

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral:

***“Ecología microbiana de los procesos de biorremediación in situ
de sedimentos de cursos de agua dulce contaminados con
hidrocarburos”***

Tesista: Lic. Viviana Ayelén Starevich

Directora: Dra. Irma Susana Morelli

Codirectora: Dra. Laura Madueño

Año: 2024

El presente trabajo, para optar al grado de Doctora 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), de la Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección de la Dra. Irma S. Morelli y la codirección de la Dra. Laura Madueño.

Los resultados de este trabajo de tesis han dado origen a los siguientes trabajos presentados en congresos:

- **Tercer Congreso ISME Latinoamericano**, 7 al 10 de agosto de 2023 en la Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Buenos Aires. Título: ***“Biorremediación ex situ de sedimentos contaminados con hidrocarburos: efecto de la aireación”***. Starevich V, A.; Madueño L.; Morelli I, S.
- **18Th International Symposium on Microbial Ecology (ISME)**. Lausanne, Suiza, septiembre 2022. Título: ***“Microbial community structure and metabolic profile of anthropized freshwater sediments from Argentina to develop sustainable management strategies”*** Starevich V. A., Madueño L., Festa S., Agnello A. C., Layun M. F., Cecotti, M., Onetto, M. E., Morelli I. S.
- **Segundo congreso ISME América Latina**. Universidad de Los Andes, Colombia, 27-30 Julio 2021. Título: ***“Estudio de la actividad degradadora anaeróbica de hidrocarburos en sedimentos de agua dulce con hidrocarburos”*** Starevich V. A.; Madueño L.; Morelli I, S. (Póster modalidad virtual).
- **Primer congreso ISME América Latina**. Valparaíso, Chile 11-13 de septiembre 2019. Título: ***“Estudio de la degradación anaeróbica potencial de hidrocarburos en la aplicación de Recuperación Natural Monitoreada de sedimentos contaminados de cursos de agua dulce”*** Starevich V, A.; Madueño L.; Morelli I, S.

En paralelo se realizaron colaboraciones que derivaron en la publicación de los siguientes artículos científicos:

- ***“Microbial community structure and metabolic profile of anthropized freshwater tributary channels from La Plata River, Argentina, to develop sustainable remediation strategies”***. Starevich V. A., Madueño L., Festa S., Agnello A. C., Layun M. F., Cecotti, M., Onetto, M. E., Del Panno M.T., Morelli I. S. October 2023 DOI: [10.21203/rs.3.rs-3496349/v1](https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-3496349/v1) License [CC BY 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)
- ***“Assessment of biological contribution to natural recovery of anthropized freshwater sediments from Argentina: autochthonous microbiome structure and functional prediction”***. Madueño L., Starevich V.A., Agnello A. C., Coppotelli B. M., Laprida C., Vidal N.C., Di Marco P., Onetto, M. E., Del Panno M.T., Morelli I. S. Front Microbiol. 2021 Mar 5; 12:601705. doi: 10.3389/fmicb.2021.601705. PMID: 33897628; PMCID: PMC8059475.

Y las siguientes presentaciones en congresos:

- **Tenth International Conference on Remediation and Management of Contaminated Sediments**, 11-14 febrero de 2019, Nueva Orleans, EEUU. Poster. Título: ***“Assessment of the biological contribution to monitored natural recovery of anthropized freshwater sediments”*** Madueño L., Starevich V. A., Coppotelli B.M., Agnello A.C., Vidal N. C., Oneto M. E., Del Panno M. T., Morelli I. S.
- **IV Congreso Argentino de Microbiología Agrícola y Ambiental**, 11, 12 y 13 de abril de 2018, Mar del Plata, Argentina. Póster. Título: ***“Estudio de la factibilidad de la Recuperación Natural Monitoreada como tecnología para el saneamiento de sedimentos de cursos de agua dulce con diferente historia de impacto ambiental”*** Starevich V, A., Zulueta M., Granada M., Coppotelli B. M, Oneto M, E., Vidal N., Del Panno M, T. Madueño L., Morelli I, S.

A mi nonno y a papá.

-Má, ¿qué hay abajo de la tierra? -

Agradecimientos

Quisiera agradecer a todos los que de alguna manera hicieron posible la realización de este trabajo.

A mis directoras;

Irma, gracias por considerarme para el proyecto canales, por siempre tener más confianza que yo en que las cosas iban a salir, por siempre tener la respuesta correcta y por ser no solo la cabeza, sino el corazón del L5.

Lau, gracias por todos estos años de trabajo juntas, por la paciencia, la buena onda y el apoyo en estos últimos días tan difíciles!!

Bibi, gracias por tus consejos, correcciones y por tu ayuda.

A CONICET e Y-TEC por otorgarme la beca que me permitió trabajar de lo que tanto me gusta.

A la UNLP, en particular a la Facultad de Ciencias Exactas y a quienes forman parte de la Secretaría de Posgrado y el Departamento de Ciencias Biológicas por brindarnos su ayuda.

Al CINDEFI y a cada uno de sus integrantes por todo lo compartido. Especialmente a mis compas becarios, a Esteban HPLC, Julito y Gladis.

Al L5 de ayer y al de hoy, por cada día compartido, por todas las risas, llantos, viajes, por la compañía y la ayuda de cada uno de ustedes. En especial:

A Tere, por siempre ser tan amable, por su interés, por su gran ayuda estos días.

A Claudita, porque todo lo que me enseñaste lo puse en práctica en esta tesis y nunca te lo pude agradecer.

A Vero, por sus retos ;) por estar atenta siempre y por enseñarme a interpretar los resultados del GC.

A Mariana, por sus historias de mil vidas, por ser un ejemplo de superar lo malo siempre con una sonrisa.

A Pauli, por sus abrazos inigualables.

A Sabri y Caro, por estar ahí para apoyar, enseñar y escuchar. Gracias por nuestros zooms de QIIME en pandemia! Y gracias, Sa por tu ayuda y opinión en la recta final.

A Maca, Rober y Pepi, que me conocieron y aguantaron en modo tesis y siempre me enseñan algo para ser menos "vintage".

A mis compañeros de aventura doctoral, por haber hecho que sea tan lindo ir a trabar cada día:

Esteban, el mejor amigo que la ciencia me pudo dar!!!! Gracias por tu recibimiento cada mañana, por tu ayuda en el lab, por tu opinión, lectura, por enseñarme, por estar presente y atento a todo todos los días, no importa cuantos kilómetros de distancia nos separen y gracias por siempre hacerte un tiempo para mí.

Nati, gracias por esa alegría contagiosa, por ser tan solidaria, por nuestras charlas en el auto esperando el micro, por tus audios larguísimos, sos genial!

Marian, gracias por hacerme parte del grupo allá por el 2013, por ser tan atenta, aconsejarme, escucharme, por tus dotes de anfitriona que hacen que uno se sienta tan bien cuando esta con vos!

Linux, gracias por estar ahí lista para acompañarme a hacer alguna maldad, por nuestros after lab de catarsis que tan bien me han hecho!

Juni, mi pequeña saltamontes, que además de ser mi compañera de cada día de lab ayudó a esta grandulona a avanzar en varias cositas de la vida, gracias!

Pelufina, gracias por ayudarme siempre y por compartir tu casa y familia con nosotras!

Martini, gracias por tu empatía, por tu compañía y charlas hermosas, espero haber aprendido un poco de tu forma excelente de trabajar.

Sobre todo; gracias por su amistad!!! Los quiero!!!!

A mi familia, Tía, Tío, primos y cuñados, por todo el cariño que me dan.

A mis sobris Santi y Emma que son lo más hermoso que existe!

A mamá, por enseñarme a terminar cada cosa que empiezo, por cuidarnos tanto y por estar siempre que te necesito. Gracias!!!

A mis hermanas, porque son una parte de mí, son indispensables y las quiero muchísimo!

A mi nonna, gracias por demostrarme tanto cariño, por ser mi amiga, por preocuparte y alegrarte por mí.

Gracias San, por ser mi gran compañero, por toda tu paciencia, por hacerme las cosas más fáciles, por ser mi apoyo todos los días y sobre todo por quererme aun cuando estoy en modo Britney je,je,je. Te quiero mucho, mucho!!!!!!

A mis amigos de la facu, del colegio, de la vida, ¡gracias por estar siempre!

A Pau por escucharme.

A Flor, por esas meriendas de charlas larguísimas y a Gra, que su recuerdo me inspira a ir siempre para adelante.

Especialmente a mis Murallas que hasta pueden “sentir mis vibras” y me bancan en todo!!!

Índice

Abreviaturas	13
1. Introducción	15
1.1 El petróleo en Argentina.....	15
1.1.1 Descubrimiento.....	15
1.1.2 Procesamiento	15
1.2 Sedimentos	16
1.3 Compuestos de origen antrópico con impacto en sedimentos.....	18
1.3.1 Hidrocarburos del petróleo	18
1.3.2 Elementos potencialmente tóxicos.....	20
1.4 Normativa ambiental Argentina	20
1.5.1 Dragado.....	27
1.5.2 <i>Capping</i>	28
1.5.3 Remediación Natural Monitoreada	29
1.5.3.1 Diagnóstico molecular ambiental.....	30
1.6 Comunidades microbianas y biorremediación de sedimentos	31
1.6.1 Degradación aeróbica de hidrocarburos	31
1.6.2 Degradación anaeróbica de hidrocarburos.....	32
2. Hipótesis y Objetivos	37
2.1 Hipótesis.....	37
2.2 Objetivos	37
2.2.1 Objetivo general.....	37
2.2.2 Objetivos específicos	37
3. Materiales y Métodos.....	39
3.1 Materiales.....	39
3.1.1 Muestreo	39
3.1.2 Medios de cultivo	41
3.1.3 Buffers y soluciones	42
3.1.3.1 Buffers	42
3.1.3.2 Soluciones de agarosa.....	42
3.1.3.3 Mezcla de PAH en pentano	42
3.2 Métodos	42

3.2.1 Recuentos de bacterias aeróbicas	42
3.2.1.1 Preparación de las suspensiones de sedimento	42
3.2.1.2 Recuento de bacterias heterótrofas cultivables.....	43
3.2.1.3 Recuento de Bacterias degradadoras de PAH.....	43
3.2.1.4 Recuento de bacterias degradadoras de hidrocarburos alifáticos	43
3.2.2 Recuentos de bacterias anaeróbicas.....	43
3.2.2.1 Preparación de las suspensiones de sedimento	43
3.2.2.2 Recuento de bacterias heterótrofas anaeróbicas.....	44
3.2.2.3 Recuento de bacterias sulfato reductoras por el método del NMP.....	44
3.2.3 Determinación de la Actividad Biológica	44
3.2.3.1 Actividad Deshidrogenasa	44
3.2.3.2 Actividad Ureasa	45
3.2.3.3 Actividad Lipasa	45
3.2.3.4 Actividad Aril-sulfatasa	45
3.2.3.5 Actividad fosfatasa ácida y alcalina	46
3.2.3.6 Actividad Proteasa	46
3.2.4 Determinaciones de parámetros fisicoquímicos	47
3.2.5 Extracción de Ácido nucleicos	49
3.2.5.1 Extracción de ADN total de cepas bacterianas.....	49
3.2.5.2 Extracción de ADN de las muestras de sedimento	49
3.2.5.3 Extracción de ARN y síntesis de cADN de sedimentos	49
3.2.6 Secuenciación masiva de amplicones del gen 16S rRNA del sedimento.....	49
3.2.7 Análisis bioinformático de los amplicones 16S rRNA de las muestras de sedimento	50
3.2.7.2 Abundancia diferencial de rutas metabólicas en los sedimentos.....	51
3.2.8 Cuantificación del gen 16S rRNA, de genes funcionales de degradación de hidrocarburos y de sus transcritos.....	51
3.2.8.1 Obtención de patrones plasmídicos	51
3.2.8.2 Cuantificación de genes y transcritos	55
3.2.9 Secuenciación de los transcritos.....	56
3.2.10 Efecto de la aireación sobre la biorremediación de sedimentos afectados con hidrocarburos	56
3.2.10.1 Preparación de los microcosmos	56
3.2.10.2 Determinación del porcentaje de humedad en la mezcla de sedimento.....	58
3.2.10.3 Determinación de oxígeno disuelto	58

3.2.10.4 Cuantificación del contenido de hidrocarburos totales C10-C40 por cromatografía gaseosa ..	58
3.2.10.5 Secuenciación de amplicones del gen 16S rRNA de los sedimentos de los microcosmos.....	59
3.2.10.6 Análisis bioinformático de los amplicones 16S rRNA de los microcosmos	59
3.2.11 Análisis estadísticos	59
3.2.12 Análisis de abundancia diferencial utilizando ANCOM-BC.....	60
4. Estudio de la estructura de la comunidad microbiana en los sedimentos de un curso de agua dulce y evaluación de la contribución biológica a la degradación de hidrocarburos	62
4.1 Caracterización fisicoquímica y microbiológica de muestras de agua y sedimento	63
4.1.1 Caracterización del agua	63
4.1.2 Caracterización de los sedimentos	64
4.1.2.1 Contenido de hidrocarburos en los sedimentos.....	65
4.1.2.2 Contenido de elementos potencialmente tóxicos (EPT) en los sedimentos	68
4.1.2.3 Recuentos de microorganismos cultivables en los sedimentos	69
4.1.2.4 Estudio de la actividad biológica de los sedimentos	70
4.2 Estudio de la estructura y diversidad de las comunidades bacterianas en los sedimentos	73
4.2.1 Estudio de α y β diversidad.....	74
4.2.2 Asignación taxonómica	81
4.3.1 Estudio de las rutas metabólicas diferenciales entre los grupos 1, 2 y 3	86
4.3.2 Predicción del potencial degradativo de hidrocarburos	90
4.5.1 Cuantificación de transcritos.....	95
4.5.2 Asignación taxonómica de los transcritos.....	96
4.6 Discusión	99
5. Efecto de la aireación sobre la biorremediación de sedimentos afectados con hidrocarburos	109
5.1 Determinación de oxígeno disuelto en el agua	110
5.2 Características macroscópicas de los sedimentos.....	111
5.3 Determinación de las actividades enzimáticas en los sedimentos.....	113
5.4 Determinación de la concentración de hidrocarburos totales	115
5.5 Cuantificación del gen 16S rRNA y de genes funcionales de degradación de hidrocarburos	116
5.6 Estudio de la diversidad de las comunidades microbianas en los microcosmos.....	119
5.6.1 Diversidad alfa	119
5.6.2 Diversidad beta	120

5.7 Predicciones de los KOs de degradación de compuestos xenobióticos	125
5.7 Discusión	129
6. Conclusiones	135
7. Bibliografía	139
Anexo	153

Abreviaturas

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

AI: Amonio Intercambiable.

ASV: Variantes de Secuencia de Amplificación (del inglés *Amplicon Sequence Variants*).

BTEX: Benceno, Tolueno, Etilbenceno, Xileno.

cADN: Ácido Desoxirribonucleico complementario.

CG: Cromatografía Gaseosa.

DMA: Diagnóstico Molecular Ambiental.

EPT: Elementos Potencialmente Tóxicos.

HA: Hidrocarburos Alifáticos.

HAr: Hidrocarburos Aromáticos.

HT: Hidrocarburos Totales.

NiS: Nitrógeno Soluble.

NMP: Número Mas Probable.

NT: Nitrógeno Total.

PAH: Hidrocarburos policíclicos aromáticos.

PBS: Buffer fosfato salino.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PgB: Medio de cultivo Postgate B.

PREDOX: Potencial de Oxido Reducción.

PROF: Profundidad.

PT: Fosforo Total.

qPCR: PCR cuantitativa.

RHD: Dioxigenasa Hidroxilante de anillo.

RMN: Remediación Natural Monitoreada.

RNA: Ácido ribonucleico.

rRNA: Ácido ribonucleico ribosomal.

RT-qPCR: PCR cuantitativa de transcritos de cADN

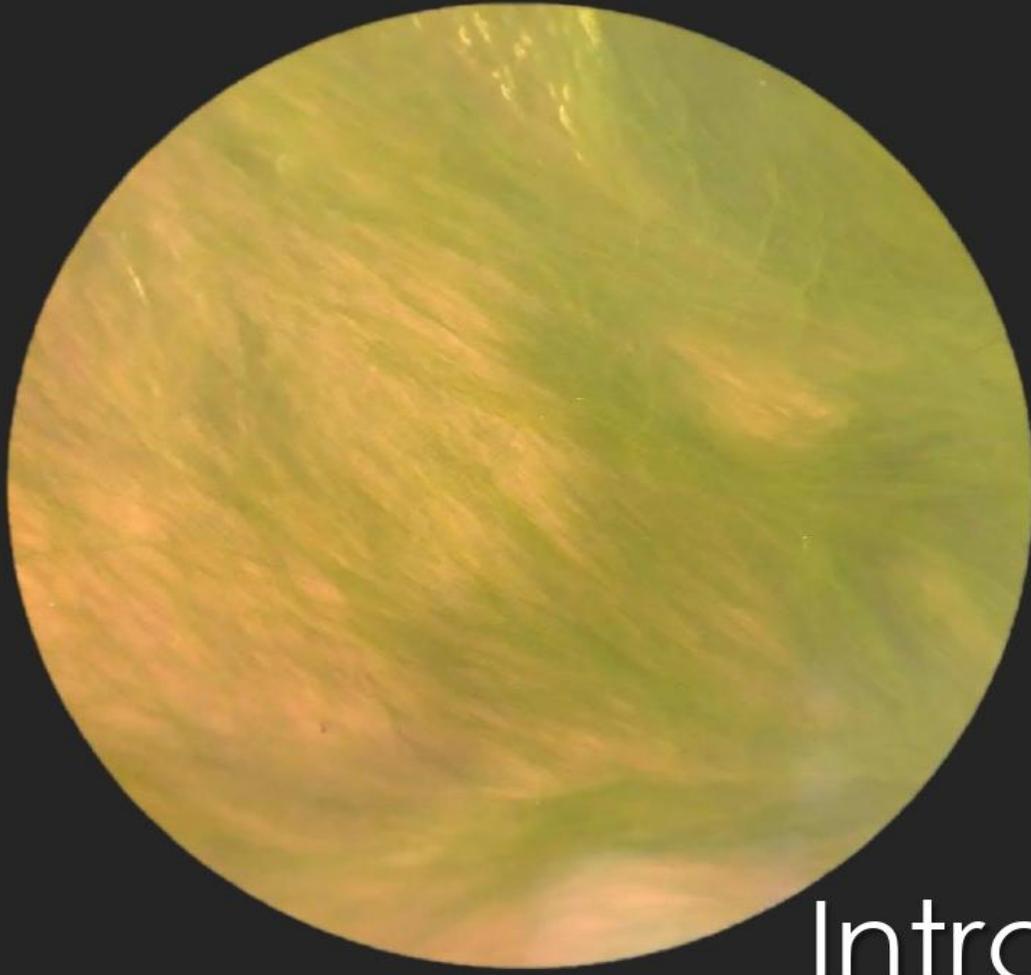
S-2: Sulfuro.

SRB: Bacterias sulfato reductoras.

SS: Sulfato Soluble.

TCA: Ciclo de los Ácidos Tricarboxílicos.

Capítulo 1



Introducción

1. Introducción

1.1 El petróleo en Argentina

1.1.1 Descubrimiento

Antes de que se hallara petróleo en Argentina, el principal combustible utilizado era el carbón, el cual se importaba casi íntegramente desde Inglaterra.

La primera concesión para la exploración y explotación de petróleo en el país se dio en la provincia de Jujuy en 1865, la empresa “Compañía Jujeña de Kerosén” logro refinar petróleo. Sin embargo, debió cerrar debido a la falta de capitales. Entre 1872 y 1891 existieron otras concesiones en las provincias de Jujuy, Mendoza y Neuquén. Estos establecimientos tuvieron producciones poco abundantes y con dificultades para el transporte debido a su lejanía con los puertos¹. En el año 1907 se descubrió petróleo crudo en la cuenca del Golfo San Jorge en Comodoro Rivadavia. Este hecho, que es considerado el descubrimiento del petróleo en Argentina, permitió alcanzar el autoabastecimiento de petróleo en 1980 y posibilitó que Argentina se volviera un país exportador de este producto a partir de 1992².

1.1.2 Procesamiento

Para abastecer el mercado nacional y exportar subproductos del petróleo fue necesario instalar refinerías. Hoy en día Argentina cuenta con ocho refinerías en las provincias de Buenos Aires, Santa Fe, Salta, Mendoza y Neuquén, pertenecientes a diferentes empresas nacionales e internacionales y terminales marítimas de almacenamiento de crudo (terminales de crudo) ubicadas en las provincias de Buenos Aires, Chubut, Santa Cruz y Tierra del fuego, que se muestran en la Figura 1.1. Además, se desarrolló una red de transporte y distribución que incluye puertos marítimos y fluviales, redes de ductos, terminales de carga entre otras instalaciones necesarias.

Debido al creciente aumento de las actividades de extracción, procesamiento y transporte de petróleo existen ambientes acuáticos y terrestres que se ven afectados por las consecuencias de estas actividades. La última emergencia ambiental en nuestro país fue reportada en 2021 en la provincia de Río Negro donde una ruptura en el ducto troncal de una empresa causó un gran derramamiento de crudo³. Anteriormente, en la provincia de Buenos Aires, hace más de veinte años, un accidente entre dos buques liberó 5.400.000 litros de petróleo en las aguas del Río de la Plata⁴ frente a las costas de Magdalena.

¹ <https://elhistoriador.com.ar/el-descubrimiento-de-petroleo-en-comodoro-rivadavia-por-felipe-pigna/>

² Fuente: Instituto Argentino del Gas y el Petróleo. “La industria Argentina de los Hidrocarburos. Panorama general a 2020”

³ <https://www.infobae.com/economia/2021/12/11/catastrofe-ambiental-se-produjo-un-derrame-de-petroleo-de-grandes-dimensiones-en-rio-negro/>

⁴ <https://www.infobae.com/tendencias/ecologia-y-medio-ambiente/2018/11/19/a-dos-decadas-del-mayor-derrame-de-petroleo-sobre-agua-dulce-de-la-historia-mundial/>

Algunos sitios de interés para el estudio y monitoreo de ambientes con hidrocarburos del petróleo en sedimentos de agua dulce son los estuarios del Río de La Plata, Bahía Blanca o la bahía de Ushuaia (Arias et al., 2010; Commendatore et al., 2012; Oliva et al., 2015; Madueño et al., 2021).

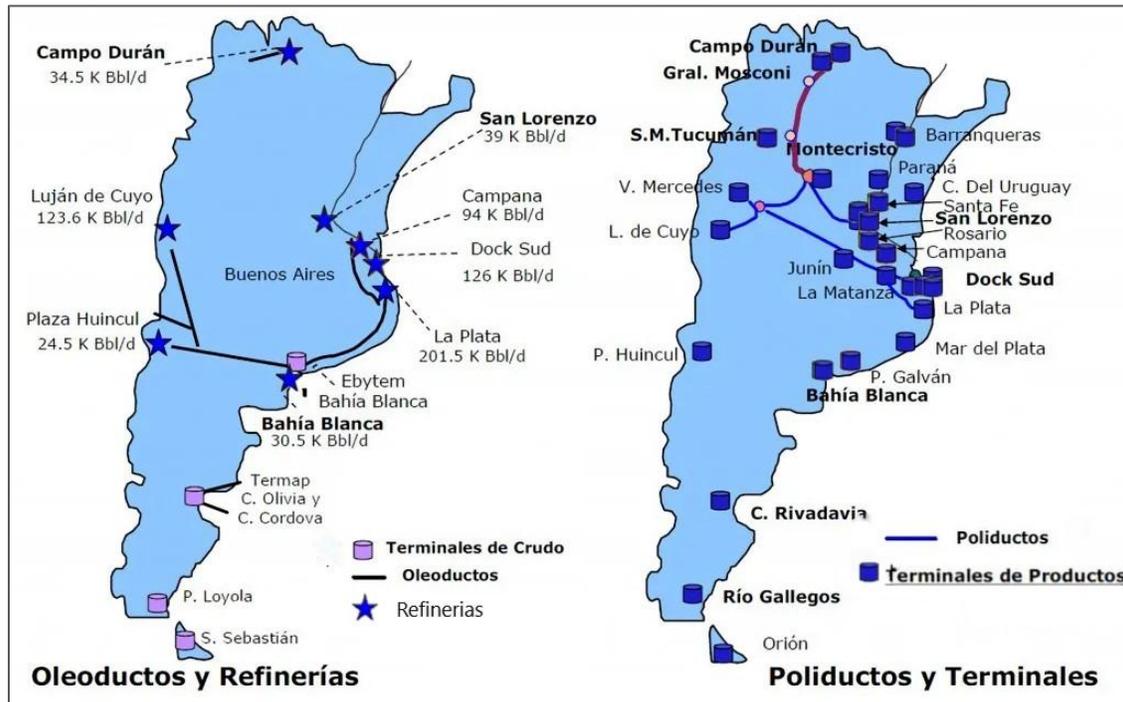


Figura 1.1: Ubicación de terminales de crudo, oleoductos, refinerías, poliductos y terminales de productos en Argentina. Imagen modificada del diario “El Patagónico” del 29 octubre de 2012⁵

1.2 Sedimentos

Los sedimentos son materiales no consolidados, productos de modificación de rocas, suelos y materia orgánica que han sufrido meteorización, transporte, transformación y deposición cerca de la superficie de la tierra o de cuerpos de agua. Dependiendo de su origen, los sedimentos pueden contener partículas de diferentes tamaños, formas, composiciones minerales y químicas. Generalmente, el material más grueso, como arena (> 62,5 µm – < 2 mm) y cantos rodados (> 4 mm – < 64 mm), suele asentarse cerca de las orillas de lagos y en canalones de ríos, y las partículas más delgadas como limos (3,9 – 62,5 µm) o arcilla (< 3,9 µm), se alojan en áreas más profundas y de menor flujo, como fondos de lagos (Cardoso et al., 2019).

⁵ <https://www.elpatagonico.com/en-el-mercado-del-refino-se-consolidan-nuevos-jugadores-n673573>

Los sedimentos acuáticos tienden a formar agregados, que son una combinación de minerales, materia orgánica, aire, agua y microorganismos. En los agregados de sedimentos, hay también vacíos entre partículas, llamados poros, que pueden estar ocupados tanto por agua como por aire. El agua intersticial que ocupa los poros de los sedimentos actúa como líquido dónde se solubilizan varios iones y sales, que son esenciales para la aparición de muchas sustancias y reacciones químicas como también para la existencia y desempeño de microorganismos. Además, el agua de poro puede contener cantidades significativas de CO_2 y CH_4 disueltos o contener O_2 gaseoso.

Los sedimentos reciben grandes cantidades de materia orgánica de origen autóctono, compuesta por algas, plantas y otros animales originarios del propio medio acuático, así como también alóctono, compuesta principalmente de materiales terrestres y derivados de la actividad antropogénica (Figura 1.2) que se presenta en dos formas: materia orgánica disuelta o particulada (Cardoso et al., 2019).

Por otro lado, los sedimentos actúan como fuente y sumideros de contaminantes. En aguas superficiales, los compuestos orgánicos e inorgánicos de origen antrópico pueden disolverse o absorberse a la materia en suspensión y a los sedimentos de acuerdo con sus propiedades químicas. En el caso de una fuerte sorción, la sedimentación de las partículas en suspensión y la formación de sedimentos eliminan estos compuestos sólo de la fase acuosa acumulándolos en los ríos y lagos (Chiaia-Hernández et al., 2022).

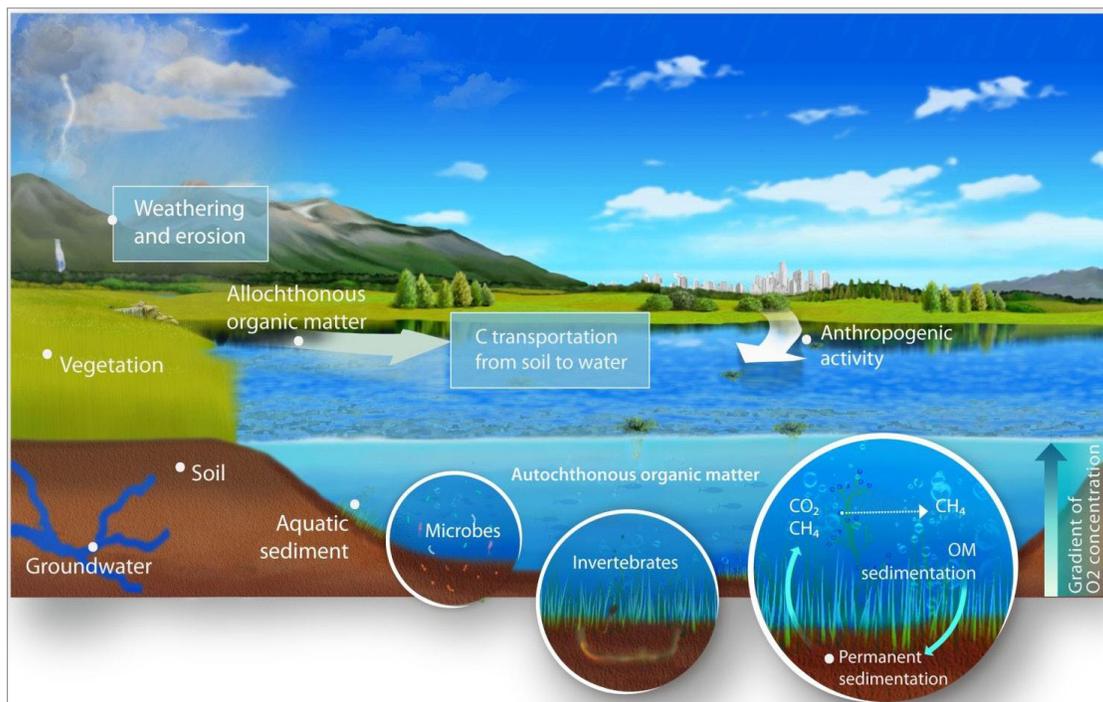


Figura 1.2: Origen de la materia orgánica presente en los sedimentos de ecosistemas acuáticos. Materia orgánica alóctona, compuesta principalmente de materiales terrestres y derivados de la actividad antropogénica; y materia orgánica autóctona, compuesta por algas, plantas y otros animales originarios del propio medio acuático. Tomado de: Cardoso, S.J. et al.; 2019.

1.3 Compuestos de origen antrópico con impacto en sedimentos

1.3.1 Hidrocarburos del petróleo

Puede considerarse al petróleo como una mezcla de hidrocarburos gaseosos, líquidos y sólidos con pequeñas cantidades de compuestos que contienen nitrógeno, oxígeno y azufre, así como trazas de componentes metálicos. Debido a sus propiedades recalcitrantes, los hidrocarburos del petróleo se clasifican como contaminantes prioritarios emergentes (Logeshwaran et al., 2018).

Los componentes del petróleo crudo pueden dividirse en crudos parafínicos, asfálticos y mixtos, según la Organización Mundial de la Salud, 1982. Los compuestos parafínicos se componen de hidrocarburos alifáticos (parafinas), cera de parafina (hidrocarburos alifáticos de cadena más larga), y aceites de alto grado. La nafta es la más ligera de las fracciones parafínicas, seguida del kerosén. Los componentes asfálticos contienen mayores concentraciones de hidrocarburos ciclo alifáticos y aceites lubricantes de alta viscosidad.

Los disolventes del petróleo son el producto de la destilación del crudo y se clasifican generalmente por rangos de puntos de ebullición. Los lubricantes, las grasas y las ceras son fracciones de alto punto de ebullición de los petróleos crudos. Las fracciones sólidas más pesadas de los petróleos crudos son los residuos o betunes (Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR))⁶.

La transformación del carbón en coque, o el refinado pirolítico de residuos de petróleo en hidrocarburos más bajos, provoca la emisión de hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH) de origen pirogénico. Pero, además, estos compuestos pueden provenir de fuentes petrogénicas entre las que se encuentran el transporte, la estiba y la utilización de combustible líquido crudo y sus productos; los vertidos de petróleo en aguas oceánicas y fluviales, las filtraciones de tanques de almacenamiento de petróleo sobre y bajo tierra, y la acumulación de grandes cantidades de vertidos menores de gasolina, diesel y constituyentes interrelacionados con el transporte (Kour et al., 2021). Los PAH son compuestos hidrofóbicos con dos o más anillos bencénicos fusionados que se clasifican según su peso molecular en: PAH de bajo peso molecular (entre 2-3 anillos) y PAH de alto peso molecular (entre 4-6 anillos). La Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA) incluyó en la lista de contaminantes prioritarios a 16 PAH (acenafteno, acenaftileno, antraceno, fluoranteno, fluoreno, naftaleno, fenantreno, pireno, benzo[a]antraceno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[ghi]perileno, benzo[a]pireno, criseno, dibenzo[a,h]antraceno e indeno[1,2,3-cd]pireno) debido a su toxicidad, potencial daño para la salud humana y frecuencia de aparición en ambientes monitoreados (Zelinkova y Wenzl, 2015)(Tabla 1.1).

⁶ <https://wwwn.cdc.gov/TSP/ToxProfiles/ToxProfiles.aspx?id=424&tid=75>

Otros hidrocarburos comúnmente hallados afectando sedimentos son los hidrocarburos mono aromáticos conocidos como BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno y xileno). Los compuestos BTEX suelen ser más volátiles que los PAH, con puntos de ebullición más bajos, y se evaporan fácilmente en el aire (Onyena et al., 2023). Debido a su baja densidad y elevada presión de vapor es de esperar que, en ambientes acuáticos, los BTEX se concentren en la capa superficial del agua y se evaporen a la atmósfera. Sin embargo, se han hallado en partes más profundas de la columna de agua e incluso en sedimentos (Astrahan et al., 2023).

Physical and chemical properties of the 16 priority PAHs.

PAHs compounds	Structure	No. of benzene rings	MW (g/mol)	Water solubility (mg/L)	Boiling point (C)	Melting point (C)	Vapor pressure at 25 °C, Pa	Log K _{ow}	Carcinogenicity
Naphthalene (Nap)		2	128.17	3.93	218	80.2	10.4	3.37	3
Acenaphthylene (Acy)		3	152.2	3.93	265-280	92-93	9 × 10 ⁻¹	4	3
Acenaphthene (Ace)		3	154.2	1.93	278-279	90-96	3 × 10 ⁻¹	4	3
Fluorene (Flu)		3	166.2	1.68-1.98	293-295	116-118	9 × 10 ⁻²	4.18	3
Phenanthrene (Phe)		3	178.2	1.2	339-340	96-101	2 × 10 ⁻²	4.57	3
Anthracene (Ant)		3	178.2	0.076	340	216-219	1 × 10 ⁻³	4.54	3
Fluoranthene (Fla)		4	202.26	0.2-2.6	375-393	107-111	1.2 × 10 ⁻³	5.22	3
Pyrene (Pyr)		4	202.25	0.077	360-404	150-156	6 × 10 ⁻⁴	5.18	3
Benzo(a)anthracene (BaA)		4	228.3	0.01	435	157-167	2.8 × 10 ⁻⁵	5.91	2B
Chrysene (Chr)		4	228.3	0.0028	441-448	252-256	5.7 × 10 ⁻⁷	1.65	2B
Benzo(b)fluoranthene (BbF)		5	252.31	0.0012	481	167-168	NA	5.80	2B
Benzo(k)fluoranthene (BkF)		5	252.31	0.00076	480-471	198-217	5.2 × 10 ⁻⁸	6	2B
Benzo(a)pyrene (BaP)		5	252.31	0.0023	493-496	177-179	7 × 10 ⁻⁷	6.04	1
Dibenz(a,h)anthracene (DBaA)		5	278.4	0.0005	524	266-270	3.7 × 10 ⁻¹⁰	6.75	2A
Indeno(1,2,3-c,d)pyrene (InP)		6	276.33	0.062	530	162-163	NA	6.58	2B
Benzo(g,h,i)perylene (BghiP)		6	276.33	0.00026	525	275-278	1.4 × 10 ⁻⁹	6.5	3

1: Carcinogenic to humans.
 2A: Probably carcinogenic to humans.
 2B: Possibly carcinogenic to humans.
 3: Not classifiable as carcinogenic to humans.

Tabla 1.1: Características fisicoquímicas de los 16 hidrocarburos policíclicos aromáticos prioritarios. Tomado de Kumar et al., 2021.

1.3.2 Elementos potencialmente tóxicos

El término “*Elementos potencialmente tóxicos*” (EPT) se utiliza actualmente para englobar a aquellos elementos (metales pesados, metaloides y elementos no metálicos) asociados con el impacto ambiental y toxicidad (Pourret y Hursthouse, 2019). La presencia de EPT en un sistema fluvial está determinada por distintos factores, como la geología, la mineralogía, la hidrología, la botánica, la reactividad química, el patrón de uso del suelo y la productividad biológica. Estos elementos que entran en las aguas superficiales procedentes de fuentes naturales o antropogénicas pasan a formar parte de la suspensión de agua y del sistema de sedimentos mediante procesos de absorción, precipitación e intercambio iónico (Antunes et al., 2018).

El origen de los EPT en sedimentos puede ser, natural (debido a la meteorización de rocas) o antropogénico (industrias químicas, petroquímicas y agricultura). Dado que los EPT no son biodegradables pueden acumularse en el medio ambiente. Algunos EPT como Co, Cr, Cu, Mn, Ni, Se y Zn, son esenciales para los sistemas biológicos, pero pueden ser nocivos si están presentes en exceso. En cambio, otros como Ba, Cd, Pb, V, As, Hg son perjudiciales para los seres humanos, los animales y los cultivos (Relić et al., 2019).

Los microorganismos que habitan los sedimentos desempeñan un papel importante manteniendo la actividad metabólica y aliviando los niveles de elementos potencialmente tóxicos. Los cambios en los niveles de EPT provocan cambios en las comunidades microbianas, por lo que algunos microorganismos pueden utilizarse como bioindicadores de la presencia de altas concentraciones de estos compuestos (Zhang et al., 2022).

1.4 Normativa ambiental Argentina

Antes de la reforma de la constitución de 1994 la Nación no poseía atribuciones para legislar de forma obligatoria en todo el territorio nacional, sobre protección ambiental y recursos naturales.

Luego de dicha reforma en el Artículo 41 se establece que:

“Todos los habitantes gozan del derecho a un ambiente sano, equilibrado, apto para el desarrollo humano y para que las actividades productivas satisfagan las necesidades presentes sin comprometer las de las generaciones futuras; tienen el deber de preservarlo. El daño ambiental generará prioritariamente la obligación de recomponer, según lo establezca la ley. Las autoridades proveerán a la protección de este derecho, a la utilización racional de los recursos naturales, a la preservación del patrimonio natural, cultural y de la diversidad biológica, y a la información y educación ambientales. Corresponde a la Nación dictar las normas que contengan los presupuestos mínimos de protección, y a las provincias, las necesarias para complementarlas, sin que aquéllas alteren las jurisdicciones locales. Se prohíbe el ingreso al territorio nacional de residuos actual o potencialmente peligrosos, y de los radioactivos”.

El Bloque de Legalidad Ambiental de Argentina está conformado por la Constitución Nacional, los Tratados Internacionales sobre la materia, los Códigos de fondo (Civil y Comercial, Penal y de Minería), Leyes de Presupuestos Mínimos y Leyes Nacionales sobre materia ambiental, en ese orden de relación piramidal. Por debajo de ellas se encuentran las Leyes Provinciales, de aplicación circunscripta a sus respectivos territorios (Bondaz y Pellegrino 2021).

En el año 2002 se sancionó la Ley N° 25.675 “Ley General del Ambiente” que establece presupuestos mínimos, es decir, normas básicas que se deben cumplir en todo el país para lograr una gestión sustentable y adecuada del ambiente, la preservación y protección de la diversidad biológica y la implementación del desarrollo sustentable.

A partir del Convenio Internacional de Basilea sobre Movimiento Transfronterizo de Desechos Peligrosos, se sancionó en 1991 la Ley Nacional de Residuos Peligrosos N° 24.051, que establece las disposiciones fundamentales para el manejo de los residuos peligrosos. Según esta norma, se denomina peligroso a todo residuo que pueda causar daño, directa o indirectamente, a seres vivos o afectar el suelo, el agua, la atmósfera o el ambiente en general. Quedan excluidos los residuos domiciliarios, los radiactivos y los derivados de las operaciones normales de los buques, ya que éstos se rigen por leyes especiales y convenios internacionales⁷.

Con el posterior decreto reglamentario N° 831/93 (Ley Nacional de residuos peligrosos N° 24.051) quedan establecidos los niveles guía de calidad de suelos para los hidrocarburos policíclicos aromáticos o PAH y para los hidrocarburos volátiles o BTEX (Benceno, Tolueno, Etilbenceno y Xileno), según el uso diferencial de los mismos (agrícola, residencial e industrial). Cada normativa ambiental establece sus propios valores o niveles guía, estos son; valores o límites para determinados parámetros ambientales que indican qué concentraciones de sustancias o condiciones son consideradas aceptables o seguras para la salud humana y el medio ambiente. En la Tabla 1.2 se detallan los valores de esta normativa para PAH y BTEX en suelos, expresados en µg/g (ppm) de peso seco.

⁷ <https://www.argentina.gob.ar/ambiente/control/residuos-peligrosos>

Constituyente Peligroso	CAS	Uso Agrícola	Uso Residencial	Uso Industrial
Benceno	71-43-2	0.05	0.5	5
Benzo(A)Antraceno	56-55-3	0.1	1	10
Benzo(A)Pireno	50-32-8	0.1	1	10
Benzo(B)Fluoranteno	205-99-2	0.1	1	10
Benzo(k)Fluorantano	207-08-9	0.1	1	10
Dibenzo(A,H)Antraceno	95-50-1	0.1	1	10
Etilbenceno	100-41-4	0.1	5	50
Fenantreno	85-01-8	0.1	1	10
Indeno(1,2,3-CD)Pireno	193-39-5	0.1	1	10
Naftaleno	91-20-3	0.1	5	50
Pireno	129-00-0	0.1	10	100
Tolueno	108-89-3	0.1	3	30
Xilenos (totales)	1330-20-7	0.1	5	50

Tabla 1.2: Niveles guía de calidad de suelos para PAH y para BTEX (ppm) según su uso establecidos en el decreto reglamentario N° 831/93 correspondiente a la Ley Nacional de residuos peligrosos N° 24.051.

