos y nos da una representación gráfica utilizando una escala de colores para indicar aquellos géneros con mayor o menor abundancia relativa (en orden creciente de azul a rojo).

En la figura V.16 se observa la formación de dos grupos en el eje X (GI y GII). GI está conformado por los microcosmos contaminados e inoculados a ambos tiempos de incubación (Phe+CON y Phe+AM). No obstante en este grupo hay una prevalencia de los géneros *Sphingobium*, *Kaistobacter* y *Prostheco bacter*, sus predominancias variaron de un microcosmo al otro. Mientras que el género *Sphingobium* dominó en Phe+AM al día 14 de incubación (27,19% de abundancia relativa), al día 63 lo hace el género *Kaistobacter* (18,47%), seguido de *Prostheco bacter* (14,44%) (Tabla SV.5 en material suplementario). En el microcosmo inoculado con CON presentó la mayor abundancia relativa el género

Prothecobacter (21,62%) al día 14 de incubación, sin embargo disminuyó significativamente al día 63 (2,51%) y aumentó el género *Kaistobacter* (15,43%).

El segundo grupo (GII) se separa en dos *clusters* (CI y CII). CI de menor tamaño agrupa al microcosmo Phe a ambos días de incubación y está caracterizado principalmente por los géneros *Arthrobacter* y *Sphingomonas*, ambos géneros presentaron una mayor abundancia relativa al día 63 de incubación (16,74% y 22,03% respectivamente).

En el *cluster* de mayor tamaño (CII) se agrupan los microcosmos no contaminados, en los cuales se encontraron en mayor abundancia relativa *Acidobacterium*, *Holophaga* y *Prothecobacter*. Cabe destacar que en el microcosmo de suelo prístino inoculado con la cepa AM el género *Sphingobium* no logró establecerse como uno de los géneros dominantes.

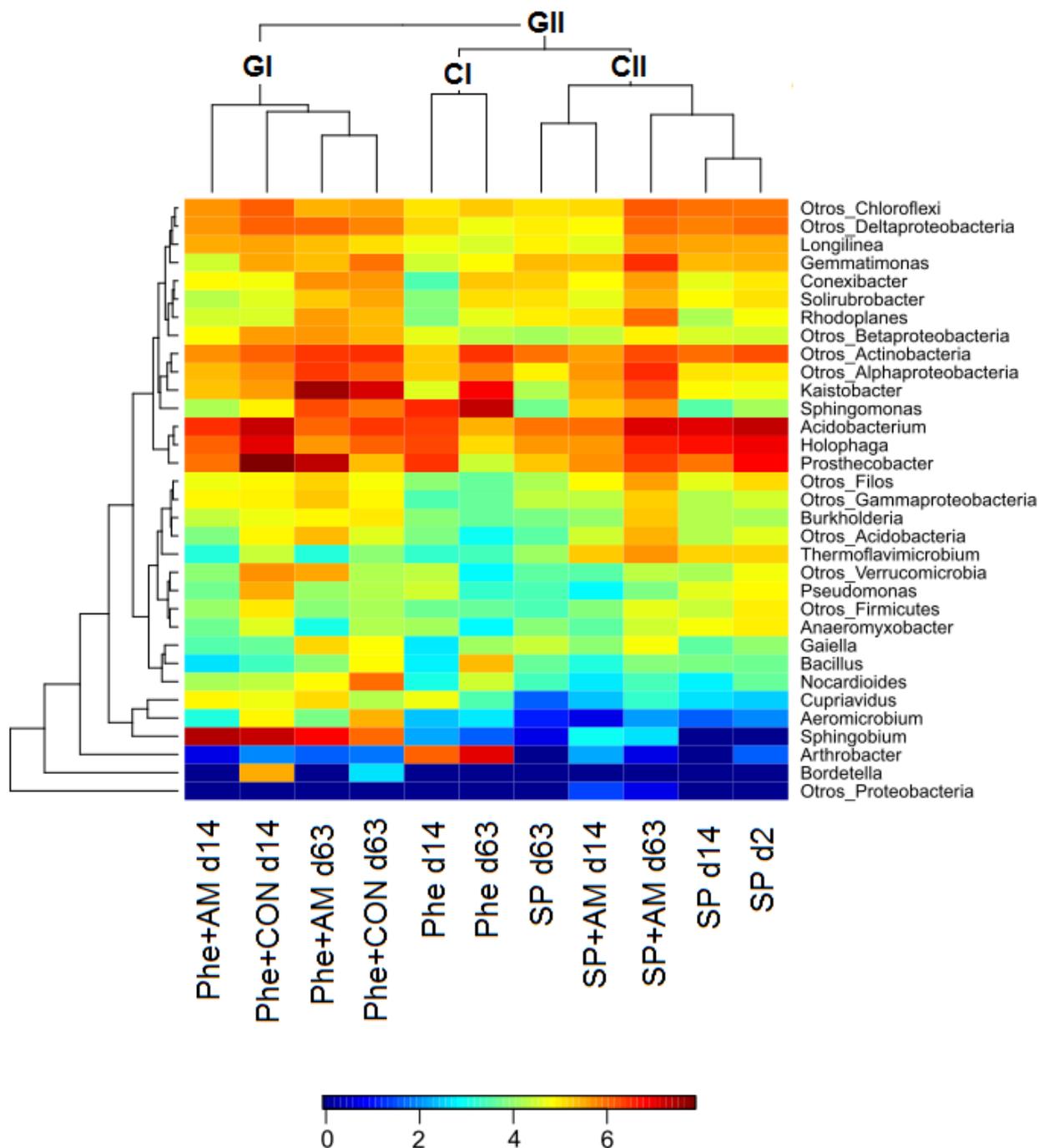


Figura V.16. Distribución de los géneros bacterianos con una abundancia relativa mayor a 2% en un doble dendrograma jerárquico. El cluster filogenético y la relación entre los microcosmos fue determinada por la distancia Bray-Curtis. La gráfica de mapa de intensidad de colores muestra la frecuencia de cada género bacteriano (variables agrupadas en el eje y) en cada muestra (eje x). Los valores en el mapa de intensidades de color representan el Log-transformado de la frecuencia (Log X+1) de cada género y la intensidad de los colores se corresponde con la leyenda indicada debajo de la figura.

V.2 Discusión

El éxito de los tratamientos de bioaumentación depende de la selección de los inoculantes, ya sea una cepa pura o consorcios microbianos, capaces de adaptarse al sitio a descontaminar (Adams y col., 2015). La supervivencia de los microorganismos inoculados se encuentra íntimamente relacionada con la competencia por los recursos con la población microbiana nativa del sitio contaminado. Por lo tanto resulta crítico no solo entender la fisiología del inóculo sino también como afecta la estructura y la función de la comunidad microbiana del suelo a la cual se está introduciendo (Cunliffe y Kertesz, 2006).

En este capítulo se realizaron ensayos de bioaumentación en microcosmos de suelo prístino contaminado artificialmente con fenantreno con el objetivo de evaluar el impacto de diferentes formulaciones bacterianas sobre la degradación del contaminante y la estructura y la dinámica del microbioma del suelo. Las formulaciones bacterianas utilizadas fueron un consorcio natural, previamente estudiado en profundidad en el capítulo IV, un consorcio definido y dos cepas puras.

En general la biodegradación utilizando una cepa bacteriana aislada no representa el comportamiento real de los microorganismos ambientales durante la degradación en ambientes naturales contaminados con PAH, debido a que en la naturaleza la biorremediación depende de las actividades metabólicas cooperativas entre poblaciones microbianas (Janbandhu y Fulekar, 2011).

El término microbiostasis se define como la incapacidad de los microorganismos de multiplicarse en un determinado ambiente (Mallon y col., 2015) y se atribuye a la falta de nutrientes disponibles y a la hostilidad del ambiente del suelo para los microorganismos inoculados, debido a factores bióticos y abióticos (Cubitto y Gentili, 2015). En estas condiciones, la inoculación de consorcios bacterianos presentaría una ventaja frente a la utilización de cultivos puro, ya que la eficiencia de estos últimos se puede ver afectada por su incapacidad para competir con la población microbiana nativa y modificar el ambiente en el que son inoculados (Bardi y col., 2006).

La biodiversidad de los consorcios microbianos apoya su supervivencia en el ambiente (Fuentes y col., 2013). En ambientes naturales los microorganismos están distribuidos heterogéneamente y la cercanía dentro de la comunidad podría mejorar el metabolismo sinérgico de contaminantes orgánicos (Fuentes y col., 2013), facilitando la alimentación cruzada entre las diferentes especies, un prerrequisito para la degradación de contaminantes orgánicos en el suelo (Sorensen y col., 2002). La estructura espacial tiene un rol muy importante en la estabilidad de los consorcios (Escalante y col., 2015). En las comunidades que involucran interacciones recíprocas cooperativas, la estructura espacial

limitaría la potencial aparición de individuos que no cooperan con la degradación, lo que es esencial para una coexistencia estable (Escalante y col., 2015).

La mayoría de los estudios de bioaumentación en suelos contaminados con compuestos orgánicos han utilizado cepas puras (Cunliffe y Kertesz, 2006; Coppotelli y col., 2010; Dueholm y col., 2015; Joshi y col., 2015; Madueño y col., 2015) o consorcios artificiales diseñados a partir de cepas con capacidades catabólicas deseadas (Ghazali y col., 2004; Jacques y col., 2008; Silva y col., 2009; Alkhatib y col., 2011; Sprocati y col., 2012; Mukherjee y Bordoloi, 2011; Gojgic-Cvijovic y col., 2012; Ma y col., 2015). Jacques y col., (2008) determinaron que la efectividad de la inoculación de un consorcio definido en microcosmos de suelo prístino contaminado artificialmente con antraceno, pireno y fenantreno fue mayor a la obtenida con las cepas aisladas. Son pocos los estudios que han llevado a cabo estrategias de bioaumentación con consorcios naturales (Zhao y col., 2011; Mao y col., 2012; Nikolopoulou y col., 2013), y no se ha encontrado bibliografía que compare la eficiencia en ensayos de bioaumentación de un consorcio bacteriano natural con consorcios definidos y/o con cepas aisladas.

Las formulaciones utilizadas en el presente trabajo de tesis, a excepción del sistema inoculado con la cepa no degradadora *Pseudomonas* sp. Bc, resultaron eficientes como estrategia para acelerar la eliminación del contaminante (Figura V.1). La inoculación tanto de consorcios como de la cepa con capacidad degradadora (*Sphingobium* sp. AM), produjo un aumento inmediato en los recuentos de bacterias heterótrofas cultivables (Figura V.2a.), degradadoras de PAH (Figura V.2b) y actividad deshidrogenasa (Figura V.3), con la consiguiente eliminación de la fase lag en la degradación de fenantreno, de aproximadamente 7 días, observada en el microcosmo sin inocular (Phe) (Figura V.1). Dicha fase lag, normalmente observada en estudios de suelos recientemente contaminados (Miya y Firestone, 2000; de Menezes y col., 2012; Martin y col., 2012; Niepceron y col., 2013), muestra el tiempo necesario para la adaptación de la comunidad microbiana, que resulta un parámetro de biodegradación interesante, como una buena medida del potencial catabólico del microbioma del suelo (Couling y col., 2010).

El término adaptación utilizado en la literatura de biodegradación es confuso dado que se refiere a un fenómeno que puede ocurrir tanto en comunidades microbianas mixtas como en linajes microbianos individuales. Los mecanismos que permitirían la adaptación, propuestos por Van der Meer y col., (1992), son: la inducción y/o represión de enzimas específicas y/o el enriquecimiento de la población microbiana capaz de transformar el compuesto de interés. En coincidencia con lo reportado por Simarro y col., (2013), los resultados descritos en el presente trabajo muestran que a pesar de que tanto la cepa *Sphingobium* sp. AM como el consorcio definido no fueron cultivados con presión de selección previamente a ser inoculados, se comportaron de igual manera que CON, que fue crecido en fenantreno como

única fuente de carbono y energía. Tal como se mencionó en el capítulo IV las enzimas claves que actúan al comienzo de la ruta de degradación de fenantreno en la cepa *Sphingobium* sp. AM serían constitutivas, por lo que la cepa podría responder rápidamente a la presencia del contaminante aún proviniendo de medios de cultivos ricos en nutrientes.

La inoculación con una cepa no degradadora de fenantreno como la cepa *Pseudomonas* sp. Bc, presente en el consorcio natural, retrasó la fase lag de eliminación de fenantreno (Figura V.1), probablemente gracias a la incorporación de una gran cantidad de biomasa no degradadora que generó una dilución de las poblaciones degradadoras. Este hecho se pudo evidenciar en la importante disminución en el número de bacterias degradadoras de PAH (Figura V.2b), que se correlaciona con el efecto diferido encontrado en la cinética de degradación de fenantreno en el microcosmo Phe+Bc. Por otro lado, los perfiles DGGE de los microcosmos inoculados mostraron cambios inmediatos en la estructura de la comunidad bacteriana, comparados con el microcosmo SP, caracterizados por la aparición de bandas intensas (Figura V.4); mientras que en los perfiles de DGGE del microcosmo Phe sólo fue posible observar la aparición de poblaciones bacterianas dominantes luego de 14 días de incubación.

Martin y col., (2012), sugirieron que la fase lag en la degradación de fenantreno en microcosmos contaminados y no inoculados, se debía al tiempo necesario para la multiplicación de los microorganismos degradadores de PAH del suelo, más que a la necesidad de la inducción de enzimas específicas. En el presente trabajo se ha encontrado claros indicios de que la duración de la fase lag en la degradación de fenantreno estaría determinada por el tiempo necesario para que la comunidad microbiana evolucione desde la comunidad nativa hacia una comunidad enriquecida en poblaciones degradadoras; las estrategias de bioaumentación utilizando tanto cepas como consorcios degradadores, lograron acortar el tiempo necesario para el establecimiento de la comunidad degradadora y por el contrario la “dilución” de las poblaciones degradadoras por la inoculación de un microorganismo no degradador incrementó la fase lag (Figura V.1 y Figura V.2b).

Al finalizar el tratamiento todos los microcosmos mostraron valores de eliminación de fenantreno mayores al 95% (Figura V.1), sin embargo sólo los sistemas inoculados (a excepción del inoculado con la cepa *Pseudomonas* sp. Bc alcanzaron valores remanentes del contaminante por debajo de los límites establecidos por la legislación nacional (50 mg kg⁻¹, Ley Nacional Argentina 24051). Los microcosmos Phe y Phe+Bc alcanzaron valores semejantes de concentración de fenantreno remanente (73,05±3,16 y 63,17±38,38 mg de fenantreno por Kg de suelo seco respectivamente). La mayor degradación observada en los microcosmos inoculados se podría relacionar con las evidencias del establecimiento y la supervivencia tanto de la cepa *Sphingobium* sp. AM, en los microcosmos Phe+AM y Phe+CD, como de la cepa de *Sphingobium*, mayoritaria en CON (Banda 8, Capítulo IV);

encontrada a través de los perfiles de DGGE (Figura V.4). El establecimiento de la cepa AM fue también evidenciado en el microcosmos Phe+CD a partir de los resultados de la biblioteca genómica realizada a partir del DNA total extraído luego de 14 días de incubación (Tabla V.S1 en material suplementario). Por otro lado, en el caso de los microcosmos Phe+CON y Phe+AM, los estudios de secuenciación masiva de los genes 16S rRNA aportaron claras evidencias del establecimiento y sobrevivencia de los inoculantes, ya que los sistemas inoculados presentaron una alta abundancia relativa de secuencias pertenecientes al género *Sphingobium*, con respecto al microcosmo Phe (Figura V.16 y Tabla VS.5 en material suplementario).

La supervivencia del inóculo introducido al suelo es uno de los retos más difíciles del bioaumentación, generalmente el número de microorganismos exógenos disminuye rápidamente luego de la inoculación, tanto en estudios realizados con bacterias aisladas como consorcios microbianos (Viñas y col., 2005a; Yu y col., 2005; Mrozik y Piotrowska-Seget, 2010; Tyagi y col., 2011). La supervivencia de un inoculante dependería de que el/los microorganismos introducidos puedan superar las barreras bióticas y abióticas, para luego establecerse según su habilidad para acceder a los recursos presentes en el ambiente blanco, y como consecuencia modificar la estructura y la funcionalidad de la comunidad microbiana (Mallon y col., 2015).

Los resultados encontrados en este trabajo muestran que la cepa *Sphingobium* sp. AM poseería propiedades fisiológicas que le permiten vencer las barreras determinadas por las características físicas, químicas y biológicas del suelo receptor, logrando establecerse tanto cuando fue inoculada en forma aislada como en un consorcio (Phe+CD). Del mismo modo, en el microcosmo inoculado con CON, se pudo determinar el establecimiento de por lo menos uno de los microorganismos presentes en el mismo, perteneciente también al género *Sphingobium*, capaz de sobrevivir en un suelo no nativo y competir con las poblaciones microbianas indígenas.

Otra evidencia de la necesaria interacción entre el inóculo y el medio ambiente biótico y abiótico es el hecho de que la eficiencia de los distintos inoculantes ensayados en este trabajo, no se correlaciona con la eficiencia en la eliminación del fenantreno en medio líquido (Tablas IV.5 y IV.9). Mientras que en medio líquido el CD fue el que mostró el mayor porcentaje de degradación de fenantreno (Tabla IV.9), seguido por la cepa AM (Tabla IV.5) y en último lugar CON (Figura IV.2). El microcosmo inoculado con la cepa AM fue el que alcanzó valores de fenantreno remanente significativamente menores ($p < 0.05$) a los alcanzados por los microcosmos inoculados con los consorcios, no existiendo diferencias significativas entre estos últimos (Figura V.1).

Por lo tanto, la caracterización fisiológica, tanto del consorcios como de los microorganismos aislados, realizada en este estudio, como en el caso de otros estudios (Molina y col., 2009;

Coppotelli y col., 2010; Janbandhu y Fulekar, 2011; Madueño y col., 2011; Mishra y col., 2014; Fu y col., 2014; Bacosa e Inoue, 2015), no lograrían predecir el comportamiento de los inoculantes una vez liberados al medio ambiente. La alta eficacia de un inóculo en solución acuosa no garantizaría el éxito de los procesos de bioaumentación en suelos contaminados (Ramirez y col., 2001; Kuppusamy y col., 2016).

Uno de los factores que podría afectar la efectividad de un inoculante es el protocolo de inoculación. Como consecuencia de la utilización de dos protocolos distintos de inoculación se observaron diferencias en la degradación de fenantreno en microcosmos de suelo entre la cepa AM (Figura V.1) y la cepa *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA (Coppotelli y col., 2008), pese a que ambas cepas presentaron rendimientos de degradación similar en medio líquido (Tabla IV.5 Capítulo IV; Coppotelli, 2008). Mientras que en este trabajo se llevó a cabo un solo evento de inoculación (1×10^8), Coppotelli y col., (2008) llevaron a cabo tres inoculaciones sucesivas (1×10^8 en cada inoculación). Como resultado, obtuvieron una alta abundancia del inoculante en suelo lo que podría explicar la pausa observada en la degradación de fenantreno, debida a la acumulación de metabolitos tóxicos de fenantreno generada por la actividad metabólica de una comunidad bacteriana con baja diversidad genética y funcional.

Por lo tanto, el uso de estrategias de bioaumentación para el tratamiento de suelos contaminados debe ser precedido por una serie de ensayos de laboratorio y estudios en microcosmos, con el objetivo de evaluar la capacidad de los microorganismos seleccionados de colonizar el suelo y degradar el contaminante. Se hace necesario entonces adoptar una perspectiva ecológica, lo que permitiría profundizar en principios generales, teorías microbiológicas y aplicaciones prácticas del fenómeno de invasión (inoculación) (Mallon y col., 2015),

A través de los estudios realizados en este trabajo fue posible comprobar que el establecimiento de la cepa AM dependería de la presencia de fenantreno. Este hecho se observó claramente a través de los perfiles de PCR-DGGE del microcosmo SP+AM (Figura V.4), donde la banda que migra en la misma posición que la cepa AM solo se observó al comienzo del ensayo (hasta el día 7). El mismo resultado se discutió en el trabajo de Cunliffe y Kertesz, (2006) donde la cepa *Sphingobium yanoikuyae* B1 solo se mantiene en el tiempo cuando se contamina el suelo y no es detectable luego de 10 días en los microcosmos no contaminados; y bajo esta última condición tampoco observaron cambios en la estructura de la comunidad a través de los perfiles PCR-DGGE, lo que sugeriría que el inóculo no pudo establecerse. En el presente trabajo, si bien se observaron cambios en la organización espacial en el MDS del microcosmo SP+AM con respecto al microcosmo SP (Figura V.6), se debe considerar que el análisis se llevó a cabo con el coeficiente de similitud de Jaccard, uno de los más comúnmente utilizados (Greenacre y Primicerio, 2013). Es por

este motivo que las diferencias encontradas podrían deberse a que el coeficiente solo considera como propiedad la presencia de bandas.

La utilización de métodos de secuenciación de alto rendimiento nos permitió conocer en forma detallada la composición de la comunidad microbiana, confirmando que la inoculación con la cepa AM en ausencia de fenantreno no produjo cambios importantes en la comunidad bacteriana nativa. Los valores de los números de Hill 0D , 1D y 2D del microcosmo SP+AM (Tabla V.3) muestran valores de diversidad y riqueza de especies similares a los del microcosmo SP; por otro lado el 35,46% de las OTUs compartidas (Figura V.12 y Tabla V.5), el análisis de correspondencia (Figura V.13) y el doble dendrograma jerárquico junto al mapa de intensidades de color (Figura V.16) mostraron que la comunidad bacteriana del microcosmo SP+AM, a ambos tiempos de incubación estudiados, se encuentra espacialmente cercana a la del microcosmo SP.

Si analizamos en conjunto los resultados podemos diferenciar entre dos etapas distintas en el proceso de invasión. Mientras que el recuento de bacterias degradadoras de PAH del microcosmo SP+AM (Figura V.2b) fue significativamente superior a los valores encontrados en el microcosmo SP durante todo el tratamiento (lo que sugeriría la sobrevivencia del inoculante), la medida de la actividad deshidrogenasa del microcosmo SP+AM (Figura V.3) se mantuvo por debajo de los valores encontrados en el microcosmo SP. Esto último junto a los estudios de la composición detallada de la comunidad a través de pirosecuenciación del gen 16S rRNA, demuestran que el inoculante no fue capaz de establecerse (participar en el flujo del carbono) en ausencia de fenantreno.

En la naturaleza, la **sobrevivencia** del inoculante, superando las barreras bióticas y abióticas, no le garantiza la adquisición de los nutrientes (Mallon y col., 2015). En un ambiente diverso, como es el suelo prístino (valor de 1D , 567,9), la cantidad de recursos disponibles es muy limitada y las posibilidades de **establecimiento** de un inoculante es muy baja. El agregado de un recurso fácilmente disponible (en este caso el fenantreno), aumenta la posibilidad de una invasión exitosa.

Las comunidades microbianas forman redes complejas de especies interactuando, por lo tanto el establecimiento del inoculante supone alterar la estructura de estas interacciones (Barberán y col., 2012). Las nuevas metodologías moleculares nos dan la posibilidad de realizar una mirada aguda sobre las comunidades microbianas, lo que nos permitiría dilucidar como diferentes inoculantes podrían alterar la red ecológica de la comunidad nativa.

La tecnología de pirosecuenciación con código de barras utilizada permitió determinar que la contaminación con fenantreno produjo un fuerte impacto negativo sobre la diversidad (1D y 2D) y riqueza de especies (0D) de la comunidad microbiana del suelo (Tabla V.3), y que este efecto negativo se hace aún más marcado al final del tiempo de incubación, cuando se ha

eliminado el 96,35% del fenantreno incorporado (Figura V.1). De igual manera sucedió en un trabajo de Ding y col., (2012) quienes confirman mediante la misma tecnología utilizada en este trabajo que la diferencia de la comunidad bacteriana entre los microcosmos contaminados y los no contaminados aumentó con el tiempo. Esto puede deberse a que la degradación del contaminante por microorganismos especializados produce metabolitos intermediarios que generan una nueva presión de selección en la comunidad microbiana (Zrafi-Nouira y Saidane-Mosbahi, 2012).

La inoculación con la cepa *Sphingobium* sp. AM causó inicialmente una pérdida en la diversidad bacteriana del suelo (2D , 14,84) aún mayor a la observada en el microcosmo Phe (Tabla V.3), probablemente como consecuencia directa del alto predominio de las secuencias correspondientes al inoculante. Sin embargo al finalizar el tratamiento el microcosmo Phe+AM alcanzó valores de riqueza y diversidad de especies mayores a los encontrados en el microcosmo Phe. La inoculación del consorcio, además de acelerar la biodegradación de fenantreno (Figura V.1) logró la recuperación de la diversidad y riqueza de especies (Tabla V.3), siendo el sistema que comparte el mayor número de secuencias con el microcosmo SP (45,01%) (Figura V.12 y Tabla V.5), y se ubicó espacialmente cercano tanto en el análisis de correspondencia a nivel de OTUs (Figura V.13) como en el MDS de los perfiles de bandas derivados del análisis por PCR-DGGE (Figura V.6)

El efecto positivo de un inoculante (invasor) sobre la diversidad del hábitat invadido se reportó previamente para distintos organismos (plantas, moluscos y bacterias) (Wonham y col., 2005; Horňák y Corno, 2012;). Se postula que el inoculante podría promover nuevas interacciones y nichos ecológicos (Horňák y Corno, 2012), lo que podría, como consecuencia, modificar la velocidad de consumo de los recursos disponibles (en nuestro caso fenantreno).

Se describió que la disminución de la diversidad microbiana del suelo podría reducir la estabilidad de la comunidad microbiana frente a posteriores perturbaciones naturales o antropogénicas (Degens y col., 2001). En este sentido la inoculación con el consorcio natural tendría un doble efecto benéfico, acelerar la degradación del contaminante y recuperar la diversidad del microbioma nativo. Sin embargo, la pérdida de biodiversidad se ve desafiada por la redundancia funcional que asume que diferentes especies pueden tener una misma función en el ecosistema, por lo que la pérdida no necesariamente afecte la funcionalidad del ecosistema (Mendes y col., 2015; Rodríguez y col., 2015). Sería necesario realizar estudios funcionales que permitan corroborar si la inoculación con CON mejoraría la estabilidad y funcionalidad del suelo.

Los resultados de los estudios de pirosecuenciación del gen 16S rRNA proveen una descripción más robusta y detallada de los cambios en la comunidad bacteriana producidos por la contaminación y la inoculación, permitiendo la identificación de las poblaciones que

sufrieron un incremento o reducción en su abundancia relativa, comparada con el microcosmo SP.

Las comunidades microbianas de todos los microcosmos presentaron una dominancia de 8 filos bacterianos, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Firmicutes*, *Gemmatimonadetes*, *Proteobacteria* y *Verrucomicrobia* (Tabla V.S2 en material suplementario), con más del 98% de las secuencias totales de cada microcosmo. La composición y la diversidad de la comunidad bacteriana se vio fuertemente afectada por la presencia de fenantreno y de los inoculantes en los distintos niveles taxonómicos (Figura V.14, V.15 y V.16). Tanto la contaminación como las distintas estrategias de inoculación produjeron un claro predominio del filo *Proteobacteria* (Figura V.14). Aunque con menor profundidad, los resultados de la biblioteca genómica, que incluye al microcosmos Phe+CD, fueron concordantes (Figura V.10). Esta observación no resulta sorprendente debido a que el filo *Proteobacteria* se ha reportado previamente por su habilidad de utilizar hidrocarburos aromáticos y alifáticos (Kersters y col., 2006) y además se observaron cambios en su abundancia relativa generados por la contaminación con petróleo y los procesos de biorremediación (Sutton y col., 2013). Martin y col., (2012) observaron mediante la tecnología de SIP la dominancia de *Betaproteobacteria* en microcosmos de suelo crónicamente contaminado con PAH y suplementado con fenantreno marcado con ^{13}C , sin embargo en este trabajo de tesis, la clase *Alphaproteobacteria* fue dominante (Figura V.14 y Tabla V.S3 en material suplementario) no solo en los microcosmos contaminados e inoculados (hecho que era de esperarse ya que la cepa *Sphingobium* sp. AM y gran parte de las poblaciones presentes en CON pertenecen a dicha clase) sino también en el microcosmo Phe. Si bien las *Gammaproteobacteria* han demostrado estar involucradas en la degradación de los hidrocarburos del petróleo como el pireno, fenantreno, antraceno y naftaleno entre otros (Patel y col., 2013), la contaminación con fenantreno en microcosmos de suelo prístino generó un descenso en su abundancia relativa que no fue tan marcado en los microcosmos contaminados e inoculados (Figura V.14 y Tabla V.S3 en material suplementario).

En los tres microcosmos contaminados y dentro de la clase *Alphaproteobacteria*, el mayor incremento fue observado en el orden *Sphingomonadales* (Figura V.15), que estuvo mayormente representado por los géneros *Sphingomonas*, *Sphingobium* y *Kaistobacter* (Figura V.16 y Tabla S.5 en material suplementario). Este resultado es esperado en los microcosmos inoculados, dado que es el orden que se presenta en mayor porcentaje en el inóculo (*Sphingobium*). Sin embargo, cuando se incorporó solo fenantreno (microcosmo Phe) el mayor aumento se observó en el género *Sphingomonas*, otro miembro de la familia *Sphingomonadaceae* (Figura V.16 y Tabla V.S5 en material suplementario). El aumento en la abundancia relativa del género *Sphingomonas* ha sido previamente reportado en

microcosmos de suelo prístino contaminado con fenantreno (Ding y col., 2012). Estos autores, también encontraron que el aumento de *Sphingomonas* fue acompañado de un aumento en el secuencias del género *Polaromonas*, un género bacteriano perteneciente al orden *Burkholderiales*, que se ha considerado responsable de la degradación de PAH en suelo o sedimentos (Sun y col., 2010). En nuestro trabajo, el orden *Burkholderiales* fue también estimulado en los tres microcosmos contaminados estudiados (Figura V.15 y Tabla V.S4 en material suplementario), sin embargo el incremento de este orden resulta temporal en el microcosmo Phe, donde disminuyó fuertemente al final del ensayo. En el microcosmo inoculado con CON este resultado se podría adjudicar a la incorporación de secuencias pertenecientes al orden *Burkholderiales* presentes en el consorcio (2.9%). Resulta muy interesante que la inoculación de la cepa *Sphingobium* sp. AM, tanto en suelo contaminado como no contaminado, haya producido un efecto estimulador sobre las poblaciones perteneciente al orden *Burkholderiales*, co-existiendo en los microcosmos contaminados e inoculados, al igual que en CON (como ya fue discutido en el capítulo IV). Sin embargo, es necesario tener en cuenta que en el suelo se aumentan las dimensiones del sistema y existen factores que mitigan la severidad de la competencia. Estos factores podrían ser la multiplicidad de recursos y la heterogeneidad espacial entre otros, que logran evitar la exclusión por competitividad y permiten la co-existencia de dos poblaciones que ocuparían nichos idénticos (Atilas y Bartha, 1998). Esto podría explicar la diferencia encontrada en la eficiencia de CON durante la degradación de fenantreno en medio líquido (Capítulo IV; Figura IV.2) y en suelo (Figura V.1).

Treves y col., (2003), sugirieron que al aumentar el aislamiento espacial, en una comunidad con un patrón de competencia donde una o dos especies son dominantes, se logra un cambio a una comunidad con un perfil con falta de competencia. La separación espacial en microcosmos de suelo resultó en su trabajo, como en este, en la coexistencia de especies que en cultivo mostraron competencia, una desplazando a la otra. Por otra parte, Jiang y col., (2007) realizaron ensayos de bioaumentación con un cultivo mixto de dos cepas degradadoras de fenol en un biorreactor de gránulos aerobios de biomasa con lodo activado contaminado con dicho compuesto. Si bien en cultivo una cepa desplazaba a la otra, en los ensayos de bioaumentación observaron que estas dos cepas con funciones similares lograron coexistir gracias a la heterogeneidad del sistema de gránulos que les brindó aislamiento espacial. Aún en la actualidad resulta muy difícil de establecer las interacciones que determinan la coexistencia y la competencia entre poblaciones degradadoras de hidrocarburos (Brzeszcz y col., 2016). Sin embargo, el avance de los enfoques ómicos, SIP y otras nuevas metodologías nos permitirán conocer la diversidad taxonómica y funcional del microbioma de suelos contaminados durante los procesos de biorremediación, explorar interacciones entre los taxones y sus procesos metabólicos (Myrold y Nannipieri, 2014), y

desarrollar modelos predictivos sobre la actividad degradadora de la comunidad microbiana del suelo (Morelli y col., 2015).

El orden *Burkholderiales* a nivel de género estuvo representado por *Burkholderia*, *Bordetella* (solo en el microcosmo Phe+CON) y *Cupriavidus*. El género *Achromobacter* y *Bordetella* están filogenéticamente muy relacionados (Spilker y col., 2014) por lo que la asignación de secuencias del 16S RNA al género *Bordetella* se podría también adjudicar a *Achromobacter*. *Achromobacter* y *Cupriavidus* se han reportado previamente como degradadores de PAH (Goyal and Zylstra, 1996; Perez-Pantoja y col., 2008; Wang y col., 2008).

La contaminación con fenantreno produjo además un importante incremento relativo del orden *Actinomycetales* (perteneciente al filo *Actinobacteria*) (Figura V.15), en concordancia con lo encontrado en microcosmos de suelo artificialmente contaminado con antraceno (Castro Silva y col., 2013), en reactores de suelo contaminado con aceite (Militon y col., 2010) y en procesos de atenuación natural de suelos contaminados con crudo (Pucci y col., 2000).

Bastida y col., (2015) observaron también un aumento en el orden *Actinomycetales* con respecto al control (suelo sin contaminar) en microcosmos de suelo contaminado artificialmente con aceite; sin embargo utilizando un acercamiento metaproteómico no encontraron proteínas claves relacionadas a la degradación de hidrocarburos pertenecientes al filo *Actinobacteria*, por lo que sugirieron que este filo podría utilizar metabolitos intermediarios generados por otros microorganismos degradadores u ocupar nichos de poblaciones inhibidas por la contaminación, en vez de participar directamente con la degradación de hidrocarburos. A nivel de género el filo *Actinobacteria*, en el microcosmos Phe, se vió mayormente representado por *Arthrobacter* (Figura V.16), casi no detectable en el resto de los microcosmos. El género *Arthrobacter* está ampliamente distribuido en la naturaleza y se encuentra frecuentemente asociado con ambientes contaminados con hidrocarburos (Hennessee y Li, 2010). Algunas de sus características fisiológicas, como la producción de biosurfactantes (Kosaric, 2001) y la alteración de la fluidez de la membrana celular (Kallimanis y col., 2007), indican que podría ser muy útil en estrategias de biorremediación.

En comunidades degradadoras es útil tener diferentes respuestas fisiológicas a los hidrocarburos con el objetivo de aumentar el potencial de degradación (Bundy y col., 2002). En el microcosmo Phe, el aumento notorio de *Actinomycetales*, de lento crecimiento, y de *Sphingomonadales*, de rápido crecimiento y eficiente degradador de PAH, pondría en evidencia las diferentes estrategias desarrolladas por la comunidad del suelo para degradar el contaminante. Está claro que la inoculación produjo una inhibición en el orden *Actinomycetales* (Figura V.15 y V.16), que se podría relacionar con la incorporación de una

significativa masa de células capaces de crecer a altas velocidades, como lo son las *Proteobacteria* (Lebeau, 2011; Brzeszcz y col., 2016).

La inoculación con la cepa AM generó no solo un aumento en *Sphingomonadales*, *Burkholderiales* y *Actinomycetales* sino también de *Rhizobiales* (Figura V.15). Pocos trabajos reportan la presencia de *Rhizobiales* en sitios contaminados con hidrocarburos y la interacción de estas bacterias con dichos contaminantes. Bastida y col., (2015) reportaron que el orden *Rhizobiales* y la abundancia relativa de sus proteínas disminuía con la contaminación del suelo con petróleo. Sin embargo, recientemente, Muratova y col., (2014) demostraron que *Ensifer meliloti* presentó la capacidad de degradar fenantreno en presencia de ácido succínico como co-sustrato.