A la fecha, no existe una normativa específica en Argentina que establezca niveles guía de contenido de hidrocarburos y metales para definir la salud de los sedimentos. Por este motivo se suele utilizar la normativa internacional. Un ejemplo de normativa utilizada para evaluar la calidad de los sedimentos de agua dulce es la “*Canadian Sediment Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life*” (Guía de calidad de sedimentos para la protección del ambiente acuático canadiense)⁸. En la Tabla 1.3 se encuentran los niveles de la norma canadiense para PAH de bajo y alto peso molecular, basados en la Guía provisional de calidad de sedimentos (ISQG) y en los niveles de efectos probables (PEL). La Tabla 1.4 resume los valores de esta guía en referencia a los metales Hg, Cd, Pb, Cu, Zn, Cr, As y Ni.

⁸ <https://ccme.ca/en/resources/sediment>

Interim sediment quality guidelines (ISQGs) and probable effect levels (PELs) for PAHs ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\text{ dw}$).		
	ISQG	PEL
Freshwater sediments		
LMW-PAHs		
Naphthalene	34.6*	391 [†]
2-Methylnaphthalene	20.2*	201 [†]
Acenaphthylene	5.87*	128 [†]
Acenaphthene	6.71*	88.9 [†]
Fluorene	21.2*	144 [†]
Phenanthrene	41.9	515
Anthracene	46.9*	245 [†]
HMW-PAHs		
Fluoranthene	111	2355
Pyrene	53.0	875
Benz(a)anthracene	31.7	385
Chrysene	57.1	862
Benzo(a)pyrene	31.9	782
Dibenz(a,h)anthracene	6.22*	135 [†]

*Provisional; adoption of marine ISQG developed using the modified NSTP approach.
[†]Provisional; adoption of marine PEL developed using the modified NSTP approach.

Tabla 1.3: Niveles guía de PAH de bajo y alto peso molecular en sedimentos. Tomados de: *Canadian Sediment Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH)*.

Elemento	ISQG/TEL	PEL
Hg	0,17	0,486
Cd	0,6	3,5
Pb	35	91,3
Cu	35,7	197
Zn	123	315
Cr	37,3	90
As	5,9	17
Ni	18	36

Tabla 1.4: Niveles guía de metales en sedimentos según *Canadian Sediment Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life*. Valores expresados en mg/Kg de sedimento seco.

En la provincia de Buenos Aires, el Ministerio de Ambiente de la Provincia es quien puede ejecutar las acciones que conducen a una gestión ambientalmente adecuada de los recursos naturales, fiscalizando las acciones que puedan causar impacto en el aire, agua, suelo o que pudieran afectar el ambiente. La provincia tampoco cuenta con una normativa general para establecer la calidad de los sedimentos, sin embargo, posee una norma que permite tomar decisiones sobre la utilización del material dragado de cursos de agua. En la Resolución

263/19 *Dragado de Puertos y Canales*⁹ del año 2019, se encuentran las normas y procedimientos para la declaración de impacto ambiental de proyectos de dragado en puertos y canales de acceso en la provincia de Buenos Aires. En el anexo de esta resolución están detalladas las concentraciones de compuestos orgánicos (Tabla 1.5) que se utilizan como referencia para determinar si los sedimentos deben ser tratados y como debe ser su disposición final. Estos valores están basados en la Normativa holandesa, que define:

- **Valor Límite (VL):** nivel de concentración por debajo del cual se considera al sedimento como relativamente limpio. Esto implica que podría volcarse nuevamente al cuerpo de agua.

- **Valor de Referencia (VR):** indica un nivel máximo permitido y por encima del cual se consideran inaceptables para la sostenibilidad del ambiente, marcando por lo tanto el límite entre la posibilidad de disponer libremente el material en el cuerpo de agua.

- **Valor de Intervención (VI):** es un valor indicativo que señala la urgencia de una remediación para evitar elevados riesgos para la salud pública y del medio ambiente circundante.

En la Tabla 1.4.2 se presentan los valores establecidos en la Resolución 263/19. Los hidrocarburos totales C10-C40, determinados por cromatografía gaseosa, figuran como aceite mineral. Para estos compuestos el VL es 1000 mg/Kg ps, el VR es 3000 mg/Kg ps y el VI es de 5000 mg/Kg ps. Además, presenta valores de intervención para cada uno de los BTEX (Benceno: 1, Tolueno: 130, Etilbenceno: 50 y Xilenos: 25 mg/Kg ps respectivamente). Mientras que, establece valores VL, VR y VI para la sumatoria de los PAH (siendo: 1, 10 y 40 mg/Kg ps, respectivamente).

En cuanto a los metales, los valores guías establecidos en la resolución 263/19 están basados en la normativa española y se detallan en la Tabla 1.6. En este caso, en lugar de valores de referencia, valores límite y valores de intervención se definen dos niveles de acción. Los valores guía correspondientes al nivel de acción 1 (Nivel 1) son aquellos que se encuentran en igual concentración o por debajo de la cual existe una menor probabilidad de efectos adversos para la biota. El nivel de acción 2 (Nivel 2) define la concentración umbral por encima de la cual existe una mayor probabilidad de observar efectos adversos para la biota.

⁹ <https://normas.gba.gob.ar/ar-b/resolucion/2019/263/204675>

Parámetro	Unidad	Valores		
		Limite	Referencia	Intervención
<i>Fenoles totales</i>	mg/Kg ps	--	--	40
<i>Aceite mineral**</i>	mg/Kg ps	1000	3000	5000
<i>PCB (SCB7)</i>	mg/Kg ps	--	0,2	1
BTEX				
<i>Benceno</i>	mg/Kg ps	--	--	1
<i>Tolueno</i>	mg/Kg ps	--	--	130
<i>Etilbenceno</i>	mg/Kg ps	--	--	50
<i>Xilenos Totales</i>	mg/Kg ps	--	--	25
Suma PAH	mg/Kg ps	1	10	40
Plaguicidas Organoclorados				
<i>Endosulfán (α)+ sulfato</i>	mg/Kg ps	0,01	0,02	--
<i>Hexaclorobenceno</i>	mg/Kg ps	0,004	0,02	--
<i>lindano (γ-HCH)</i>	mg/Kg ps	0,001	0,02	--
<i>Clordano</i>	mg/Kg ps	0,02	--	--
<i>Drins (Aldrin-Dieldrin-Endrin)</i>	mg/Kg ps	0,01	0,02	4
<i>DDT- DDD - DDE</i>	mg/Kg ps	0,02	0,02	4
<i>Heptacloro + epóxido</i>	mg/Kg ps	0,02	0,02	--
<i>Estaño</i>	mg/Kg ps	20		140*
<i>*Valores de la norma holandesa 2010</i>				
<i>**Hidrocarburos C10-C40. Cuantificación por cromatografía gaseosa</i>				

Tabla 1.5: Tabla niveles guía de compuestos orgánicos según la normativa holandesa en la que se basa la resolución 263/19 Dragado de Puertos y Canales de la Provincia de Buenos Aires. Unidades mg/Kg de peso seco (ps).

Parámetro	Nivel 1 (mg/Kg)	Nivel 2 (mg/Kg)
<i>Hg</i>	0,6	3
<i>Cd</i>	1	5
<i>Pb</i>	120	600
<i>Cu</i>	100	400
<i>Zn</i>	500	3000
<i>Cr</i>	200	1000
<i>As</i>	80	200
<i>Ni</i>	100	400

Tabla 1.6: Tabla de niveles acción para el contenido de metales según la normativa española en la que se basa la resolución 263/19 Dragado de Puertos y Canales.

1.5 Remediación de sedimentos

La remediación de sedimentos contaminados puede realizarse mediante técnicas biológicas, físicas, químicas o a través de una combinación de estas. Las técnicas convencionales para la remediación de sedimentos se resumen en la Figura 1.3, donde, se clasifican según el lugar de ejecución como: técnicas *ex situ* (dragado o excavación) y técnicas *in situ* entre las que se encuentran el *Capping*, las transformaciones mediante métodos químicos y/o físicos (Solidificación/ estabilización, Oxidación química, Separación electrocinética y *Flushing* (enjuague o purgado)), las técnicas de biorremediación (Bioaumentación, Bioestimulación, Fitorremediación) y la Remediación natural Monitoreada (RNM) (Lofrano et al., 2017; Maletić et al., 2019; Perelo, 2010).

El Bioaumentación es la introducción de microorganismos con capacidades catabólicas específicas en el entorno contaminado con el fin de complementar la población autóctona y acelerar o permitir la degradación de los contaminantes (Perelo, 2010). La Bioestimulación en sedimentos se centra en añadir aceptores de electrones que beneficien el metabolismo de degradación predominante en el sitio; por ejemplo, la bioestimulación del metabolismo anaeróbico se logra añadiendo hierro, sulfato, nitrato o inyectando metanol y acetato. En cambio la bioestimulación del metabolismo de degradación aeróbica se logra mediante aireación forzada de los sedimentos y aguas para lo que se han desarrollado diferentes sistemas de aireación que se aplican según el tipo de ambiente acuático (Fragkou et al., 2021; Perelo, 2010). Las técnicas de Fitorremediación implican la utilización de plantas para el tratamiento de contaminantes orgánicos y metales; estas estrategias han sido utilizadas mayormente sobre sedimentos dragados pero también, se han ensayado en la remediación de sedimentos marinos (Huesemann et al., 2009).

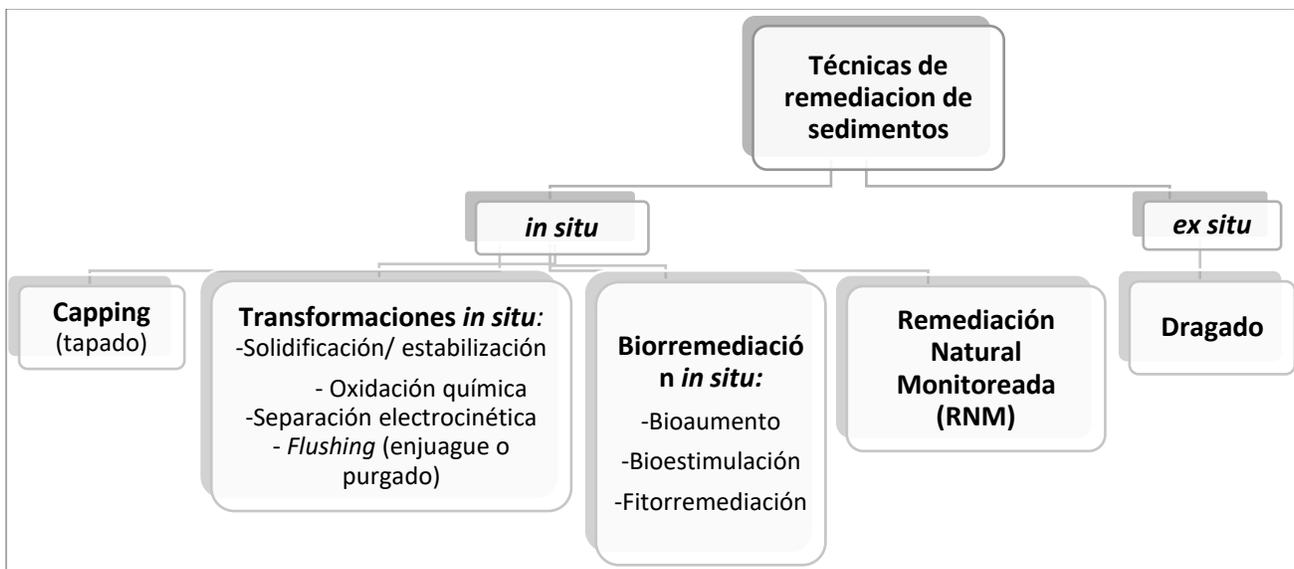


Figura 1.3: Técnicas más utilizadas para la remediación de sedimentos.

1.5.1 Dragado

El dragado se ha utilizado desde hace tiempo para mantener navegables, ríos, canales y puertos; pero, además, es la estrategia de remediación *ex situ* de sedimentos más utilizada. Consiste en la remoción física de los sedimentos mediante la utilización de dragas hidráulicas o mecánicas (Figura 1.4) con su posterior vuelco en un sitio autorizado, o transporte por tierra o agua hacia un sitio de remediación o de disposición final, dependiendo del grado de afectación que presenten. Entre las ventajas del dragado se encuentran su efectividad, rapidez de remediación y que es apto para tratar altas concentraciones de compuestos con impacto ambiental. Sin embargo, presenta como desventajas su elevado costo (debido principalmente al transporte y uso de maquinaria), que durante la remoción de los sedimentos los compuestos nocivos pueden hacerse más disponibles, alcanzando los cuerpos de agua y afectando así la biota. Además, otra desventaja del dragado es el impacto que puede ocurrir en el sitio de disposición de los sedimentos por volatilización o por generación de lixiviados (Kour et al., 2021; Maletić et al., 2019; Polrot et al., 2021).

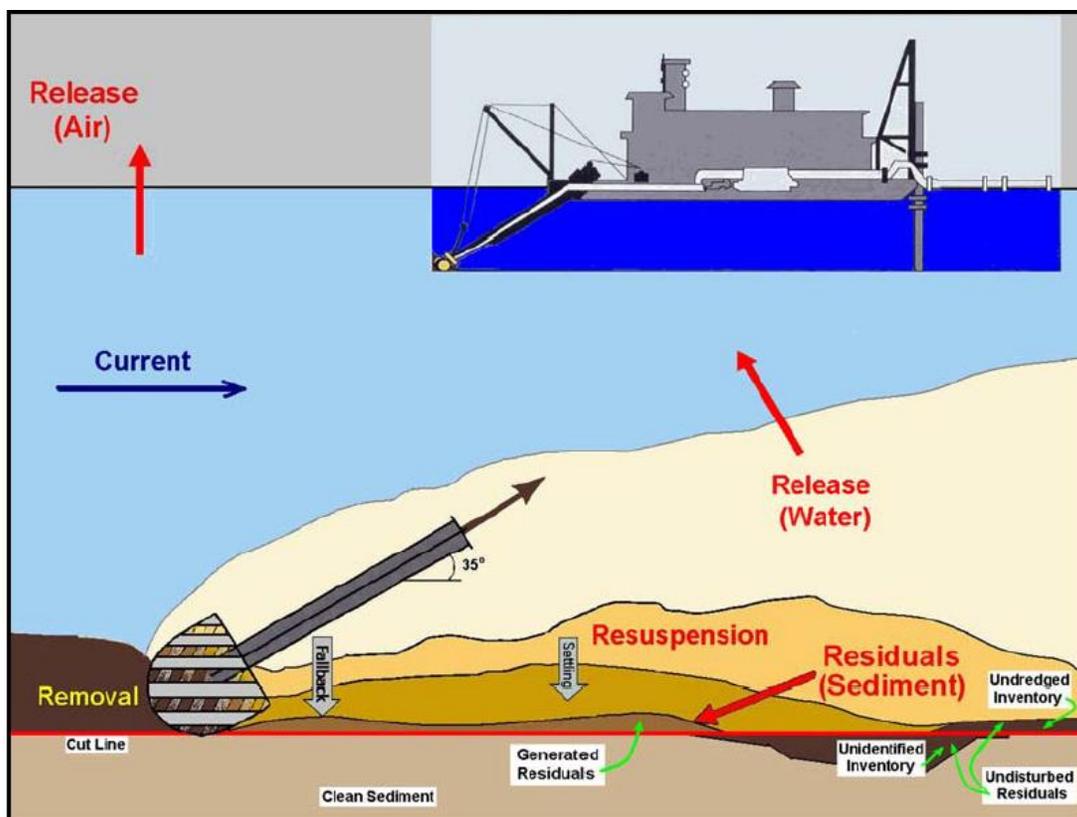


Figura 1.4: Esquema de un proceso de dragado. Tomado de: (Palermo et al., 2008) "Technical Guidelines for Environmental Dredging of Contaminated Sediments".

1.5.2 Capping

El *capping* consiste en cubrir la superficie de los sedimentos impactados con una capa de material limpio y así, aislarlos, evitar su flujo y retrasar su liberación a las aguas (Figura 1.5) (Maletić et al., 2019; Perelo, 2010). Antes del tratamiento del sitio afectado, los compuestos dañinos están en contacto directo con el medio acuático y entran en la cadena trófica. Una vez agregada la enmienda, que en el ejemplo de la Figura 1.5 es carbón activado, estos compuestos son aislados del medio acuático por unión/adsorción a la enmienda. Luego de varios años la enmienda puede cubrirse con una nueva capa de sedimentos naturales limpios. Otros de los materiales adsorbentes utilizados como enmiendas para *capping* son la arcilla orgánica, apatita, carbón vegetal, coque, zeolitas y el hierro cero-valente. Las enmiendas tienden a modificar la geoquímica de los sedimentos aumentando la unión y estabilidad de los contaminantes para reducir su riesgo para la salud humana y el medio ambiente (Lofrano et al., 2017). Se considera que el *capping* es menos costoso que el dragado, sin embargo, requiere de un monitoreo a largo plazo debido al riesgo de dejar los compuestos riesgosos en el sitio y a los cambios en las comunidades bénticas que puedan darse debido a la introducción de un material diferente al del sedimento nativo (Maletić et al., 2019).

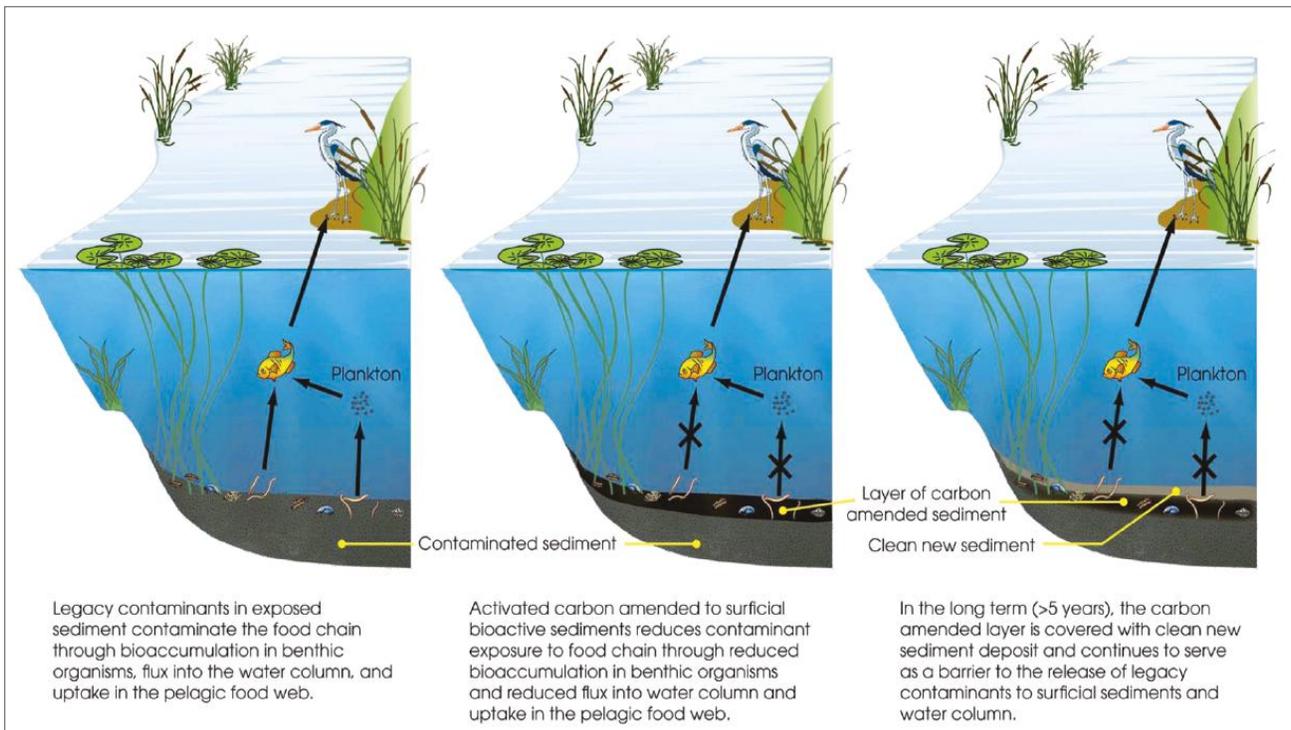


Figura 1.5: Esquema conceptual de como las enmiendas agregadas como *capping* a los sedimentos evitan su liberación al agua y el contacto con los organismos acuáticos. (Tomado de: Ghosh et al., 2011).

1.5.3 Remediación Natural Monitoreada

La agencia de protección ambiental de Estados Unidos (US EPA), define a la Recuperación/remediación Natural Monitoreada (RNM) como; *una remediación que utiliza procesos naturales en curso para contener, destruir o reducir la biodisponibilidad o toxicidad de los contaminantes en los sedimentos*. La RNM como estrategia de remediación, aprovecha los procesos fisicoquímicos que ocurren en el ecosistema y las capacidades naturales de la población microbiana autóctona de degradar dichos compuestos. Los procesos naturales de los que depende la RNM pueden resumirse en (Maletić et al., 2019):

- Procesos físicos: difusión, sedimentación, dispersión, bioturbación, volatilización, enterramiento, secuestro.
- Procesos biológicos: biodegradación, fitorremediación, estabilización biológica.
- Procesos químicos: oxidación/reducción, sorción.

La utilización de la RNM implica una evaluación exhaustiva del riesgo, la caracterización inicial del sitio, la elaboración de modelos predictivos que sugieran la disminución de la contaminación y el control de su fuente. Es imprescindible poder identificar durante la caracterización los procesos naturales que allí ocurren, establecer las expectativas de recuperación y confirmar que los mismos siguen reduciendo el riesgo con el tiempo según lo previsto. Estas actividades pueden dividirse en dos etapas, la primera implica investigación y estudio de factibilidad de base y la segunda se corresponde con monitoreos.

En este contexto, Magar y Wenning en su trabajo sobre el rol de la RNM en la remediación de sedimentos (2006) establecen las líneas de evidencia que deberían ser consideradas en investigaciones sobre sedimentos:

1. Documentación (y posible confirmación) del control de la fuente.
2. Evidencia de enterramiento de contaminantes y reducción de sus concentraciones en sedimentos superficiales.
3. Medición de la mezcla de sedimentos superficiales para estimar la capa activa bentónica y para determinar la profundidad de sedimentos superficiales a la que deben aplicarse los objetivos de las medidas de remediación.
4. Medición de la estabilidad de los sedimentos para evaluar el riesgo de resuspensión de contaminantes en condiciones normales y eventos de alta energía.
5. Evidencia de transformación de contaminantes y atenuación de riesgos.
6. Modelización de la recuperación a largo plazo, incluyendo aguas superficiales, sedimentos y biota.
7. Seguimiento de la recuperación ecológica y de la reducción del riesgo a largo plazo.
8. Conocimiento de las futuras utilidades del sitio y de controles institucionales.

La principal ventaja de la RNM es que se considera una de las estrategias de remediación de menor costo monetario debido a que no es necesario el transporte o la construcción de infraestructura específica. No obstante, las investigaciones para caracterizar el sitio y evaluar el uso de RNM y las posteriores actividades de monitoreo y seguimiento a largo plazo pueden ser más costosas que las asociadas con el dragado o con el *capping* (Magar et al., 2009).

1.5.3.1 Diagnóstico molecular ambiental

Normalmente, la caracterización y monitoreo más frecuentemente utilizado en una remediación natural no se centra en el seguimiento de los procesos biológicos que están ocurriendo en el sitio sino más bien en los resultados que derivan de estos, a través de la medida de concentración de compuestos nocivos y de sus transformaciones (Morelli et al., 2015). Sin embargo, un desarrollo eficaz y coherente de cualquier estrategia de biorremediación requiere del conocimiento profundo de los parámetros que rigen las estructuras y funcionamiento metabólico de las comunidades microbianas (Morelli et al., 2015). El diagnóstico molecular ambiental (DMA) tiene como premisa aplicar herramientas de biología molecular en las etapas de caracterización y monitoreo de sitios afectados con el fin de conocer la estructura de las comunidades microbianas. Aunque la información derivada de la secuenciación del ADN aún no se ha incluido formalmente en los programas de evaluación, en la actualidad, esta metodología está recibiendo gran atención y varios proyectos empiezan a incluir evaluaciones basadas en técnicas de *metabarcoding* y enfoques bioinformáticos (Aylagas et al., 2020; Madueño et al., 2021; Starevich et al., 2024; Wang et al., 2021). Los estudios de secuenciación que generan datos sobre comunidades microbianas autóctonas son vitales para desarrollar programas de gestión de ecosistemas y diseñar estrategias de remediación eficientes para hacer frente a la presencia de compuestos que afectan el ambiente (Madueño et al., 2021).

Hoy en día los enfoques moleculares aportan una mayor visión sobre las comunidades microbianas que habitan un ambiente concreto. Son capaces de proporcionar rápidamente pruebas de la presencia, abundancia y actividad de los miembros de la comunidad microbiana que poseen capacidades de biodegradación/biotransformación de los contaminantes (Majone et al., 2015). La genómica es una de las herramientas moleculares más ampliamente utilizadas ya que permite determinar la composición y función de una comunidad microbiana mediante la secuenciación masiva de genes o de amplicones del gen 16S rRNA. La proteómica, ayuda a descifrar los mecanismos moleculares, las vías metabólicas y las modificaciones postraduccionales dentro de la célula mientras que, a través de la transcriptómica se puede conocer cuáles son los genes que efectivamente se están expresando en una comunidad. Otros instrumentos moleculares que están comenzando a utilizarse con más frecuencia son; la metabolómica, por medio de la cual se analizan los metabolitos producidos por un organismo en respuesta a condiciones ambientales y la fluxómica, que es un enfoque

cuantitativo que estudia las tasas de las reacciones metabólicas en un organismo (Chandran et al., 2020). Estas herramientas moleculares han revolucionado los estudios modernos de biodiversidad, aumentando la confianza y el potencial de los programas de biomonitoreo en la evaluación del riesgo.

1.6 Comunidades microbianas y biorremediación de sedimentos

Las comunidades microbianas de los sedimentos desempeñan un papel central en los ciclos biogeoquímicos de la materia y el flujo de energía, muchas de ellas están estructuradas u ordenadas con la profundidad. Existe evidencia de que estas estratificaciones están regidos principalmente por los potenciales redox, al igual que en la columna de Winogradsky. Sin embargo, los diversos patrones de estratificación de los sedimentos sugieren la existencia de otros factores ambientales que también influyen en la distribución de las comunidades microbianas en los sedimentos (Rundell et al., 2014; Zhou et al., 2023). Estas comunidades con metabolismos diversos presentan un gran potencial para la atenuación natural y la biodegradación de compuestos de origen antropogénico (Yan et al., 2019). Los microorganismos de los sedimentos pueden degradar hidrocarburos del petróleo (hidrocarburos alifáticos, PAH y BTEX) de forma aeróbica utilizando oxígeno como último aceptor de electrones y, en zonas en la que la disponibilidad de oxígeno es limitada, también pueden degradarlos anaeróbicamente utilizando aceptores alternativos de electrones como por ejemplo nitrato, sulfato y hierro (III) (Zhu et al., 2020).

1.6.1 Degradación aeróbica de hidrocarburos

Los hidrocarburos de petróleo pueden degradarse aeróbicamente utilizando varias vías metabólicas oxidativas, como la oxidación terminal, la oxidación sub-terminal, ω - oxidación y β - oxidación (Varjani, 2017). Generalmente, la degradación aeróbica consiste en un paso inicial de activación, que implica la adición de oxígeno a la molécula de hidrocarburo catalizado por enzimas monooxigenasas, dioxigenasas y peroxidases. Luego, las vías de degradación periférica lo convierten, en pasos sucesivos, en intermediarios del metabolismo central como el ciclo de los ácidos tricarbónicos (Figura 1.6) (Olajire A., 2014). En el primer paso de la degradación aeróbica de n- alcanos, estos son oxidados por un sistema de enzimas monooxigenasas dependientes de portadores de electrones, las hidroxilasas de alcanos, en su correspondiente alcano-1-ol. Las monooxigenasas aisladas en procariontes se clasifican en dos categorías según su sistema de transporte de electrones y los microorganismos en los que se encuentran: (a) una enzima dependiente de rubredoxina (que contiene 2FeO), codificada por el gen *alkB* en la mayoría de las bacterias y b) una alcano hidroxilasa que contiene citocromo P450 monooxigenasas de la familia CYP153 de las bacterias (Abbasian et al., 2015).

En la degradación de hidrocarburos aromáticos los pasos principales son el ataque oxidativo inicial seguido de la escisión del anillo bencénico (Varjani et al., 2017). Las enzimas clave son las dioxigenasas hidroxilantes de anillo (RHD, *Ring Hydroxylating Dioxigenases*) pertenecientes a la familia de las oxigenasas de hierro no hemo de tipo Rieske. Algunos genes que codifican estas enzimas en bacterias Gram negativas son *nagAc* y *nahAc* mientras que en Gram positivas un ejemplo es el gen *nidA* (Duran y Cravo-Laureau, 2016). Las RHD que actúan en la degradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH-RHD) incorporan dos moléculas de oxígeno en un anillo aromático formando un cis-dihidrodiol, que se convierte en catecol por acción de una deshidrogenasa. A continuación, una catecol dioxigenasa lleva a cabo la fisión del anillo aromático por orto o meta-clivalaje que conduce a la formación de intermediarios centrales como protocatecuatos y catecoles que se convierten finalmente en intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA) (Stauffert et al., 2015; Varjani, 2017).

1.6.2 Degradación anaeróbica de hidrocarburos

En condiciones anaeróbicas, la degradación de hidrocarburos puede ocurrir por dos vías a) respiración anaeróbica y b) fermentación. En los sedimentos, la disponibilidad de aceptores de electrones alternativos al oxígeno suele estar ligada a la profundidad (Figura 1.6.1), por debajo de la zona oxigenada se encuentra la zona de transición, donde los procesos de respiración microbiana utilizan nitrito, nitrato, manganeso (IV), hierro (III) y sulfato como aceptores terminales de electrones. A medida que aumenta la profundidad, el potencial redox disminuye y la reducción del azufre pasa a ser predominante en la zona anóxica, más abajo en esta zona, hay actividad metanogénica por bacterias anaerobias estrictas y arqueas (Dhar et al., 2020).

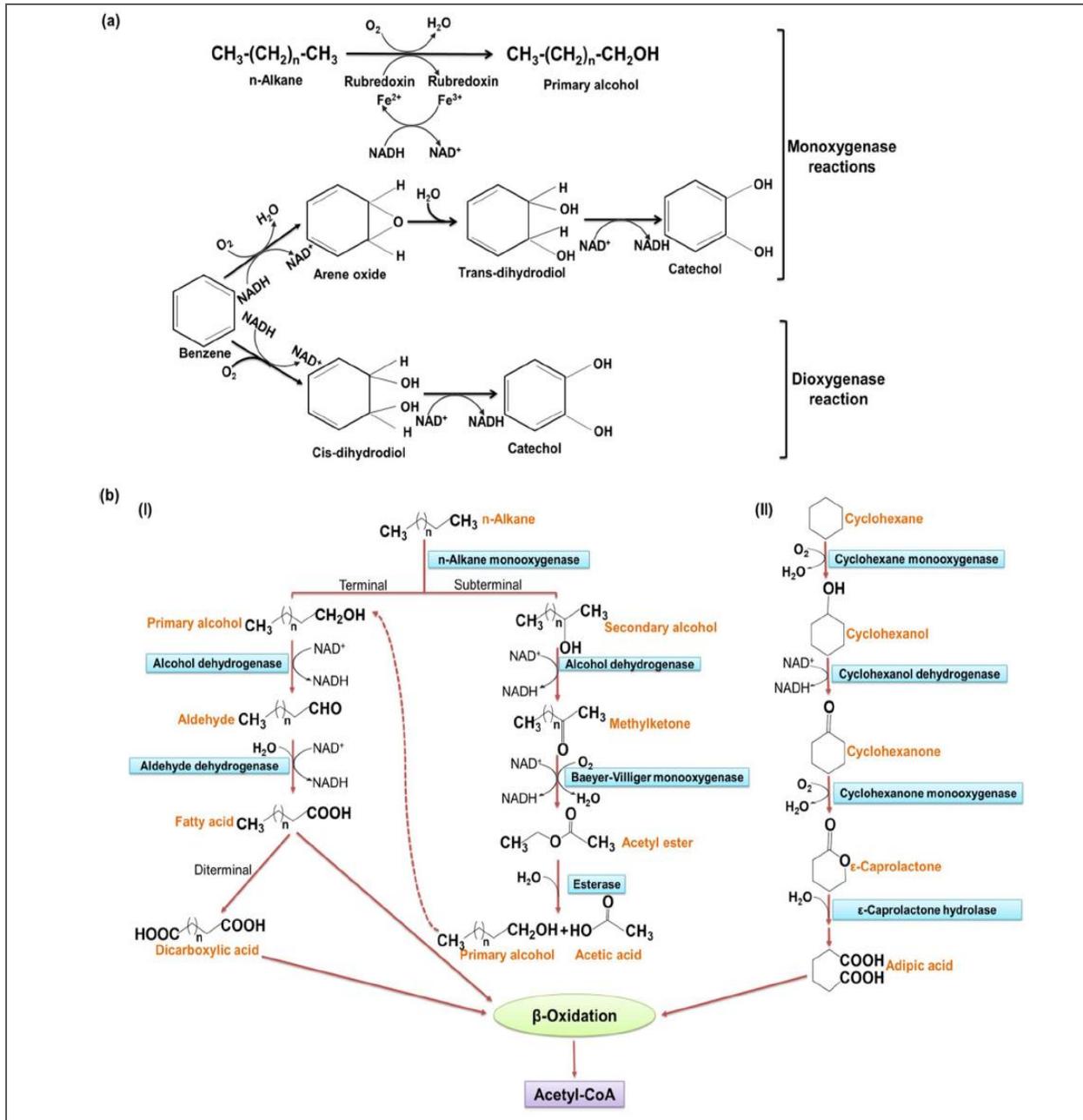


Figura 1.6: Esquema de las rutas de degradación aeróbicas de hidrocarburos a) acción de las enzimas monooxygenasas y dioxigenasas, b) vías de degradación de n-alcános y de ciclohexano. (Tomado de: Kumari et al., 2022).

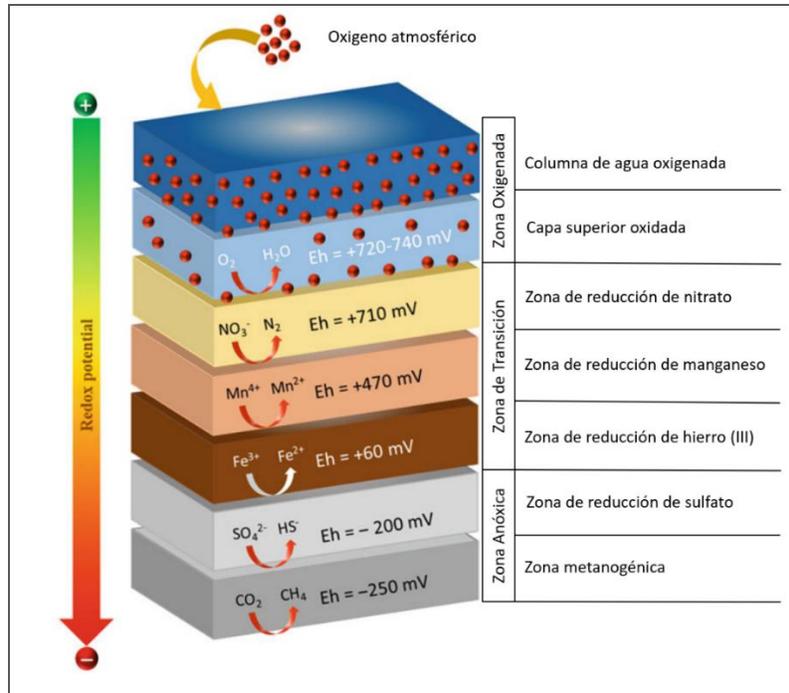


Figura 1.7: Esquema de una columna típica de sedimentos donde se indican los potenciales redox y los posibles aceptores de electrones conforme aumenta la profundidad. (Adaptado de: Dhar et al., 2020).

El mecanismo más común a través del cual los microorganismos sulfato reductores, nitrato reductores y metanogénicos degradan alcanos es a través de la activación de los alcanos por la adición al doble enlace de un fumarato en el carbono terminal o subterminal, produciendo 2-(1-metilalquil) succinatos (o 2-alkilsuccinatos). Este proceso es catalizado por la enzima alkilsuccinato sintasa, (codificada por el gen *assA*). La degradación sigue con la activación de Coenzima-A (CoA), descarboxilación y entrada a β -oxidación (Figura 1.8; (Wartell et al., 2021)).

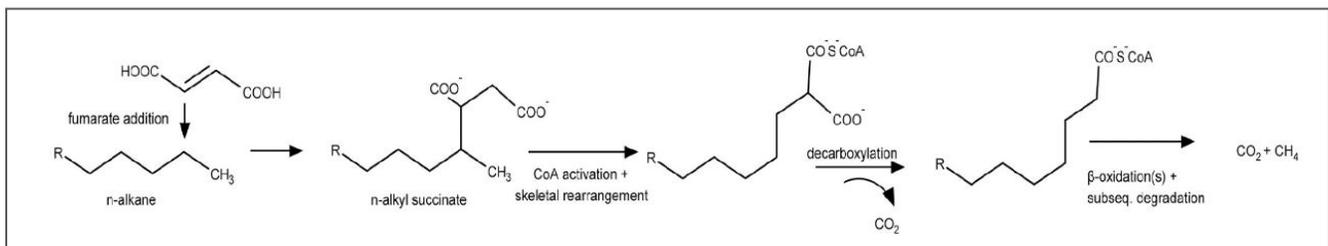


Figura 1.8: Vía de degradación anaeróbica de alcanos mediante adición de fumarato. Tomado de: Wartell et al., 2021.

En condiciones anóxicas, el ataque enzimático inicial del hidrocarburo aromático tolueno es catalizado por la enzima bencilsuccinato sintasa (codificada en el gen *bssA*), que añade el grupo metilo del tolueno al fumarato formando bencilsuccinato (Figura 1.9). A continuación, el bencilsuccinato se activa en forma de CoA-tioéster, que se transforma, a través de varios intermediarios, en benzoil-CoA. Este último es un importante intermediario

central en el catabolismo anaeróbico de los compuestos aromáticos, que canaliza metabolitos procedentes de diversas vías de degradación periféricas hacia la reducción del anillo aromático y finalmente una β -oxidación modificada a acetyl-CoA. El primer paso de la reducción del anillo puede ser llevado a cabo por una benzoil-CoA reductasa de clase I dependiente de ATP (codificada por el gen *bcrA-D*) o por una benzoil-CoA reductasa de clase II independiente de ATP (codificada por el gen *bamB-1*). La primera se encuentra normalmente en anaerobios facultativos, mientras que la segunda en anaerobios estrictos y fermentadores. La posterior escisión del anillo es realizada por la enzima 6-oxociclohex-1-eno-1- carbonil-CoA hidrolasa (codificada en el gen *bamA* u *oah*) y va seguida de reacciones similares a la β -oxidación para producir acetyl-CoA para su completa asimilación u oxidación a CO_2 (Lueders, 2017). Las vías de degradación anaeróbica de otros compuestos aromáticos no sustituidos como por ejemplo el benceno no han sido elucidadas por completo, sin embargo, hay evidencias que sufre una carboxilación directa seguida de una descomposición vía benzoil-CoA o vía naftaloil-CoA (Meckenstock y Mouttaki, 2011). Para la degradación del naftaleno se han sugerido dos vías principales: 1) carboxilación a ácido 2-naftóico y 2) metilación seguida de adición de fumarato (Wartell et al., 2021).

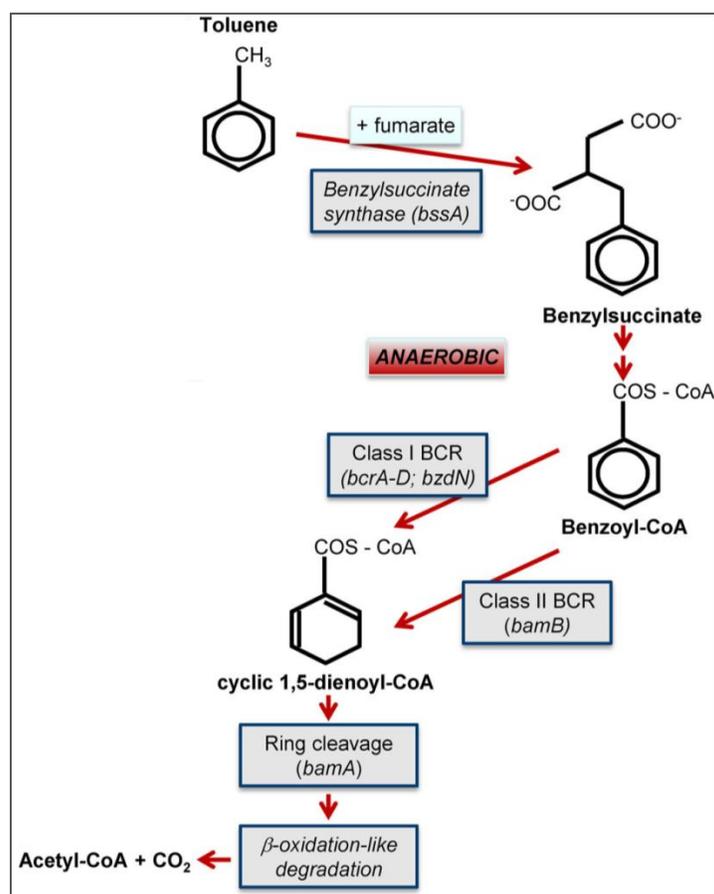
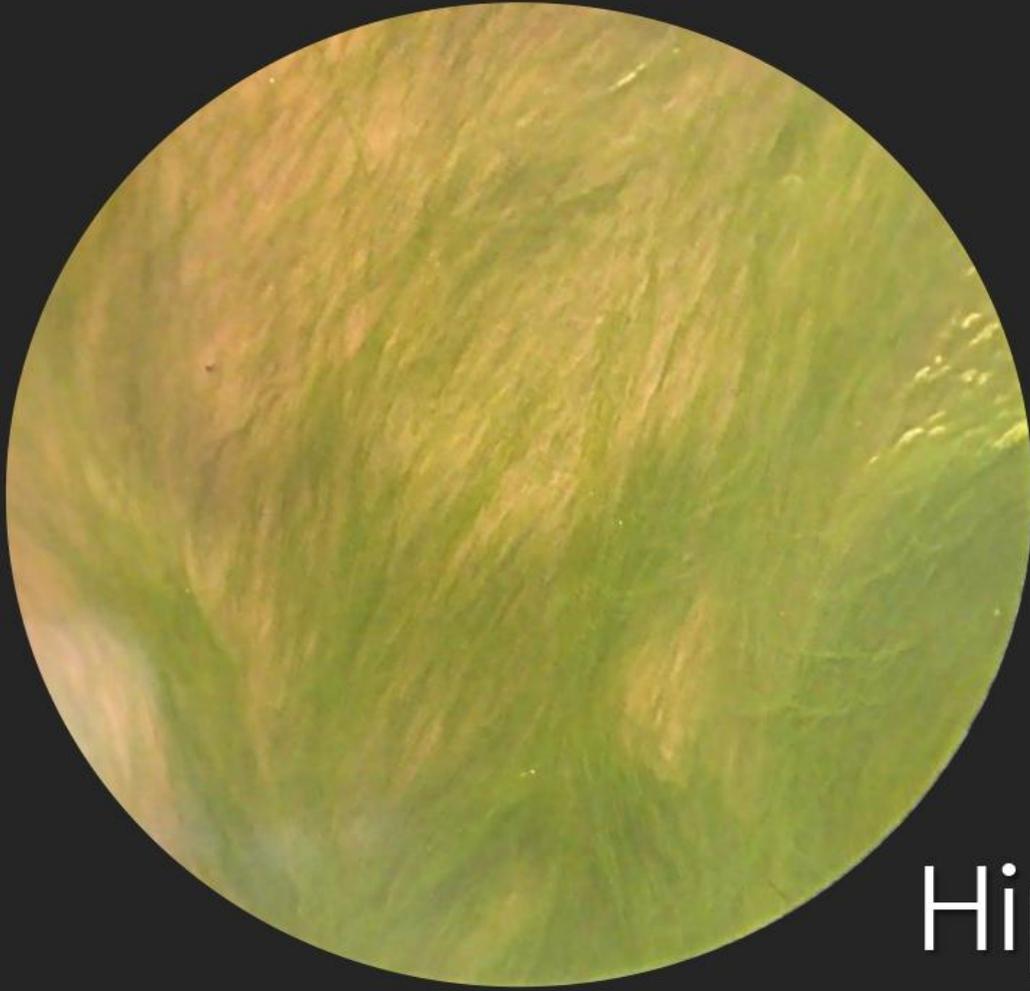


Figura 1.9: Vía de degradación anaeróbica de tolueno mediante adición de fumarato. Adaptado de: Lueders, 2017.

Capítulo 2



Hipótesis y
Objetivos

2. Hipótesis y Objetivos

2.1 Hipótesis

El estudio de las capacidades degradativas de la comunidad microbiana de sedimentos contaminados permitirá un diseño racional de estrategias de remediación.

2.2 Objetivos

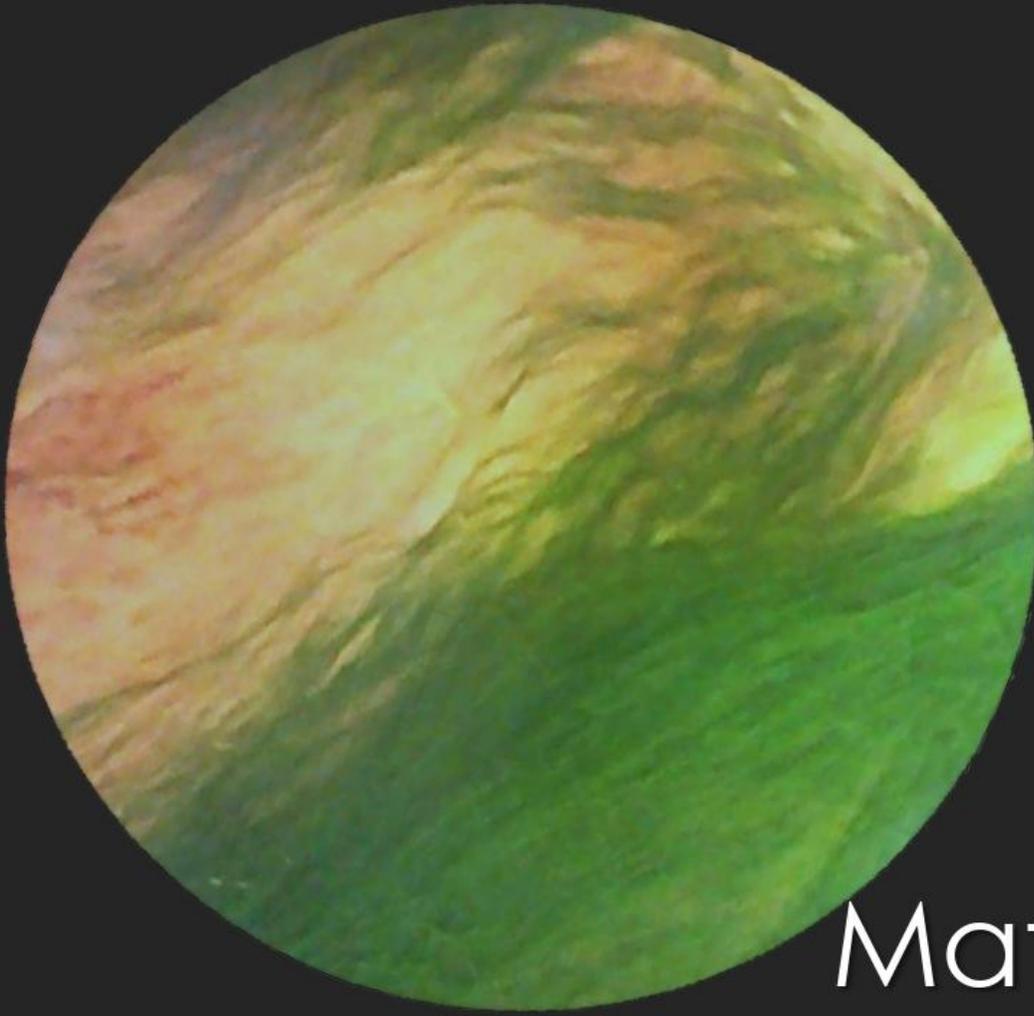
2.2.1 Objetivo general

Contribuir al mejoramiento de los conocimientos básicos que permitan diseñar, validar y optimizar procesos de biorremediación *in situ* de sedimentos afectados con hidrocarburos.

2.2.2 Objetivos específicos

- Estudiar la estructura de la comunidad microbiana autóctona de sedimentos contaminados con hidrocarburos y su potencial degradativo a partir de estudios de secuenciación del gen 16S rRNA.
- Aplicar estrategias de *q-PCR* y *RT-qPCR* al estudio de la presencia y expresión de genes de degradación de hidrocarburos *in situ*.
- Estudiar el efecto de la aireación forzada sobre el potencial de recuperación natural y la capacidad degradadora de hidrocarburos de la comunidad microbiana de sedimentos de agua dulce con hidrocarburos.

Capítulo 3



Materiales y
Métodos

3. Materiales y Métodos

3.1 Materiales

3.1.1 Muestreo

Las muestras utilizadas en este trabajo de tesis fueron obtenidas como parte de un proyecto de colaboración con una empresa, por lo que la ubicación y el nombre del curso de agua será omitida para mantener la confidencialidad. En el mes de abril de 2018 se tomaron muestras por duplicado de agua y sedimentos de 12 sitios de un curso de agua dulce, ubicado en una zona industrial donde se encuentran refinerías de petróleo y petroquímicas. Para el desarrollo de este trabajo se seleccionaron tres de los 12 sitios muestreados (I, M y E) y sus réplicas.

Se tomaron muestras de agua, en botellas de vidrio color caramelo de 1 Litro. Los sedimentos se recuperaron desde una plataforma flotante utilizando la herramienta Pistón Core tipo Hammer (Figura 3.1) que consistió en un tubo de PVC transparente (testigo o *core*), de aproximadamente 2 m de longitud y 68 mm de diámetro, provisto de un pistón que se operó manualmente. La extracción de sedimentos fue realizada por el Laboratorio de Sondeos de Ambientes Continentales y Marinos del INDEAN (Instituto de Estudios Andinos “Don Pablo Groeber”, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA) quienes también realizaron la descripción y clasificación de los sedimentos.

Luego de la extracción, los testigos con los sedimentos fueron trasladados a un laboratorio para su apertura y descripción. Por cada punto de muestreo se tomaron dos testigos que se consideraron réplicas del sitio (llamados: I e IR, M y MR, E y ER). Una vez descriptos, los sedimentos fueron clasificados según sus características geológicas y su profundidad, obteniéndose distintos estratos dentro de cada testigo, que se denominaron horizontes (H). En la Figura 3.2 se esquematizan los *cores* muestreados con los diferentes horizontes que pudieron determinarse en cada uno. Los *cores* I e IR presentaron 7 horizontes (H0 a H6), los *cores* E y ER presentaron 5 horizontes cada uno (H0 a H4) mientras que el *core* M presentó 5 horizontes (H0 a H4) y su réplica de sitio, el *core* MR presentó 7 horizontes (H0 a H6), estas diferencias se deben a la heterogeneidad propia del sitio. En las Tablas anexas 1A-F: “Características de los sedimentos” se encuentran resumidas las descripciones de cada uno de los horizontes. Las muestras de sedimentos de cada horizonte se colocaron en frascos de vidrio de 250 g y se almacenaron a 4°C. Además, se separaron muestras de todos los horizontes en tubos de polipropileno de 15 ml y se almacenaron a -20°C para extracción de ácidos nucleicos.

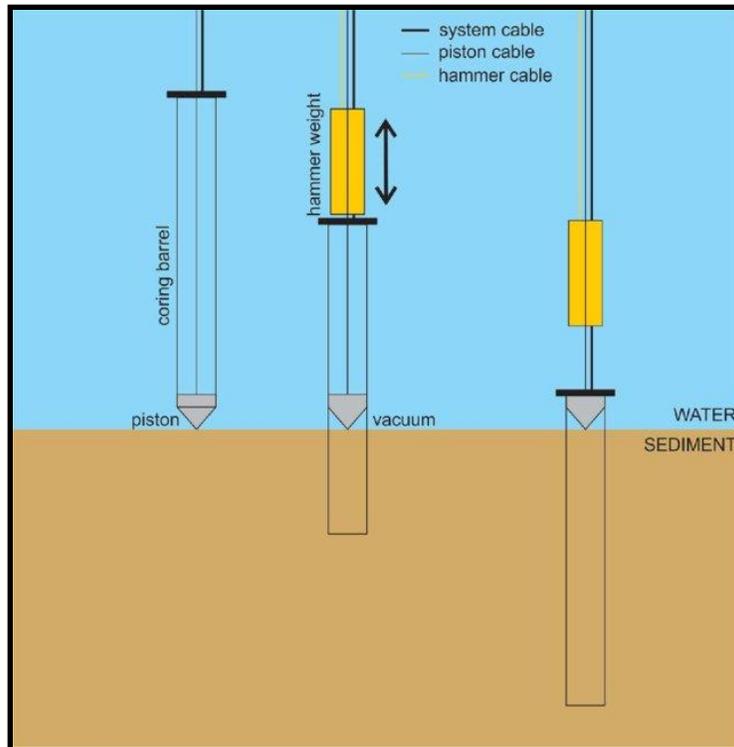


Figura 3.1: Pistón corer, dispositivo utilizado para tomar las muestras de sedimento (Imagen tomada de: Mcveigh, 2018).

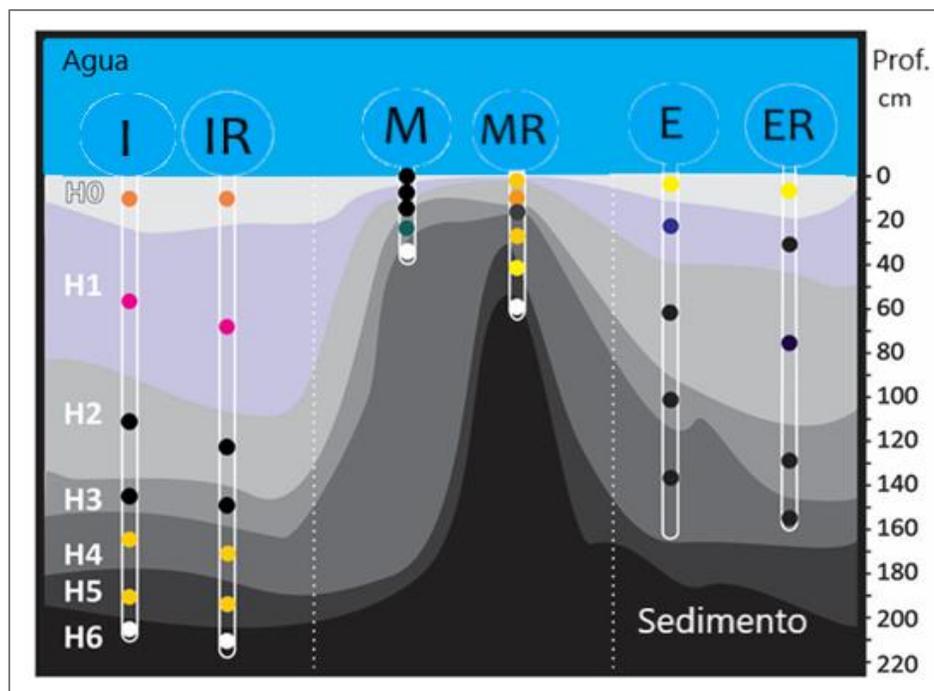


Figura 3.2: Esquema de los estratos de sedimentos observados en cada testigo muestreado. En el lateral derecho se indica la profundidad (Prof.) con una escala en centímetros (cm). Las muestras se nombrarán indicando la letra que corresponde al testigo (I, IR, M, MR, E o ER) seguido de la letra H y un número; comenzando con 0 para referirse a los horizontes superficiales y aumentando según la profundidad.

3.1.2 Medios de cultivo

Medios de cultivo / Componentes	R2 (Reasoner y Geldreich, 1985)	Medio Mineral Líquido (MML) (Vecchioli et al., 1990)	LB (Sambrook y et al., 1989)	Caldo Postgate B (PgB) (Postgate, 1963)	Medio Tioglicolato
Ác. Ascórbico (g/l)	---	---	---	0,1	---
Ác. tioglic. 80% (ul)	---	---	---	100	---
Acido Pirúvico (g/l)	0,3	---	---	---	---
Almidón (g/l)	0,5	---	---	---	---
Casamino (g/l)	0,5	---	---	---	---
CaSO₄. 2H₂O (g/l)	---	---	---	1	---
Extracto de levadura(g/l)	0,5	---	5	1	5
FeSO₄.7H₂O (g/l)	---	---	---	0,5	---
Glucosa (g/l)	0,5	---	---	---	5,5
K₂HPO₄ (g/l)	0,3	1	---	---	---
KH₂PO₄ (g/l)	---	---	---	0,5	---
KNO₃ (g/l)	---	3	---	---	---
L- Cisteína	---	---	---	---	0,5
Lactato de sodio 50% (ml)	---	---	---	5	---
MgSO₄ (g/l)	0,05	0,2	---	0,98	---
NaCl (g/l)	---	5	5	---	2,5
(NH₄)₂SO₄ (g/l)	---	1	---	---	---
(NH₄)H₂PO₄ (g/l)	---	1	---	---	---
NH₄Cl (g/l)	---	---	---	1,26	---
Proteosa peptona (g/l)	0,5	---	---	---	---
Triptona (g/l)	---	---	10	---	---
Tripteína (g/l)	---	---	---	---	15
Tioglicolato de sodio (g/l)	---	---	---	---	0,5
H₂O destilada (l)	1	1	1	1	1
pH	7,2	7,2	7,2	7,0 – 7,5	7,0 – 7,3
Resazurina (g/l)	---	---	---	---	0,001

Tabla 3.1: Medios de cultivo. Para obtener los medios sólidos se agregó a las soluciones 15 g/l de agar. El medio tioglicolato es semisólido lleva 0,75 g/l de agar. Los medios se esterizaron en autoclave a 121°C durante 15 min.

3.1.3 Buffers y soluciones

3.1.3.1 Buffers

<i>Componentes</i>	<i>TE</i>	<i>TAE</i>	<i>PBS anaeróbico</i>
<i>Tris (mM)</i>	10	8000	---
<i>EDTA (mM)</i>	1	325	---
<i>Ácido acético glacial (ml)*</i>	---	228,5	---
<i>NaCl (mM)</i>	---	---	150
<i>KH₂PO₄ (mM)</i>	---	---	3
<i>K₂HPO₄ (mM)</i>	---	---	7
<i>Ác. Ascórbico (mM)</i>	---	---	5,7

Tabla 3.2: Buffers. Se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 15 minutos. (ml*volumen agregado cada 1000 ml de agua destilada).

3.1.3.2 Soluciones de agarosa

Se prepararon soluciones de agarosa (GE Healthcare) 1,2 % p/v o 2 % p/v en buffer TAE 1X.

3.1.3.3 Mezcla de PAH en pentano

La mezcla contiene cada 1 l de pentano (97%, Cicarelli), los siguientes hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH): 0,5 g Antraceno (99%, Carlo Erba), 0,5 g Dibenzotiofeno (98%, Aldrich Chemical Company), 1 g Fenantreno (99,5%, Carlo Erba) y 0,5 g Fluoreno (99,5%, Carlo Erba). Se conservó refrigerada a 4°C.

3.2 Métodos

3.2.1 Recuentos de bacterias aeróbicas

3.2.1.1 Preparación de las suspensiones de sedimento

Se pesaron 5 g de sedimento húmedo y se colocaron en un erlenmeyer de 100 ml que contenía 50 ml de solución fisiológica (NaCl 0,85%) estéril, se homogeneizó y se llevó a un agitador rotatorio a 150 rpm durante 30 min. Luego se dejó sedimentar aproximadamente 10 min, el sobrenadante obtenido, se utilizó para realizar diluciones seriadas 1/10 en solución fisiológica a partir de las cuales se determinó el número de microorganismos viables de bacterias heterótrofas aerobias cultivables, degradadoras de hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH) y degradadoras de hidrocarburos alifáticos.

3.2.1.2 Recuento de bacterias heterótrofas cultivables

En este ensayo se sembraron 0,1 ml de cada dilución (de muestras de agua o suspensión de sedimento) en la superficie del medio de cultivo R2-Agar en placas de Petri, por duplicado y se esparcieron con espátula de Drigalsky. Se dejó incubar durante 7 días a $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Se contó el número de colonias presentes en las placas. El resultado se expresó como número de UFC/g de sedimento seco o UFC/ml de agua. (Reasoner y Geldreich, 1985).

3.2.1.3 Recuento de Bacterias degradadoras de PAH

La mezcla de PAH en pentano (Sección 3.1.3.3), que se utiliza como sustrato, se colocó en placas de 96 pocillos a razón de 20 μl por pocillo. Luego se dejó evaporar el pentano quedando una fina capa de los PAH en el fondo de cada pocillo. Posteriormente, se cargaron con 180 μl de MML y se sembraron 20 μl de diluciones seriadas (1/10) de la suspensión de sedimento o de muestra de agua por octuplicado. Las placas se incubaron a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 21 días. Pasado este periodo se registraron los pocillos positivos, donde se observó coloración que puede ir de amarillo-anaranjado al marrón debida a la acumulación de productos parciales de la degradación de los PAH (Wrenn y Venosa, 1996). El valor del NMP/g de sedimento seco o NMP/ml de agua se calculó utilizando el programa MPN calculator¹⁰, con un intervalo de confianza del 95%.

3.2.1.4 Recuento de bacterias degradadoras de hidrocarburos alifáticos

Inicialmente, se prepararon tubos de ensayo de vidrio con 5 ml de MML, se taparon y esterilizaron en autoclave a 121°C durante 15 min. Se realizaron diluciones de las muestras (suspensión de sedimento y muestras de agua) en solución fisiológica y se inocularon 500 μl de las mismas en los tubos según el esquema de tres diluciones por quintuplicado para cada muestra. Finalmente, los tubos se suplementaron con n-hexadecano al 1% y se incubaron a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 21 días (Wrenn y Venosa, 1996). Se registraron como positivos los tubos turbios y estos datos se utilizaron para calcular el NMP/g de sedimento seco o NMP/ml de agua de bacterias degradadoras de hidrocarburos alifáticos con el programa MPN Calculator, con un intervalo de confianza del 95%.

3.2.2 Recuentos de bacterias anaeróbicas

3.2.2.1 Preparación de las suspensiones de sedimento

Aproximadamente 5 g de sedimento húmedo se pesaron y se colocaron rápidamente en frascos con tapa a rosca que contenían 50 ml de buffer PBS anaeróbico estéril. Se homogeneizó la suspensión con vórtex y en un agitador rotatorio a 100 rpm durante 10 min. Se dejó decantar durante 5-10 min. Con el sobrenadante obtenido se realizaron diluciones seriadas 1/10 en buffer PBS anaerobio que luego se utilizaron como inóculo en el recuento de bacterias heterótrofas y de bacterias sulfato reductoras (SRB).

¹⁰ <https://mostprobablenumbercalculator.epa.gov/mpnForm>

3.2.2.2 Recuento de bacterias heterótrofas anaeróbicas

Se utilizaron tubos de vidrio de fondo plano y tapas a rosca en los que se colocaron 9,5 ml de medio semisólido Tioglicolato (se llenaron con el medio tibio y en constante agitación), luego se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 15min. Una vez estériles se colocaron en un baño con agua y hielo hasta verificar la aparición de una zona de color rosado de aproximadamente 1 cm en la superficie del medio (parte aeróbica), debido al indicador resazurina; el fondo del tubo (zona anaeróbica) es de color amarillento

Este recuento se realizó por la técnica del NMP inoculando en profundidad 500 µl de las diluciones seriadas 1/10 de la suspensión de sedimento (Sección 3.2.2.1). Se ensayaron tres diluciones por quintuplicado para cada muestra. Los tubos se incubaron a temperatura ambiente durante 7 días. Se registraron como positivos los tubos que presentaron turbidez por debajo de la zona rosa del medio de cultivo. El valor del NMP/g de sedimento seco se calculó utilizando el programa MPN Calculator, con un intervalo de confianza del 95%.

3.2.2.3 Recuento de bacterias sulfato reductoras por el método del NMP

Se utilizaron tubos de vidrio con fondo curvo y tapa a rosca que contenían 4,5 ml de medio PgB estéril y se inocularon con 500 µl de las diluciones realizadas a partir de la suspensión de sedimento (Sección 3.2.2.1). Se ensayaron tres diluciones por quintuplicado para cada muestra. Se incubaron durante 21 días a temperatura ambiente. Finalmente, se registraron como positivos aquellos tubos en los que se evidenció la presencia de un precipitado color negro. El valor del NMP/g de sedimento seco se calculó utilizando el programa MPN Calculator, con un intervalo de confianza del 95%.

3.2.3 Determinación de la Actividad Biológica

La actividad biológica en los sedimentos del curso de agua dulce se estudió medidas de actividad enzimática. Se utilizaron solamente los *cores* I, MR y E. Los ensayos de actividad enzimática se realizaron en una sola réplica (en la réplica de cada sitio con la mayor cantidad de horizontes) y por triplicado.

3.2.3.1 Actividad Deshidrogenasa

Se pesaron 2,5 g de sedimento húmedo y se transfirieron a frascos de 75 ml color caramelo. Se le adicionó a cada frasco 2,5 ml de solución de Triclorofeniltetrazolio (TTC) al 1% en buffer TRIS-HCl 100 mM pH 7,7. El blanco de cada reacción se realizó agregando 2,5 ml de buffer en lugar de solución de TTC al frasco conteniendo el sedimento. Se homogeneizó con vórtex y se incubó 24 h a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ en oscuridad. Pasado este tiempo se cortó la reacción mediante el agregado de 20 ml de acetona a cada frasco y posterior incubación en oscuridad durante 2 h a $22 \pm 2^\circ\text{C}$, agitando cada media hora. Luego se filtró y se midió la Absorbancia a 546 nm de los filtrados en un espectrofotómetro Beckman DU 640 UV-Visible, utilizando cubetas de vidrio. Los cálculos de actividad se estimaron mediante una curva de calibración realizada a partir de las medidas de absorbancia a 546 nm de

diluciones de una solución de 50 mg trifenil-formazan (TFP), que es el producto de la oxidación del triclorofeniltetrazolio, en 100 ml de acetona (desde 5 hasta 40 μg TPF/ml) el límite de cuantificación fue de 4,5 μg TPF/ml. Los resultados se expresaron como μg TPF/ g de sedimento seco. La determinación se realizó por triplicado. Método basado en el descrito por Thalman, 1968.

3.2.3.2 Actividad Ureasa

Se pesó 1 g de sedimento húmedo en 3 tubos plásticos de 6 ml y en un cuarto tubo para el blanco. Se les agregó 1,5 ml de una solución 0,08 M de urea (Merk. Pureza >99%) preparada en el momento, y se mezcló mediante vórtex durante 5 min. Al blanco de reacción se le agregó agua en lugar de solución de sustrato. Se incubó durante 2 h a 37°C. Luego, se centrifugó a 5000 rpm durante 10 min y se filtró el sobrenadante con papel de filtro y embudo. A 1 ml del sobrenadante filtrado se le agregó 1 ml de reactivo 1 (solución de hipoclorito de sodio 10mM en NaOH 0.125 M) y 1 ml de reactivo 2 (solución de salicilato de sodio 3 mM y nitroprusiato de sodio 0.15 mM). Posteriormente las mezclas se incubaron durante 5 min a 37°C y se midió la absorbancia a 580 nm en un espectrofotómetro Bio-Rad de microplacas. Los resultados se expresaron como μmoles de N-NH_4^+ por g de sedimento seco. Para la curva de calibración se preparó una solución estándar de sulfato de amonio de 100 ppm a partir de la cual se realizaron diluciones seriadas (desde 2 hasta 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), el límite de cuantificación fue 1,8 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Método basado en el descrito por Kandeler y Gerber, 1988.

3.2.3.3 Actividad Lipasa

En tubos plásticos de 15 ml se pesaron 0,1 g de sedimento húmedo. Se les agregó 5 ml de buffer $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 100 mM pH 7,5, se agitó con vórtex y se incubó en un baño de agua a 30°C durante 10 min. Posteriormente se les adicionó 50 μl de solución sustrato de pNP-B (p-nitrofenol butirato) 100 mM en 2-propanol preparada en el momento. Los tubos se agitaron e incubaron a 30°C por 10 min. La reacción se detuvo colocando los tubos en un baño de hielo durante 10 min. Luego, se centrifugaron a 5000 rpm por 10 min. Los sobrenadantes se filtraron con papel de filtro y embudo y se les determinó la absorbancia a 400 nm en un espectrofotómetro Bio-Rad de microplacas. Las reacciones se realizaron por triplicado y se incluyó para cada muestra un control sin sustrato. Para los cálculos de actividad se utilizó una curva de calibración realizada a partir de una solución estándar de pNP (p-nitrofenol, producto de la hidrólisis del pNP-B) 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ con la que se realizaron diluciones (desde 4 hasta 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$), el límite de cuantificación fue 3,6 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Se expresaron los resultados como μg pNP/g de sedimento seco. Método basado en el descrito por Margesin et al., 2002.

3.2.3.4 Actividad Aril-sulfatasa

En tubos plásticos de 6 ml se pesaron 0,25 g de sedimento húmedo. Se les agregó 1 ml de buffer acético-acetato pH 5,8 y 250 μl de pNP-S (p-nitrofenol sulfato), preparado en el momento en el mismo buffer. Los tubos se mezclaron con vórtex y se incubaron a 37°C durante 1 hora. Luego se agregó 2 ml de NaOH 0,5 M y 0,25 ml de

CaCl₂ 0.5 M para detener la reacción. Se centrifugaron los tubos a 6000 rpm durante diez minutos. Los sobrenadantes obtenidos se filtraron con papel de filtro y embudo y se les midió su absorbancia a 410 nm en espectrofotómetro Bio-Rad para microplacas. Las muestras se analizaron por triplicado y se realizaron controles a los que se les agregó sustrato luego de detener la reacción. Para los cálculos de resultados se utilizó una curva de calibración realizada a partir de una solución estándar de pNP-S 100 µg/ml con la que se realizaron diluciones, el límite de cuantificación fue 1,7 µg/ml. Los resultados se expresaron como µg pNP-S/g de sedimento seco. Método basado en el descripto por Geng et al., 2012.

3.2.3.5 Actividad fosfatasa ácida y alcalina

A 0,25 g de sedimento húmedo, que se pesó y colocó en tubo plástico de 6 ml se le agregó 1 ml de buffer MUB (12,1 g TRIS, 11,6 g ácido maleico, 14 g ácido cítrico, 6,6 g ácido bórico, 500 ml de solución de hidróxido de sodio 1 M; llevar a volumen final de 1 l con agua destilada) ajustado a pH 11 para medir actividad fosfatasa alcalina o a pH 6,5 para el caso de actividad fosfatasa ácida y 250 µl de solución de pNP-P (p- nitrofenol fosfato, 0.1 M) preparada en el buffer de pH correspondiente. Se mezcló con vórtex y se incubó a 37°C por 1 hora. Luego de este tiempo se agregó 1 ml de NaOH 0,5 M y 1 ml de CaCl₂ 0,5 M para detener la reacción. Posteriormente, se centrifugó 10 min a 6000 rpm, se filtró el sobrenadante con papel de filtro y embudo y se midió absorbancia a 410 nm en espectrofotómetro Bio-Rad para microplacas. Las muestras se analizaron por triplicado y se incluyeron controles a los que se les agregó el sustrato luego de detener la reacción. Para los cálculos de resultados se utilizó una curva de calibración realizada a partir de una solución estándar de pNP-P 100 µg/ml con la que se realizaron diluciones, el límite de cuantificación fue 2,7 µg/ml. Los resultados se expresaron como µg pNP-P/ g de sedimento seco. Método basado en el descripto por Verchot y Borelli, 2005.

3.2.3.6 Actividad Proteasa

Para determinar la actividad proteasa se pesó 1 g de sedimento y se colocó en tubo de ensayo de vidrio. Se agregó 5 ml de solución de caseína (Sigma Aldrich) al 2 % (preparada en buffer TRIS 0,005 M, pH 8.1) y 5 ml del mismo buffer. Se mezcló con vórtex e incubó 2 h a 50°C. Transcurrido el tiempo de reacción se agregó 5 ml de ácido tricloroacético 0,9 M (Biopack, pro-análisis), que produce la desnaturalización de la caseína no hidrolizada. Luego, se dejó decantar unos minutos y se transfirió la fase superior a un tubo de plástico para centrifugar a 10000 rpm por 5 min. A 100 µl del sobrenadante obtenido se le realizó la medida de aminoácidos libres, generados por la hidrólisis de caseína, mediante el método de Lowry. Para ello se le adicionó 500 µl de reactivo C, se incubó 15 min en oscuridad, posteriormente se agregó 100 µl de reactivo de Folin-Ciocalteu (1:1) se mezcló con vórtex e incubó 30 min en oscuridad. Finalmente, se le midió absorbancia a 750 nm en espectrofotómetro Bio-Rad para microplacas. La curva de calibración se realizó procediendo de la misma manera, pero utilizando como patrón una solución estándar de L-Tirosina (Merk®, pureza >99%) 200 µg/ml, se hicieron diluciones de esa solución y el límite

de cuantificación fue de 0.01 µg/ml. Las determinaciones se realizaron por triplicado. Se incluyó un control en cada reacción donde la solución de caseína fue agregada inmediatamente después del ácido tricloroacético. Los resultados se expresaron como µg Tyr/ g de sedimento seco. Método basado en el descrito por Ladd y Butler 1972.

Reactivo A: Carbonato de sodio 2%, NaOH 0,1 M. Reactivo B1: Sulfato de cobre 1%
 Reactivo B2: Tartrato de sodio potasio 2%. Reactivo C: Se prepara en el momento de iniciar el ensayo, mezclando los 3 anteriores en proporción 50:0,5:0,5

3.2.4 Determinaciones de parámetros fisicoquímicos

Los parámetros fisicoquímicos detallados en la Tabla 3.3 fueron determinados por la empresa Grupo INDUSER S.R.L siguiendo los protocolos de métodos analíticos de la EPA, el método para determinar hidrocarburos totales 1005 (TEXAS NATURAL RESOURCE CONSERVATION COMMISSION, TNRC 1005) y los métodos SM (Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater)¹¹.

<i>Parámetros</i>	<i>Método</i>	<i>Unidad</i>	<i>Límite de Detección</i>
<i>Hidrocarburos Totales Rango >nC6 a nC8</i>	TNRCC 1005	mg/kg	30
<i>Hidrocarburos Totales Rango >nC8 a nC10</i>	TNRCC 1005	mg/kg	30
<i>Hidrocarburos Totales Rango >nC10 a nC12</i>	TNRCC 1005	mg/kg	30
<i>Hidrocarburos Totales Rango >nC12 a nC16</i>	TNRCC 1005	mg/kg	30
<i>Hidrocarburos Totales Rango >nC16 a nC21</i>	TNRCC 1005	mg/kg	30
<i>Hidrocarburos Totales Rango >nC21 a nC35</i>	TNRCC 1005	mg/kg	30
<i>Hidrocarburos Alifáticos: nC6</i>	TNRCC 1006	mg/kg	6
<i>Hidrocarburos Alifáticos Rango >nC6 a nC8</i>	TNRCC 1006	mg/kg	6
<i>Hidrocarburos Alifáticos Rango >nC8 a nC10</i>	TNRCC 1006	mg/kg	6
<i>Hidrocarburos Alifáticos Rango >nC10 a nC12</i>	TNRCC 1006	mg/kg	6
<i>Hidrocarburos Alifáticos Rango >nC12 a nC16</i>	TNRCC 1006	mg/kg	6
<i>Hidrocarburos Alifáticos Rango >nC16 a nC21</i>	TNRCC 1006	mg/kg	6
<i>Hidrocarburos Alifáticos Rango >nC21 a nC35</i>	TNRCC 1006	mg/kg	6
<i>Hidrocarburos Aromáticos Rango >nC7 a nC8</i>	TNRCC 1006	mg/kg	6
<i>Hidrocarburos Aromáticos Rango >nC8 a nC10</i>	TNRCC 1006	mg/kg	6
<i>Hidrocarburos Aromáticos Rango >nC10 a nC12</i>	TNRCC 1006	mg/kg	6
<i>Hidrocarburos Aromáticos Rango >nC12 a nC16</i>	TNRCC 1006	mg/kg	6
<i>Hidrocarburos Aromáticos Rango >nC16 a nC21</i>	TNRCC 1006	mg/kg	6
<i>Hidrocarburos Aromáticos Rango >nC21 a nC35</i>	TNRCC 1006	mg/kg	6
<i>Benceno</i>	EPA 5021 A/8260 C	mg/kg	0,0006
<i>Tolueno</i>	EPA 5021 A/8260 C	mg/kg	0,002
<i>Etilbenceno</i>	EPA 5021 A/8260 C	mg/kg	0,0002
<i>m,p-Xileno</i>	EPA 5021 A/8260 C	mg/kg	0,01
<i>o-Xileno</i>	EPA 5021 A/8260 C	mg/kg	0,001
<i>Naftaleno</i>	EPA 3550 C/ 8310	mg/kg	0,06

¹¹ <https://www.standardmethods.org/>
<https://www.epa.gov/esam/esam-collaborative-analytical-methods-and-protocols>
<https://www.tceq.texas.gov/assets/public/remediation/trrp/Method%201005.pdf>

<i>Acenaftileno</i>	EPA 3550 C/ 8310	mg/kg	0,06
<i>Acenafteno</i>	EPA 3550 C/ 8310	mg/kg	0,06
<i>Fluoreno</i>	EPA 3550 C/ 8310	mg/kg	0,06
<i>Fenantreno</i>	EPA 3550 C/ 8310	mg/kg	0,06
<i>Antraceno</i>	EPA 3550 C/ 8310	mg/kg	0,06
<i>Fluoranteno</i>	EPA 3550 C/ 8310	mg/kg	0,06
<i>Pireno</i>	EPA 3550 C/ 8310	mg/kg	0,06
<i>Benzo(a)antraceno</i>	EPA 3550 C/ 8310	mg/kg	0,06
<i>Criseno</i>	EPA 3550 C/ 8310	mg/kg	0,06
<i>Benzo(b)fluoranteno</i>	EPA 3550 C/ 8310	mg/kg	0,06
<i>Benzo(k)fluoranteno</i>	EPA 3550 C/ 8310	mg/kg	0,06
<i>Benzo(a)pireno</i>	EPA 3550 C/ 8310	mg/kg	0,06
<i>Dibenzo(a,h)antraceno</i>	EPA 3550 C/ 8310	mg/kg	0,06
<i>Benzo(g,h,i)perileno</i>	EPA 3550 C/ 8310	mg/kg	0,06
<i>Indeno(1,2,3-cd)pireno</i>	EPA 3550 C/ 8310	mg/kg	0,06
<i>Relación C17/ Pristano</i>	EPA 3550 C/ 8015 C	---	00/00
<i>Relación C18/ Fitano</i>	EPA 3585 A/ 8015 C	---	00/00
<i>pH Relación 1:1</i>	EPA 9045 D	UpH	0,06
<i>Sulfuro Total</i>	EPA 9030 B/ 9034	mg/kg	0,6
<i>Sulfato Soluble en Medio Acuoso</i>	USDA LMM 4D2a2/ SM 4110 B	mmol/l	0,12
<i>Nitrógeno Total Kjeldahl</i>	NOM-021-RECNAT-2000-AS 25	mg/kg	3
<i>Nitrito soluble en medio acuoso</i>	USDA LMM 4D2a2/ SM 4110 B	mmol/l	0,01
<i>Amonio Intercambiable/ Extraíble KCL</i>	NOM-021-RECNAT-2000 AS-08	mg/kg	3
<i>Fósforo Total</i>	EPA 5050/ SM 4110 B 22nd Ed.	mg/kg	6
<i>Potencial Redox calculado respecto al electrodo de Hidrógeno</i>	SM 2580 Ed. 22	mV	0,001
<i>Aluminio</i>	EPA 3050 B/ 6010 D	mg/kg	1,5
<i>Antimonio</i>	EPA 3050 B/ 6010 D	mg/kg	0,6
<i>Arsénico</i>	EPA 3050 B/ 6010 D	mg/kg	0,7
<i>Cadmio</i>	EPA 3050 B/ 6010 D	mg/kg	0,2
<i>Zinc</i>	EPA 3050 B/ 6010 D	mg/kg	0,2
<i>Cobre Total</i>	EPA 3050 B/ 6010 D	mg/kg	0,3
<i>Cromo</i>	EPA 3050 B/ 6010 D	mg/kg	0,4
<i>Hierro</i>	EPA 3050 B/ 6010 D	mg/kg	1,5
<i>Manganeso</i>	EPA 3050 B/ 6010 D	mg/kg	0,3
<i>Níquel</i>	EPA 3050 B/ 6010 D	mg/kg	0,1
<i>Plata</i>	EPA 3050 B/ 6010 D	mg/kg	0,09
<i>Plomo</i>	EPA 3050 B/ 6010 D	mg/kg	0,4
<i>Selenio</i>	EPA 3050 B/ 6010 D	mg/kg	0,6
<i>Vanadio</i>	EPA 3050 B/ 6010 D	mg/kg	0,1
<i>Cobalto</i>	EPA 3050 B/ 6010 D	mg/kg	0,2
<i>Litio</i>	EPA 3050 B/ 6010 D	mg/kg	0,5
<i>Bismuto</i>	EPA 3050 B/ 6010 D	mg/kg	7,5
<i>Estroncio</i>	EPA 3050 B/ 6010 D	mg/kg	0,2
<i>Molibdeno</i>	EPA 3050 B/ 6010 D	mg/kg	0,1
<i>Boro</i>	EPA 3050 B/ 6010 D	mg/kg	7,5
<i>Humedad</i>	SM 2540 G Ed. 22	% p/p	0,06

Tabla 3.3: Parámetros fisicoquímicos determinados a los sedimentos por Grupo INDUSER S.R.L, siguiendo los protocolos de métodos analíticos de la EPA, el método para determinar hidrocarburos totales 1005.

3.2.5 Extracción de Ácido nucleicos

3.2.5.1 Extracción de ADN total de cepas bacterianas

Se colocó 1 ml de un cultivo crecido entre 18 y 24h en un tubo de polipropileno de 1,5 ml y se centrifugó 5 min a 14000 g. El pellet se resuspendió en 0,5 ml de agua destilada estéril y se incubó a 100 °C durante 10 min. Posteriormente se centrifugó a 7000 rpm durante 7 min y se guardó el sobrenadante conteniendo el ADN total a -20°C (Sambrook y col., 1989).

3.2.5.2 Extracción de ADN de las muestras de sedimento

La extracción de ADN total se realizó a partir de 1 g de sedimento utilizando el kit comercial E.Z.N.A.™ Soil DNA Isolation Kit (Omega Bio-tek, Inc., Norcross, GA, USA). Al paso de lisis indicado en el protocolo del fabricante se le realizaron modificaciones en este trabajo de tesis. Dicho paso se repitió tres veces, agregando cada vez 5,4 µl de lisozima (300 mg/ml). Además, se incluyó el agregado de 15 µl de Proteinasa K (10 mg/ml) y posterior incubación de 1 hora a 37°C en la primera repetición. Una vez obtenido el ADN se cuantificó con Nanodrop™ (Thermo Scientific) y se conservó a -20°C para su posterior uso.