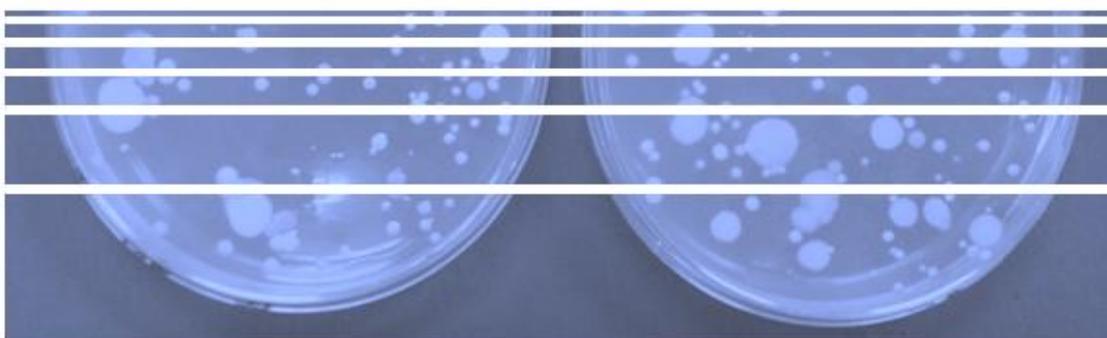
Dos órdenes, *Holophagales* y *Acidobacteriales*, pertenecientes al filo *Acidobacteria* disminuyeron en todos los microcosmos con respecto a su abundancia en el suelo inicial, y en mayor medida lo hicieron en los microcosmos Phe y Phe+AM (Figura V.15 y Tabla V.S4 en material suplementario). Si bien el filo *Acidobacteria* está ampliamente distribuido en suelos y ha sido caracterizado por ser heterótrofo versátil (Castro-Silva y col., 2013), no es fácilmente cultivable, como consecuencia su rol en el ambiente es poco comprendido (Xie y col., 2011). Este filo fue previamente reportado por disminuir su abundancia relativa en presencia de contaminación con PAH (Sipilä, 2009; Yrjälä y col., 2010; Ding y col., 2012; Castro-Silva y col., 2013). Este filo sería un estratega K y estaría adaptado a ambientes donde la cantidad de recursos es baja (Yrjälä y col., 2010).

La inoculación con CON generó un notorio aumento en el orden *Verrucomicrobiales* (Figura V.15 y Tabla V.S3 en material suplementario), que a nivel de género estuvo representado por *Prostheco bacter* (Figura V.16). Dicho género tiene como característica la formación de unos apéndices llamados prostecas que son extensiones citoplasmáticas de la pared celular. Estas extensiones le brindan algunas ventajas a estas bacterias heterótrofas aeróbicas, como una mejora en la toma de nutrientes y en la respiración, además de mejorar su adhesión a sustratos sólidos (Sessitsch y col., 2001). En un trabajo de Yrjälä y col., (2010), el filo *Verrucomicrobia*, junto con *Acidobacteriales*, predominaron en el suelo prístino, sin embargo, contrariamente a lo ocurrido en este trabajo, no encontraron representantes de este filo en suelo contaminado, sugiriendo que estas bacterias no participarían en la degradación de PAH.

La ecología y el comportamiento de la comunidad microbiana del suelo son más complejos que lo predicho por sus características fisiológicas o su abundancia en suelos contaminados con PAH. Muchos de los miembros de la comunidad microbiana podrían ser capaces de secretar enzimas degradativas o factores de crecimiento mientras que otros producirían biosurfactantes que provocan una mayor solubilización de hidrocarburos hidrofóbicos (Mukherjee y Bordoloi, 2011).

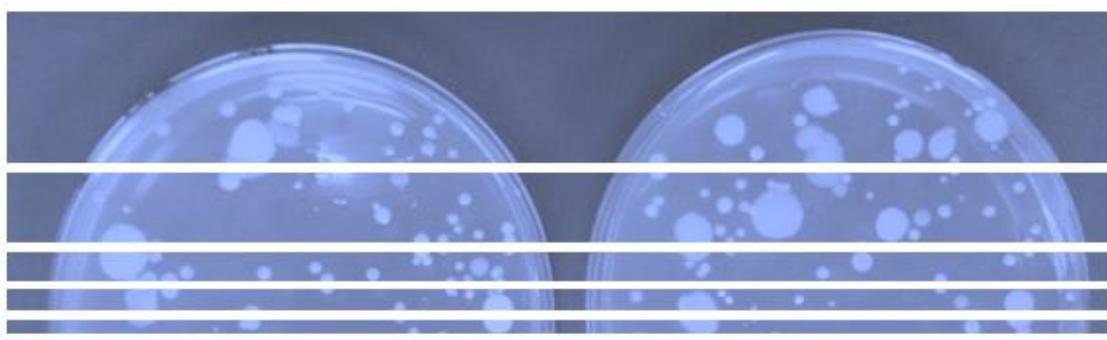
Se podría pensar en que existe una competencia por el nicho ambiental entre las poblaciones que aumentaron y disminuyeron. Aquellos filotipos que aumentaron podrían poseer ventajas ecológicas que les permite sobrevivir, multiplicarse y competir en suelos contaminados. También es posible que las poblaciones que disminuyeron sean las más sensibles al contaminante. En este caso los nutrientes liberados por las células que disminuyeron podrían ser utilizados por otras poblaciones (Ren y col., 2015).

Las metodologías empleadas ayudaron a profundizar en el conocimiento de la respuesta del microbioma del suelo utilizado frente a la inoculación. A partir de los resultados encontrados en el presente capítulo se podría afirmar que la estrategia de bioaumentación llevada a cabo con el consorcio natural y la cepa degradadora *Sphingobium* sp. AM no solo mejoró la degradación del contaminante, sino que además generó un impacto positivo sobre la diversidad del sistema.



Capítulo VI

Ensayos de bioaumento en microcosmos de suelo crónicamente contaminado con PAH



VI. Ensayos de bioaumentación en microcosmos de suelo crónicamente contaminado con PAH

En ambientes altamente modificados, como los representados por suelos antiguamente contaminados, el proceso de “envejecimiento” del contaminante hace difícil su biodegradación debido a una disminución de su biodisponibilidad por unión a la materia orgánica del suelo (Shor y col., 2003). Esto genera una reducida transferencia de masas desde la matriz de suelo hacia la interfase acuosa donde es asequible a los microorganismos (Semple y col., 2007). Por lo tanto, la biodegradación de contaminantes, como los hidrocarburos, en suelos envejecidos resulta más difícil que en suelos recientemente contaminados (Brzeszcz y col., 2016).

Actualmente la biodisponibilidad, factor de suma importancia en procesos de biorremediación en ambientes altamente heterogéneos como el suelo y sedimento, es considerada el resultado de la interacción de dos factores, un factor físico-químico que incluye las características del contaminante y la matriz del sitio y otro biológico que considera las propiedades de la comunidad microbiana indígena del sitio en cuestión (Grimm y Harwood, 1997; Huesemann y col., 2004; Parales y Haddock, 2004).

Por otro lado, los suelos expuestos a una contaminación con hidrocarburos podrían presentar grandes desafíos para mantener la diversidad estructural y funcional de las comunidades microbianas (Pessacq y col., 2015). Existen evidencias que estas comunidades altamente seleccionadas pueden considerarse sub-óptimas cuando se pretende realizar procesos de biorremediación (Bell y col., 2013).

En función de los resultados encontrados en el capítulo V, donde se observó que la inoculación causó no solo un efecto positivo sobre la degradación del contaminante sino también sobre la diversidad bacteriana del sistema, en el presente capítulo se estudió el efecto de dos estrategias de bioaumentación sobre la degradación de hidrocarburos y la recuperación de la diversidad de un suelo crónicamente contaminado. El suelo seleccionado provenía de una planta de tratamiento por *landfarming* de un residuo petroquímico con altas concentraciones de PAH. La caracterización del suelo, al que se llamó IPK se muestra en la tabla III.1 en el capítulo III (Inciso III.2.7).

Como inóculo se utilizó el consorcio CON y la cepa *Sphingobium* sp. AM, caracterizados (Capítulo IV) y utilizados previamente como inóculo en microcosmos de suelo artificialmente contaminado con fenantreno (Capítulo V).

Se realizaron 2 tratamientos: (1) suelo crónicamente contaminado e inoculado con 1×10^8 ufc de CON por gramo de suelo seco (IPK-CON); (2) suelo crónicamente contaminado e

inoculado con 1×10^8 ufc de la cepa *Sphingobium* sp. AM por gramo de suelo seco (IPK-AM). Se llevó a cabo un control sin inocular (IPK-Control).

Todos los microcosmos se prepararon por triplicado y se incubaron en oscuridad a 24 ± 2 °C y 20% de humedad durante un período de incubación de 63 días, siendo mezclados semanalmente para asegurar la aeración. Se estudió la cinética de eliminación de los hidrocarburos presentes en el suelo, la actividad biológica y el impacto sobre la diversidad de la comunidad microbiana que se genera durante esta eliminación.

VI.1 Resultados.

VI.1.1 Determinación de la eliminación de diferentes hidrocarburos presentes en los microcosmos.

Se determinó la eliminación de los hidrocarburos totales presentes en los microcosmos al día 14 y 63 de incubación. Además se analizó por separado la eliminación de fenantreno, de PAH totales y de hidrocarburos alifáticos totales presentes en la muestra. La Tabla VI.1 muestra los porcentajes de degradación alcanzados en cada microcosmo con respecto a los valores encontrados en el suelo inicial (SI), suelo recientemente tamizado.

Del análisis de los resultados se observó que el microcosmo IPK-Control presentó altos valores de degradación para todos los grupos de hidrocarburos analizados, obteniendo valores superiores al 61% de degradación al día 14 de incubación. Por otra parte, la inoculación (tanto con CON como con la cepa *Sphingobium* sp. AM) produjo valores de degradación similares a los del microcosmo control en ambos tiempos de incubación. Solo se encontraron diferencias significativas en los valores de degradación de hidrocarburos alifáticos entre IPK-CON y los microcosmos restantes, siendo el inoculado con CON el que obtuvo los menores porcentajes de degradación.

Cabe destacar que la degradación de los contaminantes orgánicos ocurrió durante los primeros 14 días de incubación (Tabla VI.1), debido a que los porcentajes encontrados al día 63 no superan el valor de degradación al día 14. Si bien el sistema se homogenizó, los resultados encontrados ponen en evidencia la gran heterogeneidad que presentó el suelo utilizado.

		% degradación			
IPK-Control d14	IPK-Control d63	IPK-CON d14	IPK-CON d63	IPK-AM d14	IPK-AM d63
Hidrocarburos totales					
62±2	54±8	64±2	39±14	69±4	55±9
Hidrocarburos alifáticos					
61±7	53±21	33±2	33±20	64±7	51±25
PAH					
62±3	54±5	70±4	43.±15	70±4	55±6
Fenantreno					
72±1	53±12	76±3	35±51	73±5	70±6

Figura VI.1. Porcentaje de eliminación de hidrocarburos totales, hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH), hidrocarburos alifáticos y fenantreno a los 14 y 63 días de incubación con respecto a la concentración en SI. La medida de la concentración de hidrocarburos inicial se realizó por cutriplicado. Se muestran los valores promedio y las desviaciones estándar de 3 ensayos independientes por microcosmo.

VI.1.2 Efecto de la inoculación sobre la dinámica de las poblaciones bacterianas cultivables

Con el objetivo comenzar a estudiar el impacto de la inoculación sobre el microbioma del suelo, se analizaron los cambios sobre la densidad de las poblaciones bacterianas heterótrofas cultivables y degradadoras de PAH.

En la figura VI.1 se observa que para el microcosmo IPK-Control los valores de ambas poblaciones estudiadas se mantuvieron constantes durante todo el ensayo. Además, la inoculación tanto de CON como de la cepa *Sphingobium* sp. AM no produjo cambios importantes en la dinámica de las poblaciones de bacterias heterótrofas cultivables durante los primeros 28 días de incubación, en comparación al microcosmo IPK-Control. Sin embargo, a partir de ese día y hasta el final del ensayo, los microcosmos inoculados mostraron una disminución de las poblaciones heterótrofas, alcanzando valores de un orden de magnitud menor al inicial. El microcosmo inoculado con el consorcio natural alcanzó valores significativamente menores al microcosmos IPK-Control al día 63 de incubación.

Por otra parte, con respecto a las poblaciones de bacterias degradadoras de PAH se observó que la inoculación produjo, al comienzo del ensayo, un aumento en el número de bacterias degradadoras, mostrando ambos microcosmos inoculados valores significativamente mayores ($p < 0,05$) a los encontrados en el microcosmo control durante los

primeros 7 días de incubación. El microcosmo IPK-AM mostró los mayores valores de poblaciones de bacterias degradadoras de PAH. A partir del día 14 de incubación se observó una disminución significativa en los recuentos de bacterias degradadoras de PAH en los microcosmos inoculados. Desde el día 14 hasta el día 63 de incubación sólo el microcosmo IPK-AM mantuvo un recuento de poblaciones degradadoras de PAH significativamente superior a los encontrados en el microcosmo control.

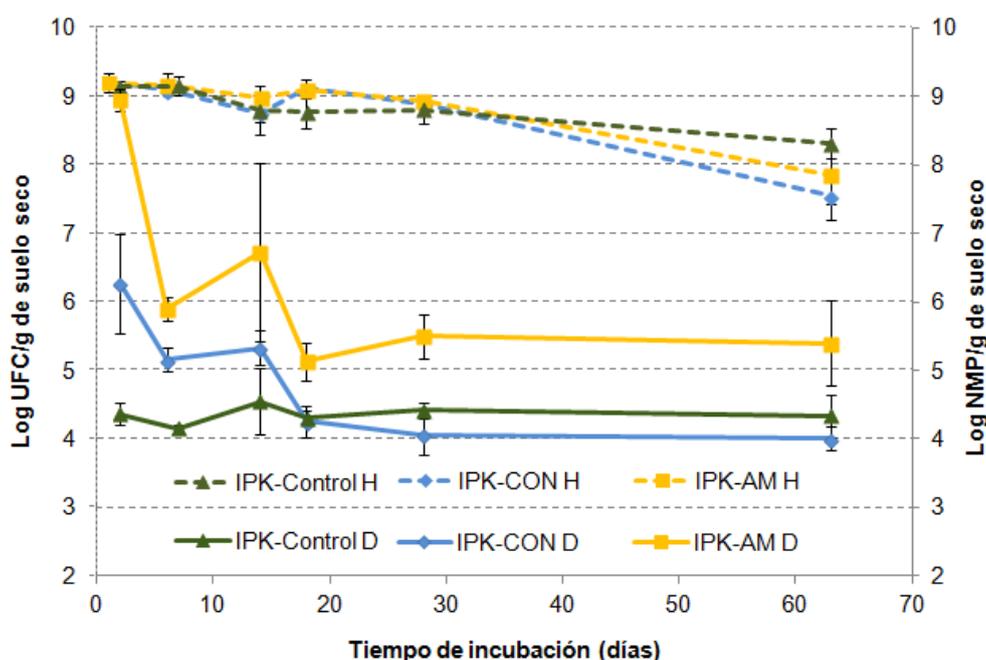


Figura VI.1. Dinámica de las poblaciones de bacterias heterotróficas cultivables (log UFC g⁻¹ por gramo de suelo seco) (H) y de bacterias degradadoras de PAH cultivables (log NMP g⁻¹ por gramo de suelo seco) (D) en los microcosmos IPK-Control, IPK-CON e IPK-AM durante 63 días de incubación. Se grafican los valores promedio y las desviaciones estándar de 3 ensayos independientes por microcosmo.

VI.1.3 Medida de actividad deshidrogenasa

Se determinó la actividad deshidrogenasa del suelo en los dos tratamientos de inoculación y en el microcosmo IPK-Control, los resultados se muestran en la figura VI.2. No se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los microcosmos inoculados y el microcosmo control durante todo el ensayo. Si bien la dispersión de la medida de actividad en el microcosmo IPK-Control es muy grande, todos los microcosmos presentaron valores de actividad deshidrogenasa que oscilaron alrededor del valor cero durante todo el período de incubación. La inhibición en la actividad deshidrogenasa del suelo utilizado en estos ensayos ya había sido previamente reportada por Pessacq y col., (2015); y la inoculación no logró revertir esta situación.

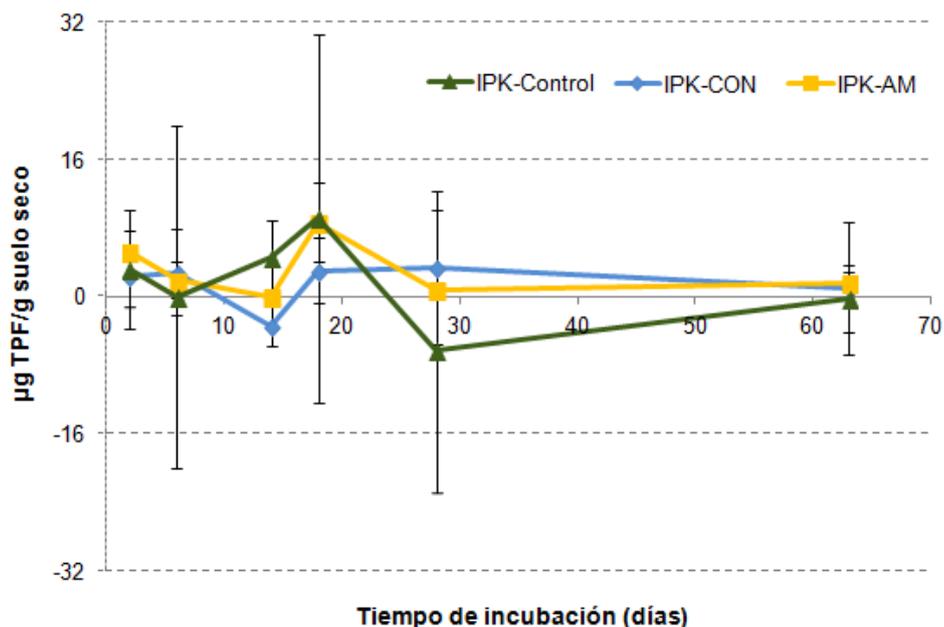


Figura VI.2. Actividad deshidrogenasa (μg de trifenil formazán (TPF) por gramo de suelo seco) en los microcosmos IPK-CON, IPK-AM e IPK-Control durante 63 días de incubación. Se grafican los valores promedio y las desviaciones estándar de 3 ensayos independientes por microcosmo.

VI.1.4 Análisis de las comunidades bacterianas de los microcosmos mediante pirosecuenciación del gen 16S rRNA

Para determinar la estructura de las comunidades bacterianas de los microcosmos IPK-Control, IPK-CON e IPK-AM y estudiar el impacto de ambos inoculantes, se llevó a cabo un análisis mediante pirosecuenciación del gen 16S rRNA, a partir del DNA total del suelo, a 2 tiempos distintos durante el período de incubación, al día 14 y 63. Además, para comprender y comparar la situación inicial de los microcosmos se analizó una muestra del del suelo inicial (SI).

Del análisis se obtuvieron un promedio de 2908 (rango de 906-6029) secuencias filtradas; que se agruparon en un total de 985 OTUs utilizando el 97% de similitud.

Para estudiar la cobertura del análisis se realizaron curvas de rarefacción (Figura VI.3) y por otra parte se calculó el índice de Good (Tabla VI.2) para cada microcosmos a los tiempos de incubación en estudio. Combinando ambos análisis se mostró que, a excepción del suelo inicial y el microcosmo IPK-Control a los 63 días de incubación, las curvas de rarefacción no lograron alcanzar la fase *plateau*, sin embargo se puede considerar que la cobertura en las muestras fue suficiente ya que los valores del índice de Good fueron cercanos a 1.0, todos

superaron el valor 0,85. Por lo tanto, el número de secuencias recuperadas de cada muestra fue suficiente para cubrir la mayor parte de la diversidad.

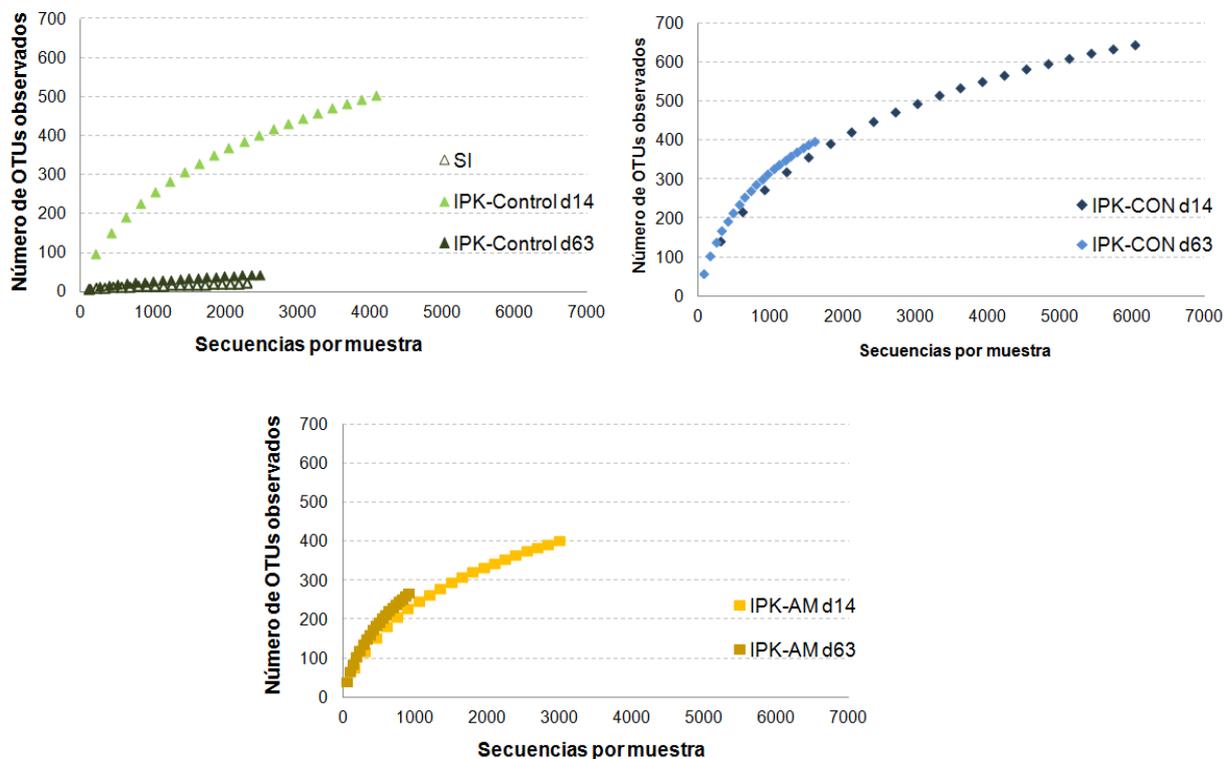


Figura VI.3. Curvas de rarefacción construidas utilizando el software EstimateS para los datos de pirosecuenciación. Las curvas de rarefacción indican el número de OTUs observados (eje y) para SI y para los microcosmos IPK-Control, IPK-CON e IPK-AM a los 14 y 63 días de incubación en función del número de secuencias (eje x).

Microcosmo	índice de Good
SI	0.99
IPK-Control d14	0.95
IPK-Control d63	0.99
IPK-CON d14	0.96
IPK-CON d63	0.89
IPK-AM d14	0.94
IPK-AM d63	0.85

Tabla VI.2 Valores del índice de Good para SI y los microcosmos IPK-Control, IPK-CON e IPK-AM obtenidos a partir de los datos de pirosecuenciación.

Por otra parte, se utilizó la familia de índices de Hill (1973) para evaluar la diversidad en los microcosmos y para ello se realizó una normalización y se estimó la diversidad a las 906 secuencias, que corresponde a la profundidad del análisis de la muestra con menor número de secuencias obtenidas (Tabla VI.3).

El suelo inicial mostró una muy reducida riqueza y diversidad de especies. La incubación bajo condiciones de aireación y humedad controlada (IPK-Control) durante 14 días produjo un aumento tanto de la riqueza de especie (0D) como la diversidad (1D y 2D). Luego de 63 días de incubación los números de Hill 0D , 1D y 2D , mostraron valores semejantes a los encontrados en el suelo inicial.

La inoculación, tanto de CON como de la cepa *Sphingobium* sp. AM, generó también luego del día 14 de incubación, un aumento en la riqueza y diversidad de especies con respecto al suelo inicial. Contrariamente a lo observado en el microcosmo IPK-Control, al día 63 de incubación los valores de 0D , 1D y 2D de los microcosmos inoculados fueron aún mayores que los encontrados luego de 14 días de incubación. El microcosmo IPK-CON fue el que mostró mayor valor de 0D , 1D y 2D , sugiriendo la presencia de una comunidad con mayor equitatividad. Al igual que lo observado en suelo recientemente contaminado (Capítulo V), la inoculación causó un impacto positivo sobre la diversidad de la comunidad bacteriana del suelo.

Microcosmo	Número de secuencias	Número de OTUs ^b	Números de Hill ^b		
			0D	1D	2D
SI	2293	24	26.21	3.31	2.31
IPK-Control d14	4084	508	486	100.15	43.94
IPK-Control d63	2463	48	59.73	4.44	2.83
IPK-CON d14	6029	647	500.25	117.28	48.38
IPK-CON d63	1596	401	528	186.87	112.48
IPK-AM d14	2988	404	403.33	82.38	31.43
IPK-AM d63	906	267	440.75	135.51	68.21

Tabla VI.3. Parámetros de diversidad obtenidos a partir del análisis de los datos de pirosecuenciación del suelo inicial y de las 3 comunidades estudiadas luego de 14 y 63 días de incubación.

Se llevó a cabo la construcción de un diagrama de Venn con el objetivo de estudiar cuantas OTUs comparten las comunidades bacterianas presentes en los distintos microcosmos (Figura VI.4 y Tabla VI.4). Para este análisis se sumaron las secuencias correspondientes a los tiempos analizados en cada uno de los microcosmos.

De un total de 985 OTUs, el suelo inicial y los microcosmos compartieron solamente 11 OTUs, representando el 1,12%; mientras que los microcosmos entre sí mostraron compartir 282 OTUs (28,63%). Estos resultados muestran el gran impacto que tuvieron las condiciones de incubación sobre la estructura de la comunidad bacteriana. Los microcosmos inoculados presentaron en común 395 OTUs (40,10%).

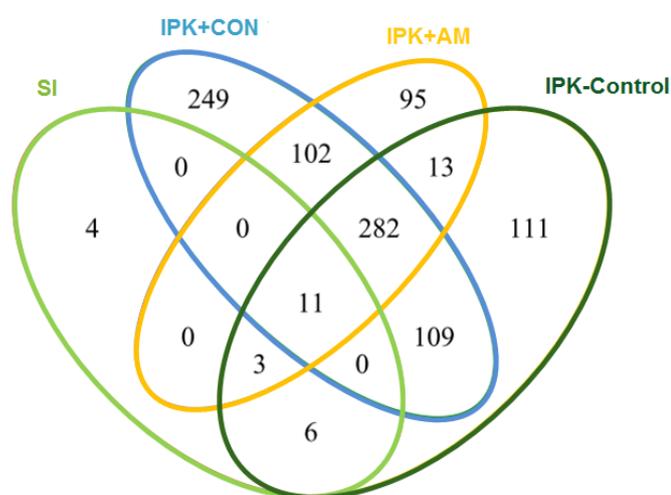


Figura VI.4. Diagramas de Venn mostrando los OTUs compartidos y únicos en el suelo inicial, IPK-Control, IPK-CON e IPK-AM. Se sumaron todos los tiempos de incubación ensayados para cada microcosmo (3% nivel de distancia), excepto el suelo inicial (SI).

	SI	IPK-Control	IPK-CON	IPK-AM
SI		2.03%	1.12%	1.42%
IPK-Control			40.81%	31.37%
IPK-CON				40.10%
IPK-AM				

Tabla VI.4. Tabla de doble entrada mostrando los porcentajes compartidos por el suelo inicial y los microcosmos de a pares.

VI.1.4.1 Análisis de correspondencia a nivel de OTU

Con el objetivo de visualizar la distribución en el plano de los microcosmos en relación a la presencia y frecuencia de los OTUs y conocer el impacto de la incubación y la inoculación sobre la composición de la comunidad microbiana, se realizó un análisis de correspondencia, que se muestra en la figura VI.5. Se observó que en base a la distribución

de OTUs los microcosmos se separaron en el plano formando tres grupos. El grupo que presenta mayor distancia espacial al resto de los grupos está formado por el SI y el microcosmos IPK-Control al día 63 de incubación. En el segundo grupo se encuentran los microcosmos IPK-Control, IPK-CON e IPK-AM al día 14 de incubación y por último, el tercer grupo, que se sitúa próximo en el plano al segundo, está formado por los microcosmos inoculados al día 63 de incubación.

Este análisis mostró que la incubación y en segundo lugar la inoculación tienen un marcado impacto sobre la estructura de la comunidad bacteriana de un suelo crónicamente contaminado con hidrocarburos.

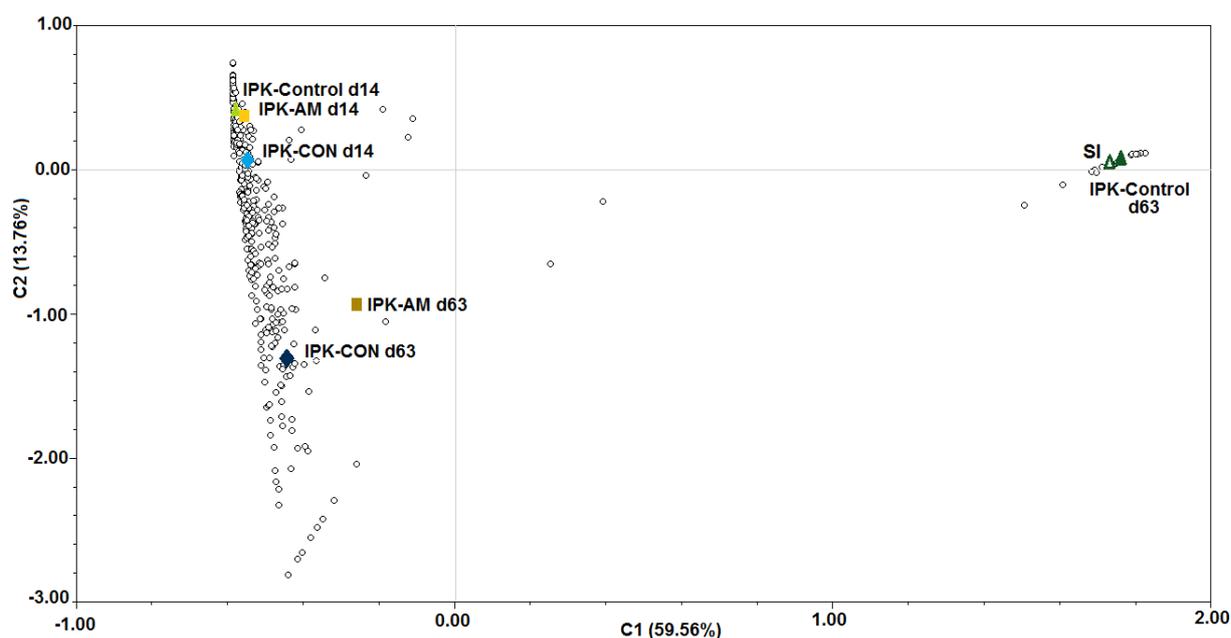


Figura VI.5. Análisis de correspondencia realizado a partir de una tabla de frecuencia de OTUs del suelo inicial y los microcosmos IPK-Control, IPK-CON e IPK-AM a los tiempos de incubación estudiados

VI.1.4.2 Impacto de la inoculación sobre la abundancia relativa de las poblaciones bacterianas de los microcosmos.

VI.1.4.2.i Análisis de las comunidades bacterianas de los microcosmos a nivel de filo y clase

Todas las secuencias representativas de cada OTU se clasificaron dentro del dominio *Bacteria* en 8 filos distintos. En la figura VI.6 se muestran las abundancias relativas de los principales filos bacterianos y se expresan los porcentajes de los dos filos mayoritarios en todos los microcosmos. Mientras que en el suelo inicial los filos predominantes fueron *Proteobacteria* (88,49% de las lecturas) y *Firmicutes* (11,08%); en los microcosmos IPK-

Control, IPK-CON e IPK-AM los principales filos microbianos encontrados y sus abundancias relativas fueron *Proteobacteria* (35,55%-88,32%), *Acidobacteria* (2,45%-7,65%), *Actinobacteria* (1,06%-29,00%), *Verrucomicrobia* (0,12%-11,35%), *Chloroflexi* (0,33%-16,87%), *Firmicutes* (0,60%-11,08%), *Gemmatimonadetes* (0,37%-2,65%) y *Bacteroidetes* (0,65%-11,93%) (Tabla VI.S6 en material suplementario).

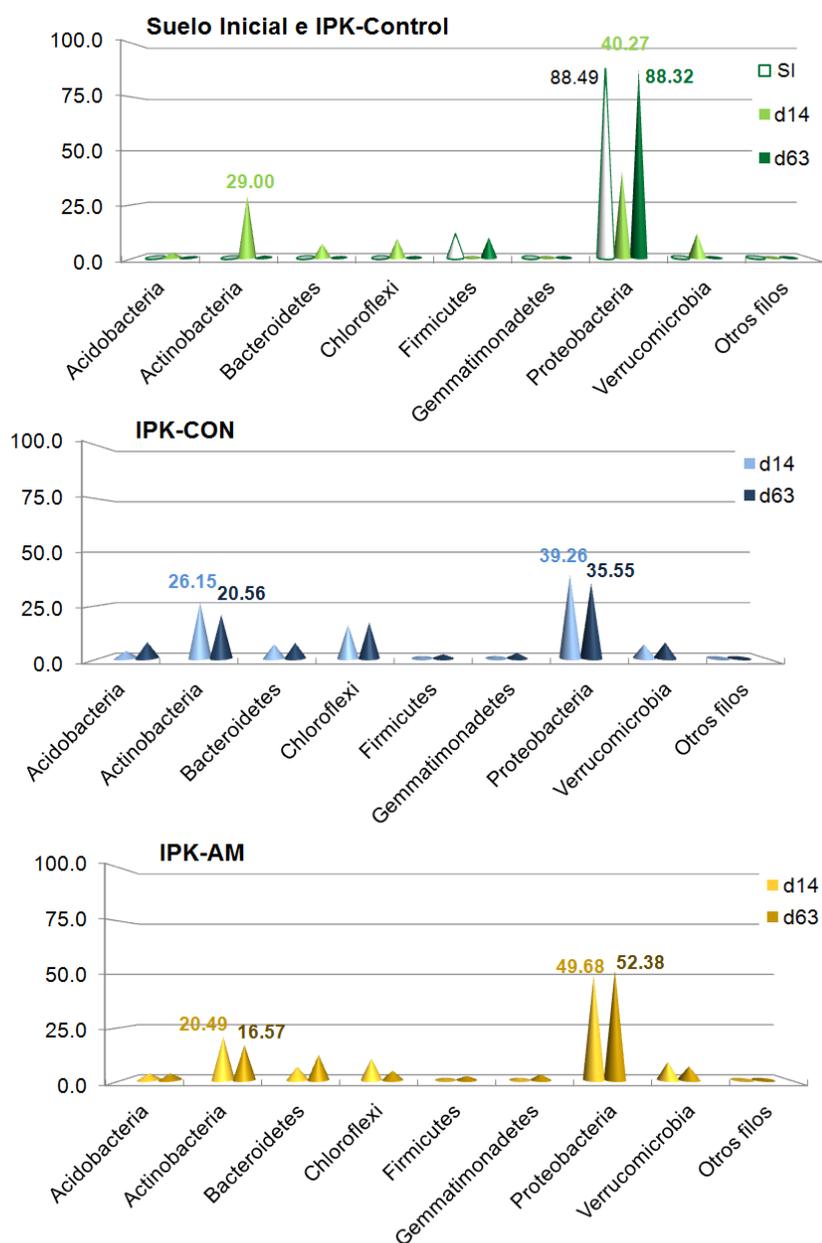


Figura VI.6. Abundancias relativas de los principales filos bacterianos en todos los microcosmos. Solo se muestran los porcentajes de los filos mayoritarios, que superen el 2%.

El filo *Proteobacteria* predominó en el suelo inicial y en el microcosmo IPK-Control a los distintos tiempos de incubación analizados. No obstante al día 14 de incubación se observó una importante disminución del número de secuencias pertenecientes a este filo (de 88,49% a 40,27%), principalmente a expensas de un aumento significativo del filo *Actinobacteria*

(29,00%). Ambos filos recuperaron valores cercanos a los iniciales al final del período de incubación. Además de los cambios en la abundancia relativa del filo *Proteobacteria*, se observaron cambios sucesionales entre las clases que componen este filo. Mientras que en el suelo inicial y al final del período de incubación se observó un claro predominio de la clase *Gammaproteobacteria*, al día 14 la clase predominante en el microcosmo IPK-Control fue *Alphaproteobacteria* (60,80%) (Figura VI.7 y Tabla VI.S2 en material suplementario)

En los microcosmos inoculados, si bien el filo *Proteobacteria* fue el predominante en ambos microcosmos, no alcanzó valores cercanos a los encontrados en el microcosmo IPK-Control. En estos microcosmos los filos *Proteobacteria* y *Actinobacteria* mantuvieron valores similares al día 14 y 63 de incubación. En particular, en IPK-CON se pudo observar también un incremento en la abundancia relativa de secuencias asociadas al filo *Chloroflexi* que se mantuvo hasta el día 63 de incubación.