3.2.5.3 Extracción de ARN y síntesis de cADN de sedimentos

La extracción de ARN total del sedimento se realizó utilizando el kit comercial E.Z.N.A.™ Soil Total RNA Isolation Mini Kit (Omega Bio-tek, Inc., Norcross, GA, USA), a partir de 0,5 g de sedimento y siguiendo las recomendaciones del fabricante. La concentración de ARN extraído se cuantificó utilizando Nanodrop™ (Thermo Scientific) y fue alicuotado en fracciones de 8 µl que se conservaron a -80°C.

El ARN fue tratado con DNasa I (Promega RQ1) a 37°C durante 50 min. Para la síntesis de cADN se utilizó; transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen) y Random Hexamer Primers (Thermo Scientific) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El cADN se conservó a -20°C.

3.2.6 Secuenciación masiva de amplicones del gen 16S rRNA del sedimento

Las muestras de ADN fueron enviadas al laboratorio MR.DNA (Molecular Research Laboratory, MR DNA; Shallowater, Texas, USA), donde se realizó la secuenciación de la región variable V4 del gen 16S rRN utilizando los primers 515/806 para Eubacterias y Arqueas en la plataforma Illumina MiSeq¹².

¹² <http://www.mrdnalab.com/>

3.2.7 Análisis bioinformático de los amplicones 16S rRNA de las muestras de sedimento

Los datos crudos de la secuenciación (archivos FastQ) se descargaron de la Plataforma BaseSpace y mediante la herramienta FastQ Processor32 (MR DNA free software applications) se removieron los linker primers, barcodes y reverse primers. Posteriormente se importaron a QIIME2 v2019.1 (Bolyen et al., 2019). Se realizó un filtrado de las secuencias de buena calidad utilizando el complemento DADA 2 (Divisive Amplicon Denoising Algorithm 2)(Benjamin J. Callahan et al., 2016) para obtener Variantes de Secuencia de Amplificación ASVs (del inglés Amplicon Sequence Variants). A continuación, las secuencias se alinearon utilizando MAFFT (Yamada et al., 2016) y se creó un árbol filogenético con la herramienta fasttree (Price et al., 2010). Para la asignación taxonómica se recurrió a la base de datos SILVA_16S_99. Luego, se realizó un filtrado para remover los ASVs de baja abundancia (< 0,1 % del promedio de profundidad de las muestras), secuencias de 16S rRNA mitocondrial o de cloroplastos y secuencias o lecturas que no estuvieron clasificadas a nivel filo. La tabla resultante con las frecuencias de ASVs por muestra fue rareficada utilizando el valor de más baja frecuencia total del conjunto de muestras. Se determinaron los índices de alfa diversidad de: Shannon, Simpson, Observed features y Faith. Se realizaron análisis de coordenadas principales PCoA para analizar la beta diversidad (Weighted UniFrac) estos análisis se realizaron con el paquete phyloseq v.1.42.0 en Rstudio, para esto se construyó un objeto phyloseq a partir de los archivos de QIIME2 con el paquete qiime2R v.1.99.6. Las diferencias entre los grupos se estudiaron mediante la función *adonis2* del paquete *vegan* (v.2.6-4) y el paquete *pairwiseAdonis* v. 0.4.

3.2.7.1 Predicción funcional mediante PICRUSt2

El software PICRUSt2 fue utilizado según las especificaciones de los desarrolladores para realizar predicciones sobre la abundancia de genes y vías metabólicas. El algoritmo PICRUSt2 incluye pasos que optimizan la predicción del genoma, incluida la colocación de las secuencias en una filogenia de referencia. Los ASVs son colocados en un árbol de referencia que contiene 20000 genes 16S rRNA completos de 41926 genomas de bacterias y arqueas que conforman la base de datos “Integrated Microbial Genomes (IMG)” que se utiliza como base para las predicciones. Los ASV se corrigen por su número de copias del gen 16S rRNA y se multiplican por sus predicciones funcionales para producir un metagenoma predicho. PICRUSt2 también proporciona la contribución de los ASV a cada función predicha, lo que permite realizar análisis estadísticos basados en la taxonomía. Además, permite inferir la abundancia de las vías a partir de mapas estructurados (Douglas et al., 2020).

La precisión de las predicciones de PICRUSt2 se determinan mediante el cálculo de los valores de NSTI (*Nearest Sequenced Taxon Index*). Este índice se calcula sumando la distancia filogenética entre cada microorganismo en la tabla de ASVs con su pariente más cercano (utilizando el genoma de referencia del pariente más cercano secuenciado). La distancia filogenética es medida en término de sustituciones por sitio en el gen 16S rRNA y ponderada por la frecuencia de ese microorganismo en la tabla de ASVs. Los valores de NSTI suelen ser

más altos cuando se trata de microbiomas filogenéticamente más diversos, lo que indica que el valor de NSTI tiene una relación inversa con la precisión de la predicción. En muestras de suelo los NSTI típicamente rondan los 0,17 (Langille et al., 2013).

3.2.7.2 Abundancia diferencial de rutas metabólicas en los sedimentos

Se predijeron 401 vías metabólicas en las muestras de sedimento con la herramienta PICRUST2, la tabla con dichas predicciones fue transformada para obtener su abundancia relativa y posteriormente realizar un análisis de abundancia diferencial. Se utilizó el paquete *MicrobiotaProcess* en R Studio (Xu et al., 2023). El gráfico obtenido representa el intervalo de confianza del tamaño del efecto (LDA, *Linear Discriminant Analysis*) de la vía metabólica. Un intervalo de confianza mayor indica que el biomarcador (en este caso la ruta metabólica) es más fluctuante, debido a la influencia del número de muestras. Los resultados se expresan como \log_{10} (LDA), que se considera significativo cuando es ≥ 2 y $p < 0,05$. A mayor \log_{10} (LDA) la vía metabólica es significativamente más abundantes en el grupo estudiado.

3.2.8 Cuantificación del gen 16S rRNA, de genes funcionales de degradación de hidrocarburos y de sus transcriptos

3.2.8.1 Obtención de patrones plasmídicos

Los patrones para cuantificar genes o transcriptos utilizados en este trabajo corresponden a un ADN circular con el gen de interés en su secuencia (genes: *PAH-RHD α* , *c230*, *16S rRNA*, *alkB*, *bamA* y *bssA*) Tabla 3.4. Estos fueron construidos a partir de la ligación entre un producto PCR del gen de interés y un vector de clonación. En nuestro laboratorio se contaba con los patrones para los genes: *PAH-RHD α* , *c230*, *16S rRNA* y *alkB*. En este trabajo de tesis se construyeron los patrones para los genes vinculados con las vías de degradación anaeróbica de hidrocarburos: *bamA* (6-oxociclohex-1-ene-1-carbonilCoA hidrolasa) y *bssA* (bencilsuccinato sintasa). A continuación, se describen los pasos realizados:

3.2.8.1.i Generación de los productos PCR

Se aplicó la técnica de PCR empleando como ADN *target* el obtenido a partir de sedimentos de sitios aledaños al estudiado en este trabajo. Se utilizaron cebadores específicos para los genes de interés cuyas mezclas de reacción se muestran en la Tabla 3.4 y sus referencias y programas se detallan en la Tabla 3.5. Una vez finalizada la amplificación, se realizaron geles de agarosa al 1,2 o 2 % p/v en buffer TAE (sección 3.1.3) coloreados con bromuro de etidio (4 μ l de bromuro de etidio cada 70 ml de buffer TAE), donde 5 μ l de cada producto PCR fue sembrado y corrido a 90 V durante 60 min, para visualizar los productos de PCR. El termociclador utilizado fue Eppendorf Mastercycler thermocycler (Eppendorf, Hamburg, Germany).

3.2.8.1.ii Purificación de los productos PCR

Los productos de PCR que amplificaron con bandas intensas y únicas del tamaño esperado se purificaron con el Kit Nucleospin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) siguiendo las especificaciones del fabricante y, a continuación, se determinó la concentración en ng/μl y el grado de purificación (relación de absorbancias 260/280 y 260/230) de cada producto PCR mediante el espectrofotómetro NanoDrop™ 2000/2000c.

<i>Secuencia del Primer</i>	<i>Gen blanco y referencia</i>	<i>Programa PCR y qPCR</i>
<u>PAHRHDαGNF:</u> GAGATGCATACCACGTKGGTTGGA	Dioxigenasa (PAH-RHDα) (Cébron et al., 2008)	1 ciclo: 95°C 5 min
<u>PAHRHDαGNR:</u> AGCTGTTGTTCTGGGAAGAYWGTGCMGTT		40 ciclos: 95°C 30seg, 57°C 30seg, 72°C 30seg.
<u>C230F:</u> AAGAGGCATGGGGCGCACCGGTTCGA TCA	Catecol 2,3-dioxigenasa (c230) (Sei et al., 1999)	1 ciclo: 72°C 7 min
<u>C230R:</u> CCAGCAAACACCTCGTTGCGGTTGCC		1 ciclo: 95°C 5 min
<u>1055F:</u> ATGGCTGTCGTCAGCT	16s rRNA (región variable V9) (Ferris et al., 1996)	40 ciclos: 95°C 30seg, 57°C 30seg, 72°C 30seg.
<u>1392R:</u> ACGGGCGGTGTGTAC		1 ciclo: 72°C 7 min
<u>alkBF:</u> AACTACATCGAGCACTACG	Alcano mono oxigenasa (alkB) (Powell et al., 2006)	1 ciclo: 94°C 5 min
<u>alkBR:</u> TGAAGATGTGGTTGCTGTTCC		1 ciclo: 94°C 15 min
<u>oahF:</u> AGTACAAYTCCTACACSACYGABATGGT	6-Oxociclohex-1-ene-1-carbonil-CoA hidrolasa (bamA) (Staats et al., 2011)	35 ciclos: 84°C 20seg, 55°C 30seg, 72°C 45seg.
<u>oahR:</u> CCRTGCTTSGGRCCVCGCTGVCCGAA		1 ciclo: 72°C 7 min
<u>SRBf:</u> GTSCCCATGATGCCGAGC	Bencil succinato sintasa (bssA) (Beller et al., 2008)	1 ciclo 95°C 5 min
<u>SRBr:</u> CGACATTGAACTGCACGTGRTCG		45 ciclos: 95°C 30seg, 58°C 45seg, 72°C 30seg.
		1 ciclo 72°C 5 min
		1 ciclo: 95°C 10 min
		45 ciclos: 95°C 15seg, 58°C 60seg, 72°C 30seg.
		1 ciclo: 72°C 5 min

Tabla 3.4: *Primers* utilizados en ensayos de PCR y qPCR. Se detallan los programas y la referencia bibliográfica de donde se obtuvieron.

Reactivos (μl)	<i>bssA</i>	<i>bamA</i>	<i>C230</i>	<i>PAH RHD-GN</i>	<i>alkB</i>	<i>16S rRNA</i>
<i>Primer F (5μM)</i>	1,9	1,2	1,2	1,2	3	1,2
<i>Primer R (5μM)</i>	1,9	1,2	1,2	1,2	3	1,2
<i>Buffer (5X)</i>	6	6	6	6	6	6
<i>dNTPs (25 μM c/u)</i>	6	0,96	2,4	2,4	2,4	2,4
<i>Taq polimerasa (5U/ml)</i>	0,2	0,2	0,15	0,15	0,2	0,3
<i>ADN molde</i>	2	2	2	2	2	2
<i>Agua</i>	12	18,44	17,2	17,2	13,4	16,9
<i>Volumen final</i>	30	30	30	30	30	30

Tabla 3.5: Volúmenes de los reactivos utilizados en las reacciones de PCR de los genes *bamA*, *bssA*, *PAH RHD-GN*, *alkB* y *16S rRNA*. En la primera columna se indica la concentración de cada reactivo junto al nombre.

3.2.8.1.iii Clonación de los productos de PCR purificados en células de *E. coli* DH5- α competentes

La clonación de los productos de PCR obtenidos se realizó siguiendo el protocolo de Lillis y colaboradores (2010). Para esto, se inoculó en un erlenmeyer con 10 ml de medio LB fresco y estéril, 500 μ l de un cultivo de 24 h de *E. coli* DH5- α . Cuando el cultivo alcanzó una DO_{600} 0,5-0,6 (2-3 h), se trasvasó a un tubo de polipropileno de 15 ml, se centrifugó a 4000 g durante 5 min y se descartó el sobrenadante. El pellet se resuspendió en baño de hielo mediante el agregado de 5 ml de solución de $CaCl_2$ 0,1 M estéril y frío, y se colocó por 24 h en posición vertical en heladera, para que las células competentes decanten. Por otro lado, se prepararon las mezclas de ligación conteniendo: el producto de PCR purificado (inserto), el vector pGEM-T, buffer y enzima ligasa provistos en el kit del vector pGEM-T Easy vector (Promega). Además, se prepararon las mezclas controles correspondientes (control sin inserto y control background, al que se agrega un inserto "control", también incluido en el kit, que tiene alta eficiencia de clonación) según las indicaciones del fabricante. Las mezclas de ligación se mantuvieron en heladera durante 24 h. Pasado este tiempo se procedió a la transformación térmica de *E. coli* DH5- α competentes. Las células se concentraron retirando cuidadosamente 4,5 ml del sobrenadante ($CaCl_2$) y resuspendiendo el pellet en el volumen de sobrenadante remanente. Las mezclas de ligación obtenidas en el paso anterior se mezclaron con 100 μ l de la suspensión *E. coli* DH5- α concentrada en nuevos tubos de polipropileno. Durante la transformación térmica los tubos se incubaron en hielo durante 30 min, luego, se llevaron a 42 °C por 2 min y nuevamente se colocaron en hielo por 5 min. Para disminuir el estrés bacteriano ocasionado por dicha

transformación, 900 µl de medio LB se agregaron a cada mezcla y se incubaron a 37 °C por 1 h. Finalmente, 100 µl de cada mezcla fueron esparcidos con espátula de Drigalsky en placas de Petri conteniendo agar LB con 100 µg/ml de ampicilina (Amp), 100 µl de IPTG 100 mM y 20 µl de X-gal 50 mg/ml (agregados previamente con espátula de Drigalsky). Las placas se incubaron 24 h a 37 °C. La aparición de colonias blancas Amp^R, que sugieren la presencia del vector con el inserto, fueron repicadas en medio LB líquido con 100 µg/ml de Amp para posterior extracción de ADN por el método del hervido (sección 3.2.5.1). Una vez obtenido el ADN total de los clones se procedió a verificar la presencia del vector mediante PCR con los primers SP6 (5'ATTTAGGTGACTATAGAA3') y T7 (5'TAATACGACTCACTATAGGG3') y la presencia del inserto, mediante PCR utilizando los primers específicos para el gen que se estaba clonando. Para corroborar la especificidad del inserto clonado y el número de pares de bases, los vectores con el inserto fueron purificados con el kit comercial Qiaprep miniprep kit (Qiagen®), y secuenciados por el servicio de secuenciación Macrogen, Korea. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con las bases de datos de secuencias pertenecientes al *National Center for Biotechnology Information Gen Bank*, utilizando la herramienta BLASTn. Finalmente, los vectores con los insertos específicos fueron conservados a -20°C para ser utilizados como patrones de clonación. La Tabla 3.6 muestra la especificidad de los patrones para cada inserto clonado.

<i>Gen</i>	<i>KO</i>	<i>Referencia</i>	<i>Especificidad del inserto (Resultado Blast)</i>	<i>Cobertura (%)</i>	<i>Identidad (%)</i>
<i>bssA</i>	K07540	Beller et al., 2008 Amplifican la bacteria sulfatoreductora PRTOL1	Sulfate-reducing bacterium PRTOL1 BssA (bssA) gene, partial cds. Acceso: EU780921.1	100	97
<i>bamA</i>	K07539	Staats et al., 2011 Amplifican: Magnetospirillum, Geobacter y Syntrophus	Uncultured bacterium clone ASM-3 6- oxocyclohex-1-ene-1-carbonyl-CoA hydrolase gene, partial cds. Acceso: JX114980.1	81	90

Tabla 3.6: Especificidad de los insertos *bssA* y *bamA* en los plásmidos utilizados como patrones en qPCR.

3.2.8.1.iv Construcción de curvas de calibración a partir de patrones plasmídicos

Para generar los patrones de cuantificación por qPCR Se midió con Nanodrop TM (Thermo Scientific) la concentración en ng/μl del ADN de los plásmidos obtenidos mediante clonación y se utilizó para calcular el número de copias del gen de interés con la Fórmula 3.1.

$$N^{\circ} \text{ copias} = \left\{ \left(\text{concentracion} \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} \times 6.023 \times 10^{23} \right) \left| \left(n^{\circ} \text{ pb} \times 1 \times 10^9 \times 650 \text{ Da} \right) \right. \right\}$$

Fórmula 3.1 Calculo del número de copias de un gen patrón para qPCR. Donde, concentración ng/μl es la concentración del ADN plasmídico y n° pb corresponde al tamaño en pb del inserto clonado más las 3015 pb del vector pGEM-T. La masa molecular promedio por par de nucleótidos es 650 Da, 6,023×10²³ es el número de Avogadro y 1x10⁹ es un corrector de unidad.

Una vez conocida la relación entre concentración (ng/μl) y copias/μl, se construyeron curvas estándares realizando diluciones seriadas 1/10 de los patrones en agua miliQ, de manera de cubrir entre 2 y 8 órdenes de magnitud de copias/μl.

3.2.8.2 Cuantificación de genes y transcriptos

Se cuantificaron los genes *bamA*, *bssA* y 16S rRNA en las muestras de ADN y de cDNA de los sedimentos a partir de curvas de calibración generadas con los plásmidos patrones obtenidos por clonación (sección 3.2.8.1.iii) y graficando los valores de Ct (ciclo umbral, del inglés *cycle threshold*) en función del logaritmo del número de copias por μl. Los ensayos de qPCR y RT-qPCR se realizaron en un volumen final de reacción de 10 μl y las mezclas de reacción de todos los genes ensayados contenían; 5 μl de 2X iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad), 1,5 μl de cada primer (0,4 μM) y 2 μl de ADN molde o agua milliQ (control negativo). Además, se incluyeron controles de inhibición por muestra (en lugar de los 2 μl de molde se colocan 1 μl de muestra, 1 μl de la dilución con concentración 1x10⁴ copias/μl patrón). Los programas de amplificación utilizados fueron los mismos que para PCR (Tabla 3.10.1) pero se les adicionó un paso final para la obtención de las *curvas de melting*, a partir de las cuales se verificó la especificidad de los amplicones, este paso consistió en realizar una rampa de temperaturas desde 55°C hasta 99°C aumentando 1°C en cada paso. El termociclador utilizado fue Rotor Gene Q 2 Plex (Qiagen) y el programa para visualizar los resultados Rotor Gene Q Series Software. La cuantificación de la curva de calibración, las muestras y los controles se realizó por triplicado.

Se calcularon los límites de cuantificación (LoQ) para cada gen/transcripto a cuantificar, como la menor concentración del patrón de calibración que muestre un coeficiente de variación ≤ 35%. El límite de detección (LoD) teórico de la técnica es de 3 copias, con un intervalo de confianza del 95% (Forootan et al., 2017).

3.2.9 Secuenciación de los transcritos

Los productos de amplificación positivos obtenidos con cDNA como molde se clonaron en *E. coli* DH5- α como se describió en las secciones 3.2.8.ii y 3.2.8.1.iii, y los clones positivos fueron secuenciados por el servicio de secuenciación Macrogen, Korea. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con las bases de datos de secuencias pertenecientes al National Center for Biotechnology Information (NCBI), Gen Bank, utilizando la herramienta BLASTn.

Se utilizó el software MEGA 11 (Tamura et al., 2021) para alinear las secuencias de los clones con las secuencias de los microorganismos con los que presentaron mayor similitud en la base de datos del NCBI y con secuencias de los genes de interés en microorganismos de referencias (obtenidas también del NCBI al realizar BLASTn con los *primers* utilizados para la cuantificación de *bamA* y *bssA*). Una vez alineadas las secuencias se construyeron dendrogramas para cada uno de los genes. Se utilizó el método *Neighbor-Joining*. Sobre las ramas de cada dendrograma se muestra el porcentaje de replicados en los que los taxones asociados se agruparon en la prueba *bootstrap* (1000 réplicas). Para el dendrograma de los clones *bamA* este análisis incluyó 14 secuencias de nucleótidos. Las posiciones de codones incluidas fueron 1°+2°+3°+no codificante. Se eliminaron todas las posiciones ambiguas de cada par de secuencias (opción de eliminación por pares). El conjunto de datos final contuvo un total de 928 posiciones. Para el dendrograma de *bssA* el análisis incluyó 13 secuencias de nucleótidos y el conjunto final de datos contuvo 512 posiciones (Tamura et al., 2011).

3.2.10 Efecto de la aireación sobre la biorremediación de sedimentos afectados con hidrocarburos

3.2.10.1 Preparación de los microcosmos

Se realizaron microcosmos utilizando una mezcla homogeneizada de sedimento de diferente profundidad y agua del curso de agua dulce estudiado en esta tesis, agregando $\frac{1}{4}$ de sedimento (aproximadamente 70 g) y $\frac{3}{4}$ partes de agua (120 ml), en frascos de vidrio de 16 cm alto y 5 cm diámetro. Se realizó una marca en cada frasco para indicar el volumen de agua inicial, la cual se fue completando con agua destilada a medida que se perdía por evaporación. La zona del recipiente donde se encontraba el sedimento se envolvió con papel aluminio con el fin de que la luz ingrese por la parte superior y así, simular las condiciones naturales. Se esperaron 24 horas después del armado para que el sedimento se asiente y luego la mitad de los frascos fueron burbujeados con aire (sistemas aireados, Ai) mediante un sistema de mangueras, válvulas y aireadores de pecera (Aireadores Precision SR-2500, 2500cm³/min) y la otra mitad se dejaron estancos (sistema sin airear, SAi) (Figura 3.4).

Los microcosmos se incubaron a 24°C con un fotoperíodo de 14 h de luz y 10 h de oscuridad. El ensayo se realizó por sextuplicado (a excepción de la caracterización inicial que se realizó por cuadruplicado). Se sacrificaron

3 microcosmos de cada condición para la determinación de hidrocarburos totales y se utilizaron los otros tres frascos para las determinaciones enzimáticas y moleculares. Los muestreos se realizaron a los días: 1 (un día luego de iniciado el experimento), 30, 90 y 280.



Figura 3.4: Esquema de las dos condiciones en las que se estudiaron los microcosmos, condición 1 Sistema sin airear SAi y condición 2 sistema aireado Ai.

3.2.10.1.2 Determinaciones realizadas

- Determinación del porcentaje de humedad de la mezcla de sedimento, sección 3.2.10.2.
- Oxígeno disuelto en agua con Multiparameter fotometer Aquaculture (Hanna Instruments), sección 3.2.10.2.3.
- Cuantificación del contenido de hidrocarburos alifáticos y aromáticos por cromatografía gaseosa (FID-GC), sección 3.2.10.4.
- Determinación de actividad biológica mediante ensayo de las actividades enzimáticas: deshidrogenasa (Thalman, 1968) (Sección 3.2.3.1), ureasa (Kandeler y Gerber, 1988)(Sección 3.2.3.2), lipasa (Margesin y col., 2012) (Sección 3.2.3.3) y proteasa (Ladd y Butler, 1972)(Sección 3.2.3.6).
- Extracción de ADN de las muestras de sedimento (E.Z.N.A.™ Soil DNA Isolation Kit Omega Bio-tek, Inc., Norcross, GA, USA) como se describió en la Sección 3.2.5.2.
- Secuenciación masiva de amplicones del gen 16S rRNA utilizando la plataforma NovaSeq PE250, Sección 3.2.10.5.
- Asignación taxonómica, análisis multivariantes y predicción funcional, (Secciones 3.2.10.6 y 3.2.10.6.1).
- Cuantificación por qPCR de microorganismos totales (16S rRNA) y de genes de degradación anaeróbica (*bssA* y *bamA*) y aeróbica (*alkB* y *c230* y *PAH-RHDα*), sección 3.2.8.

3.2.10.2 Determinación del porcentaje de humedad en la mezcla de sedimento

El porcentaje de humedad de la mezcla de sedimentos utilizada para armar los microcosmos se realizó por destilación azeotrópica. Se colocaron aproximadamente 10 g de sedimento en un balón de 250 ml y se agregó tolueno saturado en agua destilada hasta cubrir la muestra (30 ml). Se adaptó una trampa graduada Dean-Stark (10 ml) y se conectó al refrigerante para su destilación. Se utilizó una platina para calentar la mezcla a ebullición suave (Punto de ebullición de mezcla tolueno/agua 84 °C) durante aproximadamente 2 h. Transcurrido ese tiempo, se dejó enfriar y efectuó la lectura de la altura (cm) del agua destilada.

3.2.10.3 Determinación de oxígeno disuelto

Se extrajo el agua de la superficie de los microcosmos con jeringa de 50 ml sin perturbar el sedimento; se colocó en un recipiente de vidrio lentamente y sin generar burbujas. Para realizar la medida del oxígeno disuelto se utilizó el equipo Multiparameter fotometer Aquaculture (Hanna Instruments) y se procedió según las indicaciones del fabricante. Se utilizó como blanco agua de un curso de agua aledaño recolectado el mismo día del armado de los microcosmos que se conservó en heladera. Los resultados se expresan en mg de O₂/l.

3.2.10.4 Cuantificación del contenido de hidrocarburos totales C10-C40 por cromatografía gaseosa

Los microcosmos con agua y sedimento se liofilizaron con el fin de eliminar el agua. Un gramo de muestra liofilizada y 20 ml de mezcla 1:1 (v/v) de acetona:hexano, de calidad cromatográfica, se colocaron en un tubo de polipropileno de 50 ml. Se sonicó durante 60 min (ultrasonicador TestLab, 400W, 40KHz) y se centrifugó a 3000 rpm por 10 min (centrifuga Presvac model DCS-16RV). El sobrenadante se transfirió a un frasco de vidrio color caramelo de boca ancha. El pellet se utilizó para una segunda extracción procediendo de la misma manera. Luego, se filtraron los sobrenadantes utilizando filtros de nylon de 0,45 µm y 13 mm. Los extractos se guardaron a -20 °C hasta medir en CG-FID. Las determinaciones del contenido de hidrocarburos totales se realizaron inyectando 2 µl de las extracciones anteriores un cromatógrafo gaseoso Clarus 500 (Perkin Elmer) equipado con una columna PE-5HT (30 mm, 0,25 mm, 0,10 µm) acoplado a un detector de ionización de llama (CG-FID). La cantidad total de hidrocarburos de petróleo (TPH) se determinó como la suma de los componentes resueltos y no resueltos eludidos de la columna capilar CG entre los tiempos de retención C10 y C40 según la metodología estándar (prEN 14039: 2004: E, Caracterización de residuos-Determinación de Contenido de hidrocarburos en el rango de C10 a C40 por cromatografía de gases. Raphy, Comité Europeo de Normalización, Bruselas, 2004. ISO 9377-2: 2000, Calidad del agua, Determinación de hidrocarburos. Índice, Parte 2: Método que utiliza extracción con disolvente y cromatografía de gases, ISO, Ginebra, Suiza, 2000 e ISO / DIS 16703: 2004, Calidad del suelo-Determinación del contenido de Hidrocarburos en el rango C10 a C40 por cromatografía de gases, ISO, Ginebra, Suiza, 2004), (Mora y Rosso, 2022).

3.2.10.5 Secuenciación de amplicones del gen 16S rRNA de los sedimentos de los microcosmos

Se extrajo ADN de los sedimentos de los microcosmos por triplicado para cada tiempo, procediendo según se explicó en la sección 3.7.2. Las muestras de ADN fueron enviadas al laboratorio Novogene (8801 Folsom Blvd, Suite 290, Sacramento, CA 95826, USA) donde se realizó la secuenciación de la región variable V4 del gen 16S rARN utilizando los primers 515/806 para Eubacterias y Arqueas (515F: GTGCCAGCMGCCGCGGTAA 806R: GGACTACHVGGGTWTCTAAT) utilizando la plataforma NovaSeq PE250.

3.2.10.6 Análisis bioinformático de los amplicones 16S rRNA de los microcosmos

El procesamiento de los datos de secuenciación se realizó en R (R Core Team, 2014). A partir de las lecturas (*reads*) de secuenciación del gen 16S rRNA se realizó un filtrado, recorte (*trimming*), eliminación de quimeras y el *merging* (unión de las secuencias forward y reverse) empleando el paquete *dada2* (v 1.26.0) (Callahan et al., 2016), utilizando los siguientes parámetros: TruncLen = 200, 200; maxEE= 2,2; trimLeft= 5; truncQ=2. A continuación, se realizó la asignación taxonómica de las lecturas, utilizando el clasificador SILVA v.138. Los análisis posteriores se realizaron con los paquetes *phyloseq* (v. 1.42.0) y *vegan* (v. 2.6-4). Las muestras secuenciadas de los microcosmos tuvieron un rango de entre 78530 - 145446 secuencias que corresponden a un total de 8813 ASVs (Amplicon Sequence Variants) y se normalizaron al menor número de secuencias para los posteriores análisis de alfa y beta diversidad. Las diferencias entre los grupos se estudiaron mediante la función *adonis2* del paquete *vegan* (v.2.6-4) y el paquete *pairwiseAdonis* (v. 0.4). Para los gráficos de abundancia se utilizaron los paquetes *microViz* (v 0.12.1), *fantaxtic* (v 0.2.0) y *ggpobr* (v 0.6.0).

3.2.10.6.1 Predicción funcional con PICRUSt2

Se realizó la predicción de la abundancia de genes ortólogos de KEGG (KO) como se indica en la Sección 3.2.7.1, a partir del análisis de diversidad taxonómica. Los gráficos de heatmap se realizaron utilizando el paquete *tidyverse* (v 2.0.2).

3.2.11 Análisis estadísticos

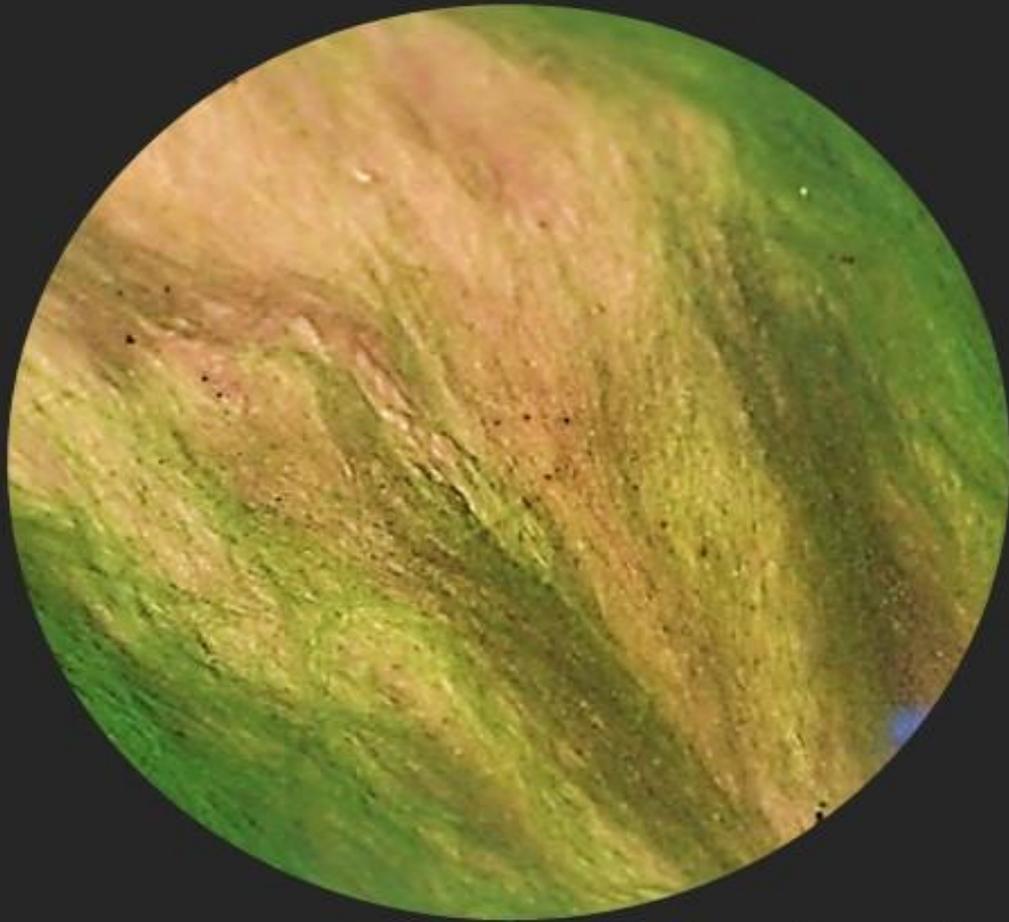
El análisis estadístico de los datos de concentración de metales en los sedimentos del curso de agua y de la concentración de hidrocarburos, actividades enzimáticas, cuantificación por qPCR de genes funcionales de los sedimentos del curso de agua y de los microcosmos; se efectuaron utilizando el software InfoStat (Di Rienzo et al., 2020). Se realizaron análisis de la varianza (ANOVA), para esto, se comprobaron los supuestos de normalidad y de homocedasticidad mediante las pruebas de Shapiro – Wilk y test de Levene, respectivamente. En el caso de no cumplirse el supuesto de normalidad se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal – Wallis. Las pruebas post – hoc a través de comparaciones de a pares se realizaron mediante el test de Tukey – Kramer.

El software bioinformático STAMP (Parks et al., 2014) se utilizó con el fin de explorar los datos de predicciones, obtenidos con PICRUSt2, de genes funcionales ortólogos (KOs) de degradación de hidrocarburos de los sedimentos y de genes vinculados con la síntesis de hidrocarburos en los microcosmos. Esta herramienta permite realizar pruebas estadísticas (ANOVA y Kruskal – Wallis) y post- hoc (Tukey – Kramer) para comparar pares y grupos de muestras y generar gráficos de abundancia de las secuencias, así como también de los intervalos de confianza.

3.2.12 Análisis de abundancia diferencial utilizando ANCOM-BC

Para el análisis de abundancias diferenciales tanto de los taxa como de los genes ortólogos (KO) se utilizó la herramienta ANCOM-BC. Esta metodología permite la implementación de test estadísticos en relación a las abundancias absolutas diferenciales de los taxa individuales y provee de intervalos de confianza validos; tiene en cuenta la naturaleza composicional de las secuenciaciones, asume que la muestra observada es una fracción desconocida de una unidad de volumen del ecosistema, y que la fracción de muestreo varía de una muestra a otra por lo que, estima las fracciones de muestreo desconocidas y corrige el sesgo inducido por sus diferencias (Lin y Das Peddada 2020). Se utilizó el paquete *ANCOMBC* v2.0.0 para la interfaz R. El análisis de los taxones diferencialmente abundantes se realizó a nivel de familia. En el caso de los microcosmos se evaluó efecto del tiempo independientemente de las condiciones de aireación. Se utilizó una prevalencia de 0,1 como línea de corte y una significancia de 0.05. Como método de ajuste de los p-valores y de mdFDR se utilizó el método de holm.

Capítulo 4



Estudio de la estructura
de la comunidad
microbiana en los sedimentos
de un curso de agua dulce y
evaluación de la
contribución biológica
a la degradación de
hidrocarburos

4. Estudio de la estructura de la comunidad microbiana en los sedimentos de un curso de agua dulce y evaluación de la contribución biológica a la degradación de hidrocarburos

A partir del muestreo realizado en 2018 se seleccionaron tres sitios del curso de agua dulce, de un total de 12 muestreados, para ser analizados en este trabajo de tesis. Dichos sitios fueron nombrados I, M y E y se escogieron considerando que son representativos de los diferentes sectores de este curso de agua. El sitio I se encuentra en el interior de industria petrolera, aguas abajo orientación nornoreste; el sitio M está aproximadamente en el centro de la región muestreada y, además, sobre este se encuentra una estructura de hierro que atraviesa el curso de agua. El sitio E se sitúa hacia el exterior de la industria y es allí donde se encuentra una descarga permitida. Los muestreos se realizaron como se indica en la sección 3.1.1. Brevemente, se utilizaron tubos de PVC de 2 metros de longitud provistos de un pistón en un extremo (*Pistón corer*). Los muestreadores se operaron manualmente desde una balsa, dejándolos caer al cuerpo de agua por su propio peso, y luego mediante el pistón se fueron introduciendo en el sedimento hasta llegar a sedimentos consolidados. Se extrajeron manualmente, antes de sacarlos completamente del agua fueron tapados con esponja vegetal para evitar que los sedimentos del interior se salgan. En cada sitio se tomaron dos testigos (*cores*) de sedimento separados aproximadamente por 1 m de distancia que se consideraron réplicas. Luego, se transportaron a un laboratorio donde fueron abiertos mediante un corte longitudinal y se tomaron las muestras correspondientes a cada horizonte de sedimento (Figura 4.1 A, B y C). Además, se tomó una muestra de agua de cada sitio, que fueron envasadas en botellas color caramelo de 1 litro.

Se caracterizaron las muestras de agua y sedimento mediante análisis fisicoquímicos. Con el objetivo de estudiar la estructura de la comunidad microbiana autóctona de los sedimentos antropizados y su potencial degradativo, se determinaron actividades biológicas vinculadas con los ciclos de la materia, y se cuantificaron microorganismos cultivables y no cultivables, mediante técnicas clásicas y moleculares. Se secuenció parcialmente el gen 16S rRNA de los extractos de ADN de los sedimentos mediante la tecnología Illumina y con la información obtenida se realizaron estudios de diversidad, análisis taxonómico y predicciones funcionales. El potencial degradador de las comunidades presentes en el sitio fue analizado a través de la predicción de vías metabólicas y de genes funcionales vinculados con la degradación de hidrocarburos y cuantificación de genes y transcriptos de degradación aeróbica y anaeróbica de hidrocarburos.



Figura 4.1: (A) Apertura longitudinal de los testigos en laboratorio. (B) Testigo abierto y descrito, donde se observan las delimitaciones en los horizontes (H) de distinta profundidad y características. (C) Envases para la toma de muestras de los horizontes de sedimento.

4.1 Caracterización fisicoquímica y microbiológica de muestras de agua y sedimento

4.1.1 Caracterización del agua

Los resultados de la caracterización fisicoquímica de las aguas de los tres sitios en estudio se muestran en la Tabla 4.1. Las muestras de agua de los sitios I y M presentaron valores de pH cercanos a la neutralidad siendo el sitio E levemente ácido.

Las concentraciones de oxígeno disuelto en agua promediaron los 2,53 mg/l; en los sitios I y E fueron inferiores a 2 mg/l, valores reportados por otros autores como característicos de cursos de agua hipóxicos (Rabalais et al., 1994).

El contenido de hidrocarburos totales C6-C35, hidrocarburos alifáticos C6-C35, hidrocarburos aromáticos C7-C35, PAH y BTEX se encontró por debajo del límite de detección (ND) (< 30 mg/l; < 3 mg/l; < 3mg/l; < 2 mg/l; < 6 mg/l respectivamente) en las aguas de los tres sitios.

Los recuentos de bacterias heterótrofas aeróbicas mostraron valores elevados comparados con los reportados por otros autores para sitios similares (Pérez et al., 1993; Yussef et al., 2010). El recuento más alto de bacterias heterótrofas aeróbicas se obtuvo para el agua del sitio M ($> 3 \times 10^8$ UFC/ml). Además, en este sitio se detectaron los mayores recuentos de bacterias degradadoras de hidrocarburos alifáticos y de aromáticos (Tabla 4.1).

Parámetros	Agua sitio I	Agua sitio M	Agua sitio E
pH*	7,0	7,1	6,5
Potencial Redox (mV)*	375	271	225
O₂ disuelto (mg/l) *	1,8	4,3	1,5
PAH (mg/kg) *	ND	ND	ND
BTEX (mg/kg) *	ND	ND	ND
Hidrocarburos Totales de C₆-C₃₅ (mg/kg) *	ND	ND	ND
Bacterias Heterótrofas Aerobias (UFC/ml)	2,57x10 ⁶	> 3,00x10 ⁸	3,92x10 ⁵
Bacterias degradadoras de alifáticos (NMP/ml)	3,22x10 ⁴	> 3,22x10 ⁴	3,22x10 ⁴
Bacterias degradadoras de aromáticos (NMP/ml)	4,15x10 ²	2,17x10 ⁴	1,29x10 ²

Tabla 4.1: Parámetros fisicoquímicos y microbiológicos de las muestras de agua. ND: no detectado.

4.1.2 Caracterización de los sedimentos

A lo largo de cada *core* de sedimento (sitio I: I e IR, sitio M: M y MR, sitio E: E y ER), se detectaron 36 horizontes de distinta profundidad (IH0, IH1, IH2, IH3, IH4, IH5, IH6, IRH0, IRH1, IRH2, IRH3, IRH4, IRH5, IRH6, MH0, MH1, MH2, MH3, MH4, MRH0, MRH1, MRH2, MRH3, MRH4, MRH5, MRH6, EH0, EH1, EH2, EH3, EH4, ERH0, ERH1, ERH2, ERH3 y ERH4), y a cada uno de ellos se le realizaron determinaciones fisicoquímicas (Tablas Anexas 3A-F y 4A-F). Las determinaciones fisicoquímicas del sitio I se realizaron mezclando los sedimentos del core I y de su réplica IR debido a que en el muestreo a campo realizado por las investigadoras de INDEAN UBA-CONICET (Laboratorio de Sondeos de Ambientes Continentales y Marinos), se observó que sus horizontes eran iguales en número y características geomórficas, por lo que se analizaron juntos (Tabla anexa TA1). En adelante, los llamaremos cores I para las descripciones fisicoquímicas.

Los valores de pH de todos los horizontes de los cores mostraron un rango entre 6,7 – 8,2 (promedio pH: 7,62), encontrándose el valor mínimo en la muestra MRH2 y el máximo en la MRH6. Los mismos presentaron potenciales redox positivos que promediaron los $(31 \pm 6) \times 10^1$ mV. No se observó una tendencia de este último parámetro a disminuir con el aumento de la profundidad, como es de esperarse en sedimentos acuáticos (Ma et al., 2019).