Por otro lado en ambos microcosmos inoculados se observó un claro predominio dentro del filo *Proteobacteria*, de secuencias pertenecientes a la clase *Alphaproteobacteria* (Figura VI.7 y Tabla VI.S2 en material suplementario).

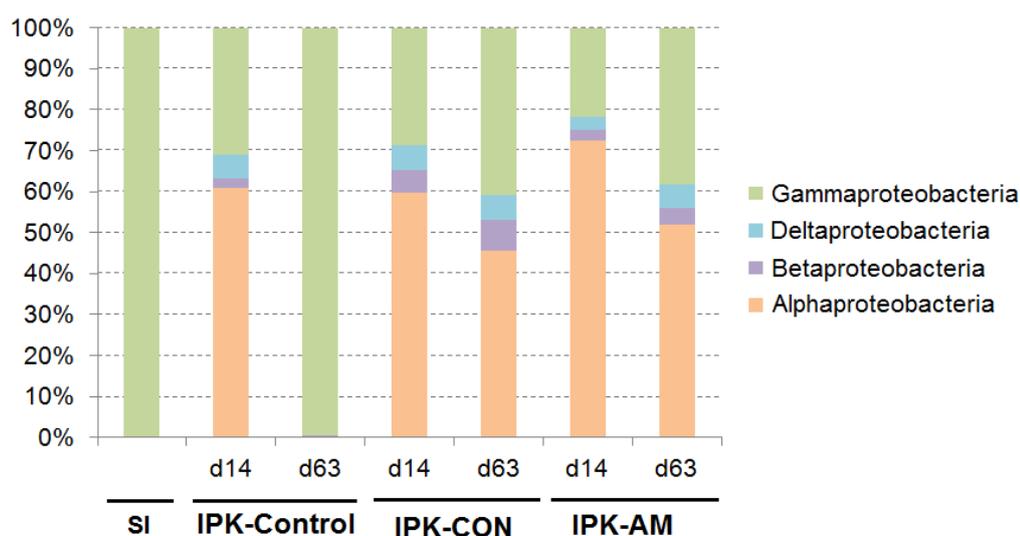


Figura VI.7. Abundancias relativas de las clases de *Proteobacteria* encontradas en el suelo inicial y en los microcosmos IPK-Control, IPK-CON e IPK-AM a los distintos tiempos de incubación estudiados.

VI.1.4.2.ii Análisis de las comunidades bacterianas a nivel de orden

Se evaluaron los cambios de las comunidades microbianas a nivel de orden a los 14 y 63 días de incubación con el fin de identificar las poblaciones afectadas o estimuladas por la inoculación. Para ello se analizaron las diferencias en la abundancia relativa en los microcosmos estudiados en comparación con los valores encontrados en el suelo inicial. En la figura VI.8 se muestran solo los órdenes que presentaron un delta mayor o igual al 4%.

El comportamiento de los órdenes bacterianos fue similar en todos los microcosmos, exceptuando IPK-Control al día 63 de incubación. En dicho microcosmo a ese tiempo de incubación no se observaron diferencias significativas con respecto al suelo inicial, lo que sugiere una sucesión temporal, con el posterior restablecimiento de la comunidad original.

En el microcosmo IPK-Control al día 14 de incubación, al igual que en los microcosmos inoculados a ambos días de incubación estudiados, los órdenes *Pseudomonadales* y *Bacillales* sufrieron un importante impacto negativo, siendo el primero el que sufrió la mayor disminución en su abundancia relativa.

Las condiciones de incubación (IPK-Control) produjeron un incremento significativo en el orden *Actinomycetales* (20,38%), seguido en orden de importancia por los órdenes *Caulobacterales* (10,35%), *Xanthomonadales* (9,12%), *Verrucomicrobiales* (8,92%), *Sphingomonadales* (6,97%), *Cytophagales* (6,95%) y *Rhizobiales* (5,78%).

Con respecto al suelo inicial, la inoculación con CON generó un impacto positivo en los órdenes *Rhodospirillales* (5,81% al día 14 de incubación), *Chloroflexales* (8,97% al día 14), *Caldineales* (5,16% al día 63 de incubación) y *Acidobacteriales* (7,03% al día 63 de incubación) (Tabla VI.S3 en material suplementario). El aumento del primer orden es esperable dado que se encontraba presente en el inóculo (Capítulo IV, Figura IV.7). Es importante remarcar que en el microcosmo IPK-CON no se pudo evidenciar un incremento significativo en el orden *Sphingomonadales*, orden de mayor abundancia relativa en CON (Capítulo IV, Figura IV.7):

La inoculación con la cepa *Sphingobium* sp. AM generó un significativo incremento (con respecto a IPK-Control e IPK-CON) del orden *Sphingomonadales*, que obtuvo su valor máximo de abundancia relativa al día 14 de incubación, 17,25% (Tabla VI.S3 en material suplementario); manteniendo un valor superior al resto de los microcosmos luego de 63 días de incubación, 9,76%. (mientras que fue del 0,12% en IPK-Control y del 4,96% en IPK-CON) (Tabla VI.S3 en material suplementario). Como fue observado y discutido previamente (Capítulo V) la inoculación con la cepa *Sphingobium* sp. AM produjo una disminución relativa del orden *Actinomycetales* (Tabla VI.S3 en material suplementario). Por otro lado, al día 63 de incubación generó un mayor aumento relativo en los órdenes *Rhodospirillales* (6,70%) y *Cytophagales* (11,58%).

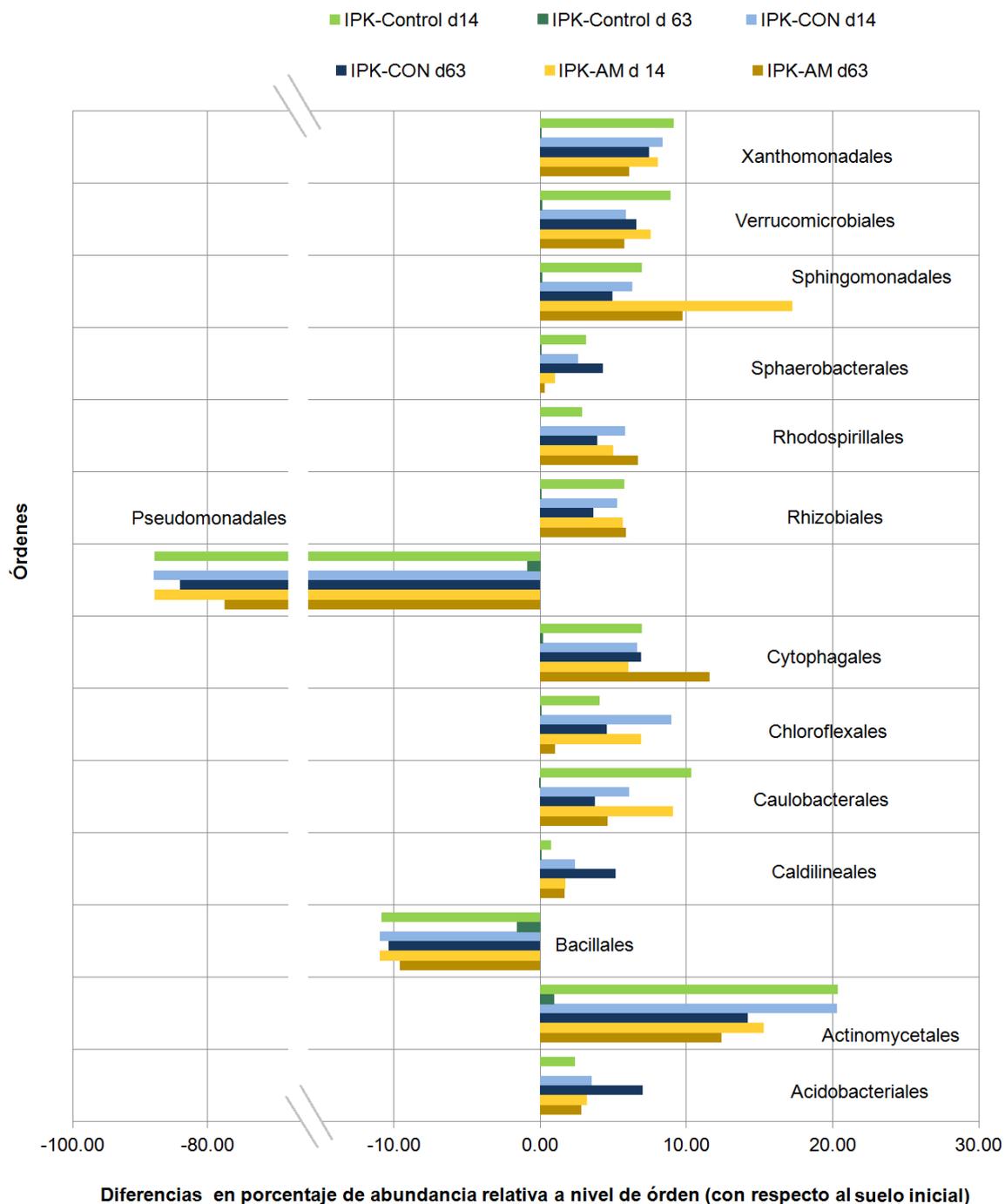


Figura VI.8 Diferencias de abundancias relativas a nivel de orden en los microcosmos IPK-Control, IPK-CON e IPK-AM con respecto al suelo inicial. Se muestran solamente diferencias que superen un delta del 4%.

VI.1.4.2.iii Análisis de las comunidades bacterianas de los microcosmos a nivel de género

Se estudiaron los cambios en las comunidades bacterianas a nivel de género mediante la construcción de un doble dendrograma jerárquico con un mapa de intensidades de color, que muestra aquellos géneros que presentaron una abundancia relativa mayor al 2%, en por lo menos uno de los microcosmos analizados (Figura VI.9 y Tabla VI.S4 en material suplementario).

El gráfico muestra en el dendrograma superior la formación de dos grupos (GI y GII). El primer grupo (GI), que se separa de los otros dos, está conformado por el suelo inicial y el microcosmo IPK-Control al 63 de incubación, caracterizado por la alta abundancia relativa del género *Acinetobacter* (88,31% y 87,71% respectivamente) (Tabla VI.S4 en material suplementario), perteneciente al orden *Pseudomonadales* y en menor grado por el género *Bacillus* (abundancia relativa 8,55% y 7,45% respectivamente) perteneciente al orden *Firmicutes*.

El segundo grupo (GII) está formado por dos *clusters* (CI y CII). En CI se agrupan los microcosmos inoculados al día 63 de incubación, que muestran gran similitud en la abundancias relativas de la mayoría de los géneros determinados, a excepción de la mayor representación de los géneros *Acidobacterium* y *Caldilinea* (pertenecientes a los órdenes *Acidobacteriales* y *Caldilineales* respectivamente) para IPK-CON y *Ohtaekwangia* (perteneciente al orden *Cytophagales*) para IPK-AM.

Por último en CII se agrupan los microcosmos IPK-Control, IPK-CON e IPK-AM al día 14 de incubación. Dentro de este *cluster* se separa el microcosmo IPK-AM, caracterizado por la mayor abundancia del género *Sphingobium*, mientras que en el microcosmo IPK-CON se observó una prevalencia del género *Chloroflexus*, perteneciente al orden *Chloroflexales*.

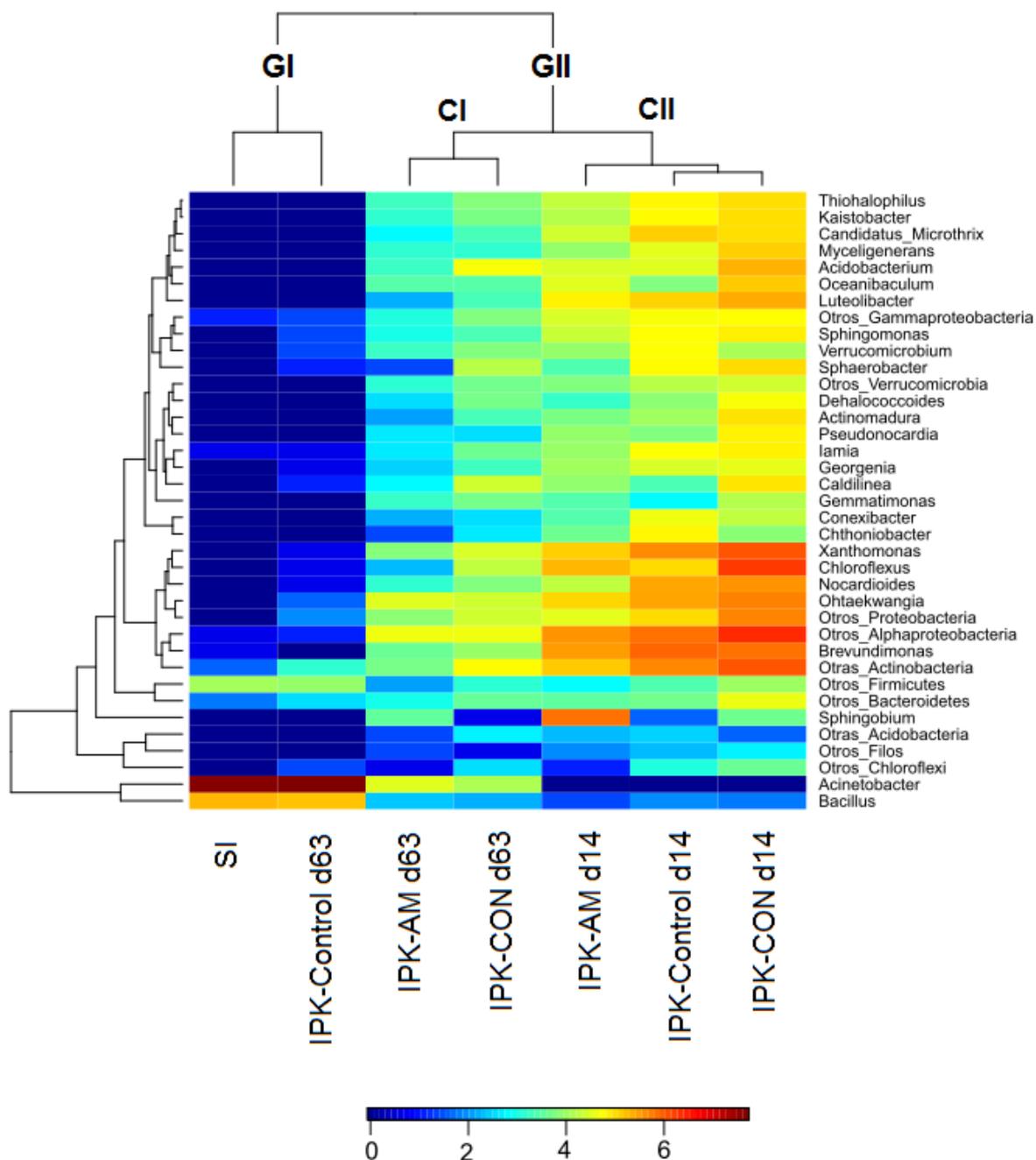


Figura VI.9. Distribución de los géneros bacterianos con una abundancia relativa mayor a 2% en doble dendrograma jerárquico. El *cluster* filogenético y la relación entre los microcosmos fue determinada por la distancia Bray-Curtis. La gráfica de mapa de intensidades de color muestra la frecuencia de cada género bacteriano (variables agrupadas en el eje y) en cada muestra (eje x). Los valores en el mapa de intensidades de color representan el Log-transformado de la frecuencia (Log X+1) de cada género y la intensidad de los colores se corresponde con la leyenda indicada debajo de la figura.

VI.2 Discusión

La diversidad de especies de un suelo se mantiene si el sitio es capaz de sostener valores similares de individuos para cada especie presente en la comunidad, de no ser así, el individuo que esté mejor adaptado al nicho más productivo se convierte en dominante en la comunidad y la diversidad disminuye (Dejonghe y col., 2001). La diversidad de una comunidad bacteriana se podría considerar como un indicador de contaminación, dado que tiende a ser muy baja en comunidades sometidas a un estrés como son los suelos o sedimentos contaminados con derivados del petróleo (Menezes Bento y col., 2005).

El suelo utilizado en este trabajo de tesis, un suelo proveniente de un proceso de *landfarming* de un residuo petroquímico, mostró una comunidad con baja riqueza de especies (0D), con poca diversidad y con especies marcadamente dominantes (1D , 2D) (Tabla VI.3). Sin embargo bajo las condiciones de incubación utilizadas, se observaron altos valores de degradación de hidrocarburos totales, tanto alifáticos como PAH y en particular fenantreno (Tabla VI.1), por parte del microbioma nativo, que no pudieron ser incrementados por la inoculación ni con la cepa *Sphingobium* sp. AM ni con CON (IPK-CON, IPK-AM) (Tabla VI.1). Kuppusamy y Thavamani, (2016) encontraron también en microcosmos de suelo contaminado con PAH y metales que la estrategia de bioaumentación, utilizando un consorcio como inoculante, mostró valores de degradación de PAH similares a los encontrados por la atenuación natural en el mismo ensayo. Los mismos autores sugirieron que el microbioma autóctono de su ensayo había sido capaz de utilizar los contaminantes orgánicos como fuente de carbono y energía, ya que en suelos con una larga historia de contaminación las comunidades microbianas estarían adaptadas a la presencia de hidrocarburos (van Herwijnen y col., 2006). Si bien se ha observado una relación directa entre diversidad microbiana y la productividad (Bell y col., 2013), que ha sido también observada en el contexto de los procesos de biorremediación (diversidad y velocidad de descomposición) (Fournier y Fournier, 1993); esta relación sería función-específica y dependería de la presencia de taxones específicos más que de la diversidad *per se* (Salles y col., 2009; Peter y col., 2011). Tal como ha sido reportado por varios autores para otros suelos (Bento y col., 2005; van Herwijnen y col., 2006; Tam and Wong, 2008; Fodelianakis y col., 2015; Kuppusamy y Thavamani, 2016), el suelo utilizado en este trabajo de tesis presentó una comunidad bacteriana nativa con baja diversidad pero eficiente en degradar hidrocarburos.

El suelo inicial presentó dos géneros altamente predominantes, *Acinetobacter* (perteneciente al orden *Pseudomonadales*) y *Bacillus* (perteneciente a la orden *Bacilliales*) (Figura VI.9 y Tabla VI.S4 en material suplementario), representando estos dos géneros más del 95% de la abundancia relativa de los microorganismos del suelo; lo que muestra la gran capacidad

de adaptación de estas poblaciones microbianas a los hidrocarburos. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Al-Bahry y col., (2016), *Bacillus* y *Acinetobacter* (juntos a *Pseudomonas* y *Serratia*) son dos de los grupos bacterianos mayormente activos en suelos contaminados con hidrocarburos, principalmente asociados a la degradación de alcanos.

Si bien el género *Acinetobacter* se encontró en una gran variedad de ambientes, es frecuentemente encontrado en áreas contaminadas (Gerischer, 2008), es estratega r y coloniza y crece rápidamente en base a hidrocarburos (Andreoni y Gianfreda, 2007). Este género ha sido previamente reportado por su capacidad de degradar compuestos aromáticos y alifáticos (como los alcanos) (Liu y col., 2009; Gopalakrishnan y Divya, 2014; Jung and Park, 2015; Brzeszcz y col., 2016) y por su actividad emulsificadora (Menezes Bento y col., 2005; Zou y col., 2014; Uzoigwe y col., 2015).

De igual manera que el género *Acinetobacter*, el género *Bacillus* se reportó como productor de biosurfactantes (Das y Mukherjee, 2007; Cerqueira y col., 2011; Uzoigwe y col., 2015). Williams y col., (2010) encontraron en microcosmos de suelo con tolueno una dominancia (80% de las OTUs aproximadamente) de microorganismos relacionados al género *Bacillus*.

Estos resultados sugieren que la limitación en la degradación estaría dada entonces por la biodisponibilidad de los contaminantes. Los tratamientos del suelo como el mezclado, la homogenización y el tamizado generarían un aumento en la biodisponibilidad de los compuestos orgánicos debido a que romperían el equilibrio con el carbono orgánico en los poros del sistema (DeWitt, 2001), y además, permitirían que las bacterias que están adheridas a un compartimento en el suelo entren en contacto con los sustratos de otros compartimientos (Schwartz y Scow, 2001), originando entonces un proceso de sucesión bacteriana (Figuras VI.8 y VI.9).

Durante los primeros 14 días de tratamiento se observó una marcada disminución de la concentración de hidrocarburos, tanto alifáticos como aromáticos, acompañada de un incremento de la riqueza, diversidad (Tabla VI.3); así como importantes cambios en la composición de la comunidad bacteriana (Figuras VI.5, VI.6, VI.7 y VI.9). A nivel de filo, el tamizado y la incubación produjeron en el microcosmo IPK-Control cambios en las abundancias relativas del filo *Proteobacteria* y *Actinobacteria*. Militon y col., (2010) reportaron un resultado semejante durante un proceso de bioestimulación (aireación) de suelos con una larga historia de contaminación con petróleo.

Mientras que la contaminación con fenantreno produjo un incremento tanto de *Proteobacteria* como de *Actinobacteria* (Capítulo V, Figura V.14), la bioestimulación de un suelo crónicamente contaminado, a través de la homogenización e incubación bajo condiciones adecuadas, produjo una sucesión de *Proteobacteria* a *Actinobacteria* (Figura VI.6), principalmente a expensas de un marcado incremento en el orden *Actinomycetales* (Figura VI.8 y Tabla VI.S3 en material suplementario). La disminución de la abundancia

relativa de *Proteobacteria* se produjo a expensas de una importante disminución de la clase *Gammaproteobacteria* y un incremento relativo de la clase *Alphaproteobacteria* (Figura VI.7 y Tabla VI.S2 en material suplementario).

Ha sido previamente establecida la habilidad de los microorganismos perteneciente a las clases *Alpha* y *Gammaproteobacteria* de utilizar tanto hidrocarburos alifáticos como aromáticos (Sutton y col., 2013), sin embargo estos filotipos han sido asociados con diferentes fases durante los proceso de biorremediación (Viñas y col., 2005a). Mientras que la clase *Alphaproteobacteria* sería dominante en las primeras etapas, la clase *Gammaproteobacteria* empezaría a ser dominante en las fases tardías (Viñas y col., 2005a). Como se discutió en el Capítulo V, se ha sugerido que los microorganismos pertenecientes al filo *Actinobacteria* no participarían directamente en la degradación de hidrocarburos (Bastida y col., 2015). Diversos estudios demostraron que el filo *Actinobacteria* representa un grupo de bacterias copiotróficas que responden rápida y positivamente a la incorporación de nutrientes (Ramirez y col., 2012; Bell y col., 2013), y su incremento se ha relacionado con la concentración de compuestos orgánicos fácilmente asimilables. Por lo que el proceso sucesional observado en el microcosmo IPK control, caracterizado por el importante aumento en la abundancia relativa de la clase *Alphaproteobacteria* y del orden *Actinomycetales*, estaría relacionado con la liberación, a través del proceso de tamizado, tanto de hidrocarburos como de otros compuestos orgánicos entrampados o absorbidos a la matriz del suelo; y como consecuencia reactivaría un nuevo proceso de biorremediación.

Luego del día 14 de incubación no se observaron, en el microcosmo IPK-Control, cambios significativos en la concentración de hidrocarburos y los resultados de pirosecuenciación del gen 16S rRNA mostraron que la comunidad microbiana rápidamente volvió a sus condiciones iniciales (Figura VI.5, VI.8 y VI.9). Demostrado que el efecto estimulador causado por el tamizado y la incubación fue de corta duración.

El crecimiento y la persistencia de un inóculo en suelo depende de su habilidad de utilizar los recursos presentes y desplazar a los componentes de la comunidad indígena del suelo (Cunliffe y Kertesz, 2006). Es importante que los microorganismos utilizados en las estrategias de bioaumentación puedan competir con la comunidad nativa y participar del flujo central de carbono y energía para mejorar la eliminación de los contaminantes (van Herwijnen y col., 2006).

En este trabajo de tesis las estrategias de inoculación no lograron generar una degradación significativamente diferente a la encontrada por la atenuación natural en IPK-Control (Tabla VI.1) y los microcosmos inoculados mostraron valores de bacterias heterótrofas cultivables (Figura VI.1) y de actividad deshidrogenasa (Figura VI.2) similares al microcosmo control durante todo el ensayo. Sin embargo, generaron un aumento en los valores de bacterias degradadoras de PAH al comienzo del ensayo que superaron a los encontrados en IPK-

Control (Figura VI.1). En particular, la inoculación con la cepa *Sphingobium* sp. AM mantuvo valores superiores de bacterias degradadoras de PAH diferenciándose del microcosmos control hasta el día 63 de incubación.

A nivel de estructura de la comunidad bacteriana, los microcosmos inoculados compartieron un gran número de OTUs (Figura VI.4) y además se encontraron espacialmente cercanos en el plano (junto a IPK-Control al día 14 de incubación) (Figura VI.5 y VI.9), distanciándose del suelo inicial y del microcosmos control al día 63 de incubación. Los valores de los números de Hill indicaron (Tabla VI.3) que al finalizar el tratamiento (día 63) los microcosmos IPK-CON e IPK-AM mostraban una comunidad con mayor riqueza de especies (0D), más diversa y con menos especies dominantes (1D y 2D), con respecto al microcosmo control y a los mismos microcosmos inoculados al día 14 de incubación. Si bien está diferencia en la diversidad entre los distintos tiempos de incubación de los microcosmos IPK-CON e IPK-AM y el microcosmo IPK-control a los 14 días de incubación, no se evidenció claramente en la abundancia relativa a nivel de filo (Figura VI.6) y a nivel de orden (Figura VI.8), sí se observaron claras diferencias a nivel de género (Figura VI.9) y OTUs (Figura VI.5). Estos cambios en la diversidad y composición de la comunidad microbiana podrían ser considerados como un indicio del establecimiento del inoculante (Mallon y col., 2015).

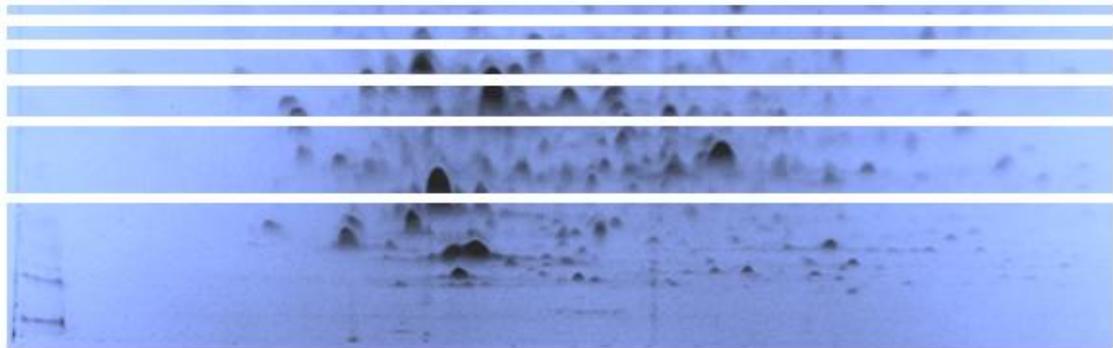
La inoculación con la cepa *Sphingobium* sp. AM causó un aumento significativo en la abundancia relativa del orden *Sphingomonadales* (Figura VI.8 y Tabla VI.S3 en material suplementario), en particular del género *Sphingobium* (Figura VI.9 y Tabla VI.4 en material suplementario), manteniéndose por encima de los valores encontrados en los microcosmos IPK-Control e IPK-CON durante todo el tratamiento. Este hecho, junto a los mayores recuentos de bacterias degradadoras de PAH encontrados en el microcosmo IPK-AM, podría sugerir que la cepa *Sphingobium* sp. AM fue capaz de sobrevivir y establecerse en suelo. Sin embargo el establecimiento de la cepa no logró incrementar la degradación de los PAH ni de los alcanos presentes en el suelo, por lo que se podría hipotetizar que el inóculo podría participar del flujo del carbono aunque no necesariamente de la utilización directa de los hidrocarburos presentes en el suelo, pero sí probablemente de los metabolitos intermediarios o de otro sustrato disponible.

En los microcosmos inoculados con CON solo se observó una diferencia significativa en la abundancia relativa de uno de los miembros de CON (Capítulo IV.4; Figura IV.7) con respecto a IPK-Control, el orden *Rhodospirillales* (Figura VI.9 y Tabla VI.S4 en material suplementario). La competencia por los sustratos y el espacio biológico entre el inoculante y la población indígena del suelo podría ser una de las causas de la disminución del número de bacterias inoculadas. Contrariamente a lo expuesto por Mao y col., (2012) si bien en este trabajo de tesis se encontró una disminución de las poblaciones inoculadas, los cambios generados en la estructura de la comunidad permanecieron en el tiempo, una vez que la

presencia de los inoculantes disminuyó. Sin embargo, estos cambios no sólo no alcanzaron a estimular la eliminación de PAH, si no que disminuyeron significativamente la degradación de alcanos (Tabla VI.1). Nuevamente encontramos evidencias que los cambios en la estructura de la comunidad no fueron a expensas de la utilización de hidrocarburos como fuente de carbono.

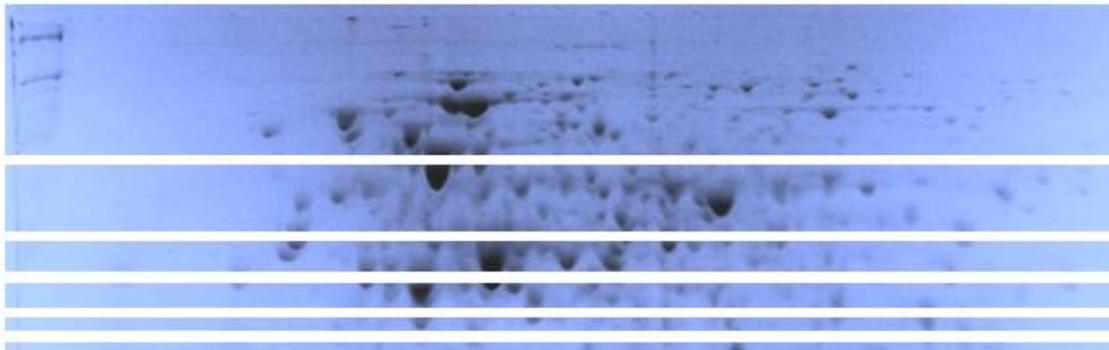
Contrariamente a lo que se asume generalmente, que un aumento en la diversidad bacteriana de un suelo corresponde a un aumento en el potencial catabólico lo que permite una mejor remoción de los contaminantes, en este trabajo de tesis ambas estrategias de inoculación lograron aumentar la diversidad de la comunidad bacteriana de un suelo crónicamente contaminado con hidrocarburos, sin incrementar la degradación de los contaminantes (Figura VI.1). Sin embargo no se puede descartar un mayor avance de la degradación (alcanzar la mineralización del contaminante) o que los sistemas inoculados muestren una mayor degradación a tiempos más largos que los analizados en este trabajo.

El objetivo principal de cualquier procesos de biorremediación debe ser no sólo eliminar el contaminante sino más importante aún, restaurar la salud del suelo y sus capacidades funcionales (Epelde y col., 2009). La presencia de un microbioma con mayor diversidad podría favorecer la estabilidad funcional del suelo (Girvan y col., 2005; Tardy y col., 2014). La biodiversidad de las comunidades microbianas amortigua los cambios funcionales inducidos por las variaciones ambientales, brindando un “seguro ecológico” para los ecosistemas (Tardy y col., 2014). Por estos motivos, se podrían utilizar estrategias de bioaumentación con el único objetivo de incrementar la diversidad de suelos impactados.



Capítulo VII

Conclusiones generales



VII Conclusiones generales

Se determinó que a pesar de ser considerada una comunidad simple, el consorcio natural degradador de fenantreno (CON) obtenido en este trabajo, mostró ser más diverso que lo determinado por técnicas convencionales (cultivo, biblioteca genómica, DGGE), por lo que sólo a través de los estudios con técnicas de secuenciación de alto rendimiento se logró conocer su estructura en términos de abundancia relativa.

La aplicación de enfoques ómicos (metagenoma funcional y metaproteómica) permitió profundizar en la caracterización catabólica de CON, confirmando la presencia dentro del consorcio de por lo menos otro microorganismo con capacidad de metabolizar fenantreno, que no fue posible obtener en forma aislada.

Se demostró que, además de las reconocidas relaciones sintróficas, existen relaciones de competencia y/o antagonismo entre los miembros de un consorcio natural; no encontrándose en la literatura evidencias experimentales de la existencia de relaciones negativas entre microorganismos naturalmente seleccionados en consorcio. Esta conclusión reafirma que las capacidades catabólicas de un consorcio no equivalen a la suma de las capacidades catabólicas de las cepas individuales. De la misma manera, la capacidad degradadora de un microorganismo o consorcio determinada en cultivo no predice su comportamiento en suelo, confirmando la importancia de la interacción del inóculo con el medio ambiente biótico y abiótico.

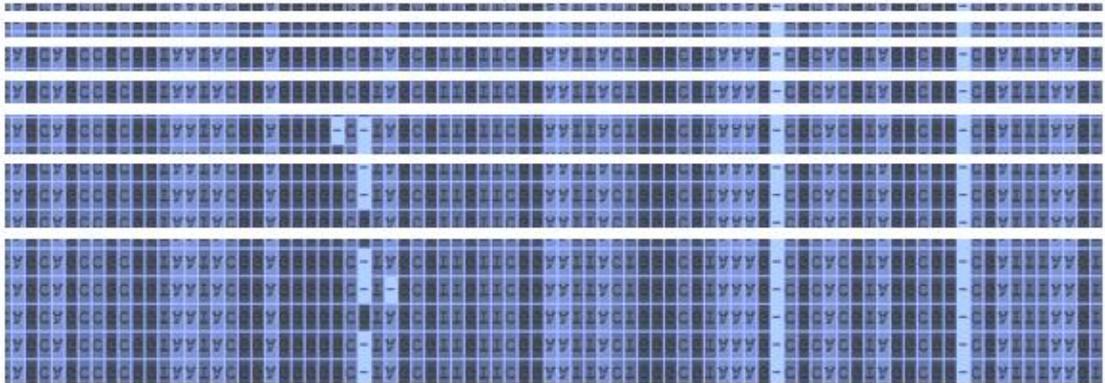
Se determinó que la inoculación sólo logró incrementar la degradación de fenantreno en suelos recientemente contaminados, principalmente reduciendo el tiempo de adaptación de la comunidad microbiana (fase lag). En suelos crónicamente contaminados la comunidad nativa ya habría sufrido la presión de selección ejercida por la contaminación y se encuentra adaptada a la presencia de hidrocarburos.

Se comprobó que el establecimiento de un inoculante en el suelo no necesariamente se correlaciona con el aumento de las capacidades catabólicas deseadas, en nuestro caso la degradación de PAH, debido a que se pudo haber establecido en función de otros recursos. Esto es sobre todo importante en el caso de suelos crónicamente contaminados, donde las actividades degradadoras de la comunidad indígena pudieron haber originado una multiplicidad de compuestos intermediarios de la degradación.

Se determinó que la inoculación tanto de CON como de la cepa *Sphingobium* sp. AM, produjo un aumento significativo en la diversidad de la comunidad bacteriana de los suelos contaminados con PAH estudiados, independientemente de la historia de la contaminación. Esto además de constituir un avance en el estudio de los principios generales que gobiernan los procesos de invasión/inoculación, tiene una importante aplicación práctica. La inoculación de cepas o consorcios bacterianos degradadores podría tener un doble efecto benéfico, acelerar los procesos de degradación y recuperar la diversidad de los suelos impactados, lo que redundaría en una mayor estabilidad y una respuesta mejor frente a nuevas condiciones de estrés.

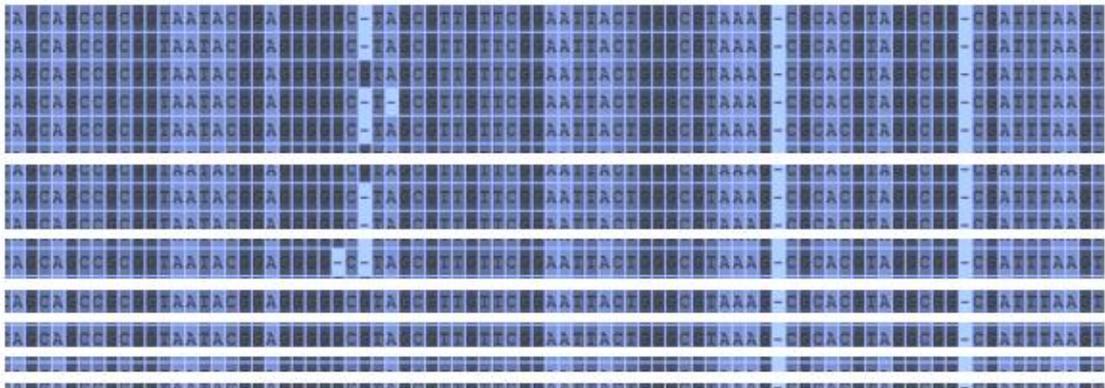
Contrariamente a lo postulado, la inoculación con el consorcio bacteriano no resultó más eficiente que la incorporación de una cepa pura, en cuanto a la velocidad y/o extensión de la degradación, a pesar de los beneficios que conllevaría la inoculación con más de una cepa bacteriana. Esto resulta muy importante desde el punto de vista tecnológico, si consideramos las dificultades en la conservación y cultivo de los consorcios naturales.