4.1.2.1 Contenido de hidrocarburos en los sedimentos

En las Figuras 4.2, 4.3 y 4.4 se muestran el contenido de hidrocarburos totales, alifáticos y aromáticos respectivamente, en los horizontes de cada core. Las concentraciones se presentan transformadas a mg/kg de sedimento seco (kg_{ss}), utilizando el porcentaje de humedad de cada una de las muestras, para poder comparar con la normativa ambiental (resolución 263/19 provincia de Buenos Aires).

La Figura 4.2 muestra que, a excepción del core M, los sedimentos superficiales (H0) presentaron menores concentraciones de hidrocarburos totales en comparación con los horizontes de profundidad intermedia (H1, H2, H3). Se observó que éstos últimos también presentaron mayores concentraciones que los horizontes profundos (H4, H5 y H6). Los horizontes con mayores concentraciones de hidrocarburos totales fueron: la mezcla entre IH2 y IRH2 (311683 mg/ kg_{ss}), MH0 (275862 mg/ kg_{ss}) y la mezcla entre IH3 y IRH3 (201373 mg/ kg_{ss}) las cuales se encuentran por encima de los valores guía establecidos por la resolución 263/19, Dragado de puertos y canales de la provincia de Buenos Aires (Capítulo 1, Tabla 1.5). Las muestras con mayor concentración de hidrocarburos alifáticos y aromáticos fueron ERH0, MH0 y la mezcla de IH2 e IRH2 (Figura 4.3 y 4.4).

La Figura 4.5 muestra la sumatoria de BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno y xileno) en cada horizonte. Los valores de la resolución 263/19 están especificados para cada uno de los hidrocarburos que agrupa esta denominación. Las concentraciones de estos compuestos en las muestras de sedimentos estuvieron en su mayoría por debajo de los valores guía. A excepción de los horizontes H1, H2, y H3 de los cores E y ER, donde las concentraciones de benceno superan el valor guía de 1 mg/ kg_{ss} . Dichos horizontes son los que presentan en sumatoria, las mayores concentraciones de BTEX.

Las concentraciones de PAH en todas las muestras estuvieron entre 0,8 - 55 mg/ kg_{ss} (Tabla anexa 3A-F) (Figura 4.6). En cuanto a la normativa referida a los PAH, la resolución 263/19 indica que se debe tomar acción cuando la sumatoria de los PAH supera los 40 mg/kg. El horizonte MH0, los horizontes H2 y H4 del core E y los horizontes H1 y H2 de la mezcla de cores I son las muestras con concentraciones de PAH que superan los niveles establecidos por la normativa.

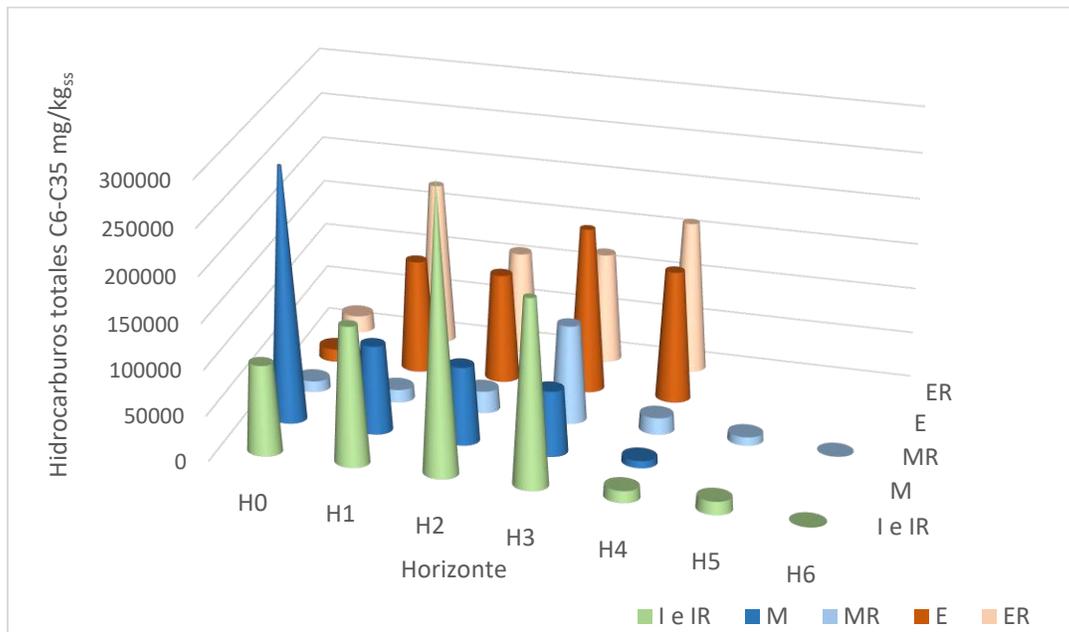


Figura 4.2: Concentración de hidrocarburos totales C6-C35 en mg/kg de sedimento seco (ss).

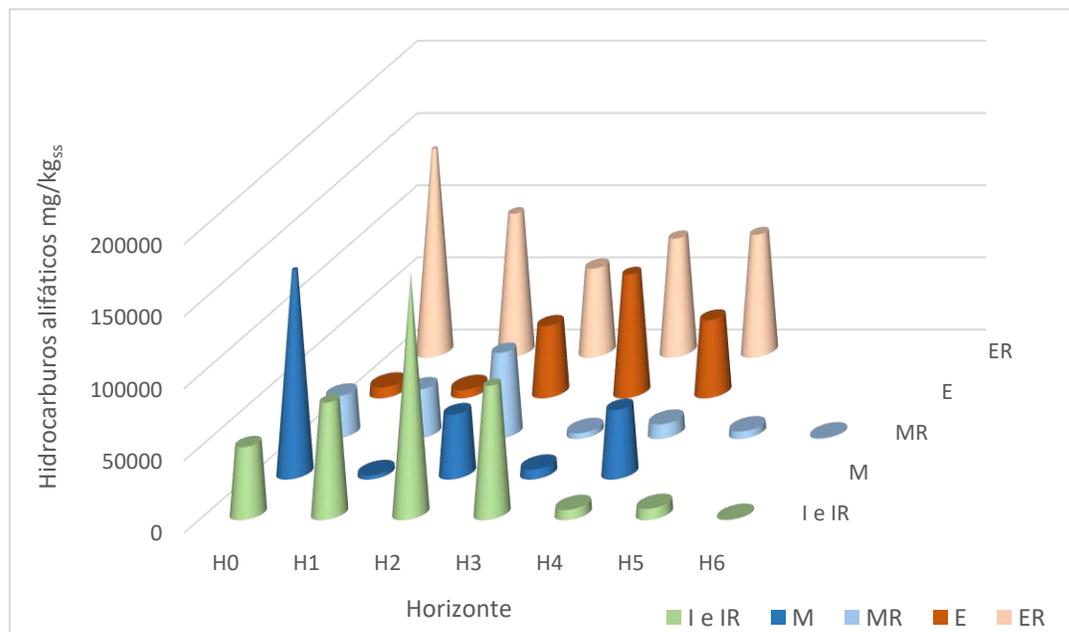


Figura 4.3: Concentración de hidrocarburos alifáticos C6-C35 en mg/kg de sedimento seco (ss).

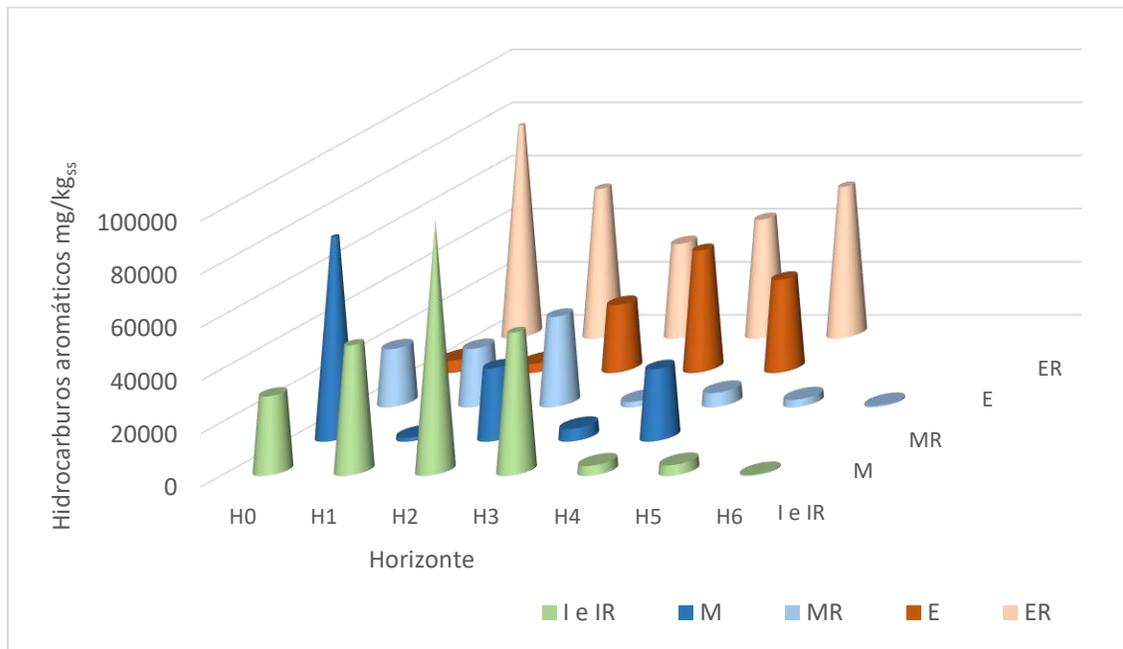


Figura 4.4: Concentración de hidrocarburos aromáticos C7-C35 en mg/kg de sedimento seco (ss).

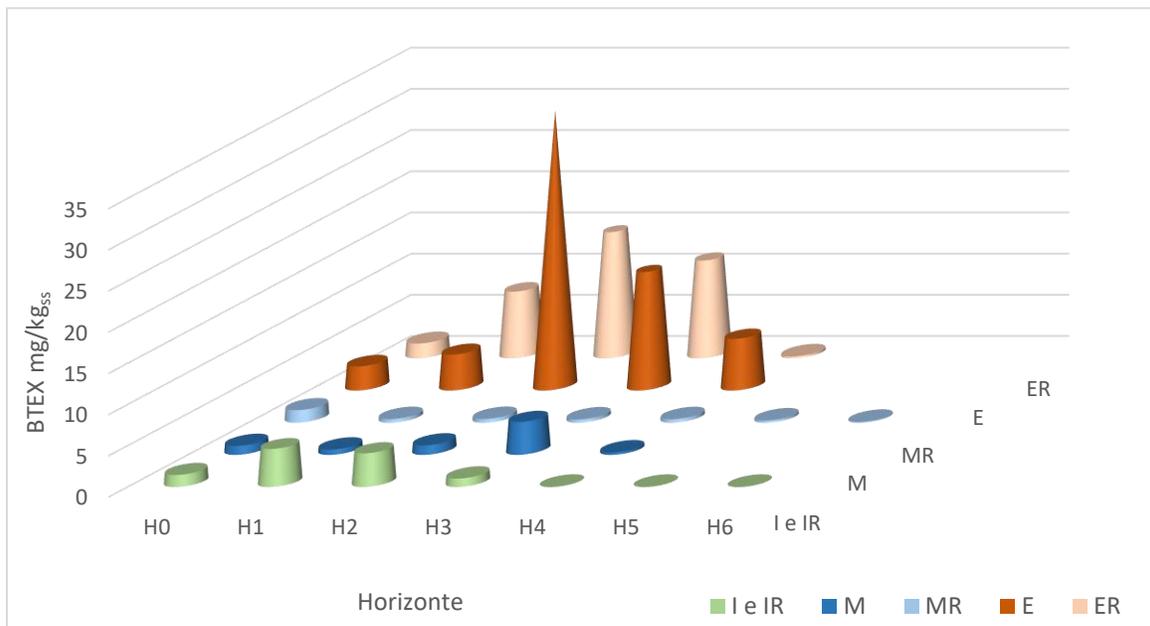


Figura 4.5: Suma de las concentraciones de benceno, tolueno, etilbenceno y xileno (BTEX) en mg/kg de sedimento seco(ss).

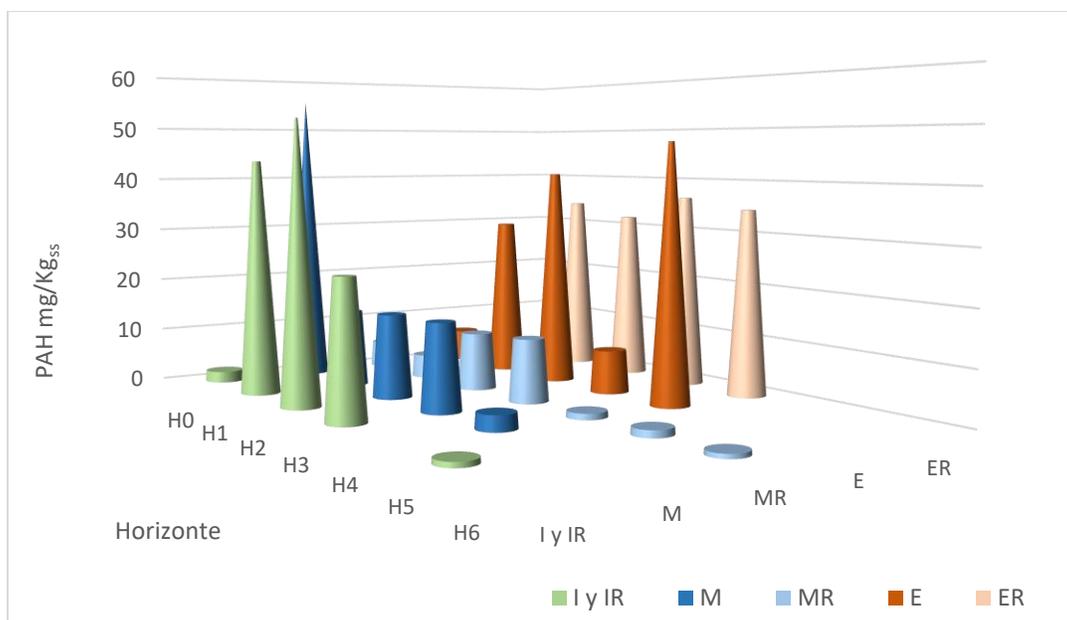


Figura 4.6: Concentración de hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH) en mg/kg de sedimento seco(ss).

4.1.2.2 Contenido de elementos potencialmente tóxicos (EPT) en los sedimentos

Las concentraciones EPT fueron determinadas en todos los horizontes de cada uno de los cores. En las Tablas Anexas 3 A-E se encuentran los valores en base húmeda (mg/kg sedimento húmedo), tal como fueron informados por la empresa que realizó las determinaciones; sin embargo, como se mencionó anteriormente, se transformaron los valores a mg/kg_{ss} para poder comparar con la normativa (datos en base seca en Tablas Anexas 4 A-E). A continuación, se describen solo aquellos elementos que presentaron concentraciones superiores al límite de detección y/o de cuantificación en al menos un horizonte y que además están contemplados en la resolución 263/19 de la provincia de Buenos Aires.

Los valores de zinc en los horizontes de todos los cores fueron inferiores al valor límite establecido por la legislación de la provincia de Buenos Aires (3000 mg/kg_{ss}; regulación 263/19). Se observó que este metal se encuentra en menores proporciones en los cores M y MR ($p < 0.05$).

Algunos de los horizontes no superficiales (IH1, IH2, IH3, EH3, ERH2 y ERH3) presentaron concentraciones de cobre superiores al límite de 400 mg/kg_{ss} establecido por la legislación de la provincia de Buenos Aires. Se hallaron diferencias significativas de concentración de cobre entre los cores M (M y MR) con el core ER ($p < 0.05$).

Las concentraciones de cromo en todos los horizontes analizados fueron inferiores a los valores guía permitidos por la legislación provincial (1000 mg/kg_{ss}) y no se hallaron diferencias significativas entre los cores.

En cuanto al níquel, las muestras IH0 e IH1 (760 y 549 mg/kg_{ss} respectivamente) son las únicas que presentaron concentraciones superiores a los valores de guía admitidos por la ley provincial (400 mg/kg_{ss}). No se hallaron diferencias significativas entre los cores.

Las concentraciones de plomo en todos los horizontes estuvieron por debajo del valor guía (600 mg/kg_{ss}) establecido por la legislación provincial. Los cores M y MR presentaron menores concentraciones que el resto de las muestras (p <0.05).

4.1.2.3 Recuentos de microorganismos cultivables en los sedimentos

Se realizaron recuentos de bacterias heterótrofas aeróbicas, anaeróbicas, degradadoras de hidrocarburos aromáticos, degradadoras de hidrocarburos alifáticos y sulfato reductoras (SRB) realizados en todos los horizontes de los cores estudiados. En las Tablas Anexas 2A-F se presentan los valores de los recuentos obtenidos para cada horizonte en cada uno los cores. En la Figura 4.7 se observa que los recuentos de microorganismos heterótrofos cultivables anaeróbicos fueron mayores que los aeróbicos en la gran mayoría de las muestras estudiadas. Con respecto a los microorganismos cultivables degradadores de hidrocarburos, los degradadores de alifáticos se encontraron levemente incrementados en comparación con los degradadores de policíclicos aromáticos (Figura 4.8). Además, fue posible detectar la presencia de bacterias SRB en todas las muestras (promedio 5,61x10² NMP/g_{ss}). Se observó una tendencia en las muestras de horizontes superficiales, a presentar valores más altos en todos los recuentos de microorganismos testeados que en el resto de los horizontes (Figuras 4.7 y 4.8).

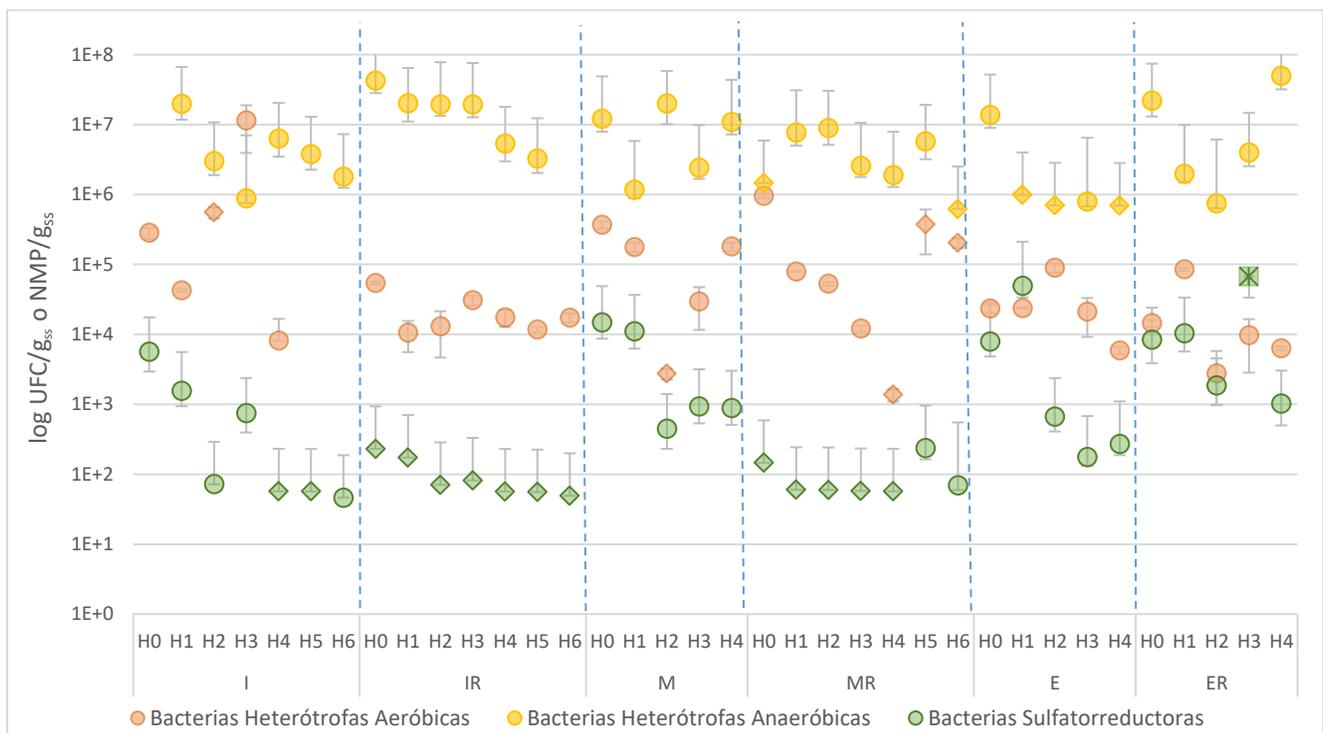


Figura 4.7: Recuento de microorganismos heterótrofos. Bacterias heterótrofas aeróbicas (expresadas como log UFC/g_{ss}, las barras indican desviaciones estándar). Bacterias heterótrofas anaeróbicas y SRB (expresadas como log NMP/g_{ss}, las barras indican el intervalo de confianza del 95%). Marcadores con forma de rombo indican que el recuento se estimó como menor al valor graficado y cuadrados indican que el recuento se estimó como mayor al valor graficado.

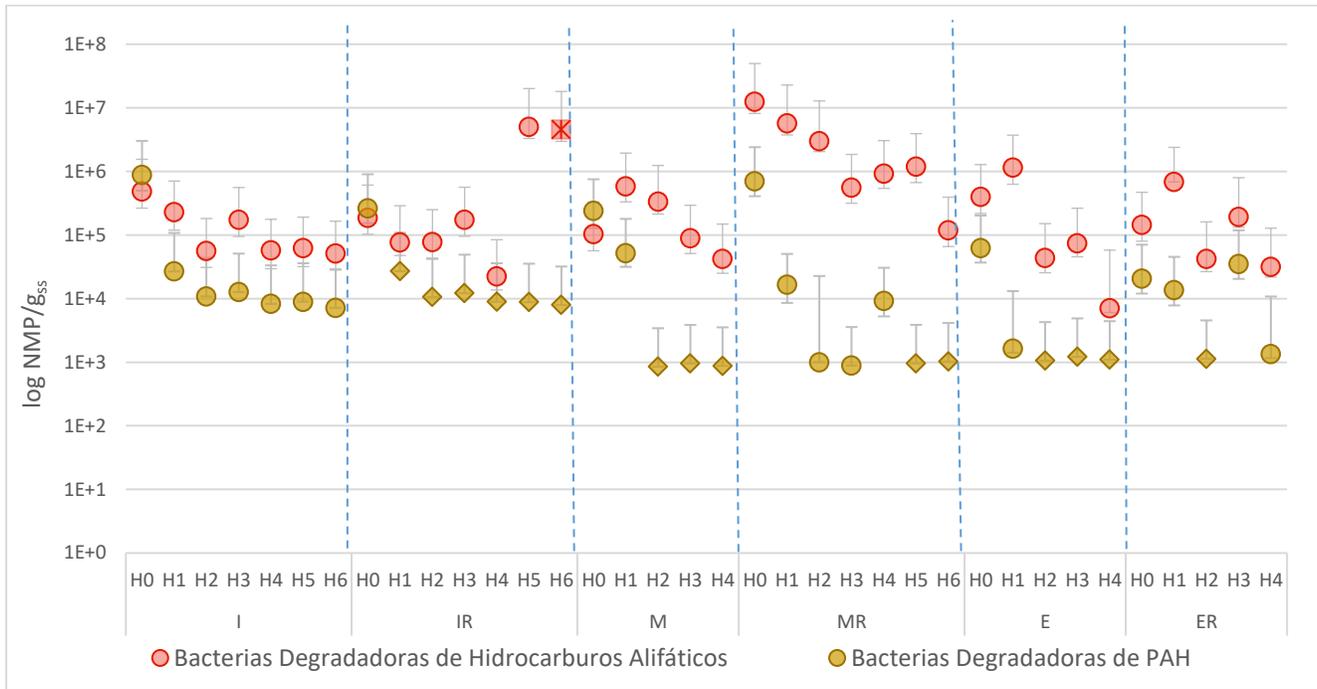


Figura 4.8: Recuentos de Bacterias Degradadoras de Hidrocarburos Alifáticos y de Bacterias Degradadoras de PAH expresados como log NMP/g_{ss}, las barras indican el intervalo de confianza del 95%. Marcadores con forma de rombo indican que el recuento se estimó como menor al valor graficado y marcadores cuadrados indican que el recuento se estimó como mayor al valor graficado.

4.1.2.4 Estudio de la actividad biológica de los sedimentos

Con el fin de estudiar la actividad biológica relacionada con los ciclos biogeoquímicos en los sedimentos se realizaron medidas de actividad enzimática en los *cores* I, MR y E procediendo según se describe en la sección 3.2.3. La actividad deshidrogenasa (Figura 4.9), mostró máximos en los horizontes H0 de los *cores* MR e I, con una tendencia a disminuir con la profundidad del horizonte. El *core* E presentó un comportamiento diferente, donde todos los horizontes exhibieron actividades deshidrogenasa con valores comparables. La actividad lipasa, pudo detectarse en todos los horizontes de los tres *cores* ensayados (Figura 4.10). En concordancia con la actividad deshidrogenasa, la actividad lipasa se encontró incrementada en los horizontes H0 y H1 y se observó una tendencia a disminuir con la profundidad de los horizontes. Las actividades más bajas se cuantificaron en el *core* MR (Figura 4.10). La actividad ureasa, pudo detectarse en todos los horizontes de los *cores* E y MR siendo el horizonte con actividad más alta el EH0 (193 µg de NH₃/g_{ss}). De las muestras del *core* I solo el horizonte H0 y el H6 presentaron actividad ureasa cuantificable (4,14 x10¹ y 1,44 x10¹ µg de NH₃/g_{ss} respectivamente) (Figura 4.11).

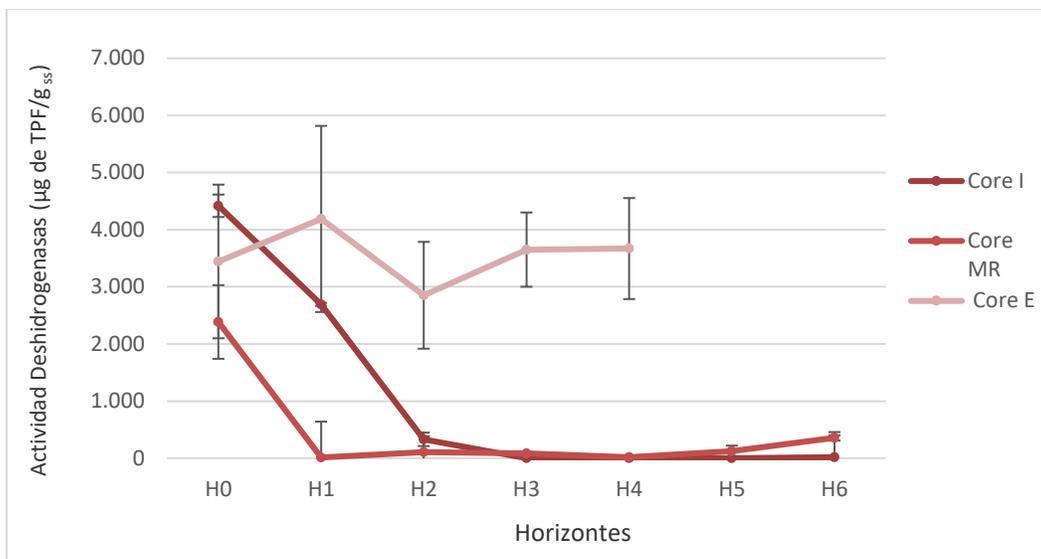


Figura 4.9: Actividad deshidrogenasa en los horizontes de los cores I, MR y E. Expresada en µg de TPF/g_{ss}

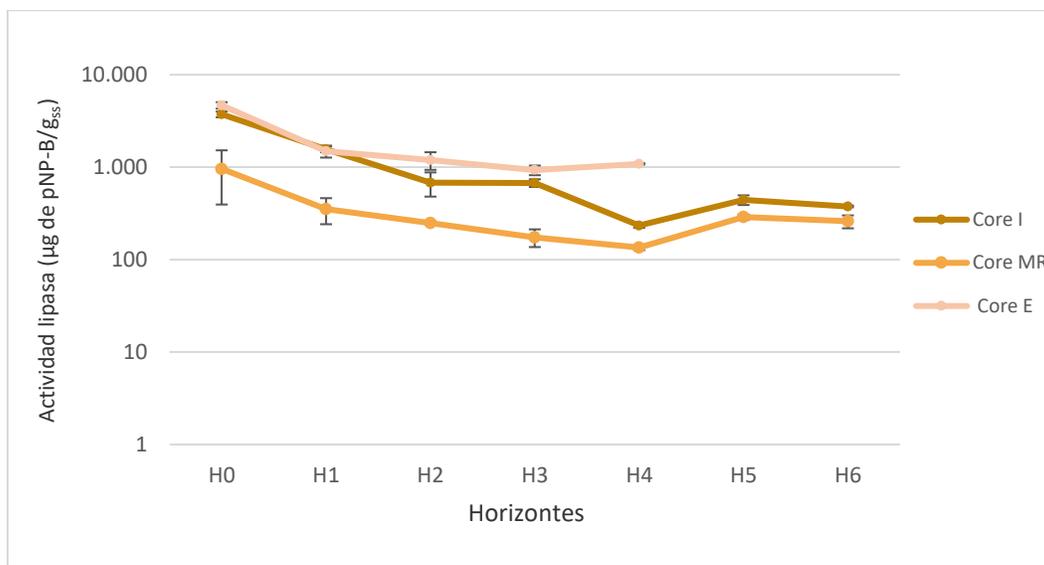


Figura 4.10: Actividad lipasa en los horizontes de los cores I, MR y E. Expresada en µg de pNP-B/g_{ss}

La actividad arilsulfatasa se pudo evidenciar en las muestras MRH6 (175 µg de pPNP/g_{ss}), EH1 (282 µg de pPN-S/g_{ss}) y EH4 (215 µg de pPN-S/g_{ss}) (Figura 4.12). Se detectó actividad fosfatasa ácida y alcalina (Figuras 4.13 y 4.14) en todas las muestras, siendo los valores más altos los de los horizontes superficiales (H0) de todos los cores. El core MR presentó la mayor actividad en sus horizontes H0 y H1.

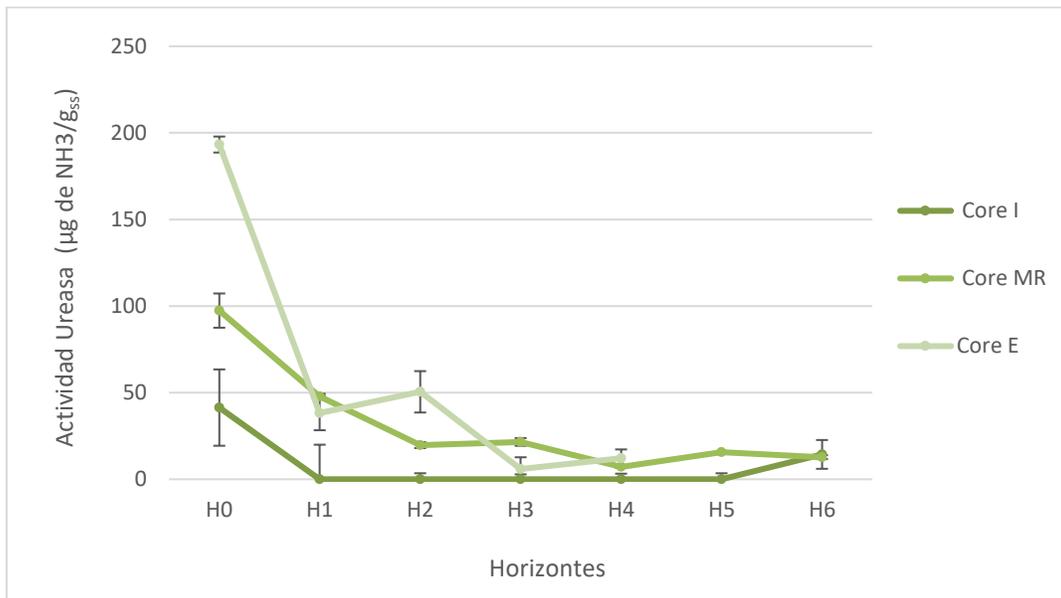


Figura 4.11: Actividad ureasa en los horizontes de los cores I, MR y E. Expresada en µg de NH₃/g_{ss}.

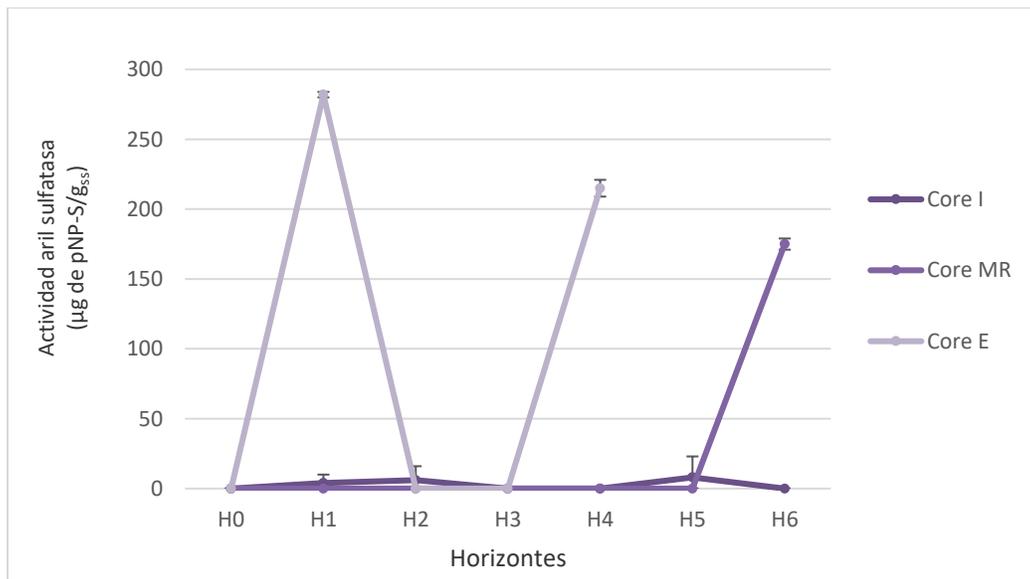


Figura 4.12: Actividad aril sulfatasa en los horizontes de los cores I, MR y E. Expresadas en µg de pNP-S/g_{ss}.

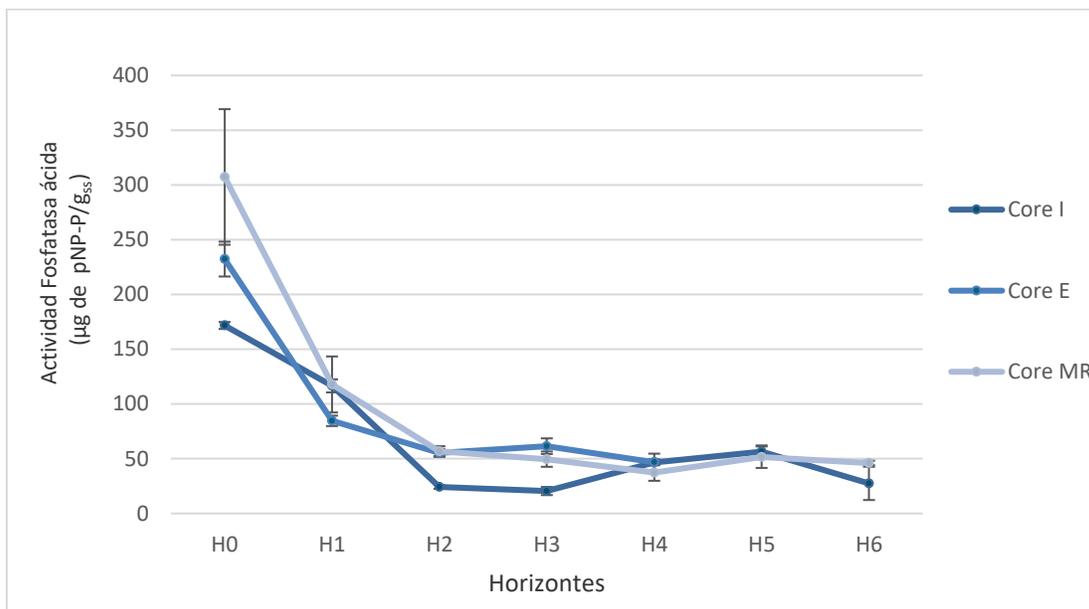


Figura 4.13: Actividad fosfatasa ácida en todos los horizontes de los cores I, MR y E. Expresadas en µg de pNP-P/g_{ss}.

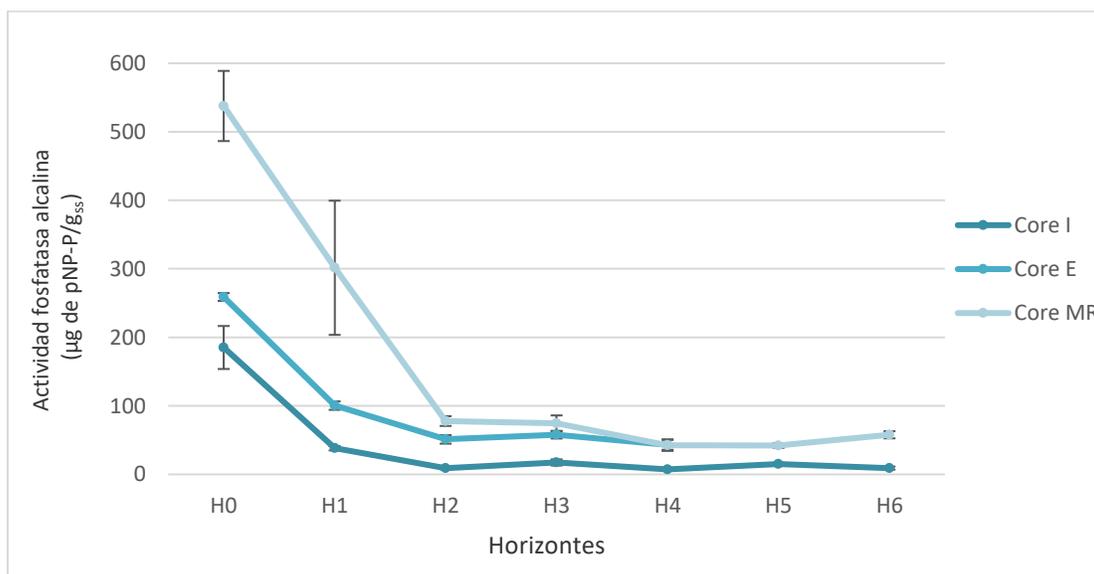


Figura 4.14: Actividad fosfatasa alcalina en todos los horizontes de los cores I, MR y E. Expresadas en µg de pNP-P/g_{ss}.

4.2 Estudio de la estructura y diversidad de las comunidades bacterianas en los sedimentos

Se secuenció la región variable V4 del gen 16S rRNA de las 36 muestras de sedimento correspondientes a los cores I, IR, M, MR, E y ER mediante la plataforma Illumina HiSeq 2000. Por medio de un análisis bioinformático,

se realizó la asignación taxonómica de las secuencias obtenidas, estudios de diversidad de los sedimentos, predicciones funcionales de vías metabólicas y de genes ortólogos (KO) (Secciones 3.2.5 y 3.2.6).

4.2.1 Estudio de α y β diversidad

En la secuenciación de amplicones del gen 16S rRNA de las muestras de sedimento se obtuvieron entre 27822 y 203752 lecturas que se asociaron a un total de 394 ASVs (Amplicon Sequence Variants). Para evaluar la profundidad de la secuenciación se realizaron curvas de rarefacción (Figura 4.15(A)). Éstas evidenciaron que la profundidad fue suficiente debido a que todas las curvas alcanzaron un plateau. Posteriormente, se realizó una rarefacción de las muestras llevándolas a la mínima profundidad de secuenciación (27822 lecturas, que corresponde a la muestra MH4) para poder compararlas en los análisis posteriores (Figura 4.15(B)). Por otro lado, se determinó el índice de Good, que en todos los casos fue superior a 0,99, indicando al igual que las curvas de rarefacción, una buena cobertura de la diversidad de bacterias y arqueas en las muestras de sedimento.

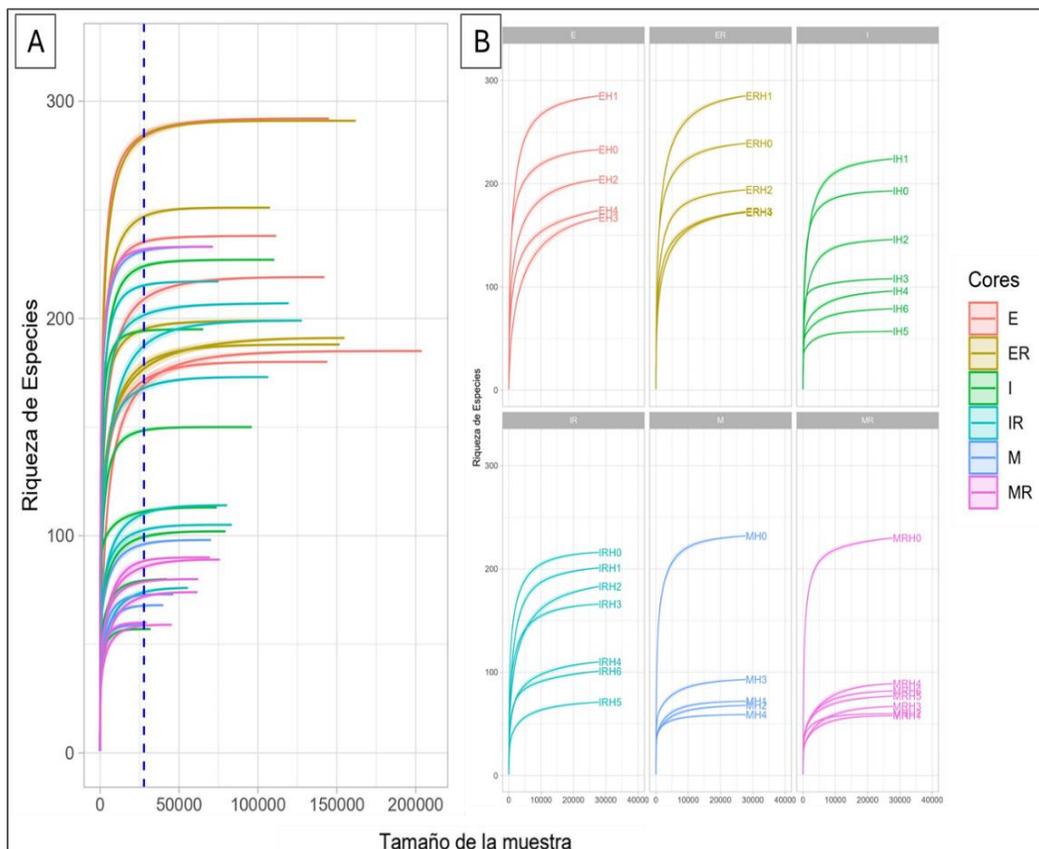


Figura 4.15: (A) Curvas de rarefacción, riqueza de especies versus tamaño de las muestras (número de secuencias obtenidas). La línea azul representa el mínimo valor de secuencias obtenido (27822). (B) Curvas de rarefacción (riqueza de especies versus tamaño de las muestras en número de secuencias), obtenidas luego de normalizar al menor número de secuencias.