Por último y considerando que el estudio de las comunidades microbianas ha sido reconocido como un parámetro ecológico imperativo en el estudio de los procesos de biorremediación, se demostró el impacto de las nuevas técnicas moleculares en la evaluación, optimización y monitoreo de las estrategias de bioaumentación.



Capítulo VIII

Bibliografía



VIII. Bibliografía

- Abdel-Shafy, H.I., Mansour, M.S.M., 2015. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egypt. J. Pet.*
doi:10.1016/j.ejpe.2015.03.011
- Achten, C., Cheng, S., Straub, K.L., Hofmann, T., 2011. The lack of microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons from coal-rich soils. *Environ. Pollut.* 159, 623–629.
doi:10.1016/j.envpol.2010.09.035
- Adams, G.O., Fufeyin, P.T., Okoro, S.E., Ehinomen, I., 2015. Bioremediation , Biostimulation and Bioaugmentation : A Review. *Int. J. Environ. Bioremediation Biodegrad.* 3, 28–39.
doi:10.12691/ijebb-3-1-5
- Adetutu, E.M., Smith, R.J., Weber, J., Aleer, S., Mitchell, J.G., Ball, A.S., Juhasz, A.L., 2013. A polyphasic approach for assessing the suitability of bioremediation for the treatment of hydrocarbon-impacted soil. *Sci. Total Environ.* 450-451, 51–8.
doi:10.1016/j.scitotenv.2013.02.007
- Agrawal, N., Shahi, S.K., 2015. An Environmental Cleanup Strategy - Microbial Transformation of Xenobiotic Compounds 4, 429–461.
- Ahmad, M., Ahmad, I., 2014. Recent Advances in the Field of Bioremediation, Biodegradation and Bioremediation.
- Aitken, M.D., Stringfellow, W.T., Nagel, R.D., Kazunga, C., Chen, S.-H., 1998. Characteristics of phenanthrene-degrading bacteria isolated from soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Can. J. Microbiol.* 44, 743.
- Alam, S.-S., Persson, F., Wilén, B., Hermansson, M., Modin, O., 2015. Effects of storage on mixed-culture biological electrodes. *Sci. Rep.* 5. doi:10.1038/srep18433
- Al-Bahry, S.N., Al-Wahaibi, Y.M., Al-Hinai, B., Joshi, S.J., Elshafie, A.E., Al-Bemani, A.S., Al-Sabahi, J., 2016. Potential in heavy oil biodegradation via enrichment of spore forming bacterial consortia. *J. Pet. Explor. Prod. Technol.* doi:10.1007/s13202-016-0228-8
- Alkhatib, F., Alam, Z., Muyibi, S.A., Husain, I.A.F., 2011. An isolated bacterial consortium for crude oil biodegradation. *African J. Biotechnol.* 10, 18763–18767. doi:10.5897/AJB11.2749
- Andreoni, V., Gianfreda, L., 2007. Bioremediation and monitoring of aromatic-polluted habitats. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76, 287–308. doi:10.1007/s00253-007-1018-5
- Atlas, R., Bartha, R., 1998. *Microbial Ecology, Fundamentals and Applications*, Cuarta edi. ed.
- Auffret, M.D., Yergeau, E., Labbé, D., Fayolle-Guichard, F., Greer, C.W., 2014. Importance of *Rhodococcus* strains in a bacterial consortium degrading a mixture of hydrocarbons, gasoline, and diesel oil additives revealed by metatranscriptomic analysis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 2419–2430. doi:10.1007/s00253-014-6159-8

- Bacosa, H.P., Inoue, C., 2015. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) biodegradation potential and diversity of microbial consortia enriched from tsunami sediments in Miyagi, Japan. *J. Hazard. Mater.* 283, 689–697. doi:10.1016/j.jhazmat.2014.09.068
- Balashova, N. V., Kosheleva, I. a., Golovchenko, N.P., Boronin, A.M., 1999. Phenanthrene metabolism by *Pseudomonas* and *Burkholderia* strains. *Process Biochem.* 35, 291–296. doi:10.1016/S0032-9592(99)00069-2
- Balashova, N. V, Stolz, a, Knackmuss, H.J., Kosheleva, I. a, Naumov, a V, Boronin, a M., 2001. Purification and characterization of a salicylate hydroxylase involved in 1-hydroxy-2-naphthoic acid hydroxylation from the naphthalene and phenanthrene-degrading bacterial strain *Pseudomonas putida* BS202-P1. *Biodegradation* 12, 179–88. doi:10.1023/A:1013126723719
- Baldwin, B.R., Nakatsu, C.H., Nies, L., 2003. Detection and Enumeration of Aromatic Oxygenase Genes by Multiplex and Detection and Enumeration of Aromatic Oxygenase Genes by Multiplex and Real-Time PCR. *Society* 69, 3350–3358. doi:10.1128/AEM.69.6.3350
- Barberán, A., Bates, S.T., Casamayor, E.O., Fierer, N., 2012. Using network analysis to explore co-occurrence patterns in soil microbial communities. *ISME J.* 6, 343–351. doi:10.1038/ismej.2011.119
- Bardi, L., Molino, E., Fabbian, R., Bertolone, E., Belviso, S., Ambrosoli, R., 2006. Bioremediation of Phenanthrene-Polluted Soils By. *Sci. Ref. Cosm.* 1–7.
- Bastida, F., Jehmlich, N., Lima, K., Morris, B.E.L., Richnow, H.H., Hernández, T., von Bergen, M., García, C., 2015. The ecological and physiological responses of the microbial community from a semiarid soil to hydrocarbon contamination and its bioremediation using compost amendment. *J. Proteomics.* doi:10.1016/j.jprot.2015.07.023
- Bell, T., Yergeau, E., Maynard, C., Juck, D., Whyte, L.G., Greer, C.W., 2013. Predictable bacterial composition and hydrocarbon degradation in Arctic soils following diesel and nutrient disturbance. *ISME J.* 7, 1200–1210. doi:10.1038/ismej.2013.1
- Bell, T.H., Yergeau, E., Juck, D.F., Whyte, L.G., Greer, C.W., 2013. Alteration of microbial community structure affects diesel biodegradation in an Arctic soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 85, 51–61. doi:10.1111/1574-6941.12102
- Benndorf, D., Balcke, G.U., Harms, H., von Bergen, M., 2007. Functional metaproteome analysis of protein extracts from contaminated soil and groundwater. *ISME J.* 1, 224–234. doi:10.1038/ismej.2007.39
- Bento, F.M., Camargo, F.A.O., Okeke, B.C., Frankenberger, W.T., 2005. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Bioresour. Technol.* 96, 1049–55. doi:10.1016/j.biortech.2004.09.008
- Bezza, F.A., Nkhalambayausi Chirwa, E.M., 2016. Biosurfactant-enhanced bioremediation of aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in creosote contaminated soil. *Chemosphere* 144,

635–644. doi:10.1016/j.chemosphere.2015.08.027

- Bogardt, A.H., Hemmingsen, B.B., 1992. Enumeration of phenanthrene-degrading bacteria by an overlayer technique and its use in evaluation of petroleum-contaminated sites. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2579–82.
- Bohorquez, L.C., Delgado-Serrano, L., López, G., Osorio-Forero, C., Klepac-Ceraj, V., Kolter, R., Junca, H., Baena, S., Zambrano, M.M., 2012. In-depth Characterization via Complementing Culture-Independent Approaches of the Microbial Community in an Acidic Hot Spring of the Colombian Andes. *Microb. Ecol.* 63, 103–115. doi:10.1007/s00248-011-9943-3
- Bouchez, M., Blanchet, D., Bardin, V., Haeseler, F., Vandecasteele, J.P., 1999. Efficiency of defined strains and of soil consortia in the biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) mixtures. *Biodegradation* 10, 429–35.
- Brzeszcz, J., Steliga, T., Kapusta, P., Turkiewicz, A., Kaszycki, P., 2016. r-strategist versus K-strategist for the application in bioremediation of hydrocarbon-contaminated soils. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 106, 41–52.
- Caldwell, D., Wolfaardt, G., Korber, D., Lawrence, J.R., 1997. Do bacterial communities transcend Darwinism? *Advances in Microbial Ecology*.
- Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W. a, Berg-Lyons, D., Huntley, J., Fierer, N., Owens, S.M., Betley, J., Fraser, L., Bauer, M., Gormley, N., Gilbert, J. a, Smith, G., Knight, R., 2012. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J.* 6, 1621–1624. doi:10.1038/ismej.2012.8
- Castro-Silva, C., Ruíz-Valdiviezo, V.M., Valenzuela-Encinas, C., Alcántara-Hernández, R.J., Navarro-Noya, Y.E., Vázquez-Núñez, E., Luna-Guido, M., Marsch, R., Dendooven, L., 2013. The bacterial community structure in an alkaline saline soil spiked with anthracene. *Electron. J. Biotechnol.* 16, 1–20. doi:10.2225/vol16-issue5-fulltext-14
- 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, 148–59. doi:10.1016/j.mimet.2008.01.009
- Celiker, H., Gore, J., 2012. Competition between species can stabilize public-goods cooperation within a species. *Mol. Syst. Biol.* 8, 621. doi:10.1038/msb.2012.54
- Cerqueira, V.S., Hollenbach, E.B., Maboni, F., Vainstein, M.H., Camargo, F.A.O., Peralba, M. do C.R., Bento, F.M., 2011. Biodegradation potential of oily sludge by pure and mixed bacterial cultures. *Bioresour. Technol.* 102, 11003–11010. doi:10.1016/j.biortech.2011.09.074
- Cerqueira, V.S., Peralba, M.D.C.R., Camargo, F. a. O., Bento, F.M., 2014. Comparison of bioremediation strategies for soil impacted with petrochemical oily sludge. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 95, 338–345. doi:10.1016/j.ibiod.2014.08.015

- Chadhain, S.M.N., Norman, R.S., Pesce, K. V., Kukor, J.J., Zylstra, G.J., 2006. Microbial dioxygenase gene population shifts during polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 4078–4087. doi:10.1128/AEM.02969-05
- Chaffron S, Rehrauer H, Pernthaler J, Mering C, 2010. A global network of coexisting microbes from environmental and whole-genome sequence data. *Genome Res.* 2010, 947–959. doi:10.1101/gr.104521.109.
- Chao, A., 2004. Species Estimation and Applications, in: *Encyclopedia of Statistical Sciences*. pp. 7907–7916.
- Chauhan, A., Jain, R.K., 2010. Biodegradation: Gaining insight through proteomics. *Biodegradation* 21, 861–879. doi:10.1007/s10532-010-9361-0
- Chen, H., 2014. Package “VennDiagram.” R Packag. version 1.6.16.
- Chiu, C.H., Chao, A., 2014. Distance-based functional diversity measures and their decomposition: A framework based on hill numbers. *PLoS One* 9. doi:10.1371/journal.pone.0100014
- Coenye, T., Vandamme, P., 2006. *Burkholderia: Molecular Microbiology and Genomics*. Horizon Bioscience.
- Cole, J.R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R.J., Kulam-Syed-Mohideen, A.S., McGarrell, D.M., Marsh, T., Garrity, G.M., Tiedje, J.M., 2009. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* 37, D141–5. doi:10.1093/nar/gkn879
- Colwell, R.K., 2013. EstimateS: Statistical estimation of species richness and shared species from 629 samples. User’s Guide and application published at: <http://purl.oclc.org/estimates> Version 9.
- Coppotelli, B.M., 2008. Obtención de inoculantes bacterianos y evaluación de su aplicación en procesos de biorremediación de suelos contaminados con PAH.
- Coppotelli, B.M., Ibarrolaza, A., Del Panno, M.T., Morelli, I.S., 2008. Effects of the inoculant strain *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA on soil bacterial community and biodegradation in phenanthrene-contaminated soil. *Microb. Ecol.* 55, 173–83. doi:10.1007/s00248-007-9265-7
- Coppotelli, B.M., Ibarrolaza, A., Dias, R.L., Del Panno, M.T., Berthe-Corti, L., Morelli, I.S., 2010. Study of the degradation activity and the strategies to promote the bioavailability of phenanthrene by *Sphingomonas paucimobilis* strain 20006FA. *Microb. Ecol.* 59, 266–76. doi:10.1007/s00248-009-9563-3
- Cortés-lópez, N., Montor-antonio, J., Olvera-carranza, C., Peña-castro, J., Moral-, S., 2014. Metagenómica : una ventana de oportunidad a nuevos genes y genomas microbianos.
- Couling, N.R., Towell, M.G., Semple, K.T., 2010. Biodegradation of PAHs in soil: Influence of chemical structure, concentration and multiple amendment. *Environ. Pollut.* 158, 3411–3420. doi:10.1016/j.envpol.2010.07.034

- Cubitto, M.A., Gentili, A.R., 2015. Bioremediation of Crude Oil–Contaminated Soil By Immobilized Bacteria on an Agroindustrial Waste—Sunflower Seed Husks. *Bioremediat. J.* 19, 277–286. doi:10.1080/10889868.2014.995376
- Cunliffe, M., Kertesz, M. a., 2006. Effect of *Sphingobium yanoikuyae* B1 inoculation on bacterial community dynamics and polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in aged and freshly PAH-contaminated soils. *Environ. Pollut.* 144, 228–237. doi:10.1016/j.envpol.2005.12.026
- Das, K., Mukherjee, A.K., 2007. Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. *Bioresour. Technol.* 98, 1339–1345. doi:10.1016/j.biortech.2006.05.032
- de Menezes, A., Clipson, N., Doyle, E., 2012. Comparative metatranscriptomics reveals widespread community responses during phenanthrene degradation in soil. *Environ. Microbiol.* 14, 2577–2588. doi:10.1111/j.1462-2920.2012.02781.x
- Degens, B.P., Schipper, L.A., Sparling, G.P., Duncan, L.C., 2001. Is the microbial community in a soil with reduced catabolic diversity less resistant to stress or disturbance? *Soil Biol. Biochem.* 33, 1143–1153. doi:10.1016/S0038-0717(01)00018-9
- Dejonghe, W., Berteloot, E., Goris, J., Boon, N., Crul, K., Maertens, S., Höfte, M., De Vos, P., Verstraete, W., Top, E.M., 2003. Synergistic degradation of linuron by a bacterial consortium and isolation of a single linuron-degrading *variovorax* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1532–41.
- Dejonghe, W., Boon, N., Seghers, D., Top, E.M., Verstraete, W., 2001. Bioaugmentation of soils by increasing microbial richness: missing links. *Environ. Microbiol.* 3, 649–657. doi:10.1046/j.1462-2920.2001.00236.x
- Del Panno, M.T., Morelli, I.S., Engelen, B., Berthe-Corti, L., 2005. Effect of petrochemical sludge concentrations on microbial communities during soil bioremediation. *FEMS Microbiol. Ecol.* 53, 305–316. doi:10.1016/j.femsec.2005.01.014
- Desai, C., Pathak, H., Madamwar, D., 2010. Advances in molecular and “-omics” technologies to gauge microbial communities and bioremediation at xenobiotic/anthropogen contaminated sites. *Bioresour. Technol.* 101, 1558–69. doi:10.1016/j.biortech.2009.10.080
- DeWitt, T., 2001. Method for assessing the chronic toxicity of marine and estuarine sediment-associated contaminants with the amphipod *Leptocheirus Plumulosus*.
- Deziel, E., Paquette, G., Villemur, R., Lepine, F., Bisailon, J., Le, O.I.S., 1996. Biosurfactant production by a soil *pseudomonas* strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbons . These include : Biosurfactant Production by a Soil *Pseudomonas* Strain Growing on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1908–1912.
- Ding, G.C., Heuer, H., Smalla, K., 2012. Dynamics of bacterial communities in two unpolluted soils after spiking with phenanthrene: Soil type specific and common responders. *Front. Microbiol.* 3, 1–16. doi:10.3389/fmicb.2012.00290

- Ding, G.C., Heuer, H., Zühlke, S., Spitteller, M., Pronk, G.J., Heister, K., Kögel-Knabner, I., Smalla, K., 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. doi:10.1128/AEM.00047-10
- Dowd, S.E., Callaway, T.R., Wolcott, R.D., Sun, Y., McKeethan, T., Hagevoort, R.G., Edrington, T.S., 2008a. Evaluation of the bacterial diversity in the feces of cattle using 16S rDNA bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP). *BMC Microbiol.* 8, 125. doi:10.1186/1471-2180-8-125
- Dowd, S.E., Sun, Y., Secor, P.R., Rhoads, D.D., Wolcott, B.M., James, G.A., Wolcott, R.D., 2008b. Survey of bacterial diversity in chronic wounds using pyrosequencing, DGGE, and full ribosome shotgun sequencing. *BMC Microbiol.* 8, 43. doi:10.1186/1471-2180-8-43
- Dowd, S.E., Sun, Y., Wolcott, R.D., Domingo, A., Carroll, J. a, 2008c. Bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP) for microbiome studies: bacterial diversity in the ileum of newly weaned Salmonella-infected pigs. *Foodborne Pathog. Dis.* 5, 459–472. doi:10.1089/fpd.2008.0107
- Dowd, S.E., Zaragoza, J., Rodriguez, J.R., Oliver, M.J., Payton, P.R., 2005. Windows .NET Network Distributed Basic Local Alignment Search Toolkit (W.ND-BLAST). *BMC Bioinformatics* 6, 93. doi:10.1186/1471-2105-6-93
- Dueholm, M.S., Marques, I.G., Karst, S.M., D’Imperio, S., Tale, V.P., Lewis, D., Nielsen, P.H., Nielsen, J.L., 2015. Survival and activity of individual bioaugmentation strains. *Bioresour. Technol.* 186, 192–199. doi:10.1016/j.biortech.2015.02.111
- Edgar, R.C., 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26, 2460–1. doi:10.1093/bioinformatics/btq461
- Edwards, U., Rogall, T., Blöcker, H., Emde, M., Böttger, E.C., 1989. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res.* 17, 7843–53.
- El Amrani, A., Dumas, A.-S., Wick, L.Y., Yergeau, E., Berthomé, R., 2015. “Omics” Insights into PAH Degradation toward Improved Green Remediation Biotechnologies. *Environ. Sci. Technol.* 49, 11281–11291. doi:10.1021/acs.est.5b01740
- El Fantroussi, S., Agathos, S.N., 2005. Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? *Curr. Opin. Microbiol.* 8, 268–75. doi:10.1016/j.mib.2005.04.011
- Entcheva, P., Liebl, W., Johann, a., Hartsch, T., Streit, W.R., 2001. Direct cloning from enrichment cultures, a reliable strategy for isolation of complete operons and genes from microbial consortia. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 89–99. doi:10.1128/AEM.67.1.89-99.2001
- Epelde, L., Mijangos, I., Becerril, J.M., Garbisu, C., 2009. Soil microbial community as bioindicator of

- the recovery of soil functioning derived from metal phytoextraction with sorghum. *Soil Biol. Biochem.* 41, 1788–1794. doi:10.1016/j.soilbio.2008.04.001
- Escalante, A.E., Rebolleda-Gómez, M., Benítez, M., Travisano, M., 2015. Ecological perspectives on synthetic biology: insights from microbial population biology. *Front. Microbiol.* 6, 1–10. doi:10.3389/fmicb.2015.00143
- Farrelly, V., Rainey, F.A., Stackebrandt, E., 1995. Effect of genome size and *rrn* gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 2798–801.
- Fazzini, R. a B., Preto, M.J., Quintas, A.C.P., Bielecka, A., Timmis, K.N., dos Santos, V. a P.M., 2010. Consortia modulation of the stress response: Proteomic analysis of single strain versus mixed culture. *Environ. Microbiol.* 12, 2436–2449. doi:10.1111/j.1462-2920.2010.02217.x
- Fernández-Luqueño, F., Valenzuela-Encinas, C., Marsch, R., Martínez-Suárez, C., Vázquez-Núñez, E., Dendooven, L., 2011. Microbial communities to mitigate contamination of PAHs in soil--possibilities and challenges: a review. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 18, 12–30. doi:10.1007/s11356-010-0371-6
- Fodelianakis, S., Antoniou, E., Mapelli, F., Magagnini, M., Nikolopoulou, M., Marasco, R., Barbato, M., Tsiola, a., Tsikopoulou, I., Giaccaglia, L., Mahjoubi, M., Jaouani, a., Amer, R., Hussein, E., Al-Horani, F. a., Benzha, F., Blaghen, M., Malkawi, H.I., Abdel-Fattah, Y., Cherif, a., Daffonchio, D., Kalogerakis, N., 2015. Allochthonous bioaugmentation in ex situ treatment of crude oil-polluted sediments in the presence of an effective degrading indigenous microbiome. *J. Hazard. Mater.* 287, 78–86. doi:10.1016/j.jhazmat.2015.01.038
- Fournier, G., Fournier, J., 1993. Effect of microbial competition on the survival and activity of 2,4-D-degrading *Alcaligenes xylosoxidans* subsp. *denitrificans* added to soil. *Microbiol. Lett Appl* 16, 178–181.
- Fu, B., Li, Q.X., Xu, T., Cui, Z.L., Sun, Y., Li, J., 2014. *Sphingobium* sp. FB3 degrades a mixture of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 87, 44–51. doi:10.1016/j.ibiod.2013.10.024
- Fuentes, M.S., Briceño, G.E., Saez, J.M., Benimeli, C.S., Diez, M.C., Amoroso, M.J., 2013. Enhanced removal of a pesticides mixture by single cultures and consortia of free and immobilized streptomyces strains. *Biomed Res. Int.* 2013, 9. doi:10.1155/2013/392573
- Fuentes, S., Barra, B., Caporaso, J.G., Seeger, M., 2016. From Rare to Dominant: A Fine-Tuned Soil Bacterial Bloom during Petroleum Hydrocarbon Bioremediation. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 888–896. doi:10.1128/AEM.02625-15
- Fuhrman, J., Steele, J., 2008. Community structure of marine bacterioplankton: Patterns, networks, and relationships to function. *Aquat Microb Ecol* 53, 69–81.
- Fuhrman, J.A., 2009. Microbial community structure and its functional implications. *Nature* 459, 193–9.

doi:10.1038/nature08058

- Gabor, E.M., Alkema, W.B.L., Janssen, D.B., 2004. Quantifying the accessibility of the metagenome by random expression cloning techniques. *Environ. Microbiol.* 6, 879–886. doi:10.1111/j.1462-2920.2004.00640.x
- Gao, D., Tao, Y., 2012. Current molecular biologic techniques for characterizing environmental microbial community. *Front. Environ. Sci. Eng. China* 6, 82–97. doi:10.1007/s11783-011-0306-6
- Gerhardt, P., 1981. *Manual of methods for general bacteriology*. American Society for Microbiology.
- Gerischer, U., 2008. *Acinetobacter Molecular Biology*. Caister Academic Press.
- Ghazali, F.M., Rahman, R.N.Z.A., Salleh, A.B., Basri, M., 2004. Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 54, 61–67. doi:10.1016/j.ibiod.2004.02.002
- Ghevariya, C.M., Bhatt, J.K., Dave, B.P., 2011. Enhanced chrysene degradation by halotolerant *Achromobacter xylosoxidans* using Response Surface Methodology. *Bioresour. Technol.* 102, 9668–9674. doi:10.1016/j.biortech.2011.07.069
- Gieg, L.M., Fowler, S.J., Berdugo-Clavijo, C., 2014. Syntrophic biodegradation of hydrocarbon contaminants. *Curr. Opin. Biotechnol.* 27, 21–29. doi:10.1016/j.copbio.2013.09.002
- Girvan, M.S., Campbell, C.D., Killham, K., Prosser, J.I., Glover, L.A., 2005. Bacterial diversity promotes community stability and functional resilience after perturbation. *Environ. Microbiol.* 7, 301–313. doi:10.1111/j.1462-2920.2004.00695.x
- Gojgic-Cvijovic, G.D., Milic, J.S., Solevic, T.M., Beskoski, V.P., Ilic, M. V, Djokic, L.S., Narancic, T.M., Vrvic, M.M., 2012. Biodegradation of petroleum sludge and petroleum polluted soil by a bacterial consortium: a laboratory study. *Biodegradation* 23, 1–14. doi:10.1007/s10532-011-9481-1
- Gomes, N.C.M., Kosheleva, I.A., Abraham, W.-R., Smalla, K., 2005. Effects of the inoculant strain *Pseudomonas putida* KT2442 (pNF142) and of naphthalene contamination on the soil bacterial community. *FEMS Microbiol. Ecol.* 54, 21–33. doi:10.1016/j.femsec.2005.02.005
- González, N., Simarro, R., Molina, M.C., Bautista, L.F., Delgado, L., Villa, J.A., 2011. Effect of surfactants on PAH biodegradation by a bacterial consortium and on the dynamics of the bacterial community during the process. *Bioresour. Technol.* 102, 9438–46. doi:10.1016/j.biortech.2011.07.066
- Gopalakrishnan, R., Divya, C. V, 2014. The pattern of degradation of diesel by *Acinetobacter* species from diesel oil contaminated soil.
- Gotelli, N.J., Chao, A., 2013. Measuring and Estimating Species Richness, Species Diversity, and Biotic Similarity from Sampling Data, *Encyclopedia of Biodiversity*. Elsevier Ltd. doi:10.1016/B978-0-12-384719-5.00424-X
- Greenacre, M., Primicerio, R., 2013. *Multivariate Analysis of Ecological Data*.

- Grimm, A.C., Harwood, C.S., 1997. Chemotaxis of *Pseudomonas* spp to the polyaromatic hydrocarbon naph- talene. *Appl Env. Microbiol* 68, 5789–5795.
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T., Ryan, P.D., 2001. Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol. Electron.* 4, 9–18. doi:10.1016/j.bcp.2008.05.025
- Handelsman, J., Handelsman, J., 2004. Metagenomics : Application of Genomics to Uncultured Microorganisms *Metagenomics : Application of Genomics to Uncultured Microorganisms* 68, 669–685. doi:10.1128/MBR.68.4.669
- Hansen, M.C., Tolker-Nielsen, T., Givskov, M., Molin, S., 1998. Biased 16S rDNA PCR amplification caused by interference from DNA flanking the template region. *FEMS Microbiol. Ecol.* 26, 141–149. doi:10.1111/j.1574-6941.1998.tb00500.x
- Hays, S.G., Patrick, W.G., Ziesack, M., Oxman, N., Silver, P.A., 2015. ScienceDirect Better together : engineering and application of microbial symbioses 40–49.
- Heidelberg, K.B., Gilbert, J. a., Joint, I., 2010. Marine genomics: At the interface of marine microbial ecology and biodiscovery: Minireview. *Microb. Biotechnol.* 3, 531–543. doi:10.1111/j.1751-7915.2010.00193.x
- Helbling, D.E., 2015. Bioremediation of pesticide-contaminated water resources: The challenge of low concentrations. *Curr. Opin. Biotechnol.* 33, 142–148. doi:10.1016/j.copbio.2015.02.012
- Hettich, R.L., Sharma, R., Chourey, K., Giannone, R.J., 2012. Microbial metaproteomics: Identifying the repertoire of proteins that microorganisms use to compete and cooperate in complex environmental communities. *Curr. Opin. Microbiol.* 15, 373–380. doi:10.1016/j.mib.2012.04.008
- Heyer, R., Kohrs, F., Reichl, U., Benndorf, D., 2015. Metaproteomics of complex microbial communities in biogas plants. *Microb. Biotechnol.* 8, 749–763. doi:10.1111/1751-7915.12276
- Hill, M., 1973. Diversity and evenness: a unifying notation and its consequences. *Ecology* 54, 427–432. doi:10.2307/1934352
- Hong, Q., Dong, X., He, L., Jiang, X., Li, S., 2009. Isolation of a biphenyl-degrading bacterium, *Achromobacter* sp. BP3, and cloning of the bph gene cluster. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 63, 365–370. doi:10.1016/j.ibiod.2008.10.009
- Horňák, K., Corno, G., 2012. Every coin has a back side: invasion by *Limnohabitans planktonicus* promotes the maintenance of species diversity in bacterial communities. *PLoS One* 7, e51576. doi:10.1371/journal.pone.0051576
- Horner-Devine, M.C., Silver, J.M., Leibold, M. a., Bohannon, B.J.M., Colwell, R.K., Fuhrman, J. a., Green, J.L., Kuske, C.R., Martiny, J.B.H., Muyzer, G., Øvreas, L., Reysenbach, A.L., Smith, V.H., 2007. A comparison of taxon co-occurrence patterns for macro- and microorganisms. *Ecology* 88, 1345–1353. doi:10.1890/06-0286
- Hua, X., Wu, Z., Zhang, H., Lu, D., Wang, M., Liu, Y., Liu, Z., 2010. Degradation of hexadecane by

- Enterobacter cloacae strain TU that secretes an exopolysaccharide as a bioemulsifier. *Chemosphere* 80, 951–6. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.05.002
- Huang, X., Tian, Y., Luo, Y.R., Liu, H.J., Zheng, W., Zheng, T.L., 2008. Modified sublimation to isolate phenanthrene-degrading bacteria of the genera *Sphingomonas* and *Burkholderia* from Xiamen oil port. *Mar. Pollut. Bull.* 57, 538–543. doi:10.1016/j.marpolbul.2007.12.013
- Huesemann, M.H., Hausmann, T.S., Fortman, T.J., 2004. Does bioavailability limit biodegradation? A comparison of hydrocarbon biodegradation and desorption rates in aged soils. *Biodegradation* 15, 261–274.
- Hugh, R., Leifson, E., 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram-negative rods. *J. Bacteriol* 24–26.
- Ibarrolaza, A., Coppotelli, B.M., Del Panno, M.T., Donati, E.R., Morelli, I.S., 2011. Application of the knowledge-based approach to strain selection for a bioaugmentation process of phenanthrene- and Cr(VI)-contaminated soil. *J. Appl. Microbiol.* 111, 26–35. doi:10.1111/j.1365-2672.2011.05036.x
- Jacques, R.J.S., Okeke, B.C., Bento, F.M., Teixeira, A.S., Peralba, M.C.R., Camargo, F.A.O., 2008. Microbial consortium bioaugmentation of a polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soil. *Bioresour. Technol.* 99, 2637–43. doi:10.1016/j.biortech.2007.04.047
- Jadeja, N.B., More, R.P., Purohit, H.J., Kapley, A., 2014. Metagenomic analysis of oxygenases from activated sludge. *Bioresour. Technol.* 165, 250–256. doi:10.1016/j.biortech.2014.02.045
- Janbandhu, A., Fulekar, M.H., 2011. Biodegradation of phenanthrene using adapted microbial consortium isolated from petrochemical contaminated environment. *J. Hazard. Mater.* 187, 333–40. doi:10.1016/j.jhazmat.2011.01.034
- Jiang, H.-L., Maszenan, A.M., Tay, J.-H., 2007. Bioaugmentation and coexistence of two functionally similar bacterial strains in aerobic granules. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75, 1191–1200. doi:10.1007/s00253-007-0917-9
- Johnsen, A.R., Karlson, U., 2005. PAH degradation capacity of soil microbial communities - Does it depend on PAH exposure? *Microb. Ecol.* 50, 488–495. doi:10.1007/s00248-005-0022-5
- Johnsen, A.R., Wick, L.Y., Harms, H., 2005. Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environ. Pollut.* 133, 71–84. doi:10.1016/j.envpol.2004.04.015
- Joshi, V. V., Prewitt, M.L., Ma, D.-P., Borazjani, H., 2015. Enhanced Remediation of Pentachlorophenol (PCP)-Contaminated Groundwater by Bioaugmentation with Known PCP-Degrading Bacteria. *Bioremediat. J.* 19, 160–170. doi:10.1080/10889868.2014.995369
- Jung, J., Park, W., 2015. *Acinetobacter* species as model microorganisms in environmental microbiology: current state and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 2533–2548. doi:10.1007/s00253-015-6439-y

- Jurelevicius, D., Alvarez, V.M., Peixoto, R., Rosado, A.S., Seldin, L., 2012. Bacterial polycyclic aromatic hydrocarbon ring-hydroxylating dioxygenases (PAH-RHD) encoding genes in different soils from King George Bay, Antarctic Peninsula. *Appl. Soil Ecol.* 55, 1–9. doi:10.1016/j.apsoil.2011.12.008
- Kang, H., Hwang, S.Y., Kim, Y.M., Kim, E., Kim, Y.S., Kim, S.K., Kim, S.W., Cerniglia, C.E., Shuttleworth, K.L., Zylstra, G.J., 2003. Degradation of phenanthrene and naphthalene by a *Burkholderia* species strain. *Can. J. Microbiol.* 49, 139–44. doi:10.1139/w03-009
- Kerstens, K., Vos, P.D.E., Gillis, M., Swings, J., Vandamme, P., 2006. Introduction to the Proteobacteria, Prokaryotes. doi:10.1007/0-387-30745-1
- Khara, P., Roy, M., Chakraborty, J., Ghosal, D., Dutta, T.K., 2014. Functional characterization of diverse ring-hydroxylating oxygenases and induction of complex aromatic catabolic gene clusters in *Sphingobium* sp. PNB. *FEBS Open Bio* 4, 290–300. doi:10.1016/j.fob.2014.03.001
- Khomenkov, V.G., Shevelev, a B., Zhukov, V.G., Kurlovich, a E., Zagustina, N. a, Popov, V.O., 2005. Metabolic pathways responsible for consumption of aromatic hydrocarbons by microbial associations: molecular-genetic characterization. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* 41, 298–302.
- Kim, S., Kweon, O., Cerniglia, C., 2009. Proteomic applications to elucidate bacterial aromatic hydrocarbon metabolic pathways. *Curr. Opin. Microbiol.* 12, 301–309. doi:10.1016/j.mib.2009.03.006
- Kiran, G.S., Ninawe, A.S., Lipton, A.N., Pandian, V., Selvin, J., 2015. Rhamnolipid biosurfactants: evolutionary implications, applications and future prospects from untapped marine resource. *Crit. Rev. Biotechnol.* 00, 1–17. doi:10.3109/07388551.2014.979758
- Kuiper, I., Lagendijk, E.L., Bloemberg, G. V, Lugtenberg, B.J.J., 2004. Rhizoremediation : A Beneficial Plant-Microbe Interaction Bioremediation : A natural method 17, 6–15.
- Kuppusamy, S., Thavamani, P., 2016. Bioaugmentation with Novel Microbial Formula vs . Natural Attenuation of a Long-Term Mixed Contaminated Soil- Treatability Studies in Solid- and Slurry-Phase Microcosms. doi:10.1007/s11270-015-2709-7
- Kuppusamy, S., Thavamani, P., Megharaj, M., Naidu, R., 2016. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by novel bacterial consortia tolerant to diverse physical settings – Assessments in liquid- and slurry-phase systems. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 108, 149–157. doi:10.1016/j.ibiod.2015.12.013
- Ladino-orjuela, G., Gomes, E., Silva, R., Salt, C., Parsons, J.R., 2016. Metabolic Pathways for Degradation of Aromatic Hydrocarbons by Bacteria. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 237, 105–117. doi:10.1007/978-3-319-23573-8
- Lafortune, I., Juteau, P., Déziel, E., Lépine, F., Beaudet, R., Villemur, R., 2009. Bacterial diversity of a consortium degrading high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons in a two-liquid phase biosystem. *Microb. Ecol.* 57, 455–68. doi:10.1007/s00248-008-9417-4