Con el objetivo de relacionar las características fisicoquímicas de los sedimentos con los resultados de la secuenciación de amplicones del gen 16S rRNA, se confeccionó una tabla cualitativa de metadata (Tabla anexa TA5) en la que se incluyeron 18 parámetros. Estos parámetros fueron seleccionados de entre todos los determinados a las muestras de sedimento (58 determinaciones) por resultar explicativos (no colineales, con $p < 0,05$, Test de Montecarlo) en un análisis de correspondencia canónico (CCA) que permitió relacionar las variables ambientales con la abundancia de especies, realizado en el marco del proyecto en el que se inscribe esa tesis, y publicado en un informe técnico de carácter confidencial.

Se estudió mediante una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis cuáles de los 18 parámetros fisicoquímicos presentaban diferencias significativas en cuanto a su efecto sobre la uniformidad y la riqueza de las comunidades microbianas de los sedimentos. La uniformidad (equitatividad) estuvo asociada con el porcentaje de humedad y profundidad ($p < 0,05$) (Tabla 4.2), en cambio la riqueza se encontró influenciada por las concentraciones de nitrógeno total (NT), amonio intercambiable (AI), fósforo total (PT), profundidad (PROF), contenido de Li, Pb, Fe, Mn y humedad de las muestras (Tabla 4.2). Notablemente, la concentración de hidrocarburos no fue una variable que definió la estructura de las comunidades microbianas en estos sedimentos (Tabla 4.2).

La β -diversidad se estudió mediante un análisis de coordenadas principales utilizando como medida de disimilitud la distancia Weighted UniFrac (Figura 4.16). Se puede distinguir que las muestras se reúnen en tres grupos, que llamaremos: Grupo 1 (color verde: IH0, IRH0, MH0, MRH0, EH0 y ERH0), Grupo 2 (color anaranjado: IH1, IRH1, IH2, IRH2, IH3, IRH3, EH1, ERH1, EH2, ERH2 y ERH3) y Grupo 3 (color lila: EH3, EH4, ERH4, IH4, IRH4, IH5, IRH5, IH6, IRH6, MH1, MRH1, MH2, MRH2, MH3, MRH3, MH4, MRH4, MRH5 Y MRH6). En el dendrograma de la Figura 4.17 se observa cómo se afilian las muestras en estos grupos. La prueba no paramétrica PAIRWISE-PERMANOVA (999 permutaciones) mostró diferencias significativas entre los grupos (Tabla 4.3).

Se graficaron los tres grupos de muestras (Figura 4.18) en función de las variables fisicoquímicas que mostraron diferencias significativas en la uniformidad y riqueza de las comunidades microbianas (NT, AI, PT, Li, Pb, Fe, Mn y Humedad) (Tabla 4.2). Los horizontes superficiales (H0) agrupados en el Grupo 1 presentaron alto porcentaje de humedad, y en su mayoría altas concentraciones de fósforo total (PT), bajo contenido de amonio intercambiable (AI), Li, Fe y Mn. El Grupo 2 está compuesto por muestras de horizontes medios de los cores I, IR, E y ER. Las muestras de este grupo contienen alto porcentaje de humedad, AI y PT, y bajo contenido de Li, Fe y Mn. Finalmente, el Grupo 3 está conformado por muestras de horizontes medios y profundos de los cores I, IR, M, MR, E y ER. La mayoría de las muestras de este grupo contienen bajo porcentaje de humedad, NT, PT, AI y Pb y, a diferencia de los otros dos grupos, presentan Li, Fe y Mn por encima de los valores promedio.

Parámetros	Diversidad			
	Riqueza		Uniformidad	
	H	p-valor	H	p-valor
HT	1,92	0,166	0,63	0,426
HA	1,35	0,245	0,74	0,390
HAr	0,75	0,386	0,90	0,344
BTEX	2,64	0,104	0,41	0,523
PAH	3,13	0,077	2,13	0,144
pH	1,95	0,163	1,70	0,194
S ⁻²	1,29	0,256	0,06	0,805
SS	3,43	0,180	0,78	0,678
NT	5,18	0,023	0,26	0,611
NiS	0,49	0,484	0,03	0,874
AI	6,25	0,013	0,001	0,975
PT	11,28	0,0008	0,31	0,579
PREDOX	2,53	0,111	3,41	0,065
PROF	9,34	0,002	5,25	0,022
Li	22,39	2,22x10⁻⁶	0,88	0,347
Pb	10,40	0,0012	0,05	0,819
Fe	25,63	4,1x10⁻⁷	2,43	0,119
Mn	19,90	8,2x10⁻⁶	0,11	0,736
Humedad	17,81	2,45x10⁻⁵	4,02	0,045

Tabla 4.2: Resultados de la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis de las variables fisicoquímicas determinadas a los sedimentos (Hidrocarburos totales TH, Hidrocarburos alifáticos AH, Hidrocarburos aromáticos HAr, Benceno-Tolueno-Etilbenceno-Xileno BTEX, pH, Sulfuro S-2, Sulfato soluble SS, Nitrógeno total NT, Nitrito soluble NiS, Amonio Intercambiable AI, Fosforo total PT, Potencial redox PREDOX, Profundidad PROF, Litio Li, Plomo Pb, Hierro Fe, Manganeso Mn y Humedad).

En celeste se indican aquellas con valores significativos sobre la riqueza y la uniformidad de las comunidades.

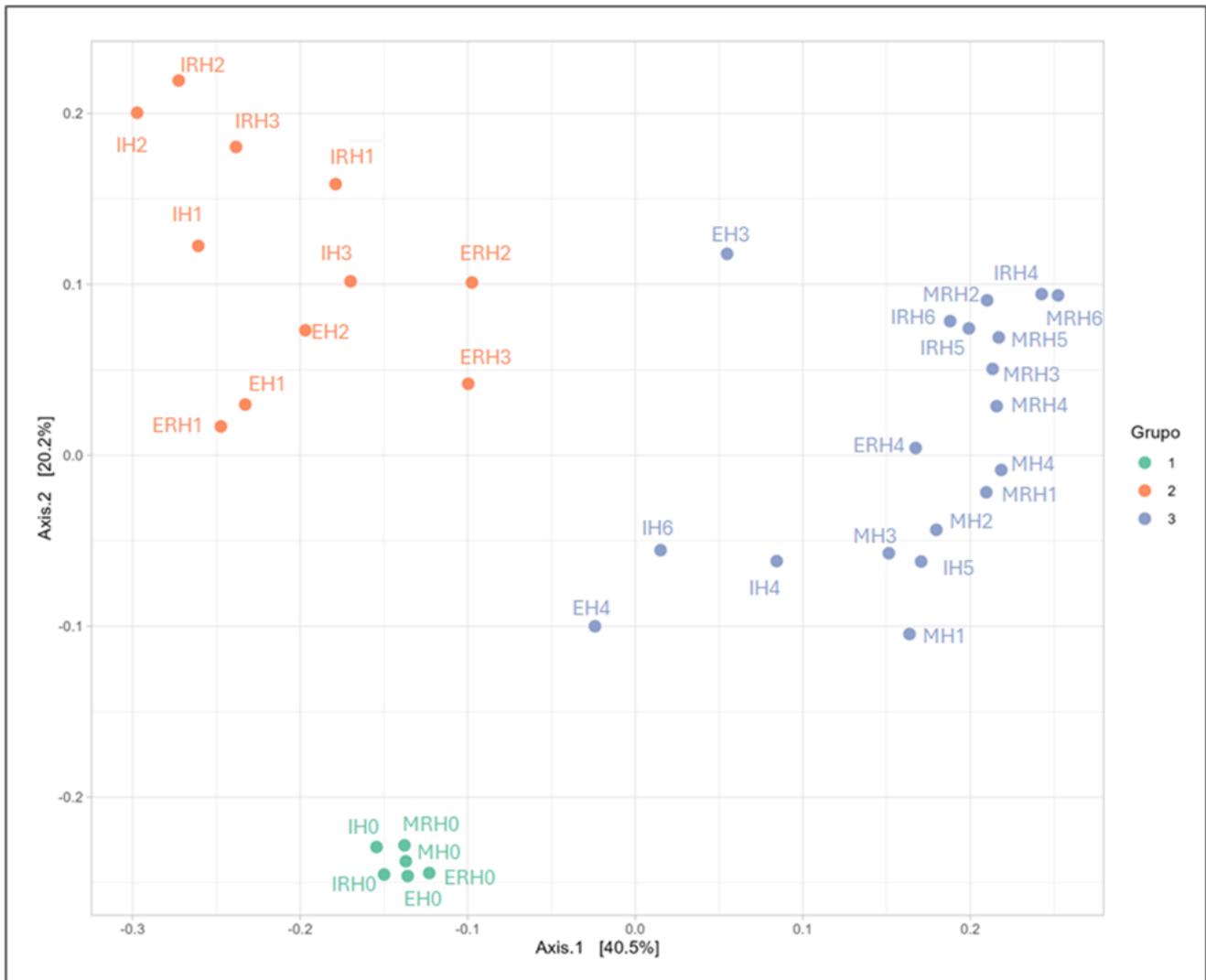


Figura 4.16: Gráfico de coordenadas principales (PCoA) distancia Weighted Unifrac de las muestras de sedimento. Grupo 1 en color verde, Grupo 2 color anaranjado y Grupo 3 color lila.

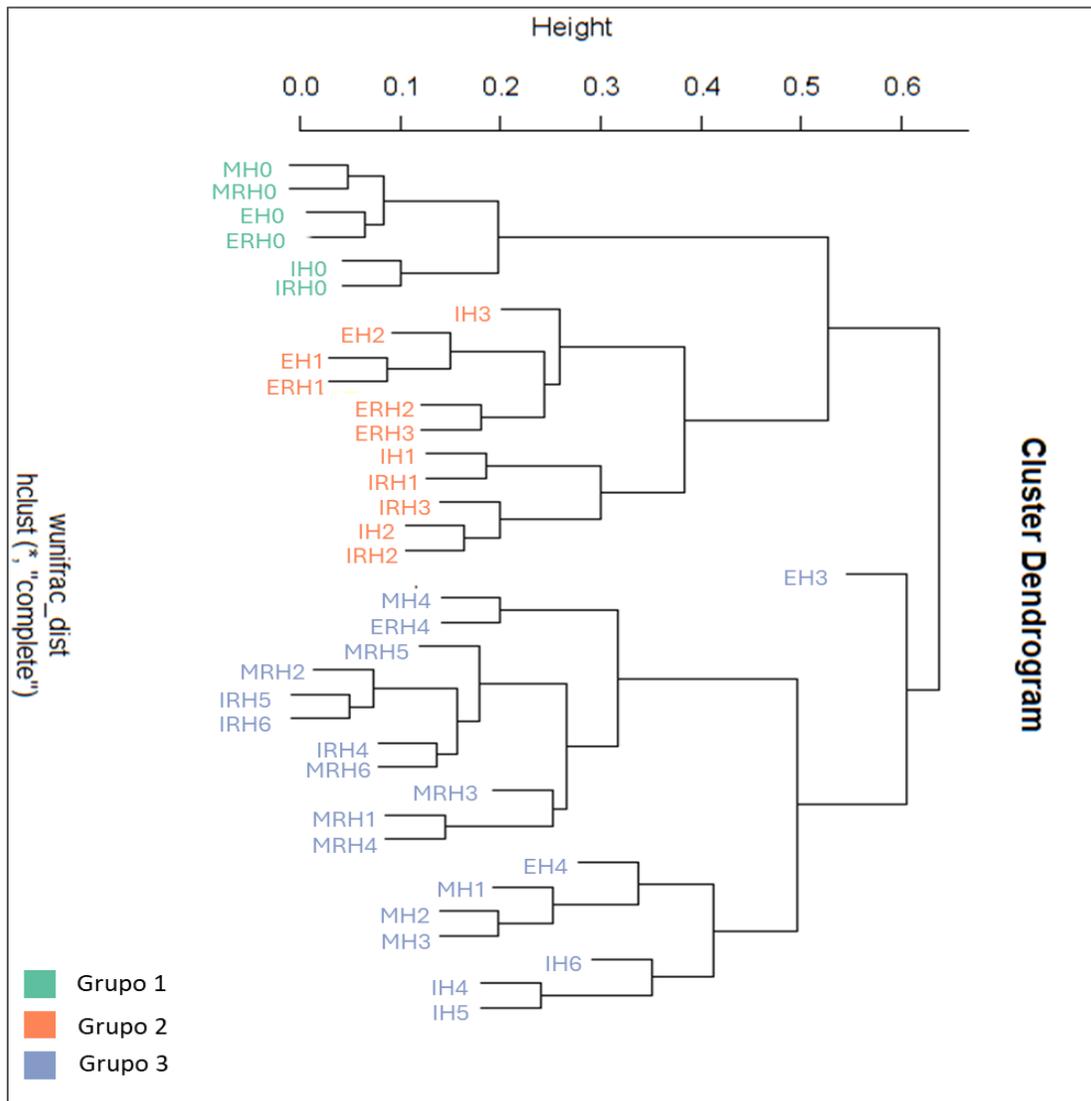


Figura 4.17: Dendrograma de las muestras de sedimentos, distancia Weighted UniFrac. Grupo 1 (G1) en color verde, Grupo 2 (G2) color anaranjado y Grupo 3 (G3) color lila.

Grupos	F	R ²	p valor ajustado
1 vs 2	27,56	0,648	0,001
1 vs 3	25,14	0,522	0,001
2 vs 3	22,73	0,448	0,001

Tabla 4.3: Resultados de la prueba no paramétrica PAIRWISE-PERMANOVA (999 permutaciones), distancia Weighted UniFrac entre los grupos 1, 2 y 3.

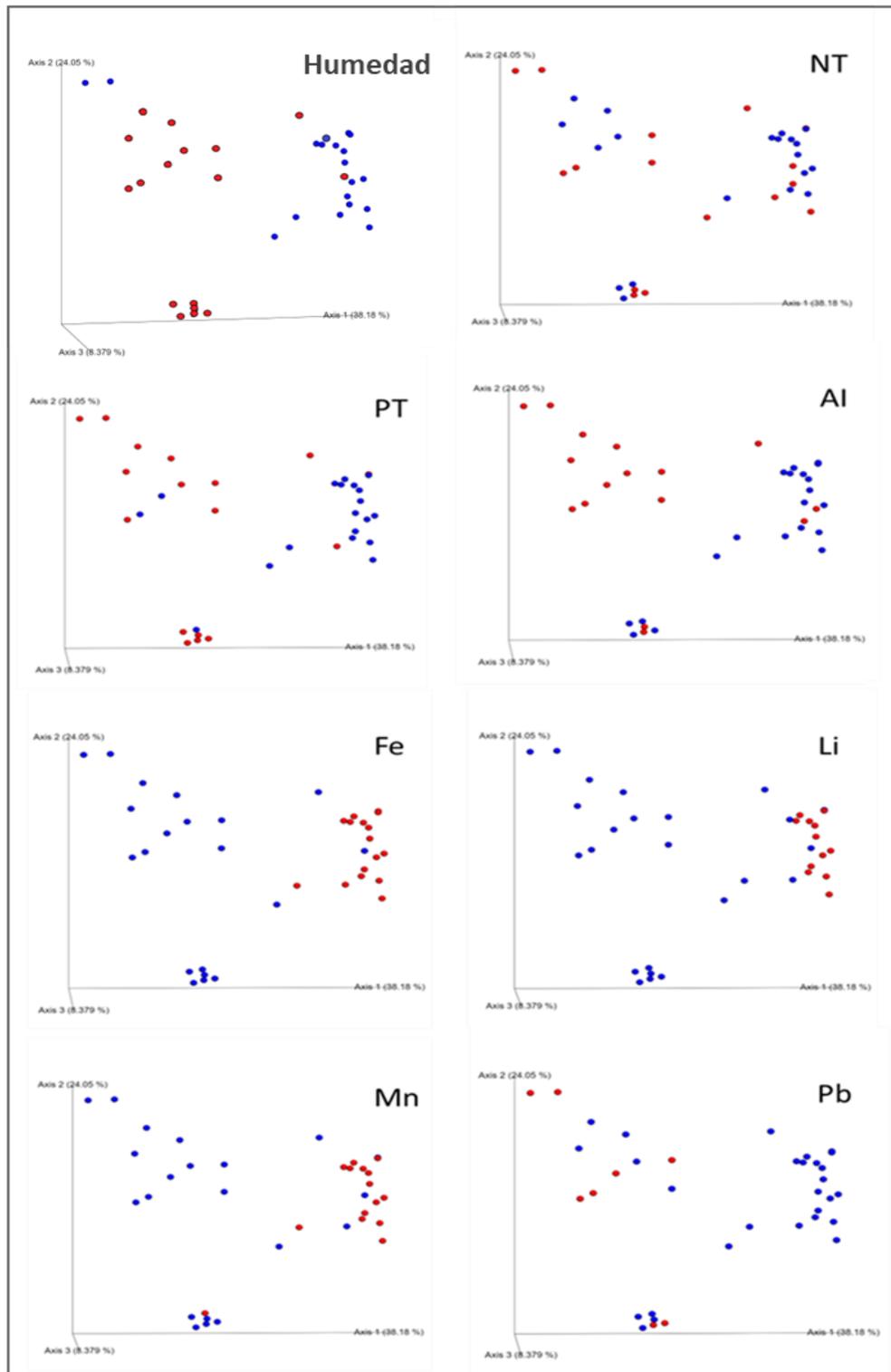


Figura 4.18: Gráfico de coordenadas principales (PCoA) distancia Weighted Unifrac. El color de los puntos indica la concentración del parámetro físicoquímico; rojo (“alto”, por encima del valor promedio) y azul (“bajo”, por debajo del valor promedio). Se muestran solo los parámetros con diferencias significativas en la uniformidad y/o riqueza de las comunidades microbianas: Humedad, Nitrógeno Total (NT), Fósforo Total (PT), Amonio Intercambiable (AI), Hierro (Fe), Litio (Li), Manganeseo (Mn) y Plomo (Pb).

Con las muestras agrupadas como se describió anteriormente se estudiaron los índices de α -diversidad. La riqueza de ASVs se estimó mediante el índice de Chao1 y la diversidad mediante los índices de Shannon y Simpson. Los grupos 1 y 2 presentaron mayor riqueza y diversidad que el Grupo 3, determinadas por los índices de Chao1 y Shannon (Figura 4.19). Los valores de índices de Simpson fueron significativamente diferentes en los tres grupos, el Grupo 1 presentó la mayor diversidad, el Grupo 2 una diversidad intermedia, y el Grupo 3 la menor diversidad.

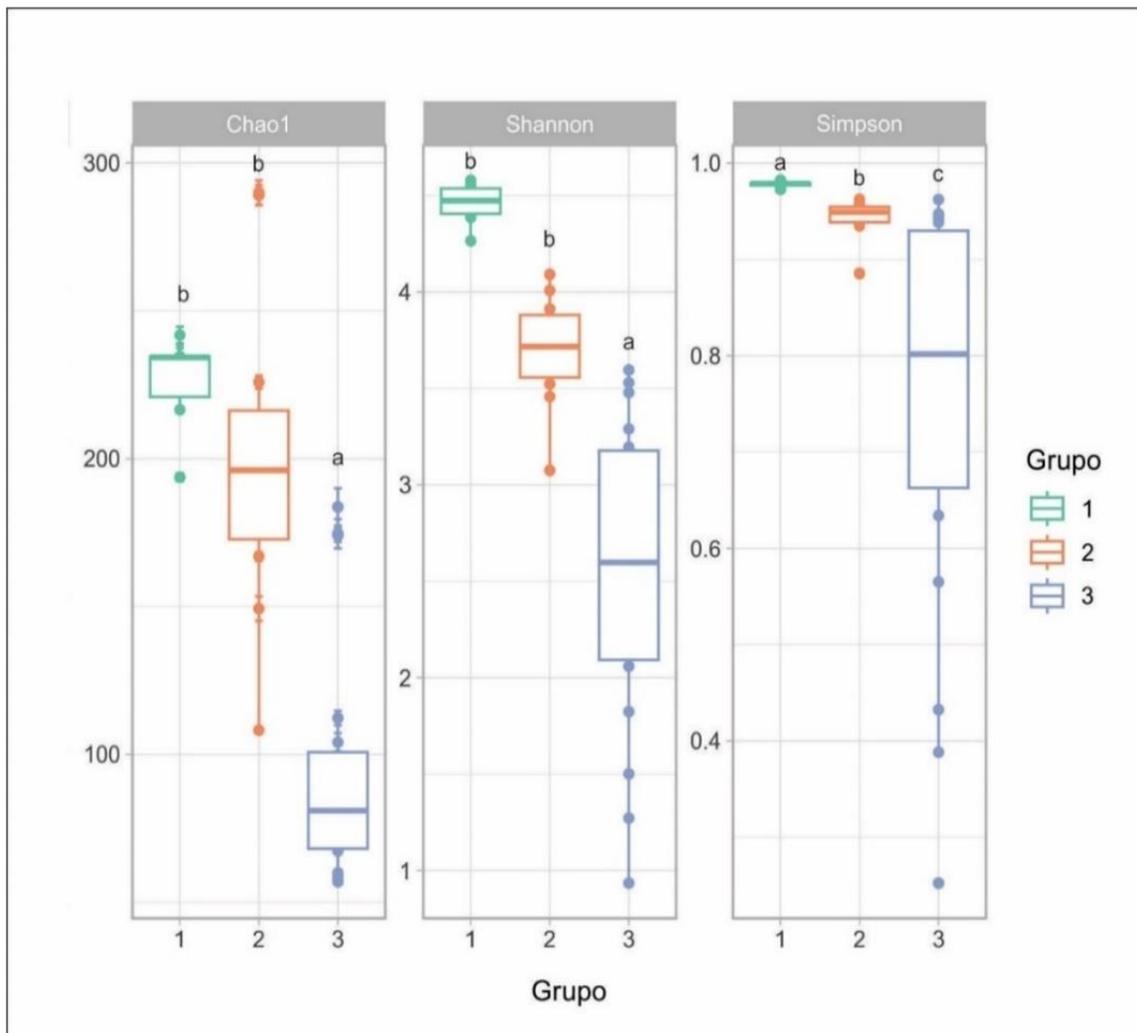


Figura 4.19: Índices de alfa diversidad en los grupos 1, 2 y 3. Letras distintas señalan diferencias significativas entre grupos ($p < 0,05$, Kruskal-Wallis).

4.2.2 Asignación taxonómica

Se determinó mediante análisis taxonómicos la abundancia relativa de los 10 filos microbianos predominantes en los sedimentos del curso de agua. En la Figura 4.20 se observan que los mismos fueron Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria, Chloroflexi, Acidobacteria, Caldiserica, Bacteroidetes, Acetothermia, Euryarchaeota y Atribacteria. La Figura 4.21 muestra la abundancia relativa de las 25 familias predominantes dentro de cada uno de los grupos de sedimentos.

En el Grupo 1 predominaron los filos Chloroflexi, representado principalmente por la familia *Anaerolineaceae* (28%) y Proteobacteria, con mayor abundancia de las familias *Burkholderiaceae* (5%) y *Syntrophaceae* (5%). En el Grupo 2 Chloroflexi fue también uno de los filos predominantes, siendo *Anaerolineaceae* (7%) la familia más abundante. Caldiserica, Acidobacteria y Actinobacteria fueron los siguientes filos predominantes en este grupo, con mayor proporción de la familia *Caldiseriaceae* (12%), y de familias no clasificadas del orden Aminicenantales (13%) y de uncultured *Actinomycetes* (8%) respectivamente. Finalmente, en el Grupo 3 los filos mayoritarios fueron Firmicutes conformado principalmente por la familia *Bacillaceae* (32%), y Proteobacteria con las familias *Burkholderiaceae* (6%) y *Pseudomonadaceae* (6%) como más abundantes, y Actinobacteria compuesta mayoritariamente por las familias *Corynebacteriaceae* (3%) y *Micrococcaceae* (9%).

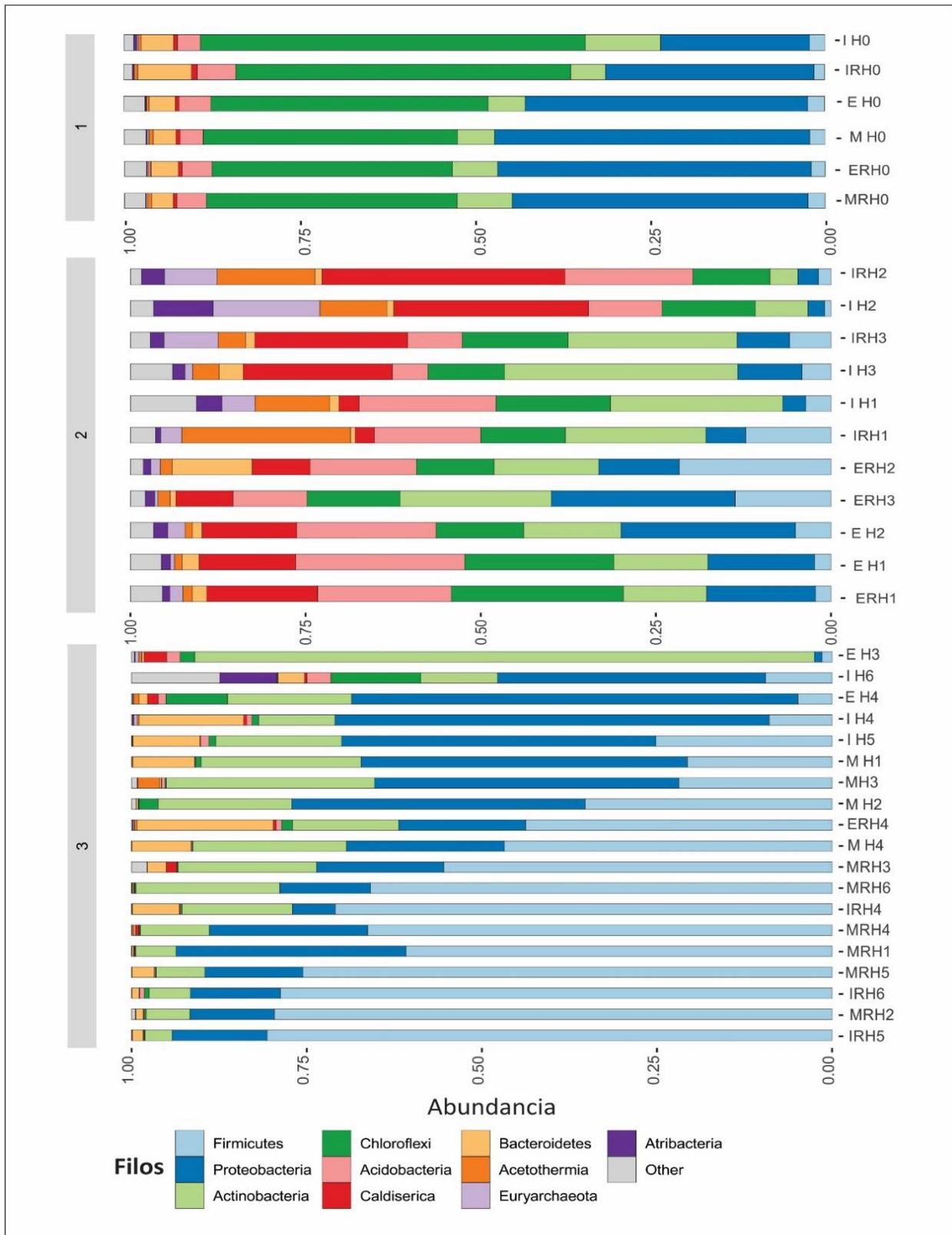


Figura 4.20: Abundancia relativa de los diez filios predominantes en cada una de las muestras que conforman los grupos 1, 2 y 3. En gris claro se agrupan los otros filios menos abundantes "Otras".

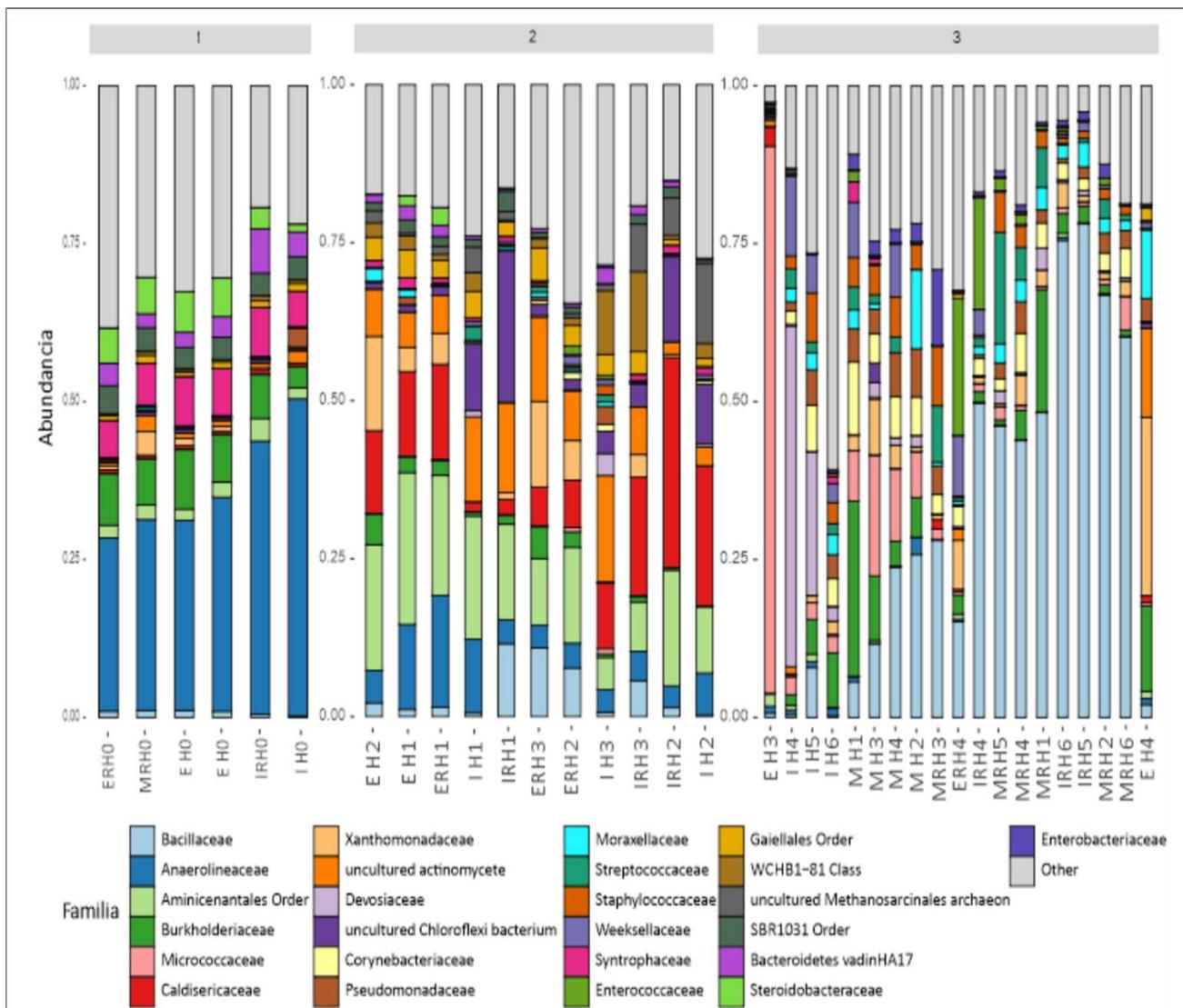


Figura 4.21: Abundancia relativa de las 25 familias predominantes en cada una de las muestras que conforman los Grupos 1, 2 y 3. En gris claro se agrupan como “others” el resto de las familias.

Se realizó un análisis de la abundancia diferencial de las comunidades en los grupos de sedimentos a nivel de familia utilizando ANCOM-BC (Analysis of Compositions of Microbiomes with Bias Correction). Los resultados se encuentran representados con el heatmap y el dendrograma (Clústers A, B y C) de la Figura 4.22 y están expresados como el logaritmo de la variación doble (“*fold change*”) en comparaciones de a pares entre los Grupos 1, 2 y 3. Aquellas familias con diferencias significativas entre alguno de los grupos se muestran en distintas gamas de colores; en color anaranjado-rojizo familias significativamente más abundantes, en la gama de los azules-violeta aquellas significativamente menos abundantes y en gris familias sin diferencias significativas en su abundancia en los diferentes grupos.

En el clúster A, las familias *Nocardiaceae*, *Corynebacteriaceae*, *Enterobacteraceae*, *Micrococcaceae*, *Pseudomonadaceae* y *Staphylococcaceae* fueron significativamente más abundantes en el Grupo 3 que en los Grupos 1 y 2; mientras que *Streptococcaceae* y *Bacillaceae* fueron más abundantes en el Grupo 3 que en el Grupo 1. Dentro del clúster B, el primer subclúster lo conformaron las familias: *uncultured bacterium_6*, (perteneciente a la clase Anaerolinea), *Patescibacteria*, *TTA-B15*, *Caldiseriaceae*, *TTA-B1*, *uncultured candidate división JS1 bacterium*, familias no cultivables de la clase *Dehalococcoidia* y *uncultured Methanosarcinales archaeon* se encontraron diferencialmente más abundantes en las muestras del Grupo 2 que en las de los grupos 1 y 3. El segundo subclúster lo formaron familias que se encontraron disminuidas en el Grupo 3 con respecto al Grupo 2; estas fueron *uncultured Chloroflexi bacterium*, *uncultured bacterium_7*, una familia no asignada del orden Aminicenantales, *anaerobic bacterium MO-CFX2*, la familia *WCHB1-81*, *Spirochaetaceae* y *uncultured actinomycete* (clase: *RBG-16-55-12*). Además, en el tercer subclúster se puede observar que en las muestras del Grupo 3 las familias no cultivables; *uncultured bacterium_1* (perteneciente al filo TA06), *uncultured* (Orden: Gaiellales), *uncultured bacterium_13* (Orden: WCHB181), las familias *Anaerolineaceae*, *Bacteriodetes vadinHA17* y la familia no clasificada del Orden SBR1031 fueron significativamente menos abundantes que en los Grupos 1 y 2. En el clúster C, se observa que la familia *Syntrophaceae* fue diferencialmente más abundante en el Grupo 1 que en el Grupo 3 y que las familias: *Phycisphaeraceae*, *Beijerinckaceae*, *Parvularculaceae*, *Chloroflexi bacterium OLB14*, *Rhodanobacteraceae*, *metagenome* (Orden: Aminicenantales), *uncultured 1* (Orden Actinomarinales), *Syntrophorhabdaceae*, *Acidithiobacillaceae*, *BSV26*, *Hydrogenophilaceae*, *Acetobacteraceae*, *SC-I-84*, *Steroideobacteraceae* y *metagenome_1* (orden: SBR10319) fueron significativamente más abundantes en el Grupo 1 que en los grupos 2 y 3.

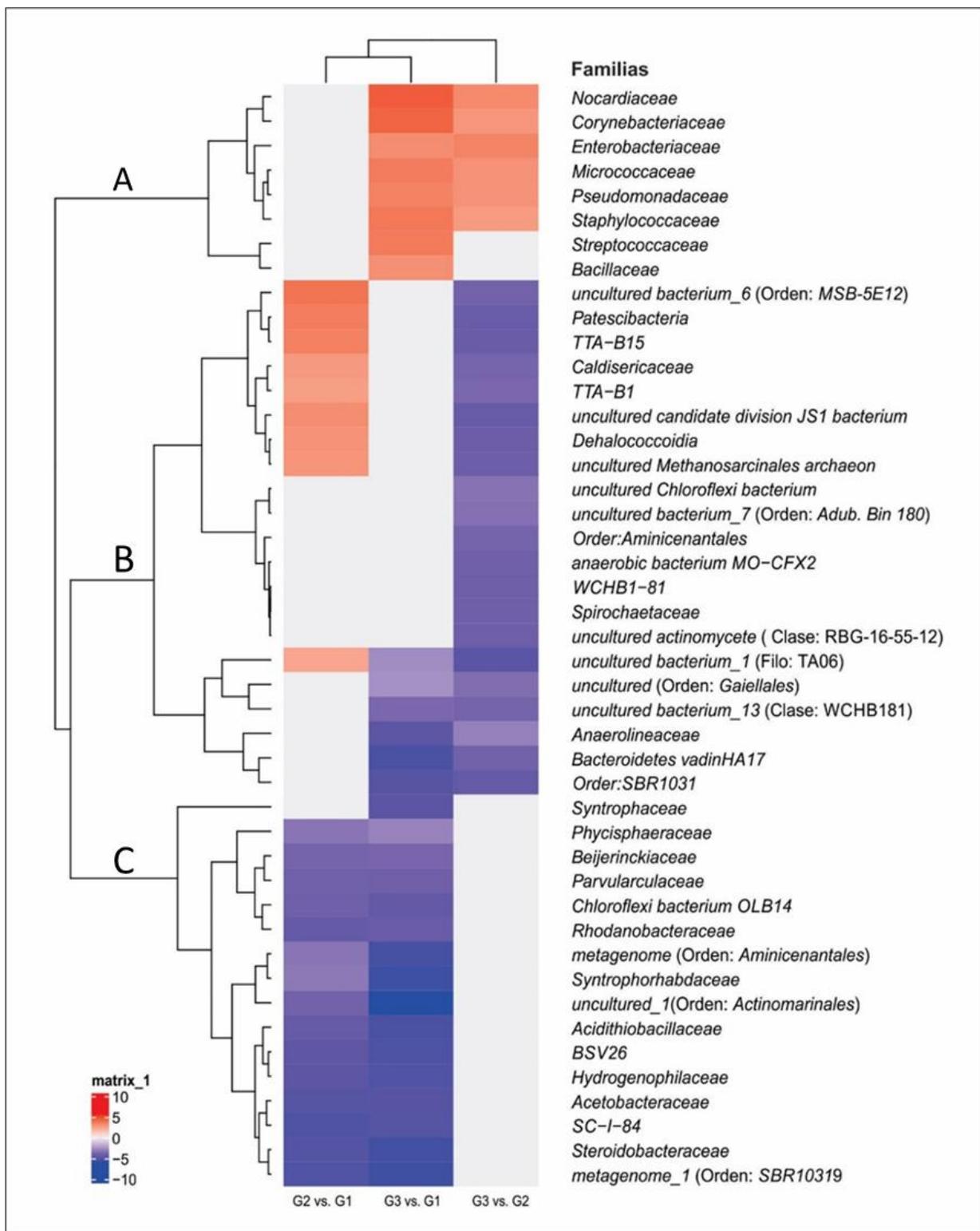


Figura 4.22: Análisis de la abundancia diferencial de las comunidades a nivel de familia de los grupos 1, 2 y 3 calculadas con ANCOM-BC ($p < 0.05$, método de ajuste holm, comparaciones múltiples con test direccional con control mdFDR por método de holm). La intensidad del color refleja la magnitud del logaritmo del *fold change* (lfc). Cada columna indica el par de grupos comparado, donde en segundo lugar se indica la condición de referencia para la comparación.

4.3 Predicción funcional *in silico*

4.3.1 Estudio de las rutas metabólicas diferenciales entre los grupos 1, 2 y 3

Se realizó el estudio del potencial funcional de las comunidades bacterianas de los tres grupos de sedimentos mediante el análisis de los datos de la secuenciación de amplicones de 16S rRNA utilizando el software PICRUSt2, para obtener predicciones de las rutas metabólicas, según clasificación MetaCyc, y de genes ortólogos (KOs), basada en la clasificación de KEGG. La precisión de las predicciones fue determinada mediante el cálculo de los valores de NSTI para cada uno de los 36 sedimentos estudiados (Tabla anexa TA6). En este trabajo la mayoría de las muestras exhibieron valores de NSTI menores a 0,17 sin embargo, las muestras IH1, IH2, IH3, IRH0, IRH2, IRH3 y MH0 presentaron valores superiores a los típicos de suelo (NSTIs entre 0,17-0,27). Dado que valores altos de NSTI son indicadores de una disminución en la precisión de las predicciones con PICRUSt2, la interpretación de estos resultados debe realizarse con cautela.

Se predijeron un total de 401 vías metabólicas para las 36 muestras de sedimentos estudiadas a las que se les realizó una análisis de abundancia diferencial (Sección 3.2.7.2). La Figura 4.23 muestra el valor de $\log_{10}(\text{LDA})$ de las vías metabólicas que mejor explican la diferencia entre cada uno de los grupos (Grupo 1, 2 y 3).