- Langenheder, S., Bulling, M.T., Solan, M., Prosser, J.I., 2010. Bacterial Biodiversity-Ecosystem Functioning Relations are Modified by Environmental Complexity. *PLoS One* 5. doi:10.1371/journal.pone.0010834
- Leary, D.H., Hervey, W.J., Deschamps, J.R., Kusterbeck, A.W., Vora, G.J., 2014. Reprint of “Which metaproteome? The impact of protein extraction bias on metaproteomic analyses.” *Mol. Cell. Probes* 28, 51–57. doi:10.1016/j.mcp.2014.01.002
- Lebeau, T., 2011. Bioaugmentation for in situ soil remediation: how to ensure the success of such a process., in: Singh, A., Parmar, N., Kuhad, R.C. (Eds.), *Bio- Augmentation, Biostimulation and Biocontrol, Soil Biology*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 129–186.
- Leigh, M.B., Pellizari, V.H., Uhlík, O., Sutka, R., Rodrigues, J., Ostrom, N.E., Zhou, J., Tiedje, J.M., 2007. Biphenyl-utilizing bacteria and their functional genes in a pine root zone contaminated with polychlorinated biphenyls (PCBs). *ISME J.* 1, 134–148. doi:10.1038/ismej.2007.26
- Li, X., Lin, X., Li, P., Liu, W., Wang, L., Ma, F., Chukwuka, K.S., 2009. Biodegradation of the low concentration of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by microbial consortium during incubation. *J. Hazard. Mater.* 172, 601–5. doi:10.1016/j.jhazmat.2009.07.044
- Litchman, E., Edwards, K.F., Klausmeier, C.A., 2015. Microbial resource utilization traits and trade-offs: Implications for community structure, functioning, and biogeochemical impacts at present and in the future. *Front. Microbiol.* 6, 1–10. doi:10.3389/fmicb.2015.00254
- Liu, Y.J., Zhang, A.N., Wang, X.C., 2009. Biodegradation of phenol by using free and immobilized cells of *Acinetobacter* sp. XA05 and *Sphingomonas* sp. FG03. *Biochem. Eng. J.* 44, 187–192. doi:10.1016/j.bej.2008.12.001
- Liu, Z., Desantis, T.Z., Andersen, G.L., Knight, R., 2008. Accurate taxonomy assignments from 16S rRNA sequences produced by highly parallel pyrosequencers. *Nucleic Acids Res.* 36, 1–11. doi:10.1093/nar/gkn491
- Lloyd-Jones, G., Laurie, A.D., Hunter, D.W.F., Fraser, R., 1999. Analysis of catabolic genes for naphthalene and phenanthrene degradation in contaminated New Zealand soils. *FEMS Microbiol. Ecol.* 29, 69–79. doi:10.1016/S0168-6496(98)00131-7
- Lorenz, P., Schleper, C., 2002. Metagenome - A challenging source of enzyme discovery. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 19-20, 13–19. doi:10.1016/S1381-1177(02)00147-9
- Lors, C., Ryngaert, A., Périé, F., Diels, L., Damidot, D., 2010. Evolution of bacterial community during bioremediation of PAHs in a coal tar contaminated soil. *Chemosphere* 81, 1263–71. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.09.021
- Loviso, C.L., 2015. Análisis metagenómico de la biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en sedimentos marinos subantárticos.
- Lovley, D.R., 2003. Cleaning up with genomics: applying molecular biology to bioremediation. *Nat.*

- Rev. Microbiol. 1, 35–44. doi:10.1038/nrmicro731
- Lu, X.Y., Zhang, T., Fang, H.H.P., 2011. Bacteria-mediated PAH degradation in soil and sediment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89, 1357–1371. doi:10.1007/s00253-010-3072-7
- Luan, T.G., Yu, K.S.H., Zhong, Y., Zhou, H.W., Lan, C.Y., Tam, N.F.Y., 2006. Study of metabolites from the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by bacterial consortium enriched from mangrove sediments. *Chemosphere* 65, 2289–96. doi:10.1016/j.chemosphere.2006.05.013
- Ma, J., Yan, G., Ma, W., Cheng, C., Wang, Q., Guo, S., 2015. Isolation and Characterization of Oil-Degrading Microorganisms for Bench-Scale Evaluations of Autochthonous Bioaugmentation for Soil Remediation. *Water, Air, Soil Pollut.* 226, 272. doi:10.1007/s11270-015-2491-6
- 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. *Env. Microbiol* 8, 455–465.
- Madueño, L., Alvarez, H.M., Morelli, I.S., 2015. Autochthonous bioaugmentation to enhance phenanthrene degradation in soil microcosms under arid conditions. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 12, 2317–2326. doi:10.1007/s13762-014-0637-5
- Madueño, L., Coppotelli, B.M., Alvarez, H.M., Morelli, I.S., 2011. Isolation and characterization of indigenous soil bacteria for bioaugmentation of PAH contaminated soil of semiarid Patagonia , Argentina. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 65, 345–351. doi:10.1016/j.ibiod.2010.12.008
- Mallick, S., Chakraborty, J., Dutta, T.K., 2011. Role of oxygenases in guiding diverse metabolic pathways in the bacterial degradation of low-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review. *Crit. Rev. Microbiol.* 37, 64–90. doi:10.3109/1040841X.2010.512268
- Mallon, C.A., Elsas, J.D. Van, Salles, J.F., 2015. Microbial Invasions : The Process, Patterns, and Mechanisms 23, 719–729.
- Mao, J., Luo, Y., Teng, Y., Li, Z., 2012. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil by a bacterial consortium and associated microbial community changes. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 70, 141–147. doi:10.1016/j.ibiod.2012.03.002
- Martin, F., Torelli, S., Le Paslier, D., Barbance, A., Martin-Laurent, F., Bru, D., Geremia, R., Blake, G., Jouanneau, Y., 2012. Betaproteobacteria dominance and diversity shifts in the bacterial community of a PAH-contaminated soil exposed to phenanthrene. *Environ. Pollut.* 162, 345–353. doi:10.1016/j.envpol.2011.11.032
- Martínez, P., Agulló, L., Hernández, M., Seeger, M., 2007. Chlorobenzoate inhibits growth and induces stress proteins in the PCB-degrading bacterium *Burkholderia xenovorans* LB400. *Arch. Microbiol.* 188, 289–297. doi:10.1007/s00203-007-0247-4
- Martiny, J.B.H., Bohannan, B.J.M., Brown, J.H., Colwell, R.K., Fuhrman, J.A., Green, J.L., Horner-

- Devine, M.C., Kane, M., Krumins, J.A., Kuske, C.R., Morin, P.J., Naeem, S., Ovreås, L., Reysenbach, A.-L., Smith, V.H., Staley, J.T., 2006. Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 102–12. doi:10.1038/nrmicro1341
- McHardy, A.C., Martín, H.G., Tsirigos, A., Hugenholtz, P., Rigoutsos, I., 2007. Accurate phylogenetic classification of variable-length DNA fragments. *Nat. Methods* 4, 63–72. doi:10.1038/nmeth976
- Megharaj, M., Ramakrishnan, B., Venkateswarlu, K., Sethunathan, N., Naidu, R., 2011. Bioremediation approaches for organic pollutants: A critical perspective. *Environ. Int.* 37, 1362–1375. doi:10.1016/j.envint.2011.06.003
- Mendes, L.W., Tsai, S.M., Navarrete, A. a., de Hollander, M., van Veen, J. a., Kuramae, E.E., 2015. Soil-Borne Microbiome: Linking Diversity to Function. *Microb. Ecol.* doi:10.1007/s00248-014-0559-2
- Menezes Bento, F., de Oliveira Camargo, F. a, Okeke, B.C., Frankenberger, W.T., 2005. Diversity of biosurfactant producing microorganisms isolated from soils contaminated with diesel oil. *Microbiol. Res.* 160, 249–55. doi:10.1016/j.micres.2004.08.005
- Mercier, A., Michel, C., Joulian, C., Touzé, S., Amalric, L., Bataillard, P., Morlay, C., Battaglia-Brunet, F., 2015. Decrease of the level of extractable polychlorinated biphenyls in soil microcosms: Influence of granular activated carbon and inoculation by natural microbial consortia. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 105, 127–136. doi:10.1016/j.ibiod.2015.08.024
- Mersi, W. Von, Sehinner, F., 1991. Biology and Fertility An improved and accurate method for determining the dehydrogenase activity of soils with iodinitrotetrazolium chloride 216–220.
- Milton, C., Boucher, D., Vachelard, C., Perchet, G., Barra, V., Troquet, J., Peyretailade, E., Peyret, P., 2010. Bacterial community changes during bioremediation of aliphatic hydrocarbon-contaminated soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 74, 669–681. doi:10.1111/j.1574-6941.2010.00982.x
- Mishra, S., Singh, S.N., Pande, V., 2014. Bacteria induced degradation of fluoranthene in minimal salt medium mediated by catabolic enzymes in vitro condition. *Bioresour. Technol.* 164, 299–308. doi:10.1016/j.biortech.2014.04.076
- Miya, R.K., Firestone, M.K., 2000. Phenanthrene-Degrader Community Dynamics in Rhizosphere Soil from a Common Annual Grass. *J. Environ. Qual.* 29, 584. doi:10.2134/jeq2000.00472425002900020029x
- Mohan, S.V., Kisa, T., Ohkuma, T., Kanaly, R. a., Shimizu, Y., 2006. Bioremediation technologies for treatment of PAH-contaminated soil and strategies to enhance process efficiency. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 5, 347–374. doi:10.1007/s11157-006-0004-1
- Molina, M.C., González, N., Bautista, L.F., Sanz, R., Simarro, R., Sánchez, I., Sanz, J.L., 2009. Isolation and genetic identification of PAH degrading bacteria from a microbial consortium. *Biodegradation* 20, 789–800. doi:10.1007/s10532-009-9267-x

- Morelli, I.S., Coppotelli, B.M., Madueño, L., Panno, T. Del, 2015. La biorremediación en la era post-genómica. *Química Viva* 14, 26–35.
- Morris, B.E.L., Henneberger, R., Huber, H., Moissl-Eichinger, C., 2013. Microbial syntrophy: Interaction for the common good. *FEMS Microbiol. Rev.* 37, 384–406. doi:10.1111/1574-6976.12019
- Moscoso, F., Tejjiz, I., Deive, F.J., Sanromán, M. a, 2012. Efficient PAHs biodegradation by a bacterial consortium at flask and bioreactor scale. *Bioresour. Technol.* 119, 270–6. doi:10.1016/j.biortech.2012.05.095
- Mrozik, A., Piotrowska-Seget, Z., 2010. Bioaugmentation as a strategy for cleaning up of soils contaminated with aromatic compounds. *Microbiol. Res.* 165, 363–75. doi:10.1016/j.micres.2009.08.001
- Muangchinda, C., Pansri, R., Wongwongsee, W., Pinyakong, O., 2013. Assessment of polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation potential in mangrove sediment from Don Hoi Lot, Samut Songkram Province, Thailand. *J. Appl. Microbiol.* 114, 1311–1324. doi:10.1111/jam.12128
- Mueller, J.G., Chapman, P.J., Pritchard, P.H., 1989. Action of a fluoranthene-utilizing bacterial community on polycyclic aromatic hydrocarbon components of creosote. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 3085–90.
- Mukherjee, A.K., Bordoloi, N.K., 2011. Bioremediation and reclamation of soil contaminated with petroleum oil hydrocarbons by exogenously seeded bacterial consortium: a pilot-scale study. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 18, 471–8. doi:10.1007/s11356-010-0391-2
- Mulligan, C.N., Cooper, D.G., Neufeld, R.J., 1984. Selection of Microbes Producing Biosurfactants in Media without Hydrocarbons. *J. Ferment. Technol.* 62, 311–314.
- Muratova, A., Pozdnyakova, N., Makarov, O., Baboshin, M., Baskunov, B., Myasoedova, N., Golovleva, L., Turkovskaya, O., 2014. Degradation of phenanthrene by the rhizobacterium *Ensifer meliloti*. *Biodegradation* 25, 787–795.
- Muyzer, G., Brinkhoff, T., Nübel, U., Santegoeds, C., Schäfer, H., Wawer, C., 1998. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology. *Mol. Microb. Ecol. Man.* 3, 1–27. doi:10.1007/978-1-4020-2177-0_313
- Muyzer, G., de Waal, E.C., Uitterlinden, A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 695–700.
- Myrold, D.D., Nannipieri, P., 2014. Classical Techniques Versus Omics Approaches. *Omi. Soil Sci.* 179–187.
- Nannipieri, P., 2006. Role of Stabilised Enzymes in Microbial Ecology and Enzyme Extraction from Soil with Potential Applications in Soil Proteomics, in: Nannipieri, P., Smalla, K. (Eds.), *Nucleic*

- Acids and Proteins in Soil. pp. 75–94.
- Nelson, M.J.K., Montgomery, S.O., Mahaffey, W.R., Pritchard, P.H., 1987. Biodegradation of trichloroethylene and involvement of an aromatic biodegradative pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 949–954.
- Niepceron, M., Martin-Laurent, F., Crampon, M., Portet-Koltalo, F., Akpa-Vinceslas, M., Legras, M., Bru, D., Bureau, F., Bodilis, J., 2013. GammaProteobacteria as a potential bioindicator of a multiple contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in agricultural soils. *Environ. Pollut.* 180, 199–205. doi:10.1016/j.envpol.2013.05.040
- Nikolopoulou, M., Pasadakis, N., Kalogerakis, N., 2013. Evaluation of autochthonous bioaugmentation and biostimulation during microcosm-simulated oil spills. *Mar. Pollut. Bull.* 72, 165–73. doi:10.1016/j.marpolbul.2013.04.007
- Núñez, E.V., Valenzuela-Encinas, C., Alcántara-Hernández, R.J., Navarro-Noya, Y.E., Luna-Guido, M., Marsch, R., Dendooven, L., 2012. Modifications of bacterial populations in anthracene contaminated soil. *Appl. Soil Ecol.* 61, 113–126. doi:10.1016/j.apsoil.2012.04.005
- Oksanen, J., F. Guillaume Blanchet, R.K., Legendre, P., Minchin, P.R., O’Hara, R.B., Simpson, G.L., Solymos, P., M. Henry H. Stevens, H.W., 2015. Package “vegan.” R Packag. version 2.3-4.
- Ortiz Lopez, A.I., 2004. Biodegradación de hidrocarburos en suelos: Efecto de la adición de co-substratos gaseosos. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.
- Overbeek, R., Fonstein, M., D’Souza, M., Pusch, G.D., Maltsev, N., 1999. The use of gene clusters to infer functional coupling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 2896–2901. doi:10.1073/pnas.96.6.2896
- Païssé, S., Goñi-Urriza, M., Coulon, F., Duran, R., 2010. How a bacterial community originating from a contaminated coastal sediment responds to an oil input. *Microb. Ecol.* 60, 394–405. doi:10.1007/s00248-010-9721-7
- Pandey, P., Pathak, H., Dave, S., 2016. Microbial Ecology of Hydrocarbon Degradation in the Soil : A Review. *Res. J. Environ. Toxicol.* 10, 1–15. doi:10.3923/rjet.2016.1.15
- Pannu, J.K., Singh, A., Ward, O.P., 2003. Influence of peanut oil on microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Can. J. Microbiol.* 49, 508–13. doi:10.1139/w03-068
- Parales, R.E., Haddock, J.D., 2004. Biocatalytic degradation of pollutants. *Curr. Opin. Biotechnol.* 15, 374–379. doi:10.1016/j.copbio.2004.06.003
- Patel, V., Jain, S., Madamwar, D., 2012. Naphthalene degradation by bacterial consortium (DV-AL) developed from Alang-Sosiya ship breaking yard, Gujarat, India. *Bioresour. Technol.* 107, 122–30. doi:10.1016/j.biortech.2011.12.056
- Patel, V., Patel, J., Madamwar, D., 2013. Biodegradation of phenanthrene in bioaugmented microcosm by consortium ASP developed from coastal sediment of Alang-Sosiya ship breaking

- yard. *Mar. Pollut. Bull.* 74, 199–207. doi:10.1016/j.marpolbul.2013.07.001
- Peng, R.-H., Xiong, A.-S., Xue, Y., Fu, X.-Y., Gao, F., Zhao, W., Tian, Y.-S., Yao, Q.-H., 2008. Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiol. Rev.* 32, 927–55. doi:10.1111/j.1574-6976.2008.00127.x
- Pérez-Pantoja, D., Donoso, R., Agulló, L., Córdova, M., Seeger, M., Pieper, D.H., González, B., 2012. Genomic analysis of the potential for aromatic compounds biodegradation in Burkholderiales. *Environ. Microbiol.* 14, 1091–1117. doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02613.x
- Pessacq, J., Medina, R., Terada, C., Bianchini, F.E., Morelli, I.S., Del Panno, M.T., 2015. Assessment of the Responsiveness to Different Stresses of the Microbial Community from Long-Term Hydrocarbon-Contaminated Soils. *Water, Air, Soil Pollut.* 226. doi:10.1007/s11270-014-2262-9
- Peter, H., Beier, S., Bertilsson, S., Lindström, E.S., Langenheder, S., Tranvik, L.J., 2011. Function-specific response to depletion of microbial diversity. *ISME J.* 5, 351–361. doi:10.1038/ismej.2010.119
- Prabhu, Y., Phale, P.S., 2003. Biodegradation of phenanthrene by *Pseudomonas* sp. strain PP2: novel metabolic pathway, role of biosurfactant and cell surface hydrophobicity in hydrocarbon assimilation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61, 342–351. doi:10.1007/s00253-002-1218-y
- Pucci, O.H., Bak, M.A., Peressutti, S.R., Klein, I., Hartig, C., Alvarez, H.M., Wunsche, L., 2000. Influence of crude oil contamination on the bacterial community of semiarid soils of Patagonia (Argentina). *Acta Biotechnol.* 20, 129–146. doi:10.1002/abio.370200207
- Puglisi, E., Cappa, F., Fragoulis, G., Trevisan, M., Del Re, A.A.M., 2007. Bioavailability and degradation of phenanthrene in compost amended soils. *Chemosphere* 67, 548–56. doi:10.1016/j.chemosphere.2006.09.058
- Puntus, I.F., Filonov, A.E., Akhmetov, L.I., Karpov, A. V., Boronin, A.M., 2008. Phenanthrene degradation by bacteria of the genera *Pseudomonas* and *Burkholderia* in model soil systems. *Mikrobiologiya* 77, 11–20. doi:10.1134/S0026261708010025
- Raes, J., Bork, P., 2008. Molecular eco-systems biology: towards an understanding of community function. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 693–9. doi:10.1038/nrmicro1935
- Ramirez, K., Craine, J., Fierer, N., 2012. Consistent effects of nitrogen amendments on soil microbial communities and processes across biomes. *Glob Chang. Biol* 18, 1918–1927.
- Ramirez, N., Cutright, T., Ju, L.K., 2001. Pyrene biodegradation in aqueous solutions and soil slurries by *Mycobacterium* PYR-1 and enriched consortium. *Chemosphere* 44, 1079–1086. doi:10.1016/S0045-6535(00)00475-6
- Rayu, S., Karpouzias, D.G., Singh, B.K., 2012. Emerging technologies in bioremediation: Constraints and opportunities. *Biodegradation* 23, 917–926. doi:10.1007/s10532-012-9576-3
- Reasoner, D.J., Geldreich, E.E., 1985. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria

- from potable water. *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 1–7.
- Ren, G., Ren, W., Teng, Y., Li, Z., 2015. Evident bacterial community changes but only slight degradation when polluted with pyrene in a red soil. *Front. Microbiol.* 6, 1–11.
doi:10.3389/fmicb.2015.00022
- Rodríguez, R.A., Herrera, A.M., Santander, J., Miranda, J. V, Fernández-Rodríguez, M.J., Quirós, Á., Riera, R., Fernández-Palacios, J.M., Otto, R., Escudero, C.G., Jiménez-Rodríguez, A., Navarro-Cerrillo, R.M., Perdomo, M.E., Delgado, J.D., 2015. Uncertainty principle in niche assessment: A solution to the dilemma redundancy vs. competitive exclusion, and some analytical consequences. *Ecol. Modell.* 316, 87–110. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2015.07.032
- Ronen, Z., Vasiluk, L., Abeliovich, A., Nejdat, A., 2000. Activity and survival of tri- bromophenol-degrading bacteria in a contaminated desert soil. *Soil Biol. Biochem.* 32, 1643–1650.
- Ros, M., Rodríguez, I., García, C., Hernández, T., 2010. Microbial communities involved in the bioremediation of an aged recalcitrant hydrocarbon polluted soil by using organic amendments. *Bioresour. Technol.* 101, 6916–6923. doi:10.1016/j.biortech.2010.03.126
- Roy, M., Khara, P., Dutta, T.K., 2012. meta-Cleavage of hydroxynaphthoic acids in the degradation of phenanthrene by *Sphingobium* sp. strain PNB. *Microbiology* 158, 685–95.
doi:10.1099/mic.0.053363-0
- Ruan, Q., Dutta, D., Schwalbach, M.S., Steele, J.A., Fuhrman, J.A., Sun, F., 2006. Local similarity analysis reveals unique associations among marine bacterioplankton species and environmental factors. *Bioinformatics* 22, 2532–8. doi:10.1093/bioinformatics/btl417
- Ruberto, L., Vazquez, S.C., Mac, W.P., 2003. Effectiveness of the natural bacterial ora , biostimulation and bioaugmentation on the bioremediation of a hydrocarbon contaminated Antarctic soil. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 52, 115–125. doi:10.1016/S0964-8305(03)00048-9
- Ruberto, L.A.M., Vázquez, S.C., Mac Cormack, W.P., 2009. Bacterial hydrocarbon-degrading consortium from Antarctic soils. *Rev. Argent. Microbiol.* 41, 262.
- Ruggeri, C., Franzetti, A., Bestetti, G., Caredda, P., La Colla, P., Pintus, M., Sergi, S., Tamburini, E., 2009. Isolation and characterisation of surface active compound-producing bacteria from hydrocarbon-contaminated environments. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 63, 936–942.
doi:10.1016/j.ibiod.2009.05.003
- Rungrasamee, W., Klanchui, A., Chaiyapechara, S., Maibunkaew, S., Tangphatsornruang, S., Jiravanichpaisal, P., Karoonuthaisiri, N., 2013. Bacterial Population in Intestines of the Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*) under Different Growth Stages. *PLoS One* 8.
doi:10.1371/journal.pone.0060802
- Salgado, H., Moreno-Hagelsieb, G., Smith, T.F., Collado-Vides, J., 2000. Operons in *Escherichia coli*: genomic analyses and predictions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 6652–7.
doi:10.1073/pnas.110147297

- Salles, J.F., Poly, F., Schmid, B., Le Roux, X., 2009. Community niche drives bacterial functioning
Submitted to: *Ecology* 90, 3324–3332.
- Salles, J.F., Souza, F.A. De, Elsas, J.D. Van, 2002. Molecular Method To Assess the Diversity of
Burkholderia Species in Environmental Samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1595–1603.
doi:10.1128/AEM.68.4.1595
- Samanta, S.K., Singh, O. V, Jain, R.K., 2002. Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental
pollution and bioremediation. *Trends Biotechnol.* 20, 243–8.
- Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning*, 2nd ed. ed. Cold Spring Harbor, New
York.
- Sanchez, J., Hochstrasser, D., Rabilloud, T., 1999. In-gel simple rehydration of immobilized pH
gradient. *Methods Mol. Biol.* 112, 221–225.
- Schneider, T., Riedel, K., 2010. Environmental proteomics: Analysis of structure and function of
microbial communities. *Proteomics* 10, 785–798. doi:10.1002/pmic.200900450
- Schwartz, E., Scow, K.M., 2001. Repeated inoculation as a strategy for the remediation of low
concentrations of phenanthrene in soil 201–207.
- Semple, K.T., Doick, K.J., Wick, L.Y., Harms, H., 2007. Microbial interactions with organic
contaminants in soil: Definitions, processes and measurement. *Environ. Pollut.* 150, 166–176.
- Seo, J.S., Keum, Y.S., Hu, Y., Lee, S.E., Li, Q.X., 2007. Degradation of phenanthrene by *Burkholderia*
sp. C3: Initial 1,2- and 3,4-dioxygenation and meta- and ortho-cleavage of naphthalene-1,2-diol.
Biodegradation 18, 123–131. doi:10.1007/s10532-006-9048-8
- Sessitsch, A., Weilharter, A., Martin, H., Kirchmann, H., Kandeler, E., Gerzabek, M.H., 2001. Microbial
Population Structures in Soil Particle Size Fractions of a Long-Term Microbial Population
Structures in Soil Particle Size Fractions of a Long-Term Fertilizer Field Experiment. *Appl.*
Environ. Microbiol. 67, 4215–4224. doi:10.1128/AEM.67.9.4215
- Shade, A., Peter, H., Allison, S.D., Baho, D.L., Berga, M., B??rgmann, H., Huber, D.H., Langenheder,
S., Lennon, J.T., Martiny, J.B.H., Matulich, K.L., Schmidt, T.M., Handelsman, J., 2012.
Fundamentals of microbial community resistance and resilience. *Front. Microbiol.* 3, 1–19.
doi:10.3389/fmicb.2012.00417
- Sharma, P., Kumari, H., Kumar, M., Verma, M., Kumari, K., Malhotra, S., Khurana, J., Lal, R., 2008.
From bacterial genomics to metagenomics: Concept, tools and recent advances. *Indian J.*
Microbiol. 48, 173–194. doi:10.1007/s12088-008-0031-4
- Shor, L.M., Liang, W., Rockne, K.J., Young, L.Y., Taghon, G.L., Kosson, D.S., 2003. Intra- aggregate
mass transport-limited bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons to *Mycobacterium*
strain PC01. *Environ. Sci. Technol.* 38, 1545–1552.
- Silva, I.S., Santos, E.D.C. Dos, Menezes, C.R. De, Faria, A.F. De, Franciscon, E., Grossman, M.,

- Durrant, L.R., 2009. Bioremediation of a polyaromatic hydrocarbon contaminated soil by native soil microbiota and bioaugmentation with isolated microbial consortia. *Bioresour. Technol.* 100, 4669–75. doi:10.1016/j.biortech.2009.03.079
- Simarro, R., González, N., Bautista, L.F., Molina, M.C., 2013. Assessment of the efficiency of in situ bioremediation techniques in a creosote polluted soil: Change in bacterial community. *J. Hazard. Mater.* 262, 158–167. doi:10.1016/j.jhazmat.2013.08.025
- Simon, C., Daniel, R., 2011. Metagenomic analyses: Past and future trends. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 1153–1161. doi:10.1128/AEM.02345-10
- Singer, A.C., van der Gast, C.J., Thompson, I.P., 2005. Perspectives and vision for strain selection in bioaugmentation. *Trends Biotechnol.* 23, 74–77. doi:10.1016/j.tibtech.2004.12.012
- Singleton, D.R., Jones, M.D., Richardson, S.D., Aitken, M.D., 2013. Pyrosequence analyses of bacterial communities during simulated in situ bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 8381–91. doi:10.1007/s00253-012-4531-0
- Sipilä, T., 2009. Plasmids and aromatic degradation in *Sphingomonas* for bioremediation - Aromatic ring cleavage genes in soil and rhizosphere.
- Sipos, R., Marialigeti, K., Palatinszky, M., Szekely, A.J., Nikolausz, M., 2004. Testing the week points of “universal” 16SrDNA primers in multitemplate PCR of environmental samples and model communities. *10th Int. Symp. Microb. Ecol. ISME-10 Microb. Planet Subsurf. to Sp.* 263.
- Sokal, R.R., Michener, C.D., 1958. *A Statistical Method for Evaluating Systematic Relationships.* University of Kansas.
- Sorensen, S.R., Ronen, Z., Aamand, J., 2002. Growth in coculture stimulates metabolism of the phenylurea herbicide isoproturon by *Sphingomonas* sp. strain SRS2. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3478–3485. doi:10.1128/AEM.68.7.3478-3485.2002
- Spilker, T., Leber, A.L., Marcon, M.J., Newton, D.W., Darrah, R., Vandamme, P., LiPuma, J.J., 2014. A simplified sequence-based identification scheme for *Bordetella* reveals several putative novel species. *J. Clin. Microbiol.* 52, 674–677. doi:10.1128/JCM.02572-13
- Sprocati, A.R., Alisi, C., Tasso, F., Marconi, P., Sciuillo, A., Pinto, V., Chiavarini, S., Ubaldi, C., Cremisini, C., 2012. Effectiveness of a microbial formula, as a bioaugmentation agent, tailored for bioremediation of diesel oil and heavy metal co-contaminated soil. *Process Biochem.* 47, 1649–1655. doi:10.1016/j.procbio.2011.10.001
- Staley, J.T., Konopka, A., 1985. Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu. Rev. Microbiol.* 39, 321–46. doi:10.1146/annurev.mi.39.100185.001541
- 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. doi:10.1016/j.biotechadv.2008.07.004
- Streit, W.R., Schmitz, R. a., 2004. Metagenomics - The key to the uncultured microbes. *Curr. Opin. Microbiol.* 7, 492–498. doi:10.1016/j.mib.2004.08.002
- Suenaga, H., 2012. Targeted metagenomics: A high-resolution metagenomics approach for specific gene clusters in complex microbial communities. *Environ. Microbiol.* 14, 13–22. doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02438.x
- Suenaga, H., Ohnuki, T., Miyazaki, K., 2007. Functional screening of a metagenomic library for genes involved in microbial degradation of aromatic compounds. *Environ. Microbiol.* 9, 2289–2297. doi:10.1111/j.1462-2920.2007.01342.x
- Sun, W., Xie, S., Luo, C., Cupples, A., 2010. Direct link between toluene degradation in contaminated-site micro- cosms and a *Polaromonas* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 956–959.
- Sutton, N.B., Maphosa, F., Morillo, J. a., Al-Soud, W.A., Langenhoff, A. a M., Grotenhuis, T., Rijnaarts, H.H.M., Smidt, H., 2013. Impact of long-term diesel contamination on soil microbial community structure. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 619–630. doi:10.1128/AEM.02747-12
- Tam, N., Wong, Y., 2008. Effectiveness of bacterial inoculum and mangrove plants on remediation of sediment contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mar. Pollut. Bull.* 57, 716–726. doi:10.1016/j.marpolbul.2008.02.029
- Tamaki, H., Wright, C.L., Li, X., Lin, Q., Hwang, C., Wang, S., Thimmapuram, J., Kamagata, Y., Liu, W.-T., 2011. Analysis of 16S rRNA amplicon sequencing options on the Roche/454 next-generation titanium sequencing platform. *PLoS One* 6, e25263. doi:10.1371/journal.pone.0025263
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007a. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24, 1596–1599. doi:10.1093/molbev/msm092
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007b. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24, 1596–1599. doi:10.1093/molbev/msm092
- Tanca, A., Palomba, A., Deligios, M., Cubeddu, T., Fraumene, C., Biossa, G., Pagnozzi, D., Addis, M.F., Uzzau, S., 2013. Evaluating the Impact of Different Sequence Databases on Metaproteome Analysis: Insights from a Lab-Assembled Microbial Mixture. *PLoS One* 8, e82981. doi:10.1371/journal.pone.0082981
- Tardy, V., Mathieu, O., Lévêque, J., Terrat, S., Chabbi, A., Lemanceau, P., Ranjard, L., Maron, P.A., 2014. Stability of soil microbial structure and activity depends on microbial diversity. *Environ. Microbiol. Rep.* 6, 173–183. doi:10.1111/1758-2229.12126
- Tauler, M., Vila, J., Nieto, J.M., Grifoll, M., 2015. Key high molecular weight PAH-degrading bacteria in a soil consortium enriched using a sand-in-liquid microcosm system. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*

doi:10.1007/s00253-015-7195-8

- Thalman, A., 1968. Zur methodik der Bestimmung der Dehydrogenase activit ? t im Boden Mittels Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC). *Landwirtsch. Forsch* 21, 249–258.
- Thavasi, R., V. R. M. Subramanyam Nambaru, S., Jayalakshmi, T.B., Banat, I.M., 2011. Biosurfactant Production by *Pseudomonas aeruginosa* from Renewable Resources. *Indian J. Microbiol.* 30–36.
- Thion, C., Cébron, A., Beguiristain, T., Leyval, C., 2013. Inoculation of PAH-degrading strains of *Fusarium solani* and *Arthrobacter oxydans* in rhizospheric sand and soil microcosms: microbial interactions and PAH dissipation. *Biodegradation* 24, 569–81. doi:10.1007/s10532-013-9628-3
- Thompson, I.P., van der Gast, C.J., Ciric, L., Singer, A.C., 2005. Bioaugmentation for bioremediation: the challenge of strain selection. *Environ. Microbiol.* 7, 909–15. doi:10.1111/j.1462-2920.2005.00804.x
- Tiwari, J.N., Reddy, M.M.K., Patel, D.K., Jain, S.K., Murthy, R.C., Manickam, N., 2010. Isolation of pyrene degrading *Achromobacter xylooxidans* and characterization of metabolic product. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 26, 1727–1733. doi:10.1007/s11274-010-0350-6
- Toledo, F.L., Calvo, C., Rodelas, B., González-López, J., 2006. Selection and identification of bacteria isolated from waste crude oil with polycyclic aromatic hydrocarbons removal capacities. *Syst. Appl. Microbiol.* 29, 244–52. doi:10.1016/j.syapm.2005.09.003
- Toledo, F.L., Gonzalez-Lopez, J., Calvo, C., 2008. Production of bioemulsifier by *Bacillus subtilis*, *Alcaligenes faecalis* and *Enterobacter* species in liquid culture. *Bioresour. Technol.* 99, 8470–5. doi:10.1016/j.biortech.2007.08.055
- Towell, M.G., Bellarby, J., Paton, G.I., Coulon, F., Pollard, S.J.T., Semple, K.T., 2011. Mineralisation of target hydrocarbons in three contaminated soils from former refinery facilities. *Environ. Pollut.* 159, 515–23. doi:10.1016/j.envpol.2010.10.015
- Treves, D.S., Xia, B., Zhou, J., Tiedje, J.M., 2003. A two-species test of the hypothesis that spatial isolation influences microbial diversity in soil. *Microb. Ecol.* 45, 20–8. doi:10.1007/s00248-002-1044-x
- Tritt, A., Eisen, J.A., Facciotti, M.T., Darling, A.E., 2012. An Integrated Pipeline for de Novo Assembly of Microbial Genomes. *PLoS One* 7.
- Tsibart, a. S., Gennadiev, a. N., 2013. Polycyclic aromatic hydrocarbons in soils: Sources, behavior, and indication significance (a review). *Eurasian Soil Sci.* 46, 728–741. doi:10.1134/S1064229313070090
- Tyagi, M., da Fonseca, M.M.R., de Carvalho, C.C.C.R., 2011. Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. *Biodegradation* 22, 231–41. doi:10.1007/s10532-010-9394-4
- Uhlik, O., Leewis, M.C., Strejcek, M., Musilova, L., Mackova, M., Leigh, M.B., Macek, T., 2013. Stable

- isotope probing in the metagenomics era: A bridge towards improved bioremediation. *Biotechnol. Adv.* 31, 154–165. doi:10.1016/j.biotechadv.2012.09.003
- Uzoigwe, C., Burgess, J.G., Ennis, C.J., Rahman, P.K.S.M., 2015. Bioemulsifiers are not biosurfactants and require different screening approaches. *Front. Microbiol.* 6, 1–6. doi:10.3389/fmicb.2015.00245
- Vainio, E.J., Moilanen, A., Koivula, T.T., Bamford, D.H., Hantula, J., 1997. Comparison of partial 16S rRNA gene sequences obtained from activated sludge bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48, 73–79. doi:10.1007/s002530051017
- Van der Meer, J., De Vos, W., Harayama, S., Zehnder, A., 1992. Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds. *Microbiol. Rev.* 56, 677–694.
- Van Elsas, J.D., Chiurazzi, M., Mallon, C.A., Elhottova, D., van Elsas, J.D., Chiurazzi, M., Mallon, C.A., Elhottova, D., Kristufek, V., Salles, J.F., 2012. Microbial diversity determines the invasion of soil by a bacterial pathogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 1159–1164. doi:10.1073/pnas.1109326109
- van Herwijnen, R., Joffe, B., Ryngaert, A., Hausner, M., Springael, D., Govers, H.A.J., Wuertz, S., Parsons, J.R., 2006. Effect of bioaugmentation and supplementary carbon sources on degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a soil-derived culture. *FEMS Microbiol Ecol* 55, 122–135. doi:10.1111/j.1574-6941.2005.00001.x
- van Kessel, M.A., Dutilh, B.E., Neveling, K., Kwint, M.P., Veltman, J. a, Flik, G., Jetten, M.S., Klaren, P.H., Op den Camp, H.J., 2011. Pyrosequencing of 16S rRNA gene amplicons to study the microbiota in the gastrointestinal tract of carp (*Cyprinus carpio* L.). *AMB Express* 1, 41. doi:10.1186/2191-0855-1-41
- Vasconcellos, S.P. De, Angolini, C.F.F., García, I.N.S., Martins Dellagnezze, B., Silva, C.C. Da, Marsaioli, A.J., Neto, E.V.D.S., de Oliveira, V.M., 2010. Reprint of: Screening for hydrocarbon biodegraders in a metagenomic clone library derived from Brazilian petroleum reservoirs. *Org. Geochem.* 41, 1067–1073. doi:10.1016/j.orggeochem.2010.08.003
- Vázquez, S., Nogales, B., Ruberto, L., Mestre, C., Christie-oleza, J., Ferrero, M., Bosch, R., Cormack, W.P. Mac, 2013. Characterization of bacterial consortia from diesel-contaminated Antarctic soils : Towards the design of tailored formulas for bioaugmentation. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 77, 22–30.
- Vecchioli, G.I., Del Panno, M.T., Paineira, M.T., 1990. Use of selected autochthonous soil bacteria to enhanced degradation of hydrocarbons in soil. *Environ. Pollut.* 67, 249–258. doi:10.1016/0269-7491(90)90190-N
- Viñas Canals, M., 2005. Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos : caracterización microbiológica , química y ecotoxicológica hidrocarburos : caracterización microbiológica , química y ecotoxicológica. *Microbiol. Madrid* 352.

- Viñas, M., Sabaté, J., Espuny, M.J., Anna, M., Vin, M., 2005a. Bacterial Community Dynamics and Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation during Bioremediation of Heavily Creosote-Contaminated Soil Bacterial Community Dynamics and Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation during Bioremediation of Heavily Creosote. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005, 71, 7008–7018. doi:10.1128/AEM.71.11.7008
- Viñas, M., Sabaté, J., Guasp, C., Lalucat, J., Solanas, A.M., 2005b. Culture-dependent and -independent approaches establish the complexity of a PAH-degrading microbial consortium. *Can. J. Microbiol.* 51, 897–909. doi:10.1139/w05-090
- Waigi, M.G., Kang, F., Goikavi, C., Ling, W., Gao, Y., 2015. Phenanthrene biodegradation by sphingomonads and its application in the contaminated soils and sediments: A review. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 104, 333–349. doi:10.1016/j.ibiod.2015.06.008
- 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, 1948–63. doi:10.1111/j.1462-2920.2008.01611.x
- Wang, J., Xu, H., Guo, S., 2008. Isolation and characteristics of a microbial consortium for effectively degrading phenanthrene. *Pet. Sci.* 4, 68–75. doi:10.1007/s12182-007-0012-y
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J., 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173, 697–703.
- Williams, M. a., Taylor, E.B., Mula, H.P., 2010. Metaproteomic characterization of a soil microbial community following carbon amendment. *Soil Biol. Biochem.* 42, 1148–1156. doi:10.1016/j.soilbio.2010.03.021
- Wilmes, P., Bond, P.L., 2006. Metaproteomics: Studying functional gene expression in microbial ecosystems. *Trends Microbiol.* 14, 92–97. doi:10.1016/j.tim.2005.12.006
- Wilmes, P., Heintz-Buschart, A., Bond, P.L., 2015. A decade of metaproteomics: Where we stand and what the future holds. *Proteomics* 3409–3417. doi:10.1002/pmic.201500183
- 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 65, 80–87.
- Wonham, M.J., O'Connor, M., Harley, C.D.G., 2005. Positive effects of a dominant invader on introduced and native mudflat species. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 289, 109–116. doi:10.3354/meps289109
- Wrenn, B.A., Venosa, A.D., 1996. Selective enumeration of aromatic and aliphatic hydrocarbon degrading bacteria by a most-probable-number procedure. *Can. J. Microbiol.* 42, 252–8.
- Xie, S., Sun, W., Luo, C., Cupples, A.M., 2011. Novel aerobic benzene degrading microorganisms identified in three soils by stable isotope probing. *Biodegradation* 22, 71–81.

doi:10.1007/s10532-010-9377-5

- Yrjälä, K., Keskinen, A.K., Åkerman, M.L., Fortelius, C., Sipilä, T.P., 2010. The rhizosphere and PAH amendment mediate impacts on functional and structural bacterial diversity in sandy peat soil. *Environ. Pollut.* 158, 1680–1688. doi:10.1016/j.envpol.2009.11.026
- Yu, K.S.H., Wong, a. H.Y., Yau, K.W.Y., Wong, Y.S., Tam, N.F.Y., 2005. Natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation on biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in mangrove sediments. *Mar. Pollut. Bull.* 51, 1071–1077. doi:10.1016/j.marpolbul.2005.06.006
- Yuan, S.Y., Wei, S.H., Chang, B. V, 2000. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a mixed culture. *Chemosphere* 41, 1463–8.
- Zhang, X.-X., Cheng, S.-P., Zhu, C.-J., Sun, S.-L., 2006. Microbial PAH-Degradation in Soil: Degradation Pathways and Contributing Factors. *Pedosphere* 16, 555–565. doi:10.1016/S1002-0160(06)60088-X
- Zhao, D., Liu, C., Liu, L., Zhang, Y., Liu, Q., Wu, W.M., 2011. Selection of functional consortium for crude oil-contaminated soil remediation. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 65, 1244–1248. doi:10.1016/j.ibiod.2011.07.008
- Zhong, L., Zhou, L., Wang, S., 2010. Isolation and Identification of Phenanthrene Degrading Bacteria and Their Roles in Bioremediation of Phenanthrene-contaminated Soil. *J. Agro-Environment Sci.* 29, 465–70.
- Zhong, Y., Luan, T., Lin, L., Liu, H., Tam, N.F.Y., 2011. Production of metabolites in the biodegradation of phenanthrene, fluoranthene and pyrene by the mixed culture of *Mycobacterium* sp. and *Sphingomonas* sp. *Bioresour. Technol.* 102, 2965–72. doi:10.1016/j.biortech.2010.09.113
- Zhou, H.W., Guo, C.L., Wong, Y.S., Tam, N.F.Y., 2006. Genetic diversity of dioxygenase genes in polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from mangrove sediments. *FEMS Microbiol. Lett.* 262, 148–57. doi:10.1111/j.1574-6968.2006.00379.x
- Zocca, C., Gregorio, S., Visentini, F., Vallini, G., 2004. Biodiversity amongst cultivable polycyclic aromatic hydrocarbon-transforming bacteria isolated from an abandoned industrial site. *FEMS Microbiol. Lett.* 238, 375–382. doi:10.1111/j.1574-6968.2004.tb09779.x
- Zou, C., Wang, M., Xing, Y., Lan, G., Ge, T., Yan, X., Gu, T., 2014. Characterization and optimization of biosurfactants produced by *Acinetobacter baylyi* ZJ2 isolated from crude oil-contaminated soil sample toward microbial enhanced oil recovery applications. *Biochem. Eng. J.* 90, 49–58. doi:10.1016/j.bej.2014.05.007
- Zrafi-Nouira, I., Saidane-Mosbahi, D., 2012. Crude Oil Metagenomics for Better Bioremediation of Contaminated Environments, in: “Introduction to Enhanced Oil Recovery (EOR) Processes and Bioremediation of Oil-Contaminated Sites.” p. 31. doi:10.5772/2053



Capítulo IX

Material suplementario



IX Material suplementario

Tabla IV.1 Comparación de 3 scaffolds que presentan genes codificantes de proteínas que participan en la vía de degradación de PAH. ^(a) % de similitud con respecto a los genes del scaffold 1 del pool 1. La comparación se realizó en base al scaffold 1 del pool 1 debido a que presentó mayor número de CDS de los tres scaffolds comparados.

Scaffold 1 pool 1		Scaffold 1 pool 2			Scaffold 1 pool 3		
Gen	Función	Gen	% de similitud ^a	Función	Gen	% de similitud ^a	Función
1	2-hidroxicromeno-2-carboxilato isomerasa	45	50.91	2-hidroxicromeno-2-carboxilato isomerasa	2	98.55	Familia de proteína 2-hidroxicromeno-2-carboxilato isomerasa dependiente de glutatión
2	Proteína hipotética		0		3	100	Proteína hipotética
3	Proteína hipotética		0			0	
4	Proteína hipotética		0		5	100	Proteína hipotética
5	Proteína hipotética		0		6	100	Proteína hipotética
6	Regulador positivo de fenol hidroxilasa		0		7	100	Regulador positivo de fenol hidroxilasa
7	Proteína hipotética		0		8	100	Proteína hipotética
8	Nitriloacetato monooxigenasa, componente A (EC 1.14.13.-)		0		11	100	Nitriloacetato monooxigenasa, componente A (EC 1.14.13.-)
9	Proteína hipotética		0		12	100	Proteína hipotética
10	2-deshidropantoato 2-reductasa (EC 1.1.1.169)		0		13	100	2-deshidropantoato 2-reductasa (EC 1.1.1.169)
11	4-hidroxi-tetrahidrodipicolato sintasa (EC 4.3.3.7)		0		14	100	4-hidroxi-tetrahidrodipicolato sintasa (EC 4.3.3.7)
12	Proteína hipotética	61	100	Proteína hipotética	15	100	Proteína hipotética
13	4-hidroxitreonina 4-fosfato deshidrogenasa (EC 1.1.1.262)	60	100	4-hidroxitreonina 4-fosfato deshidrogenasa (EC 1.1.1.262)	16	100	4-hidroxitreonina 4-fosfato deshidrogenasa (EC 1.1.1.262)
14	Benzoato 1,2-dioxigenasa, subunidad beta (EC 1.14.12.10)	59	100	Benzoato 1,2-dioxigenasa, subunidad beta (EC 1.14.12.10)	17	100	Benzoato 1,2-dioxigenasa, subunidad beta (EC 1.14.12.10)
15	Benzoato 1,2-dioxigenasa, subunidad alpha (EC 1.14.12.10)	58	100	Benzoato 1,2-dioxigenasa, subunidad alpha (EC 1.14.12.10)	18	100	Benzoato 1,2-dioxigenasa, subunidad alpha (EC 1.14.12.10)
16	Colina deshidrogenasa (EC 1.1.99.1)	57	100	Colina deshidrogenasa (EC 1.1.99.1)	19	100	Colina deshidrogenasa (EC 1.1.99.1)
17	Orto-halobenzoato 1,2-dioxigenasa beta-ISP proteína OhbA	56	100	Orto-halobenzoato 1,2-dioxigenasa beta-ISP proteína OhbA	20	99.38	Orto-halobenzoato 1,2-dioxigenasa beta-ISP proteína OhbA

18	Naph/bph dioxigenasa, subunidad grande	55	100	Naph/bph dioxigenasa, subunidad grande	21	100	Naph/bph dioxigenasa, subunidad grande
19	Proteína de transporte de ácidos grasos de cadena larga	54	100	Proteína de transporte de ácidos grasos de cadena larga	22	100	Proteína de transporte de ácidos grasos de cadena larga
20	4-hidroxi-tetrahidrodipicolato sintasa (EC 4.3.3.7)	53	100	4-hidroxi-tetrahidrodipicolato sintasa (EC 4.3.3.7)	23	100	4-hidroxi-tetrahidrodipicolato sintasa (EC 4.3.3.7)
21	Tolueno 4-monooxigenasa, subunidad TmoF	52	100	Tolueno 4-monooxigenasa, subunidad TmoF	24	100	Tolueno 4-monooxigenasa, subunidad TmoF
22	2-hidroxi-6-oxo-6-fenilhexa-2,4-dienoato hidrolasa (EC 3.7.1.-)	51	100	2-hidroxi-6-oxo-6-fenilhexa-2,4-dienoato hidrolasa (EC 3.7.1.-)	25	100	2-hidroxi-6-oxo-6-fenilhexa-2,4-dienoato hidrolasa (EC 3.7.1.-)
23	Proteína de la familia luciferasa	50	100	Proteína de la familia luciferasa	26	100	Proteína de la familia luciferasa
24	Subunidad ferredoxina de nitrato reductasa y dioxigenasas hidroxilantes de compuestos aromáticos	49	100	Subunidad ferredoxina de nitrato reductasa y dioxigenasas hidroxilantes de compuestos aromáticos	27	100	Subunidad ferredoxina de nitrato reductasa y dioxigenasas hidroxilantes de compuestos aromáticos
25	2,3-dihidroxibifenilo 1,2-dioxigenasa (EC 1.13.11.39)	48	100	2,3-dihidroxibifenilo 1,2-dioxigenasa (EC 1.13.11.39)	28	100	2,3-dihidroxibifenilo 1,2-dioxigenasa (EC 1.13.11.39)
26	Proteína hipotética		0			0	
27	Quinona oxidorreductasa (EC 1.6.5.5)	46	100	Quinona oxidorreductasa (EC 1.6.5.5)	29	100	Quinona oxidorreductasa (EC 1.6.5.5)
28	2-hidroxicromeno-2-carboxilato isomerasa	45	100	2-hidroxicromeno-2-carboxilato isomerasa	30	100	2-hidroxicromeno-2-carboxilato isomerasa
29	Toluato/benzoato dioxigenasa, subunidad grande	44	100	Toluato/benzoato dioxigenasa, subunidad grande	31	100	Toluato/benzoato dioxigenasa, subunidad grande
30	Orto-halobenzoato 1,2-dioxigenasa beta-ISP proteína OhbA	43	100	Orto-halobenzoato 1,2-dioxigenasa beta-ISP proteína OhbA	32	100	Orto-halobenzoato 1,2-dioxigenasa beta-ISP proteína OhbA
31	1,2-dihidrociclohexa-3,5-dieno-1-carboxilato deshidrogenasa (EC 1.3.1.25)	42	100	1,2-dihidrociclohexa-3,5-dieno-1-carboxilato deshidrogenasa (EC 1.3.1.25)	33	100	1,2-dihidrociclohexa-3,5-dieno-1-carboxilato deshidrogenasa (EC 1.3.1.25)
32	2-hidroximucónico semialdehído hidrolasa (EC 3.7.1.9)	41	100	2-hidroximucónico semialdehído hidrolasa (EC 3.7.1.9)	34	100	2-hidroximucónico semialdehído hidrolasa (EC 3.7.1.9)
33	Glutatión S-transferasa (EC 2.5.1.18)	40	100	Glutatión S-transferasa (EC 2.5.1.18)	35	100	Glutatión S-transferasa (EC 2.5.1.18)

58	Proteína de elemento móvil	11	100	Proteína de elemento móvil	62	100	Proteína de elemento móvil
59	Proteína hipotética	10	100	Proteína hipotética	63	100	Proteína hipotética
60	Proteína de elemento móvil	9	100	Proteína de elemento móvil	64	100	Proteína de elemento móvil
61	Proteína de elemento móvil	8	100	Proteína de elemento móvil	65	100	Proteína de elemento móvil
62	Proteína de elemento móvil	7	100	Proteína de elemento móvil	66	100	Proteína de elemento móvil
63	Proteína de elemento móvil	6	100	Proteína de elemento móvil	67	100	Proteína de elemento móvil
64	Proteína hipotética		0			0	
65	Proteína de transferencia conjugativa traA	5	100	Proteína de transferencia conjugativa traA	68	100	Proteína de transferencia conjugativa traA
66	Proteína hipotética	4	100	Proteína hipotética	69	99.79	Proteína hipotética
67	Proteína hipotética		0			0	
68	Proteína hipotética	2	97.87	Proteína hipotética		0	
69	Proteína hipotética	1	100	Proteína hipotética		0	
70	Proteína hipotética		0			0	
71	Proteína hipotética		0			0	
72	CP4-57 proteína reguladora alpA		0			0	
73	Proteína hipotética		0			0	
74	Proteína hipotética		0			0	
75	Proteína hipotética		0			0	
76	Y4hR		0			0	
77	Proteína de elemento móvil		0			0	
78	Proteína hipotética		0			0	

Tabla IV.S2Asignación funcional de los genes encontrados en RAST en el scaffold 1 del pool 1. Se muestra el primer alineamiento en BLASTp. -: Ninguna similitud significativa encontrada

Función (RAST)	BLASTp		
	Descripción	Identidad	Número de acceso
2-hidroxicromeno-2-carboxilato isomerasa	2-hidroxicromeno-2-carboxilato isomerasa [<i>Burkholderia</i> sp. K24]	98%	WP_051743458.1
Proteína hipotética	-		
Proteína hipotética	Proteína de transporte Sulfato ABC [<i>Galdieria sulphuraria</i>]	32%	YP_009051123.1
Proteína hipotética	Proteína hipotética UCDDA912_g10191 [<i>Diaporthe ampelina</i>]	48%	KKY29878.1
Proteína hipotética	-		
Regulador positivo de fenol hidroxilasa	Regulador trasncricional de la familia Fis [<i>Burkholderia</i> sp. K24]	99%	WP_030101497.1

Proteína hipotética	-		
Nitriloacetato monooxigenasa, componente A (EC 1.14.13.-)	monooxigenasa [<i>Rhodocyclaceae</i> bacterium PG1-Ca6]	74%	AJP47767.1
Proteína hipotética	5-metil tetrahidrofolato-homocistein metil transferasa [<i>Pseudoxanthomonassuwonensis</i>]	37%	WP_024869082.1
2-deshidropantoato 2-reductasa (EC 1.1.1.169)	Proteína hipotética [<i>Burkholderia</i> sp. K24]	100%	WP_030101494.1
4-hidroxi-tetrahidrodipicolato sintasa (EC 4.3.3.7)	dihidrodipicolinosintetasa [<i>Burkholderia</i> sp. K24]	99%	WP_030101493.1
Proteína hipotética	-		
4-hidroxitreonina 4-fosfato deshidrogenasa (EC 1.1.1.262)	4-hidroxitreonina 4-fosfato deshidrogenasa [<i>Burkholderia</i> sp. K24]	99%	WP_030101492.1
Benzoato 1,2-dioxigenasa, subunidad beta (EC 1.14.12.10)	Proteína hipotética [<i>Burkholderia</i> sp. K24]	100%	WP_030101491.1
Benzoato 1,2-dioxigenasa, subunidad alpha (EC 1.14.12.10)	benzeno 1,2-dioxigenase [<i>Burkholderia</i> sp. K24]	99%	WP_030101490.1
Colina deshidrogenasa (EC 1.1.99.1)	Proteína hipotética [<i>Burkholderia</i> sp. K24]	99%	WP_030101489.1
Orto-halobenzoato 1,2-dioxigenasa beta-ISP preteína OhbA	Proteína hipotética [<i>Burkholderia</i> sp. K24]	100%	WP_030101488.1
Naph/bph dioxigenasa, subunidad grande	Proteína que contiene el dominio Rieske (2Fe-2S) [<i>Burkholderia</i> sp. Ch1-1]	99%	EIF28468.1
Proteína de transporte de ácidos grasos de cadena larga	Proteína de transporte de ácidos grasos de cadena larga [<i>Burkholderia</i> sp. Ch1-1]	99%	EIF28467.1
4-hidroxi-tetrahidrodipicolato sintasa (EC 4.3.3.7)	aldolase [<i>Burkholderia</i> sp. Ch1-1]	100%	WP_007179229.1
Tolueno 4-monooxigenasa, subunidad TmoF	ferredoxina reductasa DbtAa [<i>Burkholderiafungorum</i>]	100%	AGN90994.1
2-hidroxi-6-oxo-6-fenilhexa-2,4-dienoato hidrolasa (EC 3.7.1.-)	hidrolasa [<i>Burkholderia</i> sp. DBT1]	99%	AAK96192.1
Proteína de la familia luciferasa	oxidoreductasa dependiente de flavina [<i>Burkholderia</i> sp. K24]	99%	WP_035519965.1
Subunidad ferredoxina de nitrato reductasa y dioxigenasas hidroxilantes de compuestos aromáticos	ferredoxina DbtAb [<i>Burkholderiafungorum</i>]	100%	AGN90995.1
2,3-dihidroxibifenilo 1,2-dioxigenasa (EC 1.13.11.39)	naftaleno 1,2-dioxigenasa [<i>Burkholderia</i> sp. K24]	99%	WP_030101481.1
Proteína hipotética	-		
Quinona oxidoreductasa (EC 1.6.5.5)	Oxidoreductasa [<i>Burkholderia</i> sp. DBT1]	99%	AAK96188.1
2-hidroxicromeno-2-carboxilato isomerasa	Isomerasa [<i>Burkholderia</i> sp. DBT1]	98%	AAK96187.1
Toluato/benzoato dioxigenasa, subunidad grande	Proteína Rieske (2Fe-2S) [<i>Burkholderia</i> sp. HB1]	98%	WP_053858390.1
Orto-halobenzoato 1,2-dioxigenasa beta-ISP preteína OhbA	antranilato 1,2-dioxigenase [<i>Burkholderia</i> sp. K24]	100%	KFX63966.1
1,2-dihidrociclohexa-3,5-dieno-1-carboxilato deshidrogenasa (EC 1.3.1.25)	1,6-dihidroxiciclohexa-2,4-dieno-1-carboxilato dehydrogenase [<i>Burkholderia</i> sp. K24]	98%	WP_030101476.1
2-hidroximucónico semialdehído hidrolasa (EC 3.7.1.9)	2-hidroxi-6-oxo-2,4-heptadienoato hidrolasa [<i>Burkholderia</i> sp. K24]	97%	WP_030101475.1
Glutathión S-transferasa (EC 2.5.1.18)	glutathione S-transferase [<i>Burkholderia</i> sp. K24]	99%	WP_030101474.1
4-oxalocrotonato tautomerasa (EC 5.3.2.-)	4-oxalocrotonato tautomerasa [<i>Burkholderia</i> sp. K24]	100%	WP_030101473.1
4-oxalocrotonato descarboxilasa (EC 4.1.1.77)	4-oxalocrotonato descarboxilasa [<i>Burkholderia</i> sp. K24]	98%	WP_030101472.1

4-hidroxi-2-oxoalderato aldolasa (EC 4.1.3.39)	4-hidroxi-2-oxoalderato aldolasa [<i>Burkholderia</i> sp. HB1]	99%	WP_053858391.1
Acetaldehído deshidrogenasa (EC 1.2.1.10), en cluster de genes de la degradación de fenol, cresol y catecol	Acetaldehído deshidrogenasa [<i>Burkholderia</i> sp. K24]	98%	WP_030101470.1
4-oxalocrotonato descarboxilasa (EC 4.1.1.77)	2-keto-4-pentenoato hidratasa [<i>Burkholderia</i> sp. HB1]	100%	WP_053858392.1
5-carboximetil-2-hidroxiuconato semialdehído oxidoreducata (EC 1.2.1.60)	betaina-aldehído deshidrogenasa [<i>Burkholderia</i> sp. K24]	99%	WP_030101468.1
Catecol 2,3-dioxigenasa (EC 1.13.11.2)	catechol 2,3-dioxygenase [<i>Burkholderiasartisoli</i>]	100%	AAF02426.1
Proteína Hierro-Azufre	ferredoxina [<i>Burkholderia</i> sp. K24]	100%	WP_030101466.1
Proteína hipotética	-		
Proteína hipotética	Glutamil-tRNA sintetasa [<i>Coccidioidesposadasii</i> RMSCC 3488]	38%	KMM73106.1
Proteína hipotética	MULTISPECIES: ACP S-Malonil transferasa [<i>Microbacterium</i>]	41%	WP_028495634.1
Proteína reguladora GntR, HTH:GntR, C-terminal	Regulador transcripcional [<i>Dechloromonas aromatica</i>]	60%	WP_011289515.1
Proteína de elemento móvil	Proteína hipotética [<i>Cupriavidus basilensis</i>]	85%	WP_017225076.1
Proteína de elemento móvil	transposasa [<i>Burkholderia oklahomensis</i>]	78%	WP_045568293.1
Transportador 4-hidroxibenzoato	Transportador 4-hidroxibenzoato [<i>Burkholderia</i> sp. HB1]	99%	WP_053858401.1
Porina	Proteína hipotética [<i>Burkholderia</i> sp. HB1]	100%	WP_053858402.1
Proteína de elemento móvil	Proteína de elemento móvil [<i>Ralstoniasolanacearum</i> FQY_4]	72%	AGH87143.1
Proteína de elemento móvil	Proteína de elemento móvil [<i>Ralstoniasolanacearum</i>]	74%	WP_020829879.1
Proteína de elemento móvil	Transposasa [<i>Burkholderia</i> sp. WSM4176]	86%	WP_018420966.1
Proteína de elemento móvil	Transposasa [<i>Burkholderia</i> sp. WSM4176]	93%	WP_018420966.1
Integrasa/recombinasa	integrasa [<i>Burkholderia</i> sp. Ch1-1]	100%	WP_007179160.1
Integrasa/recombinasa	integrasa [<i>Burkholderia</i> sp. Ch1-1]	100%	WP_007179161.1
Integrasa/recombinasa	integrasa [<i>Burkholderia</i> sp. Ch1-1]	100%	WP_007179162.1
Proteína de elemento móvil	Transposasa [<i>Burkholderiaambifaria</i> MEX-5]	85%	EDT37225.1
Proteína de elemento móvil	Familia de protein transposasa [<i>Burkholderiaoklahomensis</i>]	91%	AIO68298.1
Proteína hipotética	-		
Proteína de elemento móvil	Proteína de elemento móvil [<i>Ralstoniasolanacearum</i>]	74%	WP_020829879.1
Proteína de elemento móvil	endonucleasa [<i>Burkholderiamimosarum</i>]	95%	WP_042293423.1
Proteína de elemento móvil	transposasa [<i>Burkholderia mimosarum</i>]	85%	WP_036047363.1
Proteína de elemento móvil	endonucleasa [<i>Burkholderia fungorum</i>]	95%	WP_027693486.1
Proteína hipotética	-		
Proteína de transferencia conjugativa traA	Proteína de movilización del plásmido [<i>Burkholderia fungorum</i>]	99%	WP_046568695.1
Hypothetical protein	-		

Proteína hipotética	Proteína hipotética [<i>Burkholderia</i> sp. HB1]	99%	WP_053858404.1
Proteína hipotética	Proteína hipotética [<i>Burkholderia</i> sp. HB1]	98%	WP_053858406.1
Proteína hipotética	Proteína hipotética [<i>Burkholderia</i> sp. HB1]	99%	WP_053858407.1
Proteína hipotética	-		
Proteína hipotética	Proteína hipotética [<i>Burkholderia</i> sp. HB1]	100%	WP_053858408.1
CP4-57 proteína reguladora alpA	Proteína hipotética AC233_11335 [<i>Burkholderia</i> sp. HB1]	99%	ALE55200.1
Proteína hipotética	tonB, familia SusC/RagA [<i>Bacteroides fragilis</i> str. S23 R14]	36%	EXZ99061.1
Proteína hipotética	Proteína hipotética [<i>Burkholderia</i> sp. HB1]	100%	WP_053858410.1
Proteína hipotética	Proteína hipotética [<i>Burkholderia</i> sp. HB1]	100%	WP_053858411.1
Y4hR	Preproteína traslocas, subunidadt SecA [<i>Burkholderiafungorum</i>]	98%	AJZ63658.1
Proteína de elemento móvil	endonucleasa DDE [<i>Burkholderia</i> sp. Ch1-1]	98%	WP_007179771.1
Proteína hipotética	Proteína hipotética [<i>Burkholderia</i> sp. HB1]	99%	WP_053858412.1

Figura IV.S1. Duplicado del análisis por electroforesis bidimensional de dos condiciones distintas de CON. Concentración de proteínas a ambos tiempos de incubación $2,16 \text{ mg.ml}^{-1}$.

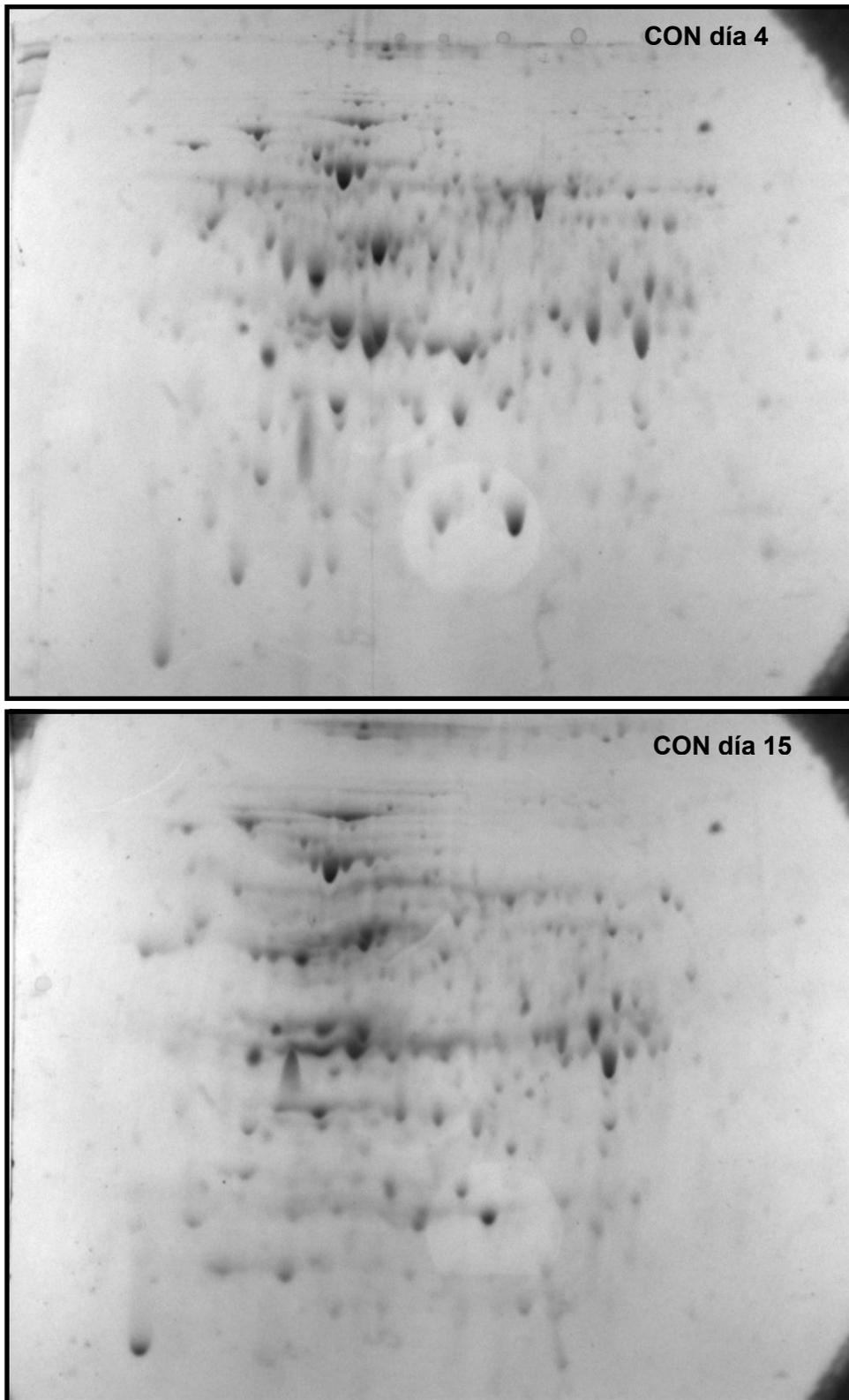


Tabla V.S1. Secuencias del gen 16S rRNA más cercanamente relacionadas a cada secuencia presente en los clones estudiados. ^a Número de acceso a GenBank de la secuencia más cercanamente relacionada. Referencias de filo: *Acidobacteria* (ACB), *Actinobacteria* (ACT), *Bacteroidetes* (B), *Firmicutes* (F), *Gemmatimonadetes* (G), *Proteobacteria* (P), *Thermotogae* (T) y Unknown (U). ^aNúmero de acceso a GenBank de la secuencia más cercanamente relacionada

	(Filo) Secuencia del gen 16S rRNA más cercanamente relacionada	N° acceso ^a	% de similitud
SP	1 (ACB) Uncultured Acidobacteria bacterium clone KBS_T1_R1_149276_e10	HM062353.1	96%
	2 (ACT)Uncultured Frankiaceae bacterium clone Amb_16S_866	EF018595.1	99%
	3 (ACB) Uncultured Acidobacteria bacterium clone HEW_08_071	HQ598440.1	89%
	4 (F) Uncultured Firmicutes bacterium clone GASP-WA1W2_G06	EF072431.1	96%
	5 (P) Uncultured gamma proteobacterium clone sw-xj121	GQ302552.1	99%
	6 (U) Uncultured bacterium isolate DGGE gel band LK11_23	GQ336946.1	95%
	7 (P) Uncultured proteobacterium clone GASP-MA2W2_C03	EF663211.1	99%
	8 (T) Uncultured Thermotogae bacterium clone GASP-KB1W2_F02	EU297818.1	93%
	9 (ACB) Uncultured Acidobacteria bacterium clone SEG_08_307	HQ597897.1	96%
	10 (G) Uncultured Gemmatimonadetes bacterium clone GASP-WC2W1_E07	EF075191.1	98%
	11 (P) Uncultured gamma proteobacterium	AB252884.1	98%
	12 (P) Uncultured Rhodoplanes sp. clone GASP-KB2S2_D01	EU298111.1	99%
	13 (ACT) Uncultured Rubrobacteridae bacterium clone EB1058	AY395377.1	94%
	14 (ACB) Uncultured Acidobacteria bacterium clone KBS_T8_R1_149288_d9	HM061725.1	99%
	15 (P) Uncultured Rhodoplanes sp. clone GASP-WB1S3_D05	EF073507.1	99%
	16 (G) Uncultured Gemmatimonadetes bacterium clone EB1081	AY395400.1	98%
	17 (P) Bradyrhizobium sp. ARR494	HE576466.1	99%
	18 (U) Uncultured bacterium clone p8o06ok	FJ479057.1	100%
	19 (F) Uncultured Firmicutes bacterium clone GASP-MB3S1_H10	EF665537.1	96%
Phe	20 (P) Novosphingobium sp. SaCR4	JQ806421.1	99%
	21 (P) Novosphingobium sp. SaCR4	JQ806421.1	99%
	22 (ACB) Candidatus Solibacter usitatus clone P1s-321	GQ287461.1	99%
	23 (P) Novosphingobium sp. SaCR4	JQ806421.1	99%
	24 (ACB) Uncultured Acidobacteriales bacterium clone Plot22-2C04	EU665015.1	99%
	25 (P) Novosphingobium sp. SaCR4	JQ806421.1	99%
	26 (P) Uncultured proteobacterium clone Amb_16S_684	EF018318.1	99%
	27 (ACB) Uncultured Acidobacteria bacterium clone KBS_T1_R2_149270_h3	HM062131.1	93%
	28 (P) Uncultured Rhodocyclaceae bacterium clone Amb_16S_972	EF018681.1	99%

	29	(P) Uncultured Desulfovirga sp. clone D.an-38	JX505105.1	92%
	30	(F) Uncultured Firmicutes bacterium clone GASP-KC1S3_E01	EU299280.1	93%
	31	(P) Uncultured gamma proteobacterium clone QuLP2H5	JQ253501.1	93%
	32	(ACB) Uncultured Acidobacteriales bacterium clone Plot4-2C10	EU449661.1	99%
	33	(P) Novosphingobium pentaromatorans US6-1	CP009291.1	94%
	34	(P) Novosphingobium sp. DC-9	KC410867.1	99%
	35	(P) Uncultured bacterium clone a1	HM047771.1	100%
	36	(U) Uncultured bacterium clone p7e17ok	FJ478896.1	99%
	37	(P) Uncultured bacterium clone a1	HM047771.1	98%
	38	(P) Uncultured bacterium clone a1	HM047771.1	100%
	39	(ACT) Arthrobacter sp. B24(2013)	KC693706.1	100%
	40	(U) Uncultured bacterium clone EMIRGE_OTU_s3t2d_367	JX222646.1	90%
	41	(P) Cupriavidus sp. A26(2012)	JX941525.1	99%
	42	(U) Uncultured bacterium isolate 1112851587040	HQ118724.1	99%
	43	(P) Achromobacter sp. I_43-J6PA9A	JQ917807.1	99%
	44	(ACB) Uncultured Acidobacteria bacterium clone SEW_08_290	HQ598997.1	100%
	45	(ACB) Uncultured Acidobacteriales bacterium clone Plot29-2C01	EU202756.1	99%
	46	(F) Uncultured Firmicutes bacterium clone GASP-MA2W3_D04	EF663318.1	98%
	47	(U) Uncultured bacterium clone GL29901b02	JF265690.1	97%
	48	(G) Uncultured Gemmatimonadetes bacterium clone GASP-WB1W3_B09	EF073750.1	97%
	49	Uncultured bacterium clone GL29901b02	JF265690.1	97%
	50	(P) Achromobacter sp. NCCP-1102	LC065129.1	99%
	51	(P) Uncultured Burkholderia sp.	FN394970.1	100%
Phe+CON	52	(P) Uncultured Myxococcales bacterium clone Plot17-2D03	EU440669.1	99%
	53	(U) Uncultured bacterium clone ncd2724g08c1	JF235499.1	99%
	54	(P) Sphingomonas agrestis strain DP682	AY521016.2	100%
	55	(P) Sphingomonas agrestis strain DP682	AY227699.2	99%
	56	(U) Uncultured bacterium clone I1N-E18-C_C11	HM125356.1	99%
	57	(P) Sphingomonas agrestis strain DP682	AY227699.2	100%
	58	(U) Uncultured bacterium clone MA72_2004T1d_C08	EF378459.1	98%
	59	(U) Uncultured bacterium clone C7 C3	GU366796.1	98%
	60	(P) Sphingobium sp. SC-D1	KC435016.1	89%
	62	(P) Uncultured Nitrosomonadaceae bacterium clone	EF018556.1	95%
	62	(P) Uncultured Sphingobium sp. clone H1-61	JF703413.1	92%

	63	(P) Sphingobium sp. AX-B	KM925003.2	100%
	64	(ACB) Uncultured Acidobacteria bacterium clone ZYs1-179	JX494018.1	95%
	65	(P) Sphingobium chungbukense	EU679660.1	100%
	66	(ACT) Uncultured Streptomyces sp. clone T1A-02	GQ369160.1	94%
	67	(U) Uncultured bacterium clone Elev_16S_1613	EF020173.1	100%
	68	(P) Uncultured beta proteobacterium clone GASP-KC1S3_C03	EU299260.1	99%
	69	(P) Sphingobium sp. KK22	HQ830159.1	100%
	70	(U) Uncultured bacterium clone DCP434	HQ265010.1	99%
	71	(P) Sphingobium sp. KK22	HQ830159.1	99%
	72	(U) Uncultured bacterium clone JH-WHS149	EF492930.1	99%
	73	(P) Sphingobium sp. KK22	HQ830159.1	100%
	74	(P) Sphingobium sp. KK22	HQ830159.1	99%
	75	(P) Sphingobium sp. KK22	HQ830159.1	100%
	76	(U) Uncultured bacterium clone QQSB09	JF417728.1	98%
	77	(ACT) Uncultured Conexibacter sp. clone B308	JF833635.1	99%
	78	(P) Sphingobium sp. KK22	HQ830159.1	99%
	79	(P) Sphingobium sp. KK22	HQ830159.1	99%
	80	(P) Sphingobium sp. KK22	HQ830159.1	97%
	81	(P) Sphingobium sp. KK22	HQ830159.1	100%
Phe+CD	82	(P) Sphingobium sp. KK22	HQ830159.1	99%
	83	(ACB) Uncultured Holophaga sp.	AJ536875.1	99%
	84	(P) Sphingobium sp. KK22	HQ830159.1	100%
	85	(B) Uncultured Bacteroidetes bacterium clone A24YE24RM	FJ569664.1	99%
	86	(P) Sphingobium sp. KK22	HQ830159.1	100%
	87	(P) Sphingobium sp. KK22	HQ830159.1	100%
	88	(P) Sphingobium sp. KK22	HQ830159.1	100%
	89	(G) Uncultured Gemmatimonadetes bacterium clone GASP-WB1W1_E10	EF073601.1	98%
	90	(P) Sphingobium sp. KK22	HQ830159.1	99%
	91	(P) Uncultured alpha proteobacterium clone A5YF01RM	FJ569944.1	94%
	92	(U) Uncultured bacterium isolate 1112855455149	HQ118219.1	96%
	93	(P) Sphingobium sp. KK22	HQ830159.1	100%
	94	(P) Sphingobium sp. KK22	HQ830159.1	100%
	95	(P) Sphingobium sp. KK22	HQ830159.1	100%
	96	(P) Uncultured Rhodoplanes sp. clone GASP-KC3W2_B10	EU300474.1	98%
	97	(U) Uncultured bacterium clone p35k06ok	FJ479049.1	98%

Tabla V.S2. Abundancia relativa de los principales filos bacterianos en cada microcosmo de suelo artificialmente contaminado con fenantreno a los 2, 14 y 63 días de incubación.