Las vías distintivas predichas en el Grupo 1 agrupadas como rutas de Metabolismo de degradación/asimilación (azul) fueron la Vía reductora de acetyl CoA, TCA ciclo reductivo I, Degradación de glucógeno I, Degradación de creatinina II, Degradación de glutaril CoA, Desnitrificación y la Super vía de oxidación de compuestos de C1 a CO₂. Entre las vías de procesamiento de ácidos nucleicos (violeta) que distinguieron a este grupo se encontraron la Biosíntesis de queosina y Procesamiento de tRNA y en cuanto a las vías del metabolismo energético (verde) la Glicólisis, Glicólisis II, Degradación de nucleobases de purina, Degradación de L-glutamato V, Fermentación homoláctica y Fermentación de L-lisina a acetato y butanoato fueron diferenciales en el Grupo 1. Por último las vías de biosíntesis (rojo) como la Super vía de biosíntesis de ubiquitinol 8, Biosíntesis de L-glutamato y L-glutamina, Biosíntesis de GDP glicero-alfa-D-mano -heptosa, y de CMP-legionaminato, Super vía de biosíntesis de bacterioclorofila II, Biosíntesis I y III de 3,8 di vinil clorofil a (aeróbica) y Biosíntesis II de 3,8 di vinil clorofil a (anaeróbica) estuvieron también incrementadas en este grupo.

En el Grupo 2 las vías predichas como distintivas clasificadas como de degradación/asimilación (azul) fueron el Ciclo reductivo de los TCA incompleto, Degradación de nucleótidos y nucleósidos y la Super vía de degradación de sulfolactato. Se observó en este grupo un predominio de vías de biosíntesis (rojo), la mayoría de ellas relacionadas con la síntesis de nucleótidos, de ribonucleótidos, de cofactores y de metabolitos secundarios entre las que se encontraron la Síntesis de novo de desoxirribonucleótidos de pirimidina III, Biosíntesis I y II de ribonucleótidos 5 aminoinmidazol, Biosíntesis I y II de fosfatidilglicerol, Super vía de biosíntesis de novo de nucleótidos de purina I y II, Biosíntesis de tetrahidrometanopterina, factor 420 y coenzima B, entre otras. Se halló

en el Grupo 2, dentro de la categoría Procesamiento de ácidos nucleicos (violeta), la biosíntesis de 7- (3-amino-3-carboxipropil) wyosina, y dentro del conjunto de vías del metabolismo energético (verde) la ruta significativa fue la Glicólisis V (*Pyrococcus*).

El Grupo 3 se caracterizó por tener incrementadas las vías del metabolismo energético (verde) como el Ciclo TCA VII (productores de acetato), Ciclo TCA VIII (*Helicobacter*), Super vía del glioxilato bypass y TCA, Ciclo del glioxilato, Oxidación de formaldehído I, Super vía de glucólisis, piruvato deshidrogenasa, TCA y glioxilato bypass, Fermentación de hexitol a lactato, formiato, etanol y acetato. En relación con las rutas metabólicas clasificadas como de biosíntesis (rojo) se pudieron observar diferencialmente en este grupo la Maduración de peptidoglucano, Biosíntesis de L-lisina, Ciclo S adenosil-L-metionina, Biosíntesis IV y V de peptidoglucano, Super vía de biosíntesis de tetrahidrofolato, de (Kdo) 2 lípido A, Biosíntesis de ácido teicoico y Biosíntesis de ectoína, Biosíntesis I y II y Super vía de Biosíntesis de L-metionina, Biosíntesis de metil-cetonas, Degradación de glicerol a butanodiol y Super vía de Biosíntesis de 2,3 butanodiol, entre otras. Diferenciaron a este grupo también, varias vías del metabolismo de degradación/asimilación (azul) entre las que cabe mencionar la Degradación V de 4-aminobutanoato, Degradación de aminas biogénicas aromáticas, reciclado de anhidromuropéptidos, Nitrato reducción y el Ciclo de la urea, y otras vías relacionadas con la degradación de compuestos como ornitina, aminas, aminoácidos, lactosa, galactosa, sacarosa, glicol, inositol, oxidación de octano y oxidación de metanol a dióxido de carbono. Además, el Grupo 3 fue el único donde aparecieron como diferenciales vías de degradación de compuestos aromáticos (azul*), entre las que se encontraron la Degradación II de tolueno (aeróbica), Degradación III de tolueno (aeróbica vía o-cresol), Degradación I de catecol (vía meta clivaje), Degradación II de catecol (vía meta clivaje) y III (vía orto-clivaje), Degradación II de catecol a 2-oxopent-4-enoato, Degradación I de 2-nitrobenzoato, Degradación I de fenilacetato (aeróbica), Degradación de catecol a β -ceto adipato, Degradación de 4-hidroxifenilacetato, degradación III de tolueno (aeróbica vía p-cresol), Degradación de compuestos aromáticos vía β -ceto adipato, Degradación de 4- metil-catecol (orto clivaje), Ruta meta clivaje de compuestos aromáticos, Super vía de degradación de salicilato, Degradación IV de tolueno (aeróbica vía catecol) y Super vía de degradación aeróbica de tolueno.

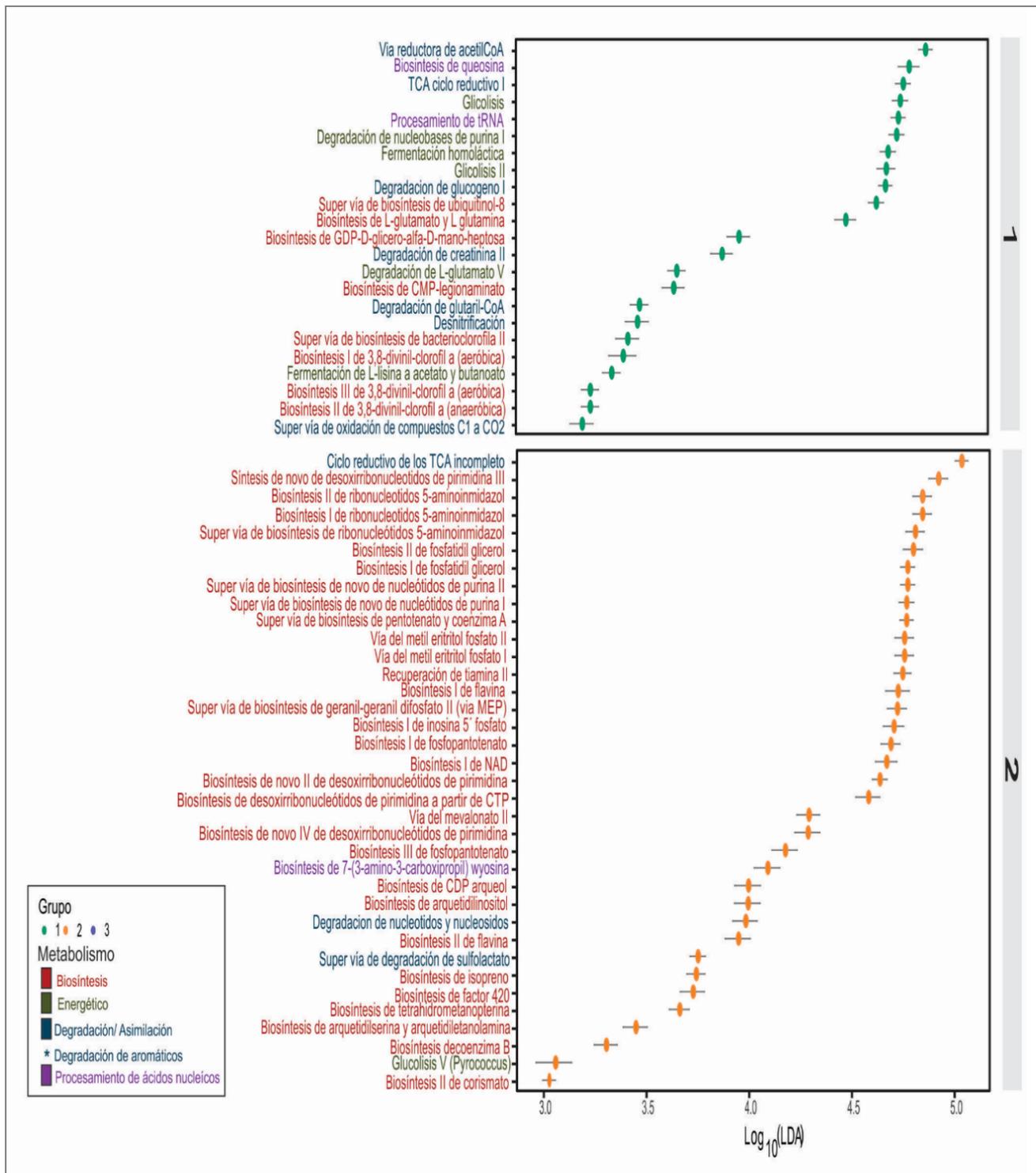


Figura 4.23: Análisis diferencial de la abundancia relativa de las vías metabólicas en los sedimentos predichas con PICRUST2. En cada rectángulo se muestran las vías significativamente más abundantes en cada grupo; expresadas como log₁₀ (LDA) (*Linear Discriminant Analysis*). Valores mayores del Log₁₀ (LDA) indican mayor abundancia de la vía metabólica. Continúa en la página siguiente.

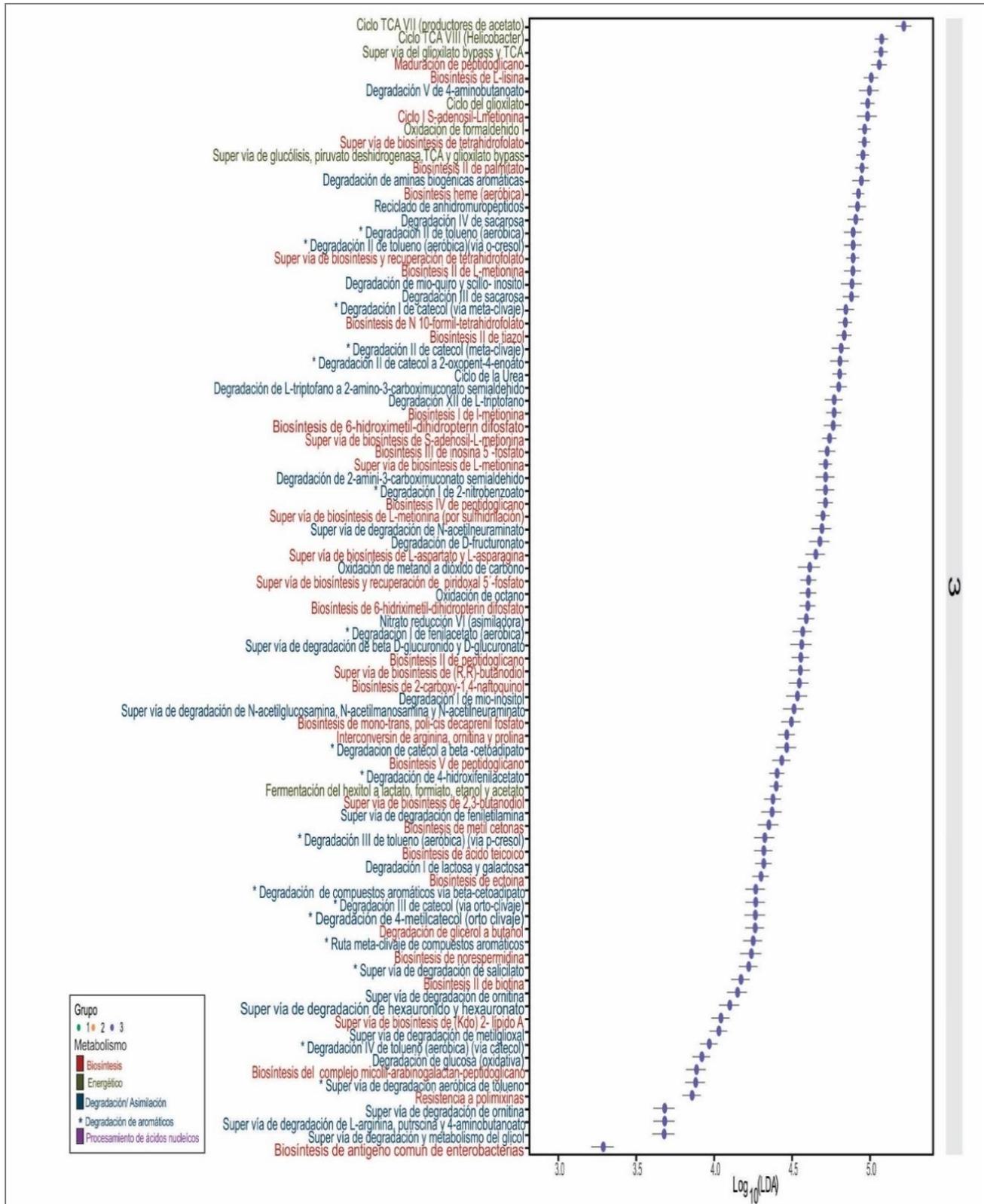


Figura 4.23: Análisis diferencial de la abundancia relativa de las vías metabólicas en los sedimentos predichas con PICRUST2. En cada rectángulo se muestran las vías significativamente más abundantes en cada grupo; expresadas como Log₁₀ (LDA) (Linear Discriminant Analysis). Valores mayores del Log₁₀ (LDA) indican mayor abundancia de la vía metabólica.

4.3.2 Predicción del potencial degradativo de hidrocarburos

El potencial degradativo de hidrocarburos en los sedimentos del curso de agua dulce se estudió analizando los resultados de la predicción funcional con PICRUSt2. Se predijeron un total de 6552 genes ortólogos (KOs), los cuales se clasificaron con la herramienta KEGG mapper. A continuación, se muestra el análisis de los 200 KOs predichos vinculados a rutas de biodegradación de hidrocarburos aromáticos. Se determinaron diferencias significativas entre los grupos de sedimentos utilizando la herramienta STAMP (Statistical Analysis of Taxonomic and Functional Profiles v2.1.3) y se evaluó su abundancia diferencial, mediante el análisis con ANCOM-BC.

Los KOs de degradación de compuestos aromáticos K00632, K00055, K00252 y K00626, se encontraron en mayores proporciones que los restantes KOs estudiados y no presentaron diferencias significativas entre los tres grupos (Figura 4.24). El primero codifica una aril-alcohol-deshidrogenasa vinculada con la degradación de tolueno y xileno y los otros tres KOs forman parte de la vía de degradación del benzoato; K00252 que codifica la enzima glutaril-CoA-deshidrogenasa (gen *gcdH*), K00626 de la enzima acetil-CoA C-acetiltransferasa (*atoB*) y el K00632 de la acetil-CoA-acetiltransferasa (*fadF*).

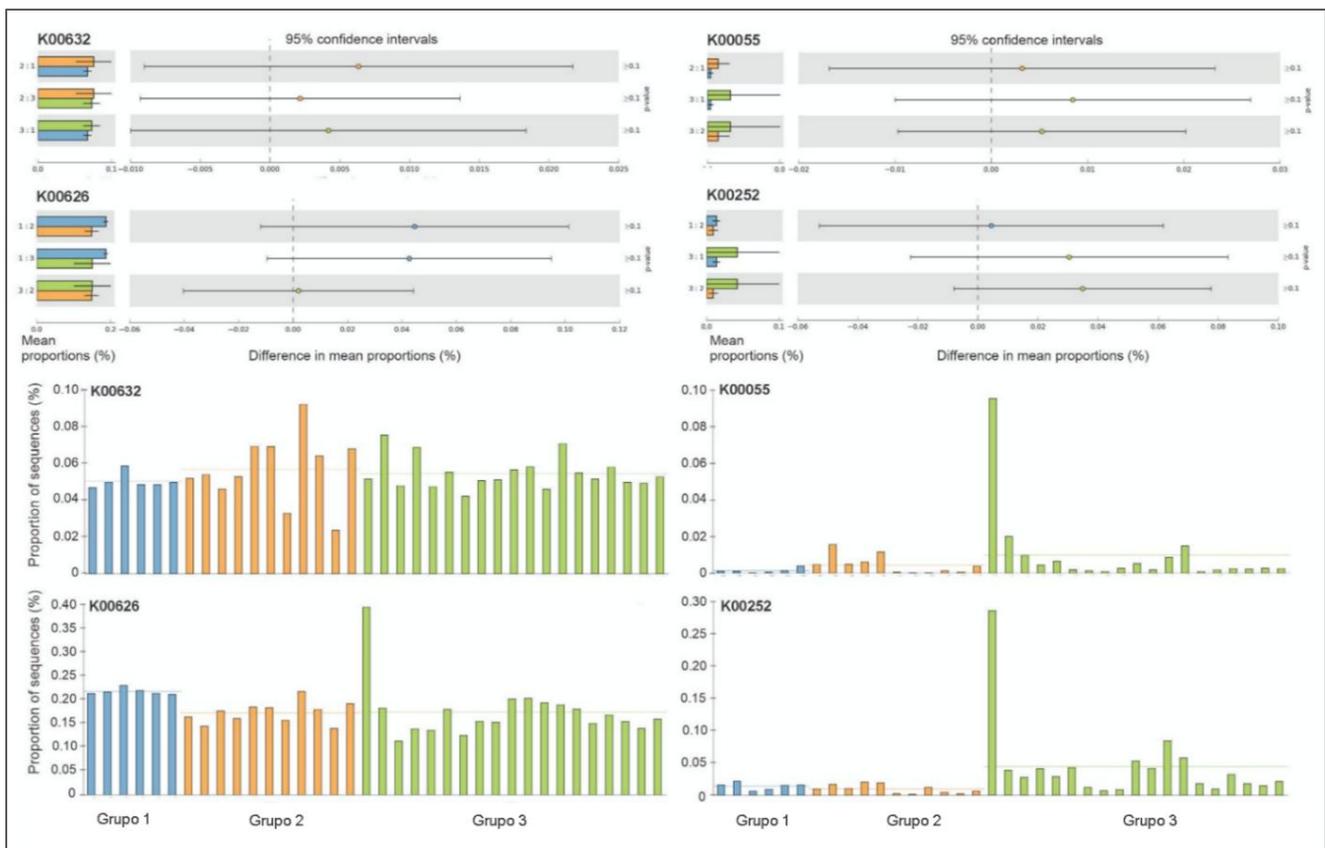


Figura 4.24: KOs de degradación de compuestos aromáticos con mayor proporción y sin diferencias significativas en los tres grupos de sedimentos. Arriba, prueba post- hoc de Tukey- Kramer y abajo, proporción de secuencias (%). Grupo1 color azul, Grupo 2 anaranjado y Grupo 3 color verde.

Los resultados del análisis de abundancia diferencial realizados con ANCOM-BC están representados en la Figura 4.25. Se observa que el Grupo 1 presentó menor proporción con respecto a los demás grupos de K17067 (formaldehído dismutasa/metanol deshidrogenasa, gen *mdo*), vinculado con la degradación de cloroalcanos y cloroalquenos y de K01666 (4-hidroxi 2-oxovalerato aldolasa, gen *mhpE*) de la degradación de compuestos aromáticos. Los KOs que presentó incrementados el Grupo 1 fueron los K11180 y K11181 (subunidades alfa y beta de la enzima sulfitoreductasa desasimilatoria, genes *dsrA* y *dsrB* respectivamente) relacionados con la sulfato reducción y a la degradación de nitrotolueno, y los K07538 (6-hidrox ciclohex-1-ene-1-carbonil-CoA deshidrogenasa, gen *had*), K07539 (6-oxociclohex-1-ene-carbonil-CoA hidrolasa, gen *oah*) y K01615 (subunidad alfa de la glutaconil CoA decarboxilasa, gen *gcdA*) vinculados con la degradación del benzoato y la vía del benzoil-CoA. Mientras que, el K00198 (subunidad catalítica de la monóxido de carbono deshidrogenasa anaeróbica, gen *cooS/acsA*), cuya función principal es catalizar la reducción reversible de CO₂ a CO y además se asigna en esta base de datos como parte de la vía de degradación de nitrotolueno, fue diferencialmente más abundante en el Grupo 1 que en el 3 (Figura 4.25).

El Grupo 2 presentó incrementos significativos con respecto al Grupo 1 en los K17067 y K01666. También, se observó una mayor proporción respecto del Grupo 3 del K07544 relacionado con la degradación de tolueno (Bencilsuccinato CoA- transferasa, gen *bbsF*) (Figura 4.25).

En el Grupo 3 se encontraron en abundancias significativamente mayores con respecto al Grupo 1 los K04073 (acetaldehído-deshidrogenasa, gen *mhpF*), K02554 (2-ceto 4-pentanoato hidratasa, gen *mhpD*) y K01617 (2-oxo- 3-hexenodioato, gen *xyll*) que participan en el metabolismo del acetaldehído, un intermediario de varias rutas metabólicas entre ellas la de degradación del benzoato, y el K10678 (nitroreductasa, gen *nfsA*) de la vía de degradación de nitrotolueno. Además, los KOs: K00198, K00196, K00172, K00171, K00170, K00169, vinculados con la degradación de nitrotolueno y el metabolismo del carbono, fueron significativamente menos abundantes en el Grupo 3 con respecto a los otros grupos.

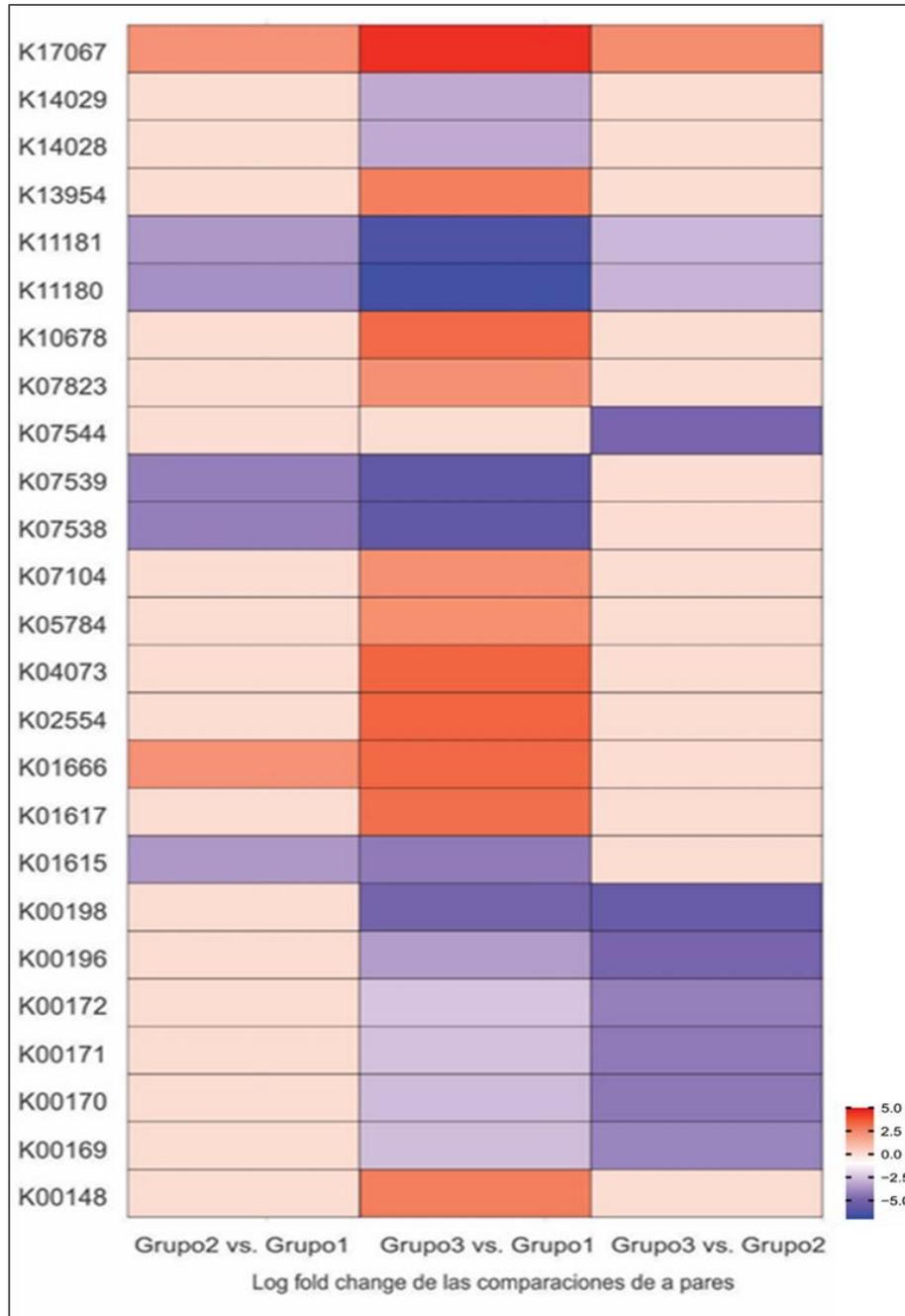


Figura 4.25: Abundancia diferencial de los KOs de degradación de compuestos aromáticos calculada con ANCOM-BC ($p < 0.05$, método de ajuste holm, comparaciones múltiples con test direccional con control mdFDR por método de holm). La intensidad del color refleja la magnitud del logaritmo del fold change (lfc). Cada columna indica el par de grupos comparado, donde en segundo lugar se indica la condición de referencia para la comparación.

La Figura 4.26 muestra cuáles fueron los taxones mayoritarios que estarían contribuyendo con los genes ortólogos (KOs) de la Figura 4.25. En el Grupo 1, los KOs de los genes *oah* y *had* (K07538 y K07539) de la degradación anaeróbica de hidrocarburos los aportaría *Syntrophaceae* (Figura 4.26). Los genes *dsrA* y *dsrB*

(K011180 y K011181) vinculados con la reducción del sulfato y degradación de nitrotolueno serían contribuidos por *Hydrogenophilaceae* y *Desulfobacteraceae*. El gen *acsA* (K00198) vinculado también con la degradación de nitrotolueno sería aportado mayormente por las familias *Peptostreptococcaceae*, *Desulfobacteraceae* y *TSAC18*. Por último, el gen *gcdA* (K01615) perteneciente a la degradación del benzoato y la vía del benzoil-CoA provendría principalmente de *Desulfobacteraceae*. En los Grupos 2 y 3, el gen *mdo* (K17067) perteneciente a vías de degradación de cloroalcanos y cloroalquenos estaría siendo aportado por *Nocardiaceae* y, las secuencias del gen de degradación de compuestos aromáticos *mhpE* (K01666) provendrían principalmente de *Burkholderiaceae* y *Bacillaceae*. Estas dos últimas familias, junto con la familia *Family X*, serían las responsables de aportar con los genes *mhpF* (K04073), *mhpD* (K02554) y *xyII* (K01617) en el Grupo 3. En este mismo grupo, las familias *Enterobacteraceae* y *Moraxellaceae* aportarían las secuencias del gen vinculado a la degradación del nitrotolueno *nfsA* (K10678) (Figura 4.26).

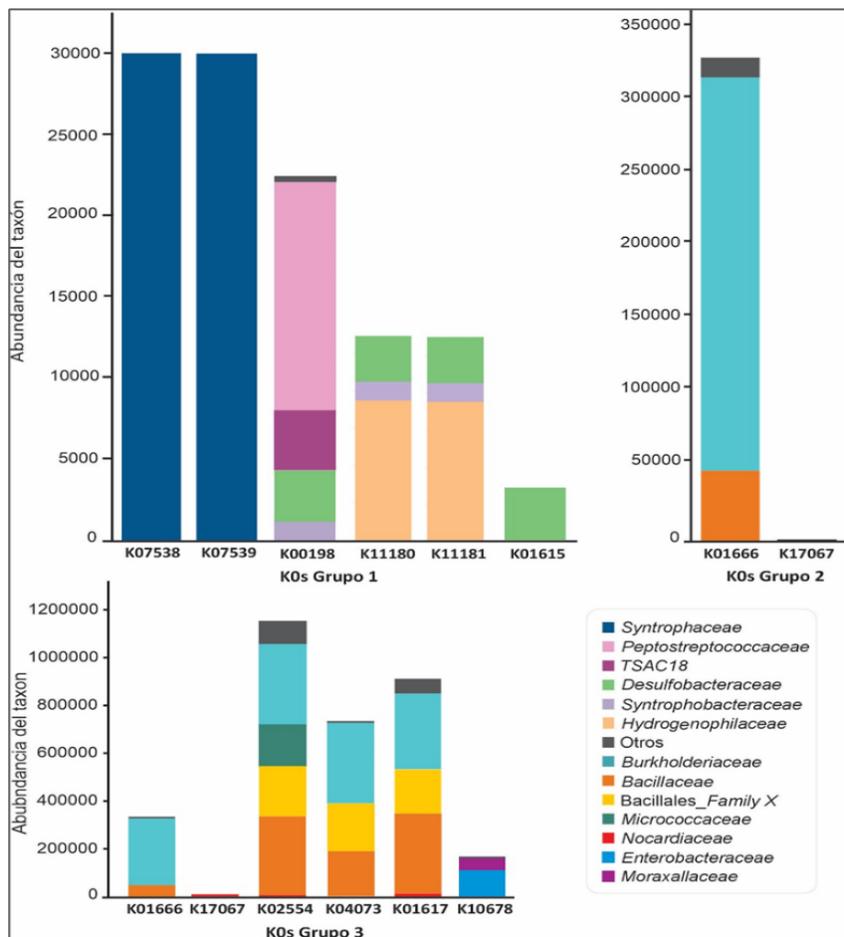


Figura 4.26: Numero de secuencias asignadas a las familias que aportarían los KOs de degradación de compuestos aromáticos diferencialmente más abundantes en los Grupos 1, 2 y 3 predichos con PICRUST2. La abundancia de los taxones se expresa como número de secuencias.

4.4 Cuantificación de genes funcionales de degradación de hidrocarburos

Con el fin de conocer el número de microorganismos totales y comparar luego con los resultados de cuantificación de los genes funcionales, se cuantificó mediante qPCR el número de copias del gen 16S rRNA en todas las muestras de sedimentos. En la Figura 4.27 (A) se encuentran representados los valores promedio del número de copias de dicho gen/ng de ADN para cada uno de los grupos de muestras de este estudio. Puede observarse que las muestras correspondientes a los horizontes superficiales del Grupo 1, presentaron los valores más altos de copias del gen 16S rRNA/ng ADN (del orden 10×10^5 copias/ng ADN), mientras que en el Grupo 3 se hallaron los menores valores de cuantificación de este gen.

Para continuar con el estudio del potencial de degradación de la comunidad bacteriana se cuantificaron genes de degradación de hidrocarburos de vías aeróbicas y anaeróbicas que suelen utilizarse como marcadores de degradación en procesos de biorremediación. Los genes funcionales de degradación aeróbica estudiados fueron los que codifican dioxigenasas de la vía alta y baja de degradación de PAH (*PAH-RHD* y *c230*) (Cébron y col., 2008; Sei y col., 1999) y el gen *alkB* que codifica una monooxigenasa de la vía de degradación de alcanos (Powell et al., 2006). Estos genes no se pudieron detectar en los sedimentos a pesar de haber hallado bacterias degradadoras de compuestos alifáticos y aromáticos mediante recuentos, y de la predicción de vías de degradación aeróbica en el Grupo 3. Debido a las bajas concentraciones de oxígeno que presenta el curso de agua (Sección 4.4.1), a la presencia de bacterias anaeróbicas y SRB en sus sedimentos (Sección 4.1.2.3) y a la predicción diferencial de genes de degradación anaeróbica de hidrocarburos (Sección 4.3.2), se decidió estudiar el potencial de degradación anaeróbica mediante la cuantificación por qPCR de los genes *bssA* y *bamA*, que suelen ser utilizados como biomarcadores de degradación (Beller et al., 2008; Kolukirik et al., 2011; Staats et al., 2011). El gen *bssA* codifica la subunidad α de la bencilsuccinato sintasa de una bacteria SRB y se utiliza para detectar y cuantificar microorganismos degradadores anaerobios de tolueno y xileno en condiciones metanogénicas y de sulfato reducción, y el gen *bamA* (u *oah*) que codifica la enzima 6-oxociclohex-1-ene-1-carbonilCoA hidrolasa y es utilizado para detectar microorganismos degradadores anaerobios de hidrocarburos.

La Figura 4.27 (B) muestra los resultados de la cuantificación del gen *bssA*. El número de copias de *bssA*/ng de ADN en los grupos 1 y 2 estuvo en el orden de 1×10^3 copias/ng ADN, mientras que en el Grupo 3 fue cercano a 1×10^2 copias/ng ADN y fue significativamente menor que en el Grupo 1. El gen *bamA* (Figura 4.27 (C)) se detectó en el orden de 1×10^3 copias/ng ADN en los tres grupos y no presentó diferencias significativas entre ellos.

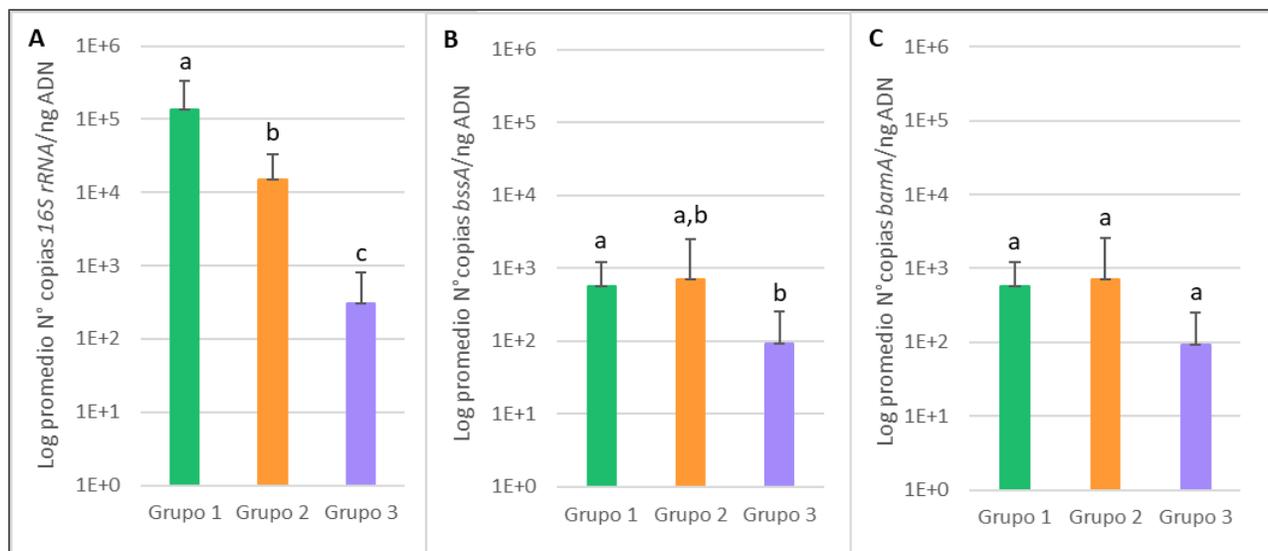


Figura 4.27: Cuantificación por qPCR del número de copias del gen 16S rRNA (A), *bssA*/ng ADN (B) y *bamA*/ng ADN (C). Letras diferentes indican diferencias significativas entre los grupos (p valor < 0,05), (ANOVA y prueba de Tukey).

4.5 Estudio de la expresión de los genes de degradación anaeróbica de hidrocarburos

4.5.1 Cuantificación de transcritos

Se estudió la expresión del gen 16S rRNA y de los genes biomarcadores de degradación anaeróbica *bamA* y *bssA* en las muestras del Grupo 1, basándonos en los resultados obtenidos en las secciones anteriores. Brevemente, los sedimentos del Grupo 1 presentaron la mayor cantidad de microorganismos cultivables (Figuras 4.7 y 4.8) y actividades enzimáticas (Figuras 4.9, 4.10, 4.11, 4.12 y 4.13), el mayor número de copias del gen 16S rRNA (Figura 4.27 A), la predicción del gen ortólogo K07538 que corresponde al gen *bamA* (oah) (Sección 4.3.2) y los genes *bamA* y *bssA* cuantificados (Figuras de 4.27 (B) y (C)). Por otra parte, como éstas son las muestras de sedimento que se encuentran en contacto con el agua y la mayor parte de la comunidad bentónica, se consideró de interés verificar si el potencial degradador que presentan se encuentra realmente activo.

Se extrajo ARN y se sintetizó cADN a partir de los sedimentos del Grupo 1 según se indica en la Sección 3.2.8 y se evaluó su expresión mediante cuantificación por RT-qPCR. En la Figura 4.28 se muestran los resultados de la expresión del gen 16S rRNA en las muestras del Grupo 1. Se observa que la expresión es similar para todos los sedimentos debido a que no se hallaron diferencias significativas entre los mismos. Además, fue posible detectar la expresión de los genes *bamA* y *bssA* en todas las muestras estudiadas, sin embargo, el número de copias obtenidos estuvo por debajo del Límite de cuantificación (LoQ) (450 y 35 copias/ μ l respectivamente) (sección 3.2.8.2).

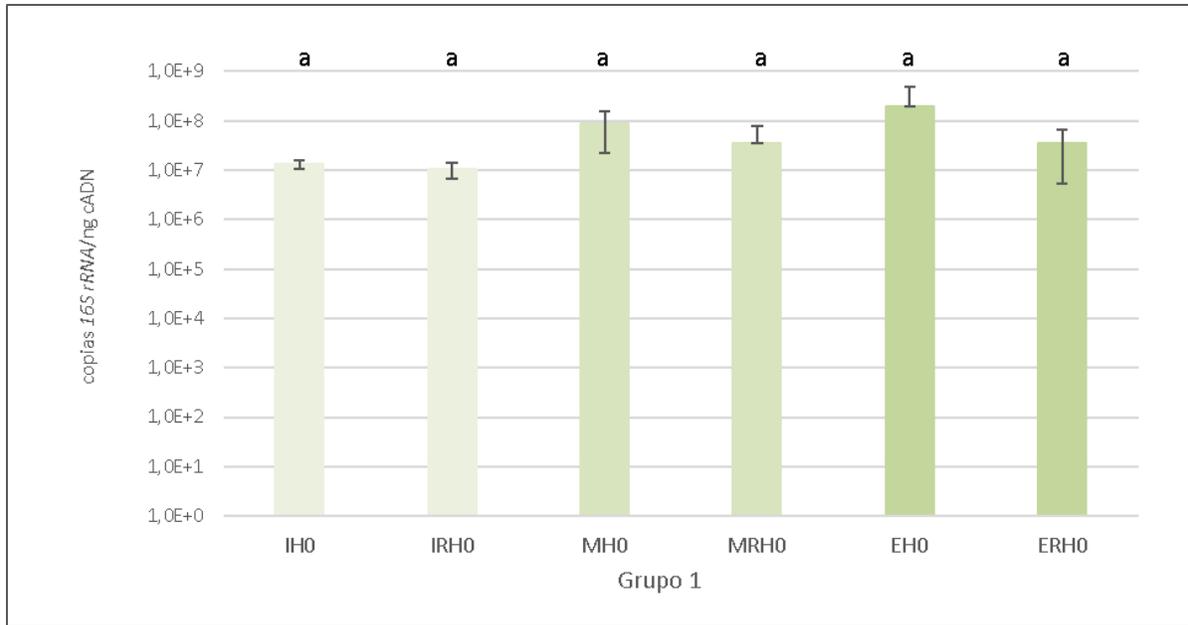


Figura 4.28: Cuantificación por RT-qPCR de los transcritos del gen 16S rRNA en los sedimentos del Grupo 1. Letras diferentes indican diferencias significativas (p valor < 0,05) (ANOVA y prueba de Tukey).

4.5.2 Asignación taxonómica de los transcritos

Los amplicones de los transcritos de *bssA* y *bamA* obtenidos en las RT-qPCR de la sección anterior, fueron clonados según protocolo de Lillis et al. (2010) y secuenciados (Sección 3.2.7.4), con el fin de conocer a los microorganismos que se encontrarían expresando estos genes funcionales en los sedimentos del Grupo 1. Las secuencias de los transcritos obtenidas, contenidas en los clones, fueron comparadas con las bases de datos de secuencias pertenecientes al NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) utilizando la herramienta BLASTn. En la Tabla 4.4 se muestran los resultados de esa comparación. Se encontró que casi todos los clones obtenidos con el amplificado del gen *bssA* (clones 10, 33, 41 y 53) alinearon con un 100% de cobertura e identidad mayor al 95% con el gen *bssA* del microorganismo sulfato reductor no clasificado PRTOL1. Además, los clones 53, 54 y 55 alinearon también con *Thauera aromatica* K172 (orden Rhodocyclales) y con el gen *bssA* de *Uncultured bacterium clone SCADC_bssA3*, pero en porcentajes de similitud y cobertura menores a PRTOL1. Los clones obtenidos a partir de amplicados del gen *bamA* (v16, v17, v18 y v28) presentaron identidades menores al 95% y cobertura mayor al 80% con el gen *bamA* de microorganismos no cultivables, y los clones v16 y v28 con el microorganismo *Syntrophus aciditrophicus* SB. El clon v21 presentó un 97,35% de similitud y un 36% de cobertura con *Geobacter Sulfurreducens* strain PCA_v2.

Clones <i>bssA</i>	% Identidad	% Cobertura	Secuencia de mayor similitud en la base de datos
10	98,97	100	Sulfate-reducing bacterium PRTOL1 BssA (<i>bssA</i>) gene
33	97,94	100	Sulfate-reducing bacterium PRTOL1 BssA (<i>bssA</i>) gene
41	97,94	100	Sulfate-reducing bacterium PRTOL1 BssA (<i>bssA</i>) gene
42	60,00	100	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone K31
53	96,91	100	Sulfate-reducing bacterium PRTOL1 BssA (<i>bssA</i>) gene
	90,53	97	Uncultured bacterium clone SCADC_ <i>bssA3</i> BssA gene, complete cds uncultured bacterium
	88,04	94	<i>Thauera aromatica</i> K172 chromosome, complete genome
54	97,94	100	Sulfate-reducing bacterium PRTOL1 BssA (<i>bssA</i>) gene
	91,58	97	Uncultured bacterium clone SCADC_ <i>bssA3</i> BssA gene, complete cds uncultured bacterium
	86,96	94	<i>Thauera aromatica</i> K172 chromosome, complete genome
55	96,91	100	Sulfate-reducing bacterium PRTOL1 BssA (<i>bssA</i>) gene
	92,63	97	Uncultured bacterium clone SCADC_ <i>bssA3</i> BssA gene, complete cds uncultured bacterium
	85,87	94	<i>Thauera aromatica</i> K172 chromosome, complete genome
Clones <i>bamA</i>	% Identidad	% Cobertura	Secuencia de mayor similitud en la base de datos
v16	98,06	82	Uncultured bacterium clone ASM-3 6-oxocyclohex-1-ene-1-carbonyl-CoA hydrolase gene, partial cds uncultured bacterium
	98,00	82	<i>Syntrophus aciditrophicus</i> SB, complete genome
v17	89,25	81	Uncultured bacterium clone ASM-3 6-oxocyclohex-1-ene-1-carbonyl-CoA hydrolase gene, partial cds uncultured bacterium
	88,33	86	Uncultured bacterium partial <i>bamA</i> gene for putative 6-oxocyclohex-1- ene-1-carbonyl-CoA hydrolase, clone Oc_1999(3H)
v18	89,24	81	Uncultured bacterium clone ASM-3 6-oxocyclohex-1-ene-1-carbonyl-CoA hydrolase gene, partial cds uncultured bacterium
	87,92	83	Uncultured bacterium partial <i>bamA</i> gene for putative 6-oxocyclohex-1- ene-1-carbonyl-CoA hydrolase, clone Oc_1999(3h)
v28	92,68	81	Uncultured bacterium clone Unamended-1 putative 6-oxocyclohex-1-ene- 1-carbonyl-CoA hydrolase gene, partial cds uncultured bacterium
	80,47	95	<i>Syntrophus aciditrophicus</i> SB, complete genome
v21	97,35	36	<i>Geobacter sulfurreducens</i> strain PCA_v2 chromosome

Tabla 4.4: Resultados de la comparación de las secuencias parciales de los clones de los genes *bssA* y *bamA* con la base de datos del NCBI.