Filo	SP			Phe		Phe+CON		Phe+AM		SP+AM	
	d2	d14	d63	d14	d63	d14	d63	d14	d63	d14	d63
Acidobacteria	36.07	36.91	21.50	24.46	6.15	23.32	13.98	18.76	8.65	20.32	23.86
Actinobacteria	12.12	11.66	25.19	15.39	33.98	7.44	23.06	10.14	13.46	14.37	12.54
Bacteroidetes	1.44	0.96	1.40	0.53	0.38	0.69	1.18	0.74	1.33	3.07	2.73
Chloroflexi	7.82	10.70	8.68	5.24	3.93	5.80	4.75	7.78	3.72	6.80	8.01
Firmicutes	5.05	5.34	3.78	1.70	3.76	2.19	2.85	1.54	1.13	6.77	4.91
Gemmatimonadetes	3.12	3.81	6.54	1.87	1.96	2.13	4.68	1.46	1.93	5.35	7.29
Proteobacteria	19.18	21.71	25.16	35.19	48.22	33.63	45.89	51.31	53.22	34.08	33.44
Verrucomicrobia	14.04	7.49	6.73	14.67	1.40	24.03	3.06	6.97	16.06	8.52	6.68
Otros filos	1.15	1.41	1.02	0.96	0.23	0.78	0.54	1.31	0.51	0.71	0.53

TablaV.S3. Abundancia relativa de las clases de *Proteobacteria* en cada microcosmo de suelo artificialmente contaminado con fenantreno a los 2, 14 y 63 días de incubación.

Clase Proteobacteria	SP			Phe		Phe+CON		Phe+AM		SP+AM	
	d2	d14	d63	d14	d63	d14	d63	d14	d63	d14	d63
Alphaproteobacteria	33.43	32.75	49.32	62.79	89.77	57.76	72.02	72.82	77.49	68.87	63.75
Betaproteobacteria	11.82	14.71	13.56	16.03	4.40	18.87	11.98	11.17	10.30	11.02	12.06
Deltaproteobacteria	38.69	38.07	23.92	14.16	3.90	13.76	10.57	10.36	7.73	12.73	16.45
Epsilonproteobacteria	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.23	0.03
Gammaproteobacteria	16.06	14.46	13.19	7.02	1.93	9.60	5.42	5.65	4.47	7.14	7.70

Tabla V.S4. Abundancia relativa de los órdenes bacterianos en cada microcosmo de suelo artificialmente contaminado con fenantreno a los 2, 14 y 63 días de incubación.(C.: Candidatus)

Orden	SP			Phe		Phe+CON		Phe+AM		SP+AM	
	d2	d14	d63	d14	d63	d14	d63	d14	d63	d14	d63
Acidimicrobiales	1.56	1.10	1.99	0.15	0.65	0.54	0.99	0.55	0.79	1.38	1.07
Acidobacteriales	21.85	21.73	12.42	12.88	3.59	13.17	8.40	11.22	5.33	12.12	14.75

Actinomycetales	4.82	4.93	8.97	12.86	26.21	4.38	13.40	4.98	5.86	4.87	4.10
Alteromonadales	0.03	0.07	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.07	0.06	0.00	0.01
Anaerolineales	3.65	4.84	4.81	2.47	1.69	2.40	2.15	4.38	2.29	3.07	3.47
Bacillales	3.17	3.97	2.92	0.89	3.56	0.95	2.20	0.65	0.74	5.53	3.81
Bacteroidales	0.04	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.01	0.00	0.00
Bdellovibrionales	0.03	0.07	0.09	0.09	0.00	0.08	0.15	0.07	0.08	0.11	0.25
Burkholderiales	1.78	2.26	2.42	4.20	1.87	5.77	4.41	5.18	4.77	3.23	3.33
Caldilineales	0.67	0.94	0.19	0.34	0.32	0.52	0.82	0.27	0.35	0.61	0.87
Campylobacterales	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.08	0.01
C. Brocadiales	0.04	0.09	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00
C. Saccharibacteria	0.29	0.22	0.00	0.23	0.06	0.22	0.05	0.25	0.05	0.19	0.11
Caulobacterales	0.07	0.09	0.09	0.04	0.05	0.00	0.22	0.13	0.21	0.19	0.34
Chlamydiales	0.03	0.00	0.00	0.11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Chlorobiales	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.08	0.00
Chloroflexales	0.45	0.70	0.43	0.23	0.63	0.55	0.16	0.62	0.13	0.77	0.36
Chromatiales	0.25	0.14	0.28	0.02	0.00	0.15	0.09	0.62	0.09	0.08	0.10
Chroococcales	0.11	0.11	0.06	0.04	0.02	0.07	0.01	0.02	0.00	0.00	0.00
Clostridiales	0.74	0.70	0.34	0.26	0.18	0.61	0.33	0.49	0.28	1.03	0.96
Cytophagales	0.20	0.20	0.25	0.00	0.03	0.09	0.13	0.00	0.09	0.29	0.36
Dehalococcoidales	2.73	3.65	2.83	1.90	0.81	2.10	1.16	1.93	0.64	1.69	2.22
Desulfobacterales	1.05	0.92	0.22	0.43	0.09	0.43	0.27	0.60	0.16	0.13	0.21
Desulfovibrionales	0.00	0.00	0.00	0.09	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Desulfuromonadales	1.56	1.88	1.43	0.94	0.35	1.12	1.16	1.63	1.30	1.27	1.25
Elusimicrobiales	0.04	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Enterobacteriales	0.08	0.16	0.22	0.04	0.27	0.23	0.13	0.17	0.04	0.00	0.00
Entomoplasmatales	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Ferrovales	0.00	0.05	0.03	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Flavobacteriales	0.25	0.07	0.03	0.11	0.05	0.13	0.07	0.03	0.05	0.87	0.67
Fusobacteriales	0.20	0.02	0.12	0.04	0.05	0.05	0.13	0.00	0.05	0.05	0.05
Gaiellales	0.74	0.63	2.58	0.30	0.90	0.32	1.50	0.54	1.61	1.35	1.32
Gallionellales	0.06	0.02	0.06	0.06	0.03	0.00	0.05	0.03	0.06	0.08	0.05

Gemmatimonadales	3.13	3.81	6.55	1.87	1.96	2.13	4.69	1.46	1.94	5.35	7.29
Gloeobacterales	0.03	0.04	0.03	0.00	0.00	0.00	0.01	0.02	0.00	0.00	0.00
Haloplasmatales	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Holophagales	14.18	14.85	8.85	11.33	2.50	9.72	5.31	7.33	2.68	7.94	8.40
Hydrogenophilales	0.00	0.02	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.07
Ignavibacteriales	0.04	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Ktedonobacterales	0.07	0.09	0.16	0.00	0.18	0.08	0.24	0.25	0.25	0.56	0.75
Legionellales	0.01	0.07	0.31	0.19	0.00	0.03	0.11	0.00	0.03	0.05	0.20
Methylophilales	0.00	0.00	0.00	0.72	0.00	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Myxococcales	3.13	3.61	2.76	1.83	0.93	1.60	2.25	1.39	1.93	2.04	2.87
Nitrosomonadales	0.43	0.67	0.81	0.66	0.20	0.50	0.99	0.49	0.56	0.40	0.45
Nitrospinales	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.03	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00
Nitrospirales	0.28	0.49	0.40	0.38	0.05	0.30	0.27	0.18	0.18	0.32	0.26
Nostocales	0.00	0.09	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05	0.12	0.00	0.00
Oceanospirillales	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03
Opitutales	0.15	0.09	0.06	0.26	0.00	0.17	0.01	0.02	0.12	0.13	0.09
Planctomycetales	0.08	0.29	0.40	0.15	0.06	0.08	0.05	0.76	0.10	0.08	0.10
Pseudomonadales	1.82	1.86	0.93	1.83	0.38	2.08	0.87	1.11	0.54	0.42	0.54
Rhizobiales	3.13	2.71	7.79	2.17	3.45	2.26	5.86	4.26	6.77	9.61	9.85
Rhodobacterales	0.04	0.00	0.03	0.00	0.02	0.03	0.00	0.07	0.00	0.05	0.03
Rhodocyclales	0.00	0.18	0.06	0.00	0.03	0.03	0.06	0.03	0.10	0.05	0.14
Rhodospirillales	0.62	1.39	1.02	0.55	0.36	1.32	1.71	0.82	2.04	1.46	2.07
Rickettsiales	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.06	0.01	0.02	0.02	0.11	0.01
Rubrobacterales	0.14	0.23	0.22	0.17	0.21	0.18	0.15	0.30	0.10	0.24	0.10
Solibacterales	0.11	0.36	0.25	0.26	0.08	0.47	0.29	0.22	0.69	0.26	0.72
Solirubrobacterales	4.19	4.24	10.43	1.68	5.36	1.86	6.49	3.41	4.60	6.06	5.46
Sphaerobacterales	0.24	0.47	0.25	0.28	0.29	0.09	0.21	0.32	0.08	0.03	0.32
Sphingobacteriales	0.95	0.69	1.12	0.43	0.30	0.47	0.98	0.67	1.19	1.91	1.71
Sphingomonadales	2.54	2.93	3.42	19.31	39.42	15.78	25.31	32.08	32.34	12.07	9.03
Syntrophobacterales	1.65	1.79	1.52	1.62	0.51	1.37	1.04	1.63	0.64	0.79	0.92
Thermales	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.00	0.03	0.00	0.00	0.01

Thermoanaerobacterales	1.15	0.67	0.53	0.55	0.03	0.63	0.33	0.40	0.11	0.21	0.15
Thermoleophilales	0.66	0.52	0.99	0.23	0.60	0.17	0.50	0.32	0.55	0.48	0.49
Thermomicrobiales	0.03	0.02	0.03	0.02	0.02	0.07	0.02	0.02	0.00	0.08	0.03
Thiotrichales	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.04	0.00	0.01
Verrucomicrobiales	13.81	7.39	6.67	14.37	1.40	23.77	2.93	6.93	15.66	8.39	6.57
Xanthomonadales	0.88	0.79	1.58	0.38	0.27	0.75	1.29	0.94	1.57	1.88	1.65

Tabla V.S5. Abundancia relativa de los géneros bacterianos en cada microcosmo de suelo artificialmente contaminado con fenantreno a los 2, 14 y 63 días de incubación. (C.: Candidatus). Referencias de filos o clases *Acidobacteria* (ACB), *Actinobacteria* (ACT), *Alphaproteobacteria* (AP), *Bacteroidetes* (B), *Betaproteobacteria* (BP), *Chlamydiae* (CLD), *Chlorobia* (CLB), *Chloroflexi* (CL), *Cyanobacteria* (CY), *Deinococci* (D), *Deltaproteobacteria* (DP), *Elusimicrobia* (E), *Epsilonproteobacteria* (EP), *Firmicutes* (F), *Fusobacteria* (FSB), *Gammaproteobacteria* (GP), *Gemmatimonadetes* (G), *Nitrospirae* (N), *Planctomycetia* (PL), *Tenericutes* (T), *Unclassifiedbacteria* (UB) y *Verrucomicrobia* (V).

Género (Filo o clase)	SP			Phe		Phe+CON		Phe+AM		SP+AM	
	d2	d14	d63	d14	d63	d14	d63	d14	d63	d14	d63
Acetivibrio (F)	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Achromobacter (BP)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.72	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00
Acidibacter (GP)	0.00	0.04	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.00	0.02
Acidimicrobium (ACT)	0.14	0.09	0.12	0.06	0.03	0.03	0.07	0.02	0.06	0.24	0.25
Acidisphaera (AP)	0.00	0.07	0.12	0.00	0.00	0.08	0.04	0.12	0.09	0.03	0.18
Aciditerrimonas (ACT)	0.63	0.82	1.17	0.06	0.40	0.29	0.42	0.23	0.34	0.45	0.43
Acidobacterium (ACB)	20.29	20.57	11.51	12.11	3.33	12.37	7.34	10.58	3.97	10.20	13.11
Acidothermus (ACT)	0.03	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.01	0.02	0.04	0.03	0.00
Acidovorax (BP)	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02
Acinetobacter (GP)	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.01	0.41	0.00	0.00	0.02
Actinoallomurus (ACT)	0.42	0.41	0.93	0.06	0.96	0.05	0.58	0.60	0.51	0.13	0.16
Actinocatenispora (ACT)	0.07	0.05	0.03	0.02	0.06	0.07	0.21	0.13	0.06	0.00	0.02
Actinocorallia (ACT)	0.00	0.00	0.00	0.04	0.04	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Actinomadura (ACT)	0.03	0.00	0.03	0.02	0.01	0.00	0.01	0.00	0.02	0.00	0.00
Actinomyces (ACT)	0.38	0.86	0.43	0.38	0.15	0.37	0.21	0.12	0.06	0.16	0.08

Actinoplanes (ACT)	0.08	0.16	0.40	0.00	0.16	0.06	0.39	0.18	0.50	0.11	0.21
Actinotalea (ACT)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.03	0.00
Adhaeribacter (B)	0.11	0.09	0.00	0.00	0.01	0.06	0.06	0.00	0.02	0.08	0.06
Aeromicrobium (ACT)	0.08	0.07	0.06	0.21	0.21	1.18	2.77	0.35	0.42	0.03	0.08
Afipia (AP)	0.03	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Agrococcus (ACT)	0.04	0.05	0.00	0.00	0.01	0.00	0.05	0.02	0.01	0.05	0.03
Algorimarina (DP)	0.00	0.00	0.09	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03
Aliihoeflea (AP)	0.00	0.04	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Altererythrobacter (AP)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01
Alteromonas(GP)	0.03	0.07	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.07	0.06	0.00	0.01
Ammoniphilus (F)	0.00	0.04	0.00	0.00	0.07	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Amycolatopsis (ACT)	0.00	0.00	0.03	0.06	0.00	0.01	0.01	0.02	0.00	0.00	0.00
Anabaena (CY)	0.00	0.09	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05	0.12	0.00	0.00
Anaerobacterium (F)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00
Anaeromyxobacter (DP)	1.97	2.15	1.54	1.29	0.24	0.84	0.81	0.66	0.19	0.92	0.97
Anderseniella (AP)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.00
Angustibacter (ACT)	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.02	0.01	0.00	0.02
Anoxybacillus (F)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01
Aquabacterium (BP)	0.08	0.09	0.12	0.17	0.09	0.18	0.23	0.17	0.29	0.00	0.00
Aquicella(GP)	0.01	0.07	0.31	0.19	0.00	0.03	0.11	0.00	0.00	0.05	0.18
Archangium (DP)	0.04	0.00	0.00	0.00	0.07	0.00	0.00	0.00	0.02	0.03	0.00
Arcobacter (EP)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.08	0.01
Arenimonas(GP)	0.33	0.18	0.52	0.06	0.04	0.08	0.12	0.02	0.10	0.34	0.33
Arthrobacter (ACT)	0.06	0.00	0.00	9.18	16.74	0.05	0.06	0.02	0.04	0.21	0.01
Azoarcus (BP)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.04
Azorhizobium (AP)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.08	0.10
Azospirillum (AP)	0.18	0.18	0.12	0.08	0.06	0.11	0.25	0.08	0.36	0.32	0.44
Bacillus (F)	0.56	0.79	1.14	0.32	3.17	0.23	1.55	0.22	0.49	0.55	0.54
Bacteriovorax (DP)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03
Bacteroides (B)	0.04	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Bauldia (AP)	0.00	0.00	0.00	0.02	0.01	0.00	0.01	0.02	0.00	0.00	0.06

Bdellovibrio (DP)	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.01	0.00	0.00	0.03	0.00
Beggiatoa(GP)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.04	0.00	0.01
Beijerinckia (AP)	0.01	0.00	0.03	0.00	0.12	0.07	0.00	0.02	0.04	0.00	0.00
Bellilinea (CL)	0.03	0.00	0.15	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.08	0.00
Blastocatella (ACB)	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.02	0.00	0.00	0.00
Blastochloris (AP)	0.14	0.07	0.25	0.02	0.21	0.04	0.28	0.10	0.14	0.34	0.28
Blastococcus (ACT)	0.11	0.05	0.19	0.02	0.34	0.04	0.29	0.10	0.22	0.29	0.13
Bordetella (BP)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.05	0.16	0.00	0.00	0.00	0.00
Bosea (AP)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.01	0.08	0.01
Bradyrhizobium (AP)	0.18	0.39	0.89	0.42	0.30	0.32	0.93	1.23	1.62	0.82	1.36
Brevundimonas (AP)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00
Brucella (AP)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.05	0.00	0.00	0.00
Burkholderia (BP)	0.88	1.27	1.36	1.04	0.55	0.95	1.78	1.31	1.28	1.45	2.16
Byssovorax (DP)	0.06	0.05	0.12	0.00	0.10	0.00	0.13	0.05	0.27	0.11	0.28
Caedibacter (AP)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.02	0.02	0.00	0.01
Caldilinea (CL)	0.67	0.93	0.19	0.34	0.31	0.52	0.81	0.27	0.35	0.61	0.87
Caldimonas (BP)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.08	0.09	0.03	0.01
Caloramator (F)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.03	0.00	0.00	0.00
C.Alysiosphaera (AP)	0.01	0.00	0.06	0.00	0.03	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00
C. Chloracidobacterium (ACB)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.04
C. Koribacter (ACB)	0.47	0.32	0.52	0.25	0.07	0.26	0.61	0.08	0.28	1.40	1.15
C. Kuenenia (PL)	0.04	0.09	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00
C. Microthrix (ACT)	0.03	0.00	0.03	0.00	0.07	0.00	0.07	0.05	0.00	0.00	0.00
C. Nucleicultrix (AP)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.04	0.00	0.00
C. Odysseella (AP)	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.03	0.00	0.00	0.00	0.11	0.00
C. Saccharimonas (UB)	0.29	0.22	0.00	0.23	0.06	0.22	0.05	0.25	0.05	0.18	0.11
C. Solibacter (ACB)	0.11	0.36	0.25	0.25	0.07	0.47	0.29	0.22	0.68	0.26	0.72
C. Xiphinematobacter (V)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00
Catellatospora (ACT)	0.00	0.00	0.06	0.02	0.01	0.00	0.05	0.07	0.10	0.16	0.20
Catenulispora (ACT)	0.00	0.04	0.00	0.00	0.04	0.00	0.01	0.00	0.02	0.00	0.01
Catenuloplanes (ACT)	0.06	0.02	0.09	0.04	0.04	0.03	0.10	0.02	0.06	0.03	0.06

Caulobacter (AP)	0.00	0.00	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.07	0.00	0.00	0.00
Cellulomonas (ACT)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.06
Cellulosimicrobium (ACT)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.04	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00
Chelatococcus (AP)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.04	0.00	0.00	0.00	0.00
Chitinophaga (B)	0.13	0.16	0.37	0.06	0.00	0.12	0.04	0.07	0.09	0.47	0.52
Chloroflexus (CL)	0.17	0.20	0.15	0.08	0.21	0.37	0.10	0.23	0.10	0.76	0.33
Chloroherpeton (CLB)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.08	0.00
Chondromyces (DP)	0.03	0.09	0.03	0.02	0.00	0.02	0.02	0.03	0.00	0.18	0.28
Chromohalobacter(GP)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03
Chthoniobacter (V)	0.10	0.02	0.00	0.04	0.00	0.09	0.12	0.02	0.35	0.00	0.02
Clostridium (F)	0.08	0.02	0.03	0.02	0.04	0.03	0.01	0.03	0.10	0.00	0.00
Conexibacter (ACT)	2.02	1.88	5.62	0.66	2.88	1.00	3.42	2.17	2.78	3.30	2.92
Crocinitomix (B)	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01
Crossiella (ACT)	0.00	0.00	0.15	0.00	0.03	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00
Cryobacterium (ACT)	0.00	0.00	0.09	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Cupriavidus (BP)	0.15	0.23	0.12	2.35	0.46	0.96	0.85	2.24	1.55	0.26	0.28
Cyanobacterium (CY)	0.08	0.04	0.06	0.04	0.01	0.01	0.01	0.02	0.00	0.00	0.00
Cystobacter (DP)	0.04	0.05	0.03	0.02	0.00	0.01	0.01	0.07	0.19	0.08	0.08
Dactylosporangium (ACT)	0.21	0.16	0.22	0.04	0.18	0.03	0.13	0.10	0.22	0.03	0.03
Defluviicoccus (AP)	0.01	0.00	0.09	0.00	0.07	0.00	0.04	0.00	0.00	0.00	0.00
Dehalococcoides (CL)	1.47	1.72	1.08	0.78	0.34	1.23	0.68	1.13	0.26	0.58	0.73
Dehalogenimonas (CL)	1.24	1.90	1.73	1.10	0.46	0.87	0.47	0.78	0.38	1.11	1.47
Delftia (BP)	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Derxia (BP)	0.00	0.05	0.00	0.00	0.01	0.03	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00
Desulfatibacillum (DP)	0.18	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Desulfitobacterium (F)	0.36	0.63	0.28	0.21	0.10	0.51	0.23	0.41	0.14	0.84	0.72
Desulfobulbus (DP)	0.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Desulfocaldus (DP)	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.00	0.00	0.03	0.00	0.00
Desulfoglaeba (DP)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.11	0.00
Desulfomonile (DP)	0.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.01
Desulforegula (DP)	0.81	0.91	0.12	0.42	0.09	0.42	0.27	0.60	0.16	0.13	0.18

Desulfovibrio (DP)	0.00	0.00	0.00	0.08	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Desulfovirga (DP)	1.27	1.52	1.27	1.40	0.43	1.14	0.85	1.44	0.58	0.40	0.61
Desulfuromonas (DP)	0.01	0.02	0.12	0.00	0.01	0.03	0.07	0.03	0.01	0.05	0.08
Devosia (AP)	0.00	0.04	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.26	0.01
Dokdonella(GP)	0.21	0.32	0.65	0.04	0.04	0.23	0.63	0.17	0.59	0.21	0.48
Dongia (AP)	0.01	0.02	0.00	0.04	0.00	0.04	0.21	0.13	0.41	0.03	0.09
Dyadobacter (B)	0.07	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05	0.00	0.00
Dyella(GP)	0.01	0.00	0.00	0.08	0.09	0.04	0.23	0.22	0.37	0.00	0.13
Edaphobacter (ACB)	0.65	0.50	0.09	0.40	0.10	0.34	0.21	0.41	0.89	0.11	0.15
Elusimicrobium (E)	0.04	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Enterobacter(GP)	0.00	0.00	0.03	0.00	0.00	0.15	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00
Erythrobacter (AP)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.01	0.03	0.04	0.00	0.00
Ferrimicrobium (ACT)	0.13	0.09	0.40	0.02	0.10	0.13	0.16	0.00	0.13	0.05	0.02
Ferrithrix (ACT)	0.26	0.07	0.15	0.00	0.03	0.05	0.15	0.13	0.07	0.18	0.11
Ferrovum (BP)	0.00	0.05	0.03	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Ferruginibacter (B)	0.03	0.00	0.00	0.02	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00	0.05	0.04
Filimonas (B)	0.01	0.11	0.03	0.02	0.04	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.11
Flaviumibacter (B)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.03
Flavisolibacter (B)	0.00	0.05	0.00	0.00	0.03	0.00	0.00	0.07	0.05	0.16	0.03
Flavitalea (B)	0.00	0.00	0.03	0.00	0.00	0.01	0.00	0.22	0.04	0.00	0.00
Flavobacterium (B)	0.18	0.07	0.03	0.11	0.04	0.05	0.02	0.03	0.05	0.74	0.46
Flexibacter (B)	0.00	0.05	0.25	0.00	0.01	0.00	0.06	0.00	0.02	0.11	0.12
Fluviicola (B)	0.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.07	0.05	0.00	0.00	0.13	0.19
Fodinicola (ACT)	0.07	0.00	0.09	0.08	0.00	0.00	0.06	0.02	0.00	0.13	0.08
Frankia (ACT)	0.08	0.27	0.46	0.06	0.61	0.05	0.34	0.35	0.42	0.13	0.12
Fusobacterium (FSB)	0.19	0.02	0.12	0.04	0.04	0.05	0.13	0.00	0.05	0.05	0.04
Gaiella (ACT)	0.74	0.63	2.56	0.30	0.90	0.32	1.49	0.53	1.60	1.34	1.32
Gallionella (BP)	0.01	0.00	0.03	0.06	0.01	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00
Geminococcus (AP)	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00
Gemmata (PL)	0.06	0.20	0.34	0.11	0.00	0.04	0.01	0.15	0.04	0.00	0.00
Gemmatimonas (G)	3.10	3.78	6.51	1.87	1.94	2.12	4.66	1.44	1.93	5.33	7.25

Geoalkalibacter (DP)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03
Geobacillus (F)	0.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Geobacter (DP)	1.47	1.79	1.14	0.91	0.33	1.07	1.06	1.51	1.22	1.16	1.12
Geodermatophilus (ACT)	0.00	0.04	0.03	0.00	0.07	0.01	0.15	0.02	0.04	0.00	0.00
Geothermobacter (DP)	0.04	0.05	0.06	0.00	0.00	0.01	0.01	0.03	0.01	0.00	0.00
Geothrix (ACB)	0.15	0.05	0.06	0.06	0.00	0.09	0.02	0.02	0.00	0.50	0.49
Gloeobacter (CY)	0.03	0.04	0.03	0.00	0.00	0.00	0.01	0.02	0.00	0.00	0.00
Haliangium (DP)	0.81	0.82	0.77	0.30	0.28	0.61	0.76	0.35	0.71	0.34	0.71
Haliscomenobacter (B)	0.06	0.02	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.03	0.32	0.31
Heliobacterium (F)	0.14	0.00	0.00	0.00	0.03	0.04	0.05	0.00	0.01	0.11	0.24
Herbaspirillum (BP)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.10	0.00	0.03	0.11	0.00
Herbidospora (ACT)	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.03	0.00	0.00	0.00
Hirschia (AP)	0.04	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05	0.00
Holophaga (ACB)	13.91	14.67	8.73	11.22	2.48	9.59	5.26	7.23	2.65	7.41	7.86
Hydrogenophaga (BP)	0.04	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Hyphomicrobium (AP)	0.11	0.05	0.43	0.04	0.25	0.16	0.25	0.30	0.25	0.37	0.27
Hyphomonas (AP)	0.00	0.00	0.03	0.00	0.00	0.01	0.00	0.07	0.00	0.00	0.00
Iamia (ACT)	0.31	0.02	0.00	0.00	0.01	0.02	0.11	0.03	0.04	0.21	0.17
Ideonella (BP)	0.00	0.02	0.03	0.00	0.01	0.01	0.01	0.02	0.05	0.05	0.00
Ilumatobacter (ACT)	0.08	0.00	0.12	0.00	0.06	0.03	0.07	0.13	0.15	0.24	0.09
Inquilinus (AP)	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.54	0.59	0.05	0.03	0.03	0.00
Intrasporangium (ACT)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.04	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Isoptericola (ACT)	0.00	0.00	0.00	0.04	0.03	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00
Isosphaera (PL)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.10	0.00	0.00	0.00
Janibacter (ACT)	0.03	0.14	0.25	0.02	1.17	0.05	0.02	0.07	0.00	0.24	0.20
Jatrophihabitans (ACT)	0.08	0.13	0.25	0.00	0.04	0.02	0.16	0.10	0.16	0.03	0.07
Kaistobacter (AP)	1.57	2.31	2.10	2.08	14.39	2.35	15.43	3.35	18.47	6.33	5.41
Kineosporia (ACT)	0.00	0.04	0.09	0.00	0.12	0.00	0.01	0.00	0.03	0.00	0.00
Kitasatospora (ACT)	0.01	0.00	0.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Kocuria (ACT)	0.00	0.00	0.00	0.02	0.09	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03
Kofleria (DP)	0.13	0.29	0.19	0.19	0.15	0.10	0.45	0.18	0.53	0.32	0.26

Kouleothrix (CL)	0.08	0.05	0.15	0.06	0.12	0.08	0.00	0.18	0.01	0.00	0.03
Kribbella (ACT)	0.01	0.00	0.00	0.36	0.45	0.09	0.16	0.08	0.05	0.00	0.00
Ktedonobacter (CL)	0.07	0.09	0.15	0.00	0.18	0.08	0.24	0.25	0.25	0.55	0.74
Kutzneria (ACT)	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Labilithrix (DP)	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01
Labrys (AP)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.00	0.03	0.04	0.00	0.00
Legionella (GP)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.00	0.02
Leifsonia (ACT)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.11	0.00
Lentzea (ACT)	0.01	0.02	0.03	0.06	0.04	0.03	0.02	0.02	0.00	0.00	0.06
Leptothrix (BP)	0.04	0.04	0.28	0.00	0.01	0.02	0.01	0.33	0.12	0.05	0.00
Levilinea (CL)	0.29	0.30	0.40	0.13	0.30	0.20	0.16	0.31	0.30	0.21	0.20
Longilinea (CL)	3.30	4.50	4.23	2.33	1.37	2.19	1.98	4.01	1.95	2.77	3.25
Longispora (ACT)	0.00	0.00	0.09	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Luedemannella (ACT)	0.04	0.07	0.06	0.02	0.06	0.00	0.24	0.07	0.02	0.21	0.18
Luteibacter (GP)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05	0.05	0.00	0.00	0.00	0.06
Luteimonas (GP)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Luteolibacter(V)	0.93	0.43	0.22	0.98	0.10	1.63	0.22	0.23	0.66	0.32	0.16
Lysinibacillus (F)	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Lysobacter (GP)	0.06	0.02	0.03	0.02	0.01	0.03	0.02	0.00	0.01	0.40	0.19
Magnetospirillum (AP)	0.00	0.11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Marmoricola (ACT)	0.08	0.02	0.37	0.02	0.30	0.05	0.13	0.07	0.14	0.29	0.11
Massilia (BP)	0.32	0.18	0.25	0.38	0.28	0.19	0.13	0.07	0.18	0.42	0.19
Melioribacter	0.04	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Mesorhizobium (AP)	0.08	0.14	0.19	0.08	0.01	0.06	0.06	0.17	0.28	0.45	0.24
Metallibacterium (GP)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.04
Methylibium (BP)	0.04	0.11	0.06	0.02	0.07	0.19	0.18	0.38	0.40	0.13	0.12
Methylobacillus (BP)	0.00	0.00	0.00	0.15	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Methylobacterium (AP)	0.00	0.00	0.03	0.11	0.01	0.01	0.01	0.05	0.16	0.05	0.01
Methylocella (AP)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.01	0.00	0.00
Methylocystis (AP)	0.01	0.11	0.15	0.04	0.06	0.00	0.02	0.02	0.17	0.00	0.04
Methylophilus (BP)	0.00	0.00	0.00	0.15	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Methylopila (AP)	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Methylosinus (AP)	0.24	0.20	0.06	0.00	0.09	0.05	0.17	0.03	0.05	0.47	0.29
Methyloversatilis (BP)	0.00	0.04	0.06	0.00	0.03	0.01	0.00	0.03	0.09	0.00	0.03
Methylovorus (BP)	0.00	0.00	0.00	0.42	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Micromonospora (ACT)	1.11	1.09	1.05	1.10	0.24	0.96	0.81	0.38	0.32	1.16	1.00
Microvirga (AP)	0.00	0.00	0.06	0.02	0.09	0.00	0.08	0.03	0.06	0.03	0.07
Moorella (F)	0.90	0.63	0.52	0.40	0.03	0.60	0.23	0.40	0.11	0.21	0.15
Mycobacterium (ACT)	0.15	0.09	0.31	0.04	0.27	0.05	0.21	0.10	0.21	0.18	0.07
Myxococcus (DP)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.07	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00
Nakamurella (ACT)	0.00	0.04	0.00	0.00	0.06	0.00	0.01	0.02	0.00	0.03	0.00
Nannocystis (DP)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.09
Natronocella (GP)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.00	0.00
Nevskia (GP)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.06	0.25	0.21	0.00	0.00
Niastella (B)	0.17	0.11	0.00	0.00	0.07	0.08	0.58	0.13	0.54	0.21	0.11
Nitrobacter (AP)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00
Nitrosococcus (GP)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.61	0.01	0.00	0.04
Nitrosospira (BP)	0.07	0.23	0.19	0.17	0.01	0.22	0.41	0.30	0.17	0.29	0.25
Nitrosovibrio (BP)	0.36	0.43	0.62	0.49	0.18	0.29	0.57	0.18	0.39	0.11	0.20
Nitrospina (N)	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.03	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00
Nitrospira (ACT)	0.28	0.48	0.40	0.38	0.04	0.29	0.27	0.18	0.18	0.32	0.26
Nocardioides (ACT)	0.53	0.27	0.86	0.42	1.29	0.68	4.82	1.06	1.23	0.37	0.33
Nonomuraea (ACT)	0.01	0.00	0.09	0.02	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.05	0.00
Nordella (AP)	0.00	0.00	0.06	0.00	0.04	0.10	0.04	0.03	0.08	0.05	0.28
Novosphingobium (AP)	0.03	0.00	0.00	1.19	0.70	0.02	0.11	0.02	0.02	0.18	0.16
Oceanibaculum (AP)	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.08	0.00
Ohtaekwangia (B)	0.01	0.04	0.00	0.00	0.00	0.03	0.01	0.00	0.00	0.11	0.18
Opiritatus (V)	0.15	0.09	0.06	0.25	0.00	0.17	0.01	0.02	0.12	0.13	0.09
Orientia (AP)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00
Ornithinococcus (ACT)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.07	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Oryzihumus (ACT)	0.00	0.02	0.00	0.00	0.04	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01
Paenibacillus (F)	0.00	0.04	0.00	0.00	0.10	0.01	0.00	0.00	0.07	0.00	0.00

Panacagramonas (GP)	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.03	0.01	0.00	0.01	0.00	0.01
Parachlamydia (CLD)	0.03	0.00	0.00	0.11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Paracoccus (AP)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Paracraurococcus (AP)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Parasegetibacter (B)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03
Pedobacter (B)	0.00	0.00	0.09	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Pedomicrobium (AP)	0.08	0.00	0.06	0.02	0.12	0.03	0.16	0.18	0.26	0.29	0.17
Pedosphaera (V)	0.10	0.09	0.40	0.06	0.01	0.12	0.06	0.07	0.11	0.00	0.01
Pelobacter (DP)	0.01	0.00	0.09	0.02	0.00	0.00	0.01	0.03	0.05	0.05	0.01
Phaselicystis (DP)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03
Phenylobacterium (AP)	0.07	0.09	0.06	0.04	0.04	0.00	0.21	0.07	0.21	0.18	0.34
Planctomyces (PL)	0.01	0.00	0.00	0.02	0.01	0.00	0.02	0.03	0.03	0.00	0.03
Plesiocystis (DP)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03
Polaromonas (BP)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.03	0.06	0.08	0.02	0.00	0.01
Polyangium (DP)	0.00	0.13	0.06	0.00	0.00	0.00	0.02	0.03	0.01	0.03	0.11
Porphyrobacter (AP)	0.03	0.00	0.00	0.00	0.03	0.00	0.00	0.03	0.00	0.00	0.03
Prolixibacter (B)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.01	0.00	0.00
Promicromonospora (DP)	0.01	0.00	0.00	0.00	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Prostheco bacter (V)	12.60	6.58	5.92	13.13	1.27	21.62	2.51	6.33	14.44	7.96	6.32
Prosthecomicrobium (AP)	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.00	0.00	0.02	0.00	0.09
Pseudolabrys (AP)	0.03	0.00	0.12	0.00	0.01	0.02	0.05	0.00	0.02	0.40	0.24
Pseudomonas (GP)	1.79	1.85	0.93	1.82	0.37	2.05	0.85	0.68	0.54	0.42	0.52
Pseudonocardia (ACT)	0.07	0.13	0.12	0.02	0.33	0.06	0.22	0.20	0.31	0.05	0.01
Pseudoxanthomonas (GP)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Ralstonia (BP)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.13	0.00
Ramlibacter (BP)	0.00	0.00	0.03	0.02	0.04	0.05	0.40	0.05	0.15	0.24	0.11
Reyranella (AP)	0.06	0.56	0.25	0.19	0.06	0.22	0.24	0.12	0.26	0.58	0.70
Rhizobium (AP)	0.46	0.36	0.68	0.25	0.30	0.49	0.78	0.38	0.87	1.21	1.15
Rhizomicrobium (AP)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.05	0.00	0.00	0.08	0.11
Rhodanobacter (GP)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Rhodobium (AP)	0.01	0.11	0.22	0.04	0.09	0.03	0.11	0.08	0.03	0.32	0.24

Rhodocista (AP)	0.00	0.02	0.09	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.00	0.03	0.04
Rhodococcus (ACT)	0.04	0.00	0.00	0.02	0.21	0.00	0.00	0.02	0.00	0.08	0.02
Rhodoferax (BP)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.15	0.03	0.02	0.02	0.02	0.00	0.00
Rhodomicrobium (AP)	0.03	0.00	0.03	0.02	0.07	0.00	0.11	0.00	0.04	0.00	0.06
Rhodopila (AP)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.04	0.00	0.00
Rhodopirellula (PL)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03
Rhodoplanes (AP)	1.63	1.16	4.38	1.00	1.58	0.80	2.60	1.49	2.54	3.98	4.52
Rhodovastum (AP)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.00
Rhodovulum (AP)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03
Roseiflexus (CL)	0.19	0.45	0.12	0.08	0.30	0.10	0.06	0.20	0.02	0.00	0.00
Roseimicrobium (V)	0.00	0.02	0.00	0.02	0.00	0.01	0.00	0.05	0.01	0.00	0.01
Rubrivivax (BP)	0.07	0.09	0.03	0.02	0.04	0.05	0.12	0.08	0.22	0.05	0.02
Rubrobacter (ACT)	0.14	0.23	0.22	0.17	0.21	0.18	0.15	0.30	0.10	0.24	0.10
Rudaea (GP)	0.04	0.00	0.06	0.00	0.03	0.02	0.05	0.02	0.01	0.00	0.03
Ruminococcus (F)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.08	0.00
Saccharibacter (AP)	0.03	0.02	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Schlegelella (BP)	0.10	0.11	0.09	0.02	0.04	0.15	0.05	0.08	0.05	0.26	0.27
Serratia (GP)	0.08	0.16	0.19	0.04	0.27	0.09	0.11	0.17	0.04	0.00	0.00
Sideroxydans(BP)	0.04	0.02	0.03	0.00	0.01	0.00	0.04	0.03	0.06	0.08	0.04
Singulisphaera (PL)	0.00	0.09	0.03	0.02	0.00	0.03	0.01	0.13	0.04	0.00	0.03
Sinorhizobium (AP)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00
Skermanella (AP)	0.03	0.13	0.03	0.06	0.01	0.06	0.04	0.00	0.02	0.00	0.09
Solimonas (GP)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Solirubrobacter (ACT)	2.14	2.33	4.75	1.02	2.44	0.86	3.02	1.19	1.79	2.74	2.51
Sphaerobacter (CL)	0.24	0.47	0.25	0.28	0.28	0.09	0.21	0.31	0.08	0.03	0.31
Sphingobacterium (B)	0.06	0.05	0.09	0.02	0.00	0.05	0.01	0.00	0.00	0.11	0.11
Sphingobium (AP)	0.00	0.00	0.03	0.17	0.06	12.12	4.96	27.19	8.67	0.47	0.15
Sphingomonas (AP)	0.86	0.59	1.27	14.57	22.03	1.21	4.48	1.08	4.86	4.90	3.23
Sphingopyxis (AP)	0.01	0.00	0.00	1.19	1.88	0.00	0.15	0.00	0.00	0.00	0.00
Sphingorhabdus (AP)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Sphingosinicella (AP)	0.01	0.00	0.00	0.04	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.13	0.00

Sphingoterrabacterium (B)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.04	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Spiroplasma (T)	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Sporichthya (ACT)	0.43	0.30	0.59	0.02	0.39	0.18	0.29	0.25	0.26	0.29	0.31
Sporosarcina (F)	0.04	0.02	0.06	0.04	0.15	0.00	0.08	0.02	0.02	0.00	0.02
Stella (V)	0.26	0.29	0.31	0.17	0.12	0.25	0.29	0.28	0.82	0.34	0.52
Stenotrophomonas (GP)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.00	0.00	0.00
Steroidobacter (GP)	0.06	0.16	0.28	0.11	0.00	0.06	0.08	0.17	0.16	0.34	0.16
Sterolibacterium (BP)	0.00	0.14	0.00	0.00	0.00	0.02	0.06	0.00	0.01	0.00	0.00
Streptomyces (ACT)	0.26	0.30	1.33	0.25	0.57	0.16	0.72	0.30	0.32	0.24	0.28
Synechococcus (CY)	0.03	0.07	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Synechocystis (CY)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.04	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Syntrophobacter (DP)	0.31	0.25	0.25	0.21	0.07	0.23	0.18	0.15	0.05	0.13	0.26
Syntrophus (DP)	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.16	0.03
Telmatobacter (ACB)	0.00	0.00	0.12	0.00	0.01	0.02	0.02	0.00	0.13	0.00	0.01
Terrabacter (ACT)	0.01	0.00	0.06	0.02	0.19	0.02	0.01	0.00	0.00	0.00	0.02
Terriglobus (ACB)	0.24	0.16	0.09	0.06	0.03	0.12	0.15	0.00	0.01	0.37	0.21
Terrimonas (B)	0.50	0.18	0.46	0.30	0.15	0.13	0.29	0.10	0.38	0.47	0.38
Tetrasphaera (ACT)	0.01	0.02	0.00	0.02	0.07	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01
Thauera (BP)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05	0.06
Thermacetogenium (F)	0.24	0.04	0.00	0.15	0.00	0.03	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00
Thermaerobacter (F)	0.15	0.05	0.03	0.00	0.00	0.02	0.01	0.00	0.02	0.00	0.00
Thermobaculum (CL)	0.64	0.63	0.40	0.36	0.27	0.28	0.34	1.09	0.35	0.32	0.43
Thermoflavimicrobium (F)	2.48	3.14	1.82	0.53	0.42	0.70	0.62	0.36	0.21	4.98	3.24
Thermoleophilum (ACT)	0.65	0.52	0.99	0.23	0.60	0.16	0.50	0.31	0.55	0.47	0.48
Thermomicrobium (CL)	0.03	0.02	0.03	0.02	0.01	0.07	0.02	0.02	0.00	0.08	0.03
Thermomonas (GP)	0.10	0.11	0.03	0.04	0.01	0.09	0.02	0.07	0.10	0.58	0.15
Thermovum (AP)	0.04	0.00	0.03	0.00	0.01	0.00	0.01	0.00	0.01	0.00	0.06
Thermus (D)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.00	0.03	0.00	0.00	0.01
Thiobacillus (BP)	0.00	0.02	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.07
Thioprofundum (GP)	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Thiorhodospira (GP)	0.25	0.13	0.28	0.02	0.00	0.09	0.08	0.00	0.01	0.08	0.06

Thiorhodovibrio (GP)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.04	0.00	0.00
Tumebacillus (F)	0.00	0.04	0.00	0.00	0.00	0.03	0.04	0.05	0.00	0.03	0.04
Vampirovibrio (DP)	0.00	0.07	0.09	0.08	0.00	0.06	0.13	0.07	0.08	0.08	0.21
Variovorax (BP)	0.04	0.02	0.00	0.13	0.04	0.10	0.23	0.22	0.26	0.03	0.08
Vasilyevaea (AP)	0.00	0.00	0.06	0.04	0.00	0.00	0.02	0.00	0.02	0.26	0.15
Verrucomicrobium (V)	0.07	0.22	0.09	0.13	0.00	0.29	0.12	0.17	0.29	0.08	0.03
Verrucosipora (ACT)	0.04	0.02	0.00	0.04	0.00	0.01	0.01	0.03	0.00	0.00	0.03
Virgisporangium (ACT)	0.07	0.00	0.00	0.00	0.01	0.02	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00
Xanthomonas (GP)	0.07	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.06
Xenophilus (GP)	0.00	0.00	0.03	0.02	0.00	0.02	0.02	0.00	0.01	0.00	0.03
Yonghaparkia (ACT)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01
Zavarzinella (PL)	0.01	0.00	0.03	0.00	0.03	0.00	0.00	0.33	0.00	0.08	0.00

Tabla VI.S1. Abundancia relativa de los principales filos bacterianos en el suelo inicial y en cada microcosmo de suelo crónicamente contaminado con PAH al día 14 y 63 de incubación.

Filo	SI	IPK-Control		IPK-CON		IPK-AM	
		d14	d63	d14	d63	d14	d63
Acidobacteria	0.00	2.45	0.00	3.44	7.65	3.15	3.09
Actinobacteria	0.22	29.00	1.06	26.15	20.56	20.49	16.57
Bacteroidetes	0.22	6.59	0.65	6.59	7.27	6.26	11.93
Chloroflexi	0.00	9.00	0.33	15.75	16.87	10.08	4.42
Firmicutes	11.08	0.78	9.52	0.96	1.88	0.60	1.88
Gemmatimonadetes	0.00	0.37	0.00	1.06	2.51	1.00	2.65
Proteobacteria	88.49	40.27	88.32	39.26	35.55	49.68	52.38
Verrucomicrobia	0.00	11.35	0.12	6.57	7.46	8.54	6.41
Otros filos	0.00	0.20	0.00	0.22	0.25	0.20	0.66

Tabla VI.S2. Abundancia relativa de las clases de *Proteobacteria* en el suelo inicial y en cada microcosmo de suelo crónicamente contaminado con PAH al día 14 y 63 de incubación.

Clase Proteobacteria	SI	IPK-Control		IPK-CON		IPK-AM	
		d14	d63	d14	d63	d14	d63
Alphaproteobacteria	0.10	60.80	0.23	59.72	45.50	72.51	51.90
Betaproteobacteria	0.00	2.19	0.28	5.49	7.58	2.49	4.22
Deltaproteobacteria	0.00	5.90	0.00	6.00	6.00	3.10	5.70
Epsilonproteobacteria	0.00	0.18	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Gammaproteobacteria	99.90	30.92	99.49	28.78	40.92	21.90	38.19

Tabla VI.S3. Abundancia relativa de los órdenes bacterianos en el suelo inicial y en cada microcosmo de suelo crónicamente contaminado con PAH al día 14 y 63 de incubación.

Orden	SI	IPK-Control		IPK-CON		IPK-AM	
		d14	d63	d14	d63	d14	d63
Acidimicrobiales	0.13	3.79	0.04	3.05	4.06	2.17	1.93
Acidobacteriales	0.00	2.40	0.00	3.52	7.03	3.19	2.84
Actinomycetales	0.09	20.46	1.02	20.40	14.31	15.36	12.49
Alteromonadales	0.00	0.11	0.00	0.02	0.00	0.04	0.00
Anaerolineales	0.00	0.29	0.00	0.56	0.58	0.07	0.11
Bacillales	11.08	0.21	9.50	0.12	0.71	0.11	1.48
Burkholderiales	0.00	0.83	0.16	1.91	2.32	0.84	1.82
Caldilineales	0.00	0.75	0.08	2.41	5.16	1.72	1.70
Campylobacteriales	0.00	0.08	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Candidatus Saccharibacteria	0.00	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.23
Caulobacteriales	0.04	10.39	0.00	6.12	3.80	9.15	4.65
Chloroflexales	0.00	4.09	0.04	8.97	4.58	6.91	1.02
Chromatiales	0.00	3.39	0.00	2.58	2.90	2.66	3.06
Chroococcales	0.00	0.00	0.00	0.03	0.00	0.00	0.11
Clostridiales	0.00	0.64	0.00	0.87	1.10	0.53	0.45
Cytophagales	0.00	6.95	0.16	6.63	6.90	6.03	11.58
Dehalococcoidales	0.00	1.50	0.00	1.93	2.71	0.84	1.36

Desulfobacterales	0.00	0.16	0.00	0.02	0.26	0.11	0.34
Desulfuromonadales	0.00	0.32	0.00	0.87	0.71	0.35	0.34
Enterobacterales	0.00	0.00	0.08	0.00	0.00	0.00	0.23
Flavobacterales	0.00	0.08	0.00	0.14	0.26	0.00	0.11
Gaiellales	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.04	0.00
Gallionellales	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.11
Gemmatimonadales	0.00	0.40	0.00	1.11	2.58	1.05	2.72
Haloplasmales	0.00	0.03	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00
Holophagales	0.00	0.13	0.00	0.03	0.52	0.00	0.11
Hydrogenophilales	0.00	0.05	0.00	0.17	0.06	0.21	0.11
Kallotenuales	0.00	0.00	0.12	0.00	0.00	0.00	0.00
Lactobacillales	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00
Legionellales	0.00	0.43	0.00	0.16	0.06	0.07	0.23
Methylococcales	0.00	0.00	0.00	0.05	0.26	0.07	0.00
Myxococcales	0.00	0.75	0.00	0.24	0.45	0.32	1.48
Nitrosomonadales	0.00	0.05	0.08	0.14	0.19	0.21	0.11
Nitrospirales	0.00	0.00	0.00	0.00	0.19	0.00	0.34
Opitutales	0.00	0.16	0.00	0.17	0.26	0.11	0.45
Oscillatoriales	0.00	0.08	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Phycisphaerales	0.00	0.08	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Planctomycetales	0.00	0.03	0.00	0.19	0.06	0.21	0.00
Pseudomonadales	88.36	0.45	87.49	0.42	4.26	0.46	10.90
Rhizobiales	0.04	5.82	0.08	5.33	3.68	5.72	5.90
Rhodobacterales	0.00	0.53	0.00	0.64	0.13	0.46	0.68
Rhodocyclales	0.00	0.03	0.00	0.03	0.19	0.04	0.11
Rhodospirillales	0.00	2.89	0.00	5.81	3.93	5.01	6.70
Rickettsiales	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.11
Sabellida	0.00	0.03	0.00	0.03	0.06	0.00	0.00
Saccharomycetales	0.00	0.00	0.24	0.00	0.00	0.00	0.00
Selenomonadales	0.00	0.00	0.00	0.00	0.13	0.00	0.00

Solibacterales	0.00	0.13	0.00	0.03	0.32	0.11	0.23
Solirubrobacterales	0.00	2.78	0.00	1.30	0.77	1.05	0.91
Sphaerobacterales	0.00	3.18	0.08	2.60	4.32	1.02	0.34
Sphingobacterales	0.22	0.16	0.49	0.12	0.32	0.53	0.57
Sphingomonadales	0.00	6.97	0.12	6.30	4.96	17.25	9.76
Syntrophobacterales	0.00	0.11	0.00	0.49	0.58	0.32	0.34
Thermoleophilales	0.00	0.16	0.00	0.03	0.26	0.07	0.00
Thiotrichales	0.00	0.00	0.00	0.07	0.00	0.00	0.00
Verrucomicrobiales	0.00	8.92	0.12	5.90	6.58	7.54	5.79
Xanthomonadales	0.04	9.16	0.08	8.45	7.48	8.10	6.13

Tabla VI.S4. Abundancia relativa de los géneros bacterianos en el suelo inicial y en cada microcosmo de suelo crónicamente contaminado al día14 y 63 de incubación. (C.: Candidatus). Referencias de filos o clases *Acidobacteria* (ACB), *Actinobacteria* (ACT), *Alphaproteobacteria* (AP), *Bacteroidetes* (B), *Betaproteobacteria* (BP), *Chloroflexi* (CL), *Cyanobacteria* (CY), *Deltaproteobacteria* (DP), *Epsilonproteobacteria* (EP), *Firmicutes* (F), *Gammaproteobacteria* (GP), *Gemmatimonadetes* (G), *Planctomycetia* (PL), *Tenericutes* (T), *Unclassified bacteria* (UB) y *Verrucomicrobia* (V).

Género	SI	IPK-Control		IPK-CON		IPK-AM	
		d14	d63	d14	d63	d14	d63
Acetivibrio (F)	0.00	0.00	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00
Achromobacter(BP)	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00
Acidisphaera (AP)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.11
Aciditerrimonas (ACT)	0.09	0.24	0.00	0.30	0.44	0.07	0.11
Acidobacterium (ACB)	0.00	2.18	0.00	3.37	6.77	2.84	2.76
Acinetobacter (GP)	88.31	0.00	87.71	0.00	3.76	0.00	9.94
Actinoallomurus (ACT)	0.00	0.00	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00
Actinomadura (ACT)	0.00	1.35	0.00	2.37	1.69	1.37	0.77
Actinomyces (ACT)	0.00	0.00	0.00	0.10	0.00	0.07	0.00
Actinoplanes (ACT)	0.00	0.00	0.00	0.02	0.06	0.07	0.00
Actinotalea (ACT)	0.00	0.17	0.00	0.27	0.00	0.33	0.00
Aeromicrobium (ACT)	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00
Agrobacterium (AP)	0.00	0.00	0.00	0.02	0.06	0.00	0.00

Agrococcus (ACT)	0.00	0.59	0.00	0.60	0.63	0.40	0.55
Agromyces (ACT)	0.00	0.02	0.00	0.00	0.06	0.17	0.00
Algoriphagus (B)	0.00	0.71	0.00	1.34	1.63	0.60	1.33
Aliihoeflea (AP)	0.00	0.02	0.00	0.03	0.06	0.00	0.00
Altererythrobacter (AP)	0.00	0.02	0.00	0.03	0.06	0.00	0.00
Alteromonas (GP)	0.00	0.10	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00
Amaricoccus (AP)	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00
Amycolatopsis (ACT)	0.00	0.05	0.00	0.12	0.00	0.17	0.00
Anaeromyxobacter (DP)	0.00	0.02	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00
Anaerosinus (F)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.13	0.00	0.00
Anderseniella (AP)	0.00	0.00	0.00	0.03	0.00	0.00	0.11
Angustibacter (ACT)	0.00	0.05	0.00	0.03	0.00	0.00	0.00
Anoxybacillus (F)	0.87	0.00	0.49	0.00	0.00	0.00	0.11
Aquicella (GP)	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00
Aquimonas (GP)	0.00	0.17	0.00	0.03	0.13	0.00	0.00
Arthrobacter (ACT)	0.00	0.17	0.04	0.08	0.13	0.33	0.00
Aurantimonas (AP)	0.00	0.02	0.00	0.00	0.19	0.00	0.00
Azorhizobium (AP)	0.00	0.00	0.00	0.05	0.00	0.03	0.00
Azospirillum (AP)	0.00	0.66	0.00	1.19	0.50	0.80	0.55
Azotobacter (GP)	0.00	0.05	0.00	0.05	0.00	0.00	0.11
Bacillus (F)	8.55	0.15	7.45	0.08	0.50	0.10	1.10
Beijerinckia (AP)	0.00	0.20	0.00	0.12	0.00	0.00	0.22
Belnapia (AP)	0.00	0.02	0.00	0.00	0.06	0.00	0.00
Blastococcus (ACT)	0.00	1.03	0.90	1.00	0.75	0.33	0.66
Blastopirellula (PL)	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00
Bordetella (BP)	0.00	0.02	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00
Bosea (AP)	0.00	0.02	0.00	0.03	0.00	0.00	0.00
Bradyrhizobium (AP)	0.00	0.07	0.04	0.46	0.19	0.47	0.22
Brevundimonas (AP)	0.04	9.18	0.00	5.62	3.26	8.07	3.98
Burkholderia (BP)	0.00	0.51	0.00	1.18	1.63	0.70	1.22

Caedibacter (AP)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.11
Caldilinea (CL)	0.00	0.69	0.08	2.31	5.02	1.64	1.66
Candidatus Alysiosphaera (AP)	0.00	0.05	0.00	0.10	0.13	0.07	0.11
C. Babela (DP)	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.11
C. Koribacter (ACB)	0.00	0.02	0.00	0.00	0.06	0.20	0.00
C. Microthrix (ACT)	0.00	4.04	0.00	2.44	1.69	2.64	1.66
C. Nitrotoga (BP)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.11
C. Saccharimonas (UB)	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.22
C. Solibacter (ACB)	0.00	0.12	0.00	0.03	0.31	0.10	0.22
Cellulomonas (ACT)	0.04	0.39	0.00	0.56	0.25	0.87	0.22
Cellvibrio (GP)	0.00	0.00	0.00	0.05	0.00	0.00	0.11
Chelatococcus (AP)	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Chloroflexus (CL)	0.00	3.75	0.04	8.58	4.45	6.59	0.99
Chthoniobacter (V)	0.00	3.01	0.00	0.76	0.82	1.24	0.33
Clostridium (F)	0.00	0.02	0.00	0.07	0.06	0.00	0.00
Conexibacter (ACT)	0.00	2.52	0.00	1.16	0.75	1.00	0.88
Corynebacterium (ACT)	0.04	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Crossiella (ACT)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.06	0.00	0.00
Cupriavidus (BP)	0.00	0.05	0.00	0.05	0.31	0.03	0.22
Cystobacter (DP)	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00
Cytophaga (B)	0.00	0.00	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00
Defluviicoccus (AP)	0.00	0.15	0.00	0.00	0.06	0.00	0.33
Dehalobacterium (F)	0.00	0.00	0.00	0.02	0.06	0.00	0.00
Dehalococcoides (CL)	0.00	1.15	0.00	1.78	2.45	0.80	1.33
Dehalogenimonas (CL)	0.00	0.22	0.00	0.07	0.19	0.00	0.00
Denitratisoma (BP)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.06	0.03	0.00
Derxia (BP)	0.00	0.07	0.00	0.17	0.00	0.03	0.22
Desulfitobacterium (F)	0.00	0.02	0.00	0.02	0.00	0.00	0.11
Desulfocaldus (DP)	0.00	1.15	0.00	0.80	0.19	0.50	0.44
Desulfococcus (DP)	0.00	0.05	0.00	0.02	0.25	0.10	0.33

Desulforhabdus (DP)	0.00	0.00	0.00	0.03	0.00	0.00	0.00
Desulfurivibrio (DP)	0.00	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Devosia (AP)	0.00	0.22	0.00	0.10	0.06	0.03	0.11
Dongia (AP)	0.00	0.15	0.00	0.37	0.44	0.17	0.22
Ensifer (AP)	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00
Enterobacter (GP)	0.00	0.00	0.08	0.00	0.00	0.00	0.00
Ferrithrix (ACT)	0.00	0.05	0.00	0.08	0.19	0.10	0.11
Flavisolibacter (B)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.30	0.00
Flavobacterium (B)	0.00	0.07	0.00	0.13	0.25	0.00	0.11
Frankia (ACT)	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.03	0.00
Gaiella (ACT)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.00
Geminicoccus (AP)	0.00	0.02	0.00	0.20	0.00	0.07	0.00
Gemmatimonas (G)	0.00	0.37	0.00	1.06	2.51	1.00	2.65
Geobacillus (F)	1.66	0.00	1.51	0.00	0.13	0.00	0.22
Geobacter (DP)	0.00	0.17	0.00	0.65	0.50	0.20	0.22
Georgenia (ACT)	0.00	2.08	0.04	1.61	1.63	1.87	1.22
Gracilibacter (F)	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Haliangium (DP)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.06	0.03	0.11
Halochromatium (F)	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Haloplasma (UB)	0.00	0.02	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00
Heliobacterium (F)	0.00	0.34	0.00	0.70	1.00	0.50	0.33
Herbaspirillum (BP)	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00
Herbiconiux (ACT)	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Holophaga (ACB)	0.00	0.12	0.00	0.03	0.50	0.00	0.11
Hydrotalea (B)	0.22	0.00	0.37	0.00	0.00	0.00	0.00
Hyphomicrobium (AP)	0.00	0.34	0.00	0.38	0.25	0.10	0.22
Iamia (ACT)	0.04	2.72	0.04	2.11	2.32	1.74	1.44
Ilumatobacter (ACT)	0.00	0.47	0.00	0.43	1.00	0.17	0.22
Inquilinus (AP)	0.00	0.05	0.00	0.10	0.13	0.23	0.11
Isopericola (ACT)	0.00	0.20	0.00	0.28	0.13	0.17	0.00

Janibacter (ACT)	0.00	0.07	0.00	0.07	0.00	0.10	0.00
Jiangella (ACT)	0.00	0.34	0.00	0.51	1.07	0.40	0.55
Kaistobacter (AP)	0.00	2.94	0.00	2.44	2.57	2.14	2.54
Kallotenue (CL)	0.00	0.00	0.12	0.00	0.00	0.00	0.00
Kineosporia (ACT)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.11
Klebsiella (GP)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.22
Kofleria (DP)	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Kribbella (ACT)	0.00	0.10	0.00	0.08	0.00	0.00	0.44
Labrenzia (AP)	0.00	0.07	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Lacibacterium (AP)	0.00	0.10	0.00	0.07	0.13	0.03	0.11
Legionella (GP)	0.00	0.39	0.00	0.13	0.06	0.07	0.22
Leifsonia (ACT)	0.00	0.05	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00
Lentzea (ACT)	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00
Levilinea (CL)	0.00	0.00	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00
Lihuaxuella (F)	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Longilinea (CL)	0.00	0.27	0.00	0.48	0.56	0.07	0.11
Luedemannella (ACT)	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00
Luteibacter (GP)	0.00	0.00	0.00	0.07	0.06	0.00	0.00
Luteimonas (GP)	0.00	0.10	0.00	0.02	0.00	0.13	0.11
Luteolibacter (V)	0.00	3.92	0.00	3.58	1.69	4.15	0.88
Lutispora (F)	0.00	0.15	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Lysobacter (GP)	0.00	0.39	0.00	0.30	0.75	0.47	0.33
Magnetospirillum (AP)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.13	0.03	0.11
Marispirillum (AP)	0.00	0.05	0.00	0.02	0.00	0.03	0.22
Marmoricola (ACT)	0.00	0.71	0.00	0.41	0.38	0.64	0.55
Mesorhizobium (AP)	0.00	0.98	0.04	0.63	1.13	1.04	1.44
Methylibium (BP)	0.00	0.07	0.00	0.13	0.00	0.03	0.11
Methylobacterium (AP)	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Methylocella (AP)	0.00	0.00	0.00	0.02	0.06	0.00	0.00
Methylococcus (GP)	0.00	0.00	0.00	0.02	0.06	0.00	0.00

Methylocystis (AP)	0.00	0.00	0.00	0.05	0.06	0.03	0.00
Methyloligella (AP)	0.00	0.15	0.00	0.30	0.13	0.23	0.33
Methylomarinovum (GP)	0.00	0.00	0.00	0.03	0.19	0.07	0.00
Methylophaga (GP)	0.00	0.00	0.00	0.07	0.00	0.00	0.00
Methylopila (AP)	0.00	0.05	0.00	0.13	0.06	0.17	0.00
Methylosinus (AP)	0.00	0.07	0.00	0.02	0.13	0.13	0.00
Microbulbifer (GP)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.00
Microcystis (CY)	0.00	0.00	0.00	0.03	0.00	0.00	0.11
Micromonospora (ACT)	0.00	0.15	0.00	0.28	0.00	0.07	0.00
Microvirga (AP)	0.00	0.07	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00
Myceligenans (ACT)	0.00	2.30	0.00	2.72	1.44	1.71	2.54
Mycobacterium (ACT)	0.00	1.47	0.00	0.96	0.63	0.97	0.44
Niastella (B)	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Nitrosomonas (BP)	0.00	0.02	0.00	0.03	0.00	0.00	0.00
Nitrospira (BP)	0.00	0.02	0.08	0.10	0.19	0.20	0.11
Nitrospira (ACT)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.19	0.00	0.33
Nocardia (ACT)	0.00	0.05	0.00	0.10	0.00	0.00	0.00
Nocardioides (ACT)	0.00	5.51	0.04	4.35	2.76	2.34	2.54
Nonomuraea (ACT)	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Novosphingobium (AP)	0.00	0.44	0.00	0.70	0.38	0.23	0.88
Oceanibaculum (AP)	0.00	1.05	0.00	2.85	1.94	3.05	3.43
Ohtaekwangia (B)	0.00	5.66	0.16	4.94	5.08	5.15	9.94
Opiritatus (V)	0.00	0.15	0.00	0.17	0.25	0.10	0.44
Ornithinicoccus (ACT)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.06	0.00	0.00
Paenibacillus (F)	0.00	0.02	0.08	0.00	0.00	0.03	0.00
Paracoccus (AP)	0.00	0.34	0.00	0.50	0.06	0.33	0.55
Paracraurococcus (AP)	0.00	0.02	0.00	0.05	0.06	0.00	0.11
Parasegetibacter (B)	0.00	0.05	0.00	0.05	0.00	0.03	0.11
Pedobacter (B)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.19	0.07	0.11
Pelagibius (AP)	0.00	0.02	0.00	0.12	0.19	0.03	0.44

Pelobacter (DP)	0.00	0.12	0.00	0.18	0.19	0.13	0.11
Phaeospirillum (AP)	0.00	0.05	0.00	0.22	0.06	0.17	0.00
Phenylobacterium (AP)	0.00	0.34	0.00	0.23	0.44	0.67	0.55
Phormidium (CY)	0.00	0.07	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Phycisphaera (PL)	0.00	0.07	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Planctomyces (PL)	0.00	0.02	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00
Plantactinospora (ACT)	0.00	0.07	0.00	0.03	0.00	0.03	0.00
Porphyrobacter (AP)	0.00	0.02	0.00	0.05	0.00	0.03	0.22
Promicromonospora (DP)	0.00	0.39	0.00	0.33	0.25	0.37	0.00
Prostheco bacter (V)	0.00	0.07	0.00	0.03	0.31	0.03	0.11
Prosthecomicrobium (AP)	0.00	0.20	0.00	0.05	0.00	0.10	0.00
Pseudolabrys (AP)	0.00	0.07	0.00	0.03	0.00	0.10	0.00
Pseudomonas (GP)	0.04	0.37	0.00	0.30	0.38	0.44	0.44
Pseudonocardia (ACT)	0.00	1.08	0.00	2.07	0.75	1.71	1.44
Pseudoxanthomonas (GP)	0.00	0.00	0.00	0.05	0.06	0.07	0.11
Ralstonia (BP)	0.00	0.00	0.04	0.02	0.00	0.00	0.00
Ramlibacter (BP)	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00
Rhizobium (AP)	0.00	1.25	0.00	1.16	0.31	1.44	0.99
Rhodobacter (AP)	0.00	0.02	0.00	0.05	0.06	0.03	0.11
Rhodocista (AP)	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.11
Rhodococcus (ACT)	0.00	0.02	0.00	0.02	0.13	0.03	0.00
Rhodoligotrophos (AP)	0.00	0.05	0.00	0.08	0.00	0.10	0.33
Rhodoplanes (AP)	0.04	1.13	0.00	0.93	0.31	1.31	1.22
Rhodovastum (AP)	0.00	0.10	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00
Rhodovibrio (AP)	0.00	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.11
Roseimicrobium (V)	0.00	1.42	0.00	1.05	1.69	1.31	1.88
Roseomonas (AP)	0.00	0.02	0.00	0.18	0.00	0.10	0.33
Rubellimicrobium (AP)	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00
Saccharopolyspora (ACT)	0.00	0.24	0.00	0.20	0.82	0.03	0.00
Sandaracinus (DP)	0.00	0.51	0.00	0.12	0.38	0.27	1.33

Schlegelella (BP)	0.00	0.00	0.00	0.03	0.13	0.00	0.00
Sediminibacterium (B)	0.00	0.00	0.08	0.00	0.00	0.00	0.00
Shinella (AP)	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.03	0.00
Singulisphaera (PL)	0.00	0.00	0.00	0.12	0.06	0.20	0.00
Sinorhizobium (AP)	0.00	0.10	0.00	0.20	0.50	0.07	0.55
Skermanella (AP)	0.00	0.02	0.00	0.15	0.00	0.10	0.11
Solirubrobacter (ACT)	0.00	0.02	0.00	0.08	0.00	0.00	0.00
Sphaerobacter (CL)	0.00	2.91	0.08	2.49	4.20	0.97	0.33
Sphingobacterium (B)	0.00	0.02	0.04	0.03	0.06	0.07	0.33
Sphingobium (AP)	0.00	0.10	0.00	0.61	0.06	11.55	3.76
Sphingomonas (AP)	0.00	2.82	0.12	2.16	1.76	2.51	2.10
Sphingopyxis (AP)	0.00	0.02	0.00	0.03	0.00	0.00	0.00
Sphingosinicella (AP)	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Sphingoterrabacterium (B)	0.00	0.05	0.00	0.03	0.06	0.03	0.00
Spongiibacter(GP)	0.00	0.02	0.00	0.07	0.00	0.00	0.00
Sporichthya (ACT)	0.00	0.00	0.00	0.03	0.00	0.03	0.00
Sporosarcina (F)	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00
Starkeya (AP)	0.00	0.07	0.00	0.03	0.00	0.00	0.00
Stella (V)	0.00	0.00	0.00	0.08	0.13	0.03	0.00
Stenotrophomonas (GP)	0.04	0.00	0.04	0.00	0.00	0.00	0.00
Steroidobacter (GP)	0.00	0.32	0.00	0.40	0.94	0.33	0.44
Stigmatella (DP)	0.00	0.12	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00
Streptoalloteichus (ACT)	0.00	0.00	0.00	0.02	0.06	0.00	0.00
Streptococcus (F)	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00
Streptomyces (ACT)	0.00	0.00	0.00	0.10	0.13	0.00	0.11
Sulfitobacter (AP)	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Sulfurospirillum (EP)	0.00	0.07	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Syntrophobacter (DP)	0.00	0.07	0.00	0.37	0.44	0.10	0.11
Syntrophus (DP)	0.00	0.02	0.00	0.07	0.13	0.20	0.22
Tetrasphaera (ACT)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.06	0.00	0.00

Thalassobaculum (AP)	0.00	0.02	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00
Thauera (BP)	0.00	0.02	0.00	0.02	0.13	0.00	0.11
Thermoflavimicrobium (F)	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Thermoleophilum (ACT)	0.00	0.15	0.00	0.03	0.25	0.07	0.00
Thermomonas (GP)	0.00	0.64	0.00	0.23	0.00	1.14	0.00
Thermovum (AP)	0.00	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Thiobacillus (BP)	0.00	0.05	0.00	0.17	0.06	0.20	0.11
Thioclava (AP)	0.00	0.02	0.00	0.03	0.00	0.07	0.00
Thiohalophilus (GP)	0.00	3.01	0.00	2.46	2.82	2.44	2.87
Thiopfundum (GP)	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.10	0.11
Thiorhodospira (GP)	0.00	0.07	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Tistlia (AP)	0.00	0.00	0.00	0.13	0.00	0.00	0.11
Variovorax (BP)	0.00	0.02	0.12	0.10	0.06	0.00	0.00
Vasilyevaea (AP)	0.00	0.10	0.00	0.15	0.06	0.07	0.00
Verrucomicrobium (V)	0.00	2.77	0.12	0.98	2.70	1.71	2.76
Xanthomonas (GP)	0.00	6.78	0.04	6.99	5.33	5.59	4.97
Xenophilus (GP)	0.00	0.00	0.00	0.05	0.13	0.00	0.00
Yonghaparkia (ACT)	0.00	0.02	0.00	0.07	0.00	0.03	0.00
Zoogloea (BP)	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00