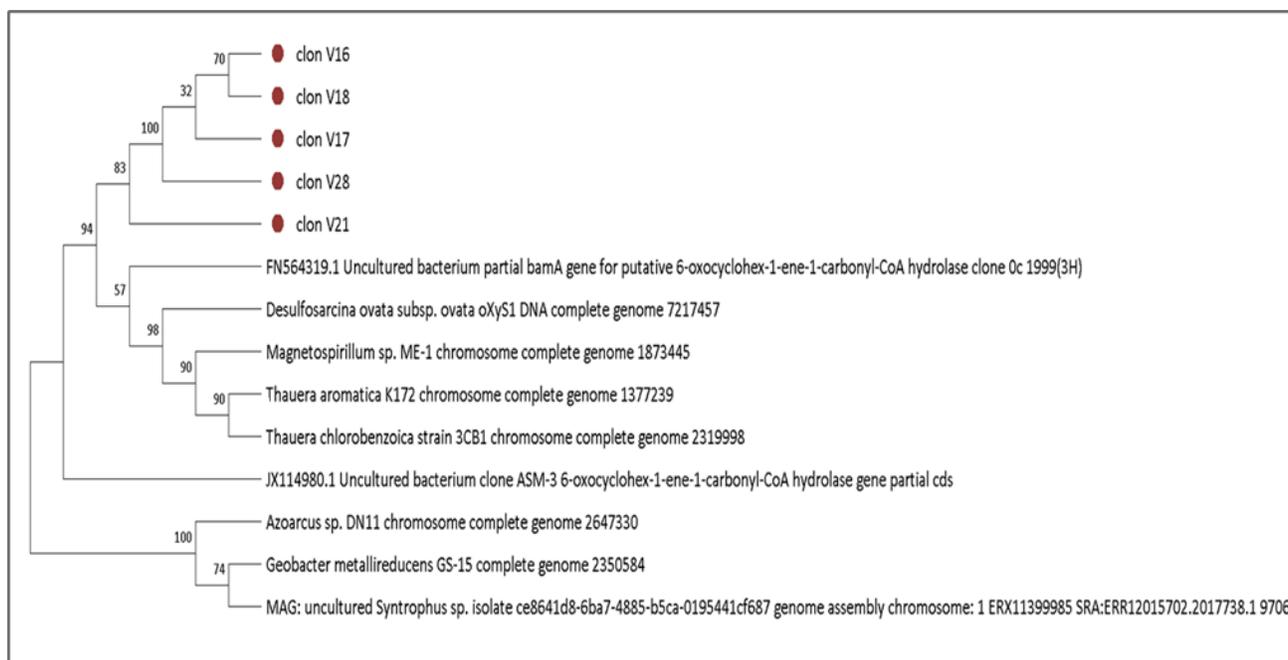


Figura 4.30: Dendrograma que muestra las relaciones de las secuencias del gen *bamA* en los clones, con secuencias de *bamA* en microorganismos de referencia. Inferido con el método Neighbor – Joining. Los valores de Bootstrap (1000 réplicas) se expresan en porcentaje y se indican sobre las ramas.

4.6 Discusión

En este capítulo se caracterizó exhaustivamente un curso de agua dulce antropizado que recibe descargas autorizadas y controladas de industrias petroquímicas. El objetivo fue estudiar su composición fisicoquímica y microbiológica, conocer cómo se estructura la comunidad microbiana y evaluar su potencial contribución en la degradación de hidrocarburos.

La caracterización fisicoquímica de las aguas de este sitio mostró bajas concentraciones de oxígeno disuelto, pH cercanos a la neutralidad y potenciales REDOX positivos. Los resultados obtenidos indicarían que presenta características similares a uno hipóxico dado que en dos de los tres puntos muestreados los valores de O_2 estuvieron por debajo de los 2 mg/l (Carter et al., 2021; Sabo et al., 1999). En estudios sobre la ocurrencia temporal y espacial de hipoxia en cursos de agua dulce, Sabo y colaboradores (1999) atribuyen la hipoxia a la poca circulación del agua, a la baja turbulencia, al lavado de la materia orgánica por pulsos de crecida/inundación y a la circulación dificultosa del agua por acumulación de sedimentos. Otros autores sugieren que a pesar de que algunos medios acuáticos son naturalmente propensos a presentar bajas concentraciones de oxígeno, el aporte antropogénico de nutrientes estimula la producción primaria y por lo tanto el consumo de oxígeno (Fennel y Testa, 2019). Este curso de agua es afectado por el ingreso de aguas del Río de la Plata durante las crecidas y además la circulación del agua es dificultosa debido a la presencia de numerosas plantas acuáticas, por lo que se sugiere que dichas características podrían explicar lo observado en este sitio en concordancia con el trabajo de Sabo. Al igual

que en otros cursos de agua pertenecientes a estuarios de Argentina y China que reciben descargas urbanas, industriales y petroquímicas (Doong y Lin, 2004; Lara et al., 1995), en este curso de agua los hidrocarburos no fueron detectados, es decir, se encontraron en concentraciones menores a los límites de detección en aguas (3 mg/l de hidrocarburos totales y 0,006 µg/l de PAH). Los recuentos de microorganismos cultivables degradadores de hidrocarburos aromáticos, alifáticos, y bacterias heterótrofas fueron superiores a los reportados por otros autores en cursos de agua contaminada con hidrocarburos de origen biogénico y antropogénico (Youssef et al., 2010). Por lo tanto, los resultados podrían sugerir que los hidrocarburos solubilizados en el agua provenientes de los sedimentos serían rápidamente degradados por las comunidades bacterianas presentes en ella, lo que permitiría el aumento del recuento de microorganismos heterótrofos y/o degradadores de hidrocarburos acompañado de concentraciones de hidrocarburos por debajo del límite de detección en el agua del sitio estudiado.

La caracterización del sedimento se realizó analizando cada uno de los 36 horizontes, que incluyeron sedimentos superficiales y sedimentos de hasta 2 metros de profundidad obtenidos a partir de 6 cores muestreados en tres puntos del curso de agua. Algunas características fisicoquímicas fueron coincidentes en la gran mayoría de las muestras de sedimento, y podrían atribuirse como rasgos generales de este sitio. Estas fueron; el pH levemente alcalino y el potencial de oxido reducción positivo independientemente de la profundidad del sedimento. Durante el proceso de descomposición de la materia orgánica en diferentes ambientes, los microorganismos utilizan inicialmente el oxígeno que se encuentra disponible, disminuyendo su concentración hasta el punto de modificar el ambiente y volverlo anóxico. En ambientes donde sucede esto, se genera un gradiente de potencial de óxido reducción y, dependiendo de las características del sitio, iones como nitrato, manganeso, hierro y sulfato se vuelven los aceptores de electrones dominantes (Voogt, 2020). El gradiente comienza con una zona oxigenada seguida de una zona de transición que va desde los 710 a -60 mV donde los microorganismos allí presentes pueden utilizar el nitrato, el hierro (III) y el manganeso (IV) como aceptores de electrones, continuada por una zona anóxica. En los sedimentos estudiados en este trabajo no se observó una tendencia del potencial REDOX a disminuir con el aumento de la profundidad de las muestras; los valores de este parámetro variaron entre 398 y 211 mV. Por lo tanto, si nos basamos en la descripción de una columna típica de sedimentos como la esquematizada en la Figura 1.7, y tenemos en cuenta la baja concentración de oxígeno en las aguas se podría sugerir que las muestras de este trabajo se encuentran en la zona de transición.

Se realizaron análisis que incluyeron los resultados de las determinaciones fisicoquímicas y los datos obtenidos a partir de la secuenciación de amplicones del gen 16S rRNA. El objetivo de este análisis fue encontrar similitudes que permitan facilitar la descripción posterior de los sedimentos, e identificar cuáles fueron las variables determinantes de la estructura de las comunidades microbianas. El análisis evidenció que la diversidad

de las comunidades microbianas estaba influenciada por al menos 9 variables, la dos más importantes fueron la profundidad y la humedad debido a que afectaron tanto la riqueza como la uniformidad de las comunidades microbianas (Tabla 4.2.1). El efecto de la profundidad ha sido reportado por varios autores; y al igual que este trabajo, describieron que la diversidad disminuye con el aumento de la profundidad, debido a la menor disponibilidad de materia orgánica, así como también a cambios en las propiedades de los sedimentos (pH, contenido de nutrientes, textura) (Huang et al., 2011; Liao et al., 2021). El contenido de agua en los sedimentos regula la biodisponibilidad de oxígeno, moviliza nutrientes y disminuye el estrés osmótico (Hollister et al., 2010; Madueño et al., 2015).

La riqueza de las comunidades estuvo influenciada por el hierro, el fósforo, el nitrógeno, el amonio intercambiable, el litio, el manganeso y el plomo. El hierro ha sido descrito como un parámetro que estructura la comunidad microbiana también en sedimentos árticos debido a que los microorganismos lo utilizan como último aceptor de electrones (Algora et al., 2015). El contenido de fósforo y el de nitrógeno son factores descritos como posibles determinantes de la estructura de la comunidad bacteriana en sedimentos (Su et al., 2018; Wang et al., 2023; Xianbiao et al., 2019; Yi et al., 2021) debido a que en altas cantidades se asocian con la eutrofización y exceso de producción primaria en cursos de agua (Feng et al., 2023).

Notablemente, la concentración de hidrocarburos no definió la estructura de las comunidades en los sedimentos estudiados en esta tesis (Tabla 4.2.1). En concordancia, otros autores encontraron en sedimentos afectados con hidrocarburos que su presencia no influenció la estructura de la comunidad procariota (Jeanbille et al., 2016; Madueño et al., 2021; Marcial Gomes et al., 2008; Starevich et al., 2024). Según Xie y colaboradores, fueron los metales y no el contenido de hidrocarburos y/o contaminantes orgánicos los que definieron la estructura de la comunidad bacteriana en sedimentos de un río con diferentes contaminantes (Xie et al., 2016). El efecto de la presencia de metales sobre la estructura de las comunidades bacterianas en sedimentos está comenzando a ser estudiado; muchas publicaciones indican que la presencia de hierro en los sedimentos es una de las variables que se correlaciona más fuertemente con la composición de las comunidades microbianas, mientras que metales como zinc, manganeso, cobre, cromo, cadmio y níquel ejercerían una influencia entre alta y moderada (Legg et al., 2012; Xie et al., 2016; Yi et al., 2021; Zhang et al., 2020). Se ha reportado que el Pb estimula la presencia de microorganismos metal-tolerantes degradadores de hidrocarburos en sedimentos (Almeida et al., 2013; Olaniran et al., 2011). Otra característica general fue la presencia de *Burkholderiaceae* y *Anaerolineaceae* en las muestras de los sedimentos. Estas familias han sido asociadas a la degradación de hidrocarburos e incluso con la primera se han desarrollado estudios que aprovechan estas capacidades con fines de remediación (Gieg et al., 2014; Macchi et al., 2021; Muangchinda et al., 2015). Sin embargo, también fueron

descriptas por otros autores como ubicuas, capaces de metabolizar la biomasa muerta en sedimentos de ecosistemas acuáticos (Paula et al., 2021; Kueves et al., 2005; Yamada et al., 2008).

Las muestras de sedimentos se asociaron en tres grupos significativamente diferentes (Figuras 4.17 y 4.18), las cuales se agruparon en función de las diferencias fisicoquímicas y de las comunidades microbianas. El Grupo 1 estuvo conformado por seis muestras de sedimentos que corresponden a los horizontes superficiales (H0). Este grupo se caracterizó por poseer concentraciones de fósforo total por encima del promedio y mayor humedad. La capacidad oxidativa y las actividades bioindicadoras de degradación de hidrocarburos ensayadas (actividades lipasa, fosfatasa ácida y alcalina) (Ziervogel et al., 2016, 2022) se encontraron incrementadas en este grupo en comparación con los grupos 2 y 3. (Figuras 4.9, 4.10, 4.13 y 4.14). Debido a que la actividad ureasa suele inhibirse en presencia de altas concentraciones de hidrocarburos (Lipińska et al., 2015), la presencia de esta actividad en los horizontes superficiales es otro indicio de actividad microbiana (Figura 4.11). Se encontraron en estos sedimentos los valores más altos de bacterias heterótrofas aeróbicas y anaeróbicas, de degradadoras de PAH, de hidrocarburos alifáticos, de SRB y del gen 16S rRNA, sugiriendo que la comunidad microbiana posee una mayor actividad que los sedimentos no superficiales, y que contiene poblaciones bacterianas que podrían estar degradando activamente los hidrocarburos. Esta función de “biofiltro” probablemente evitaría la solubilización de hidrocarburos y su consecuente pasaje a las aguas del sitio. *Syntrophaceae* (Figura 4.22) fue mayoritaria y diferencialmente más abundante en los horizontes superficiales (Figura 4.23). La familia *Syntrophaceae* agrupa bacterias sulfato reductoras que oxidan sustratos a acetato o a dióxido de carbono, utilizando sulfatos o benzoatos como aceptores finales de electrones (Kueves et al., 2005). Según bibliografía, esta familia es capaz de degradar alcanos gracias a relaciones sintróficas con arqueas metanogénicas (Gray et al., 2011). La predicción (Figura 4.25) de genes de degradación anaeróbica y la cuantificación de los genes *bamA* y *bssA* (Sección 4.4) sugirieron la potencialidad de esta familia para degradar los hidrocarburos en los sedimentos superficiales. La secuenciación de transcriptos de estos genes confirmó que *Syntrophaceae* estaría expresándolos y, en consecuencia, degradando los hidrocarburos en los sedimentos superficiales. Por lo que podríamos sugerir que los *Syntrophaceae* serían un interesante biomarcador para monitoreos de degradación anaeróbica de hidrocarburos en este curso de agua dulce. Otras familias menos abundantes pero diferenciales en este grupo se relacionaron con el ciclo del azufre, el hierro y el nitrógeno o con ambientes ricos en estos elementos. En muchos casos, el conocimiento sobre su metabolismo es limitado debido a que no se han obtenido miembros aislados aún. Entre ellas la familia *Acidithiobacillaceae* oxida azufre elemental o minerales que contienen Fe(II) (Cébron et al., 2022), *Hydrogenophilaceae* utiliza donantes de electrones como compuestos sulfúricos reducidos e hidrógeno y la familia *BSV26* ha sido reportada en sedimentos, acuíferos, lagunas de lava y en microcosmos de un acuífero con presencia de hidrocarburos sulfurados (Bin Hudari et al., 2020; Gonzalez-Pimentel et al., 2021). Los miembros de

Phicispheraceae presentan en su genomas vías de desnitrificación y pueden reducir nitrato (Jasmin et al., 2017; Lenferink et al., 2023). Las tres familias anteriormente mencionadas no se han asociado directamente con la degradación de hidrocarburos, pero sí, se han encontrado en sedimentos antropizados. Además, de la familia *Syntrophaceae*, fueron diferenciales la familia SC-I-84 asociada con la degradación potencial de tolueno (Cupples y Thelusmond, 2022) y *Steroideobacteraceae* con miembros degradadores de pesticidas organoclorados y glifosato, utilizando el hierro como fuente de energía (Montecillo, 2023; Xiao et al., 2023). Sin embargo, estas dos últimas no fueron predichas como contribuyentes de genes de degradación (Figura 4.26).

La familia desnitrificante *Rhodocyclaceae* no se encontró como diferencial (Figura 4.22) ni contribuyendo con los genes de degradación de hidrocarburos en los sedimentos superficiales (Figura 4.26), sin embargo, las vías de desnitrificación se encontraron diferencialmente incrementadas (Figura 4.23) y los transcriptos de los genes *bamA* y *bssA* presentaron similitud con los de *Thauera*, un género perteneciente a *Rhodocyclaceae* (Figuras 4.29 y 4.30). Estos resultados sugieren su importancia en la degradación de hidrocarburos en los sedimentos superficiales. Probablemente *Rhodocyclaceae* también podría ser otra familia responsable de la degradación de los hidrocarburos en estas muestras. En concordancia, algunos estudios indican que la desnitrificación está vinculada con la degradación de hidrocarburos y se ha demostrado en sedimentos antropizados que los microorganismos degradadores de PAH pueden estimularse mediante la adición de nitrato (Han et al., 2021; Ma et al., 2021; Yang et al., 2020).

Por último, la función del ciclado de la materia que presentan los sedimentos de agua dulce se pudo inferir también en los horizontes superficiales, debido a la presencia de las familias anteriormente mencionadas y a la de las familias con metabolismos diversos que se describirán a continuación. *Rhodobacteraceae* comprende bacterias aeróbicas foto y quimioheterótrofas y anaerobias fotosintéticas (Rosenberg, 2013). *Beijerinckaceae* presenta miembros heterótrofos, metilótrofos y metanótrofos facultativos (Wegner et al., 2020). La familia no cultivable *metagenome_1* (del orden SBR1031) que incluye microorganismos heterótrofos (Xia et al., 2016) y finalmente, las familias *Parvularculaceae* y *Chloroflexi bacterium OLB14* que incluyen miembros heterótrofos aerobios y quimiolitautótrofos (Yu et al., 2018, Kochetkova et al., 2020), siendo la última familia muy versátil debido a que los mismos miembros pueden utilizar carbohidratos, CO₂ o siderita como fuente de carbono y energía o hierro como fuente de energía (Kochetkova et al., 2020). En concordancia con la amplia capacidad metabólica de las familias, la predicción funcional evidenció rutas autotróficas de fijación de CO₂ y de biosíntesis de pigmentos vinculados con la obtención de energía a través de la luz, como bacterioclorofila II, 3,8 divinilclorofila I (aeróbica) y II (aeróbica y anaeróbica), resultado esperable debido a que son los sedimentos superficiales, a los que les llega la luz que atraviesa el cuerpo de agua. Los microorganismos heterótrofos aerobios y anaerobios identificados son los que podrían estar aportando las vías de degradación de glucógeno, de glutaril-CoA, de compuestos de C1 a

CO₂, así como también con la glucólisis y las fermentaciones de lactato, l-lisina y butanoato (Figura 4.24), diferencialmente predichas. Estos resultados evidencian que los sedimentos superficiales poseen una diversidad de microorganismos metabólicamente compleja con capacidad potencial de realizar autotrofia y/o heterotrofia en aerobiosis o anaerobiosis utilizando compuestos inorgánicos u orgánicos como fuentes de carbono y energía, y aceptores de electrones diversos, como oxígeno, nitrato, sulfato o hierro. Esta diversidad metabólica les permitiría adaptarse a las condiciones del entorno según sus requerimientos nutricionales aún en presencia de contaminantes de origen antropogénico, degradar hidrocarburos y recircular la materia. Los géneros *Thauera* y *Syntrophus*, estarían degradando activamente los hidrocarburos mediante nitrato y sulfato reducción respectivamente.

Los sedimentos no superficiales mostraron dos comunidades microbianas diferentes. En ambos grupos se observó un metabolismo microbiano limitado con respecto a los horizontes superficiales, debido a la disminución de las actividades enzimáticas y de los recuentos microbianos (Figuras 4.9-11, 4.15 y 4.16). Además, ambos incluyeron muestras con altas concentraciones de hidrocarburos. En los sedimentos del Grupo 2 que incluyó muestras no superficiales de los extremos del curso de agua (cores I y E), la comunidad microbiana estaría estructurada por las altas concentraciones de amonio intercambiable (Beuters y Scherer, 2012; Cavalli et al., 2015) (Figura 4.19). Predominaron familias asociadas a ambientes oligotróficos o con hidrocarburos, descritas muchas como SRB y degradadoras de dichos compuestos (*Aminicenantales* y *Actinomycetes*, *Anaerolineaceae* y *Caldiseriaceae*) (Martinez et al., 2019; Mori et al., 2008; Kadnikov et al., 2019; Kielak et al., 2016; Wunder et al., 2021; Azadi y Shojaei, 2020; Guibert et al., 2016). El análisis diferencial a nivel de familias (Figura 4.23) indicó que *Caldiseriaceae* fue la familia predominante, sin embargo, a pesar de que se suele encontrar en sitios semejantes al estudiado (Martinez et al., 2019) poco se puede sugerir sobre su función debido a que solo existe un miembro aislado (Mori et al., 2008). Estudios metagenómicos realizados por otros autores han sugerido que las familias *TTA-B15* y *TTA-B1* diferenciales en este grupo presentan la potencialidad de degradar hidrocarburos y/o compuestos aromáticos (Chen et al., 2020; Ma et al., 2017). Con respecto a esta función, solo el gen ortólogo de la degradación aeróbica de hidrocarburos aromáticos K01666 (gen *mhpE*) ha sido predicho diferencialmente en este grupo (Figura 4.26). La siguiente familia diferencial fue una no asignada dentro del orden Dehalococcoidia, relacionado con la respiración de hidrocarburos clorados. Debido a que su metabolismo es muy específico y limitado (Adrian y Löffler, 2016; Yang et al., 2020) la predicción de vías de biosíntesis de factores de crecimiento incrementadas, como biosíntesis de factor 420 y de coenzima B, (Figura 4.23) podrían estar relacionadas con la presencia de microorganismos exigentes como los miembros de este orden. En concordancia con la presencia de microorganismos dehalogenantes, también se predijo incrementado en este grupo el K17067, correspondiente al gen *mdo* incluido en la vía de degradación de cloro-alcanos y cloro-alquenos (FIGURA 4.26). La predicción

diferencial de vías de síntesis de nucleótidos y de ribonucleótidos (Figura 4.23) podría también estar asociada a altas tasas de reparación del material genético como respuesta a las condiciones ambientales, debido a que los hidrocarburos clorados son considerados carcinogénicos y mutagénicos (Lu et al., 2013). Si bien en la caracterización fisicoquímica no se han cuantificado hidrocarburos clorados, estos resultados sugieren su presencia en los sedimentos y también el potencial microbiano para resistirlos y degradarlos. Las tres familias restantes *Patescibacteria*, miembros de la familia *uncultured candidate división JS1 bacterium* y *uncultured Methnosarcinales archaeon* son capaces de producir metano (Fujii et al., 2022; Angel et al., 2012) y en relación, se encontraron incrementadas las vías de síntesis de cofactores y de metabolitos secundarios necesarios para las reacciones del metabolismo metanogénico, como la biosíntesis de tetra-hidro-metanopterin (Figura 4.23).

Por todo lo expuesto, los sedimentos no superficiales del Grupo 2, con alto contenido de amonio intercambiable presentaron una comunidad microbiana principalmente anaeróbica, sulfato-reductora, degradadora de hidrocarburos y metanogénica. La actividad metabólica de biosíntesis predicha podría estar vinculada con mecanismos de resistencia, con la producción de vitaminas y coenzimas necesarias para el crecimiento e interacciones microbianas necesarias, por ejemplo, para la metanogénesis y la dechlorinación reductiva de hidrocarburos clorados. A pesar de que los análisis estadísticos indicaron que el contenido de amonio intercambiable influenciaba la estructura de la comunidad microbiana de estos sedimentos no se encontraron microorganismos diferencialmente abundantes en relación con su metabolismo.

La comunidad bacteriana del Grupo 3, con sedimentos con altas concentraciones de hidrocarburos e influenciado por la presencia de hierro, manganeso y litio, se encontró representada por microorganismos heterotróficos aeróbicos y/o anaeróbicos facultativos capaces de degradar hidrocarburos, de utilizar oxígeno o nitrato como aceptores de electrones, de reducir compuestos de azufre, con capacidad de resistir estrés hídrico/osmótico y condiciones ambientales desfavorables como la presencia de metales, antibióticos y solventes clorados. Los genes de degradación de hidrocarburos predichos en este grupo fueron principalmente, del metabolismo aeróbico (Figura 4.25). Las familias degradadoras que se describirán a continuación aportarían en gran medida dichos genes (Figura 4.26). La familia mayoritaria fue *Bacillaceae*, que al igual que *Burkholderiaceae*, es prácticamente ubicua (Cupit et al., 2019; Mandic-Mulec et al., 2016; Sultanpuram y Mothe, 2018) y además, es descrita como resistente al estrés ambiental debido a su capacidad de formar endosporas (Ash et al., 1991). Esta familia presenta miembros degradadores de hidrocarburos capaces de reducir hierro, manganeso, y de resistir metales y antibióticos (Brzeszcz y Kaszycki, 2018; Das et al., 2024; Zakharova et al., 2010; Zhu et al., 2023; Madueño et al., 2018). En cuanto a la degradación de hidrocarburos, los genes *xyll* y *mhp D, E, F* estarían siendo aportados mayoritariamente por *Bacillales* y *Burkholderiaceae* (Figura 4.26). Otras familias diferenciales en este grupo, que en conjunto con las predicciones metabólicas y la búsqueda de genes ortólogos de degradación

(Figuras 4.23-4.26) sugieren su relación con la degradación de hidrocarburos en ambiente estresados fueron; *Pseudomonadaceae* y *Nocardiaceae* reportadas como degradadoras de hidrocarburos en ambientes que suelen generar estrés osmótico y/o hídrico en los microorganismos (Bradford et al., 2018; Ma et al., 2006; Wald et al., 2015; Zedelius et al., 2011). Según la predicción funcional, *Nocardiaceae* podría estar aportando el gen *mdo* vinculado con la degradación de cloro-alcanos y cloro-alquenos (Figura 4.26). *Corynebacteriaceae* presenta géneros que se han aislado de ambientes con cobre y hierro (Zárate et al., 2023). *Enterobacteriaceae* es una familia propia de la microbiota del intestino de animales, incluye patógenos humanos y suele poseer genes de resistencia a antibióticos. Sin embargo, también se han hallado en sedimentos con contaminantes de origen antropogénico y con metales, y se han descrito algunas con capacidad para degradar hidrocarburos (Nkanang et al., 2018; Yan et al., 2024; Zárate et al., 2023). Las secuencias del gen degradador *nfsA* serían aportadas por *Enterobacteriaceae* (Figura 4.26).

Estos resultados indicarían que los sedimentos del Grupo 3 presentan el potencial microbiano para degradar aeróbicamente de hidrocarburos, sin embargo, no fue posible detectar mediante qPCR la presencia de estos genes funcionales con los *primers* disponibles. Esto podría deberse a la naturaleza/elección de los *primers*, siendo, probablemente, los utilizados en este trabajo inespecíficos para las familias mayoritarias de los sedimentos (Powell et al., 2006; Cébron et al., 2008). Por otro lado, el hecho de no haber predicho vías de degradación anaeróbicas podría estar relacionado con una de las principales críticas hacia el software PICRUSt2. Esta es, que las predicciones basadas en amplicones están sesgadas hacia los genomas de referencia existentes, lo que hace menos probable que se identifiquen funciones raras específicas o del entorno; esta limitación está disminuyendo con el tiempo, a medida que aumenta el número de genomas de alta calidad disponibles y se completan las bases de datos (Douglas et al., 2020). Contrariamente, se pudo cuantificar la presencia de los genes de degradación anaeróbica de hidrocarburos *bamA* y *bssA* en todas las muestras de sedimento a pesar de que ninguna vía de degradación anaeróbica fue predicha como significativamente distintiva de este grupo de muestras. Otras familias propias de este grupo se encontraron más asociadas a la resistencia al Litio, como *Micrococcaceae*. Se han descrito que algunos de los géneros que la conforman son capaces de crecer en medios de cultivo con concentraciones mayores a 1,5 M de LiCl y de resistir altas concentraciones de cromo (Cubillos et al., 2018; Jroundi et al., 2020). *Staphylococcaceae* es capaz de acumular y crecer en presencia de litio (Azadi y Shojaei, 2020; Belfiore et al., 2018; Laboratorios Britania s.a., 2021; Muangchinda et al., 2016; Silva Rabelo et al., 2023; Vautrin et al., 2021). La presencia del Litio fue una de las variables que definió la estructura de la comunidad microbiana de este grupo y, en consecuencia, las familias halladas como predominantes resultaron resistentes a este metal. Algunos autores han estudiado los mecanismos de resistencia y/o acumulación de litio. Estos implican la producción de osmoprotectores como glicina, trehalosa y, ectoína, también es de importancia en la resistencia la expresión de

enzimas del ciclo TCA para producir oxalacetato y la producción de ácidos teicoicos, que le confieren carga negativa a la superficie celular de Gram positivos permitiéndoles “acumular” cationes metálicos (Belfiore et al., 2018; Karatan et al., 2005; Wotanis et al., 2017; Cubillos et al., 2018; Salazar-Ardiles et al., 2020; Chen et al., 2020); en concordancia las rutas metabólicas de la producción de estos compuestos han sido predichas en este grupo (Figura 4.23). Dentro de los mecanismos de resistencia a condiciones desfavorables que se predijeron en este grupo se encontraron también rutas de producción y resistencia a antibióticos (Figura 4.24). El antibiótico polimixina es producido por un *Bacillus* y es efectivo contra bacterias Gram negativas como *Pseudomonas* y algunas *Enterobacterias*, siendo *Burkholderiaceae* naturalmente resistente (Olaitan et al., 2014). Por lo que podríamos sugerir que dentro de la comunidad microbiana del Grupo 3 miembros de *Bacillaceae* y *Burkholderiaceae* tendrían la potencialidad genética de ganar la competencia con otras familias por un nicho específico, produciendo y/o resistiendo, por ejemplo, a la polimixina.

Las condiciones adversas como baja humedad, alta concentración de hidrocarburos y metales, actividad biológica disminuida, la presencia de microorganismos con capacidad de esporular, microorganismos tolerantes a metales y la predicción de mecanismos de resistencia a factores ambientales sugieren que los microorganismos de este grupo se encontrarían resistiendo las condiciones y no necesariamente degradando hidrocarburos, a pesar de que presentan la potencialidad de hacerlo. Sin embargo, más estudios deberán realizarse para corroborarlo.

Capítulo 5



Efecto de la
aireación sobre la
biorremediación
de sedimentos
afectados con
hidrocarburos

5. Efecto de la aireación sobre la biorremediación de sedimentos afectados con hidrocarburos

El objetivo de este capítulo fue estudiar el efecto de la bioestimulación con aire sobre la estructura de la comunidad microbiana de sedimentos antropizados. Para ello, se diseñó un ensayo de microcosmos a escala de laboratorio, explicado en detalle en la Sección 3.12 de Materiales y Métodos, donde el agua y los sedimentos del curso de agua fueron colocados en frascos de vidrio y desafiados a dos condiciones diferentes: aireación forzada mediante burbujeo en la columna de agua, (Ai) y sin aireación artificial (SAi). El experimento se llevó a cabo durante 280 días a una temperatura de 24°C, con un fotoperiodo de 14 h de luz (Figura 5.1). Se incluyeron 4 o 6 réplicas biológicas para cada tiempo estudiado. Los microcosmos fueron estudiados en 4 tiempos de incubación (1, 30, 90 y 280 días) y se les realizaron diferentes determinaciones. Sobre la mitad de las réplicas biológicas de cada tiempo, se determinó el contenido de hidrocarburos totales. Sobre la otra mitad de las réplicas se determinó la concentración de oxígeno disuelto en el agua, y en los sedimentos las actividades enzimáticas, el número de copias del gen 16S rRNA y de genes funcionales de degradación de hidrocarburos. Por último, se secuenció la región V4 del gen 16S rRNA de los extractos de ADN de cada condición y se realizaron análisis de diversidad, asignación taxonómica y predicciones funcionales. Con el fin de comparar los tratamientos, se realizaron análisis de la varianza (ANOVA), y en caso de no cumplir los supuestos se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal – Wallis. El análisis post-hoc se realizó mediante prueba de Tukey.

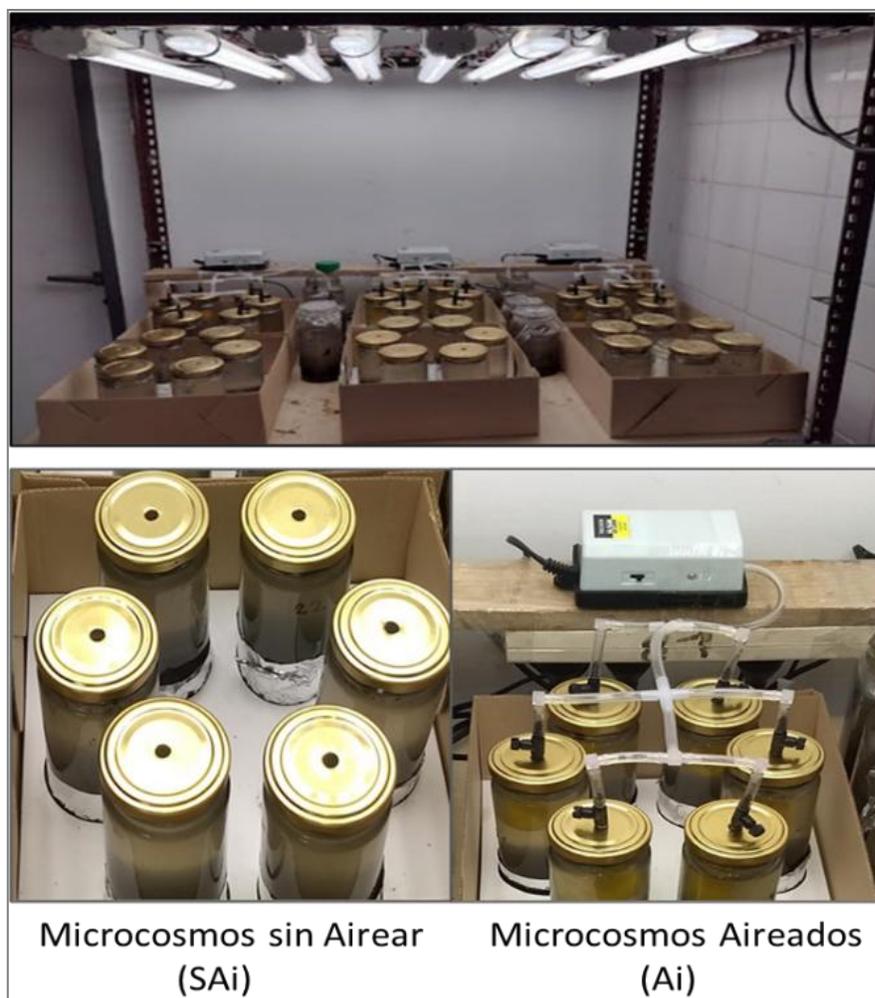


Figura 5.1: Microcosmos de agua y sedimentos del curso de agua. SAi: condición sin airear, Ai: condición con aireación forzada.

5.1 Determinación de oxígeno disuelto en el agua

En cada tiempo de muestreo se determinó espectrofotométricamente la concentración de oxígeno disuelto en el agua de los microcosmos (Sección 3.12.2). Los valores promedio de concentración de oxígeno (mg/l) para ambas condiciones en los tiempos estudiados se observan en la Figura 5.2. Los microcosmos sin airear (SAi) mostraron valores de oxígeno disuelto que estuvieron significativamente por debajo de los determinados en los aireados (Ai) en los tres primeros tiempos del ensayo. Se observó que la concentración de oxígeno de ambas condiciones aumentó respecto de la concentración inicial (día 1) y que a los 280 días no hubo diferencias significativas entre las condiciones. Sin embargo, en ninguna se alcanzó el valor de saturación de oxígeno en agua de 8,4 mg/l a 24°C, 1 atm y salinidad cero (VLMP, 2021).

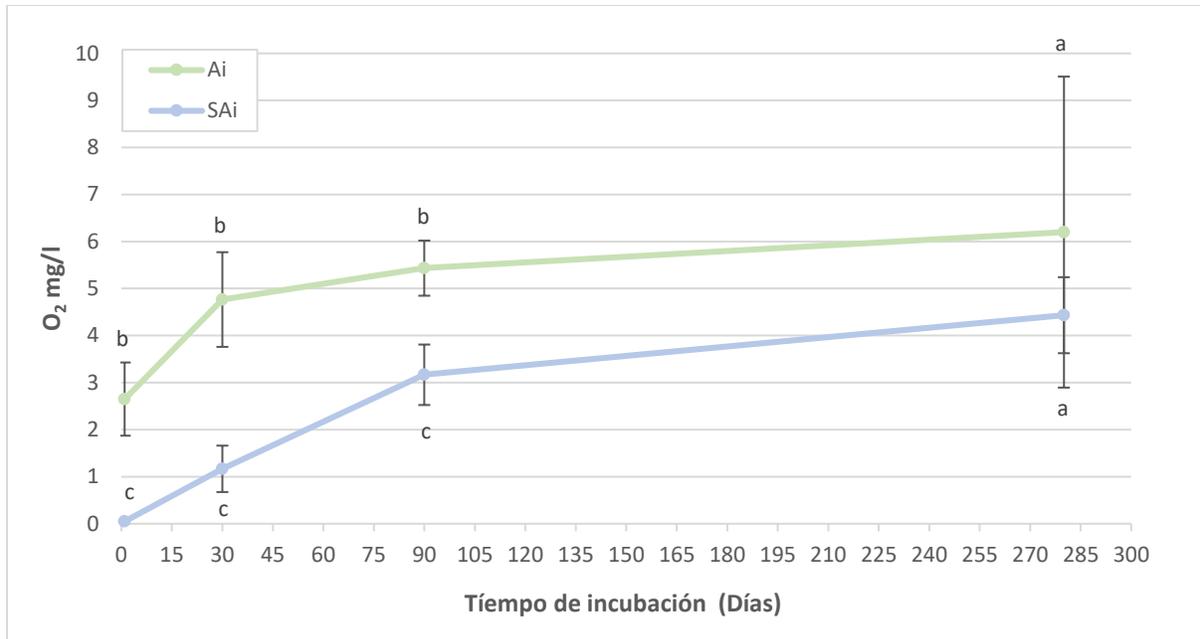


Figura 5.2: Concentración de oxígeno disuelto (mg/l) en agua de los microcosmos Ai y SAi. Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA $p < 0,05$).

5.2 Características macroscópicas de los sedimentos

En la Figura 5.3 se muestra como evolucionaron los sedimentos de los microcosmos en las condiciones Ai y SAi a lo largo del tiempo del ensayo. Puede observarse que en ambas condiciones los sedimentos sufrieron una estratificación con aparición de coloración verde, magenta, blanca, ocre y negro que se hace más evidente hacia los 280 días, así como también puede advertirse la formación de un biofilm en las aguas de los sistemas.

La Figura 5.4 A muestra en detalle las estratificaciones en los microcosmos al finalizar el ensayo y la Figura 5.4 B es una fotografía de las columnas de Winogradsky realizadas con la mezcla de los sedimentos de cada sitio del curso de agua estudiado en este trabajo, ensambladas inmediatamente después de los muestreos. Se advierte que las estratificaciones observadas en los microcosmos se asemejan a las obtenidas en las columnas de Winogradsky.

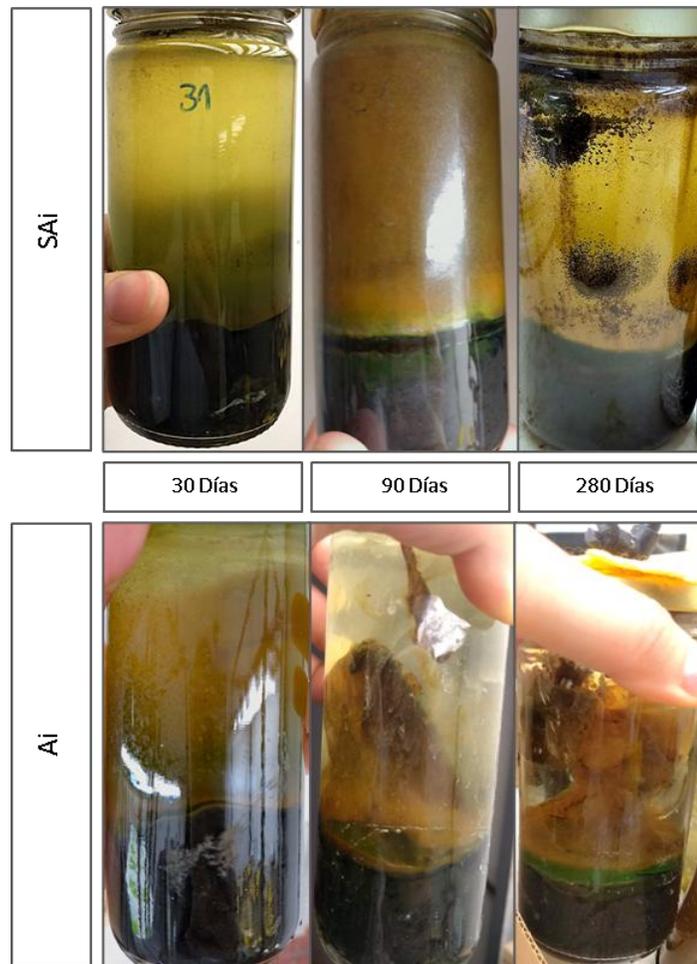


Figura 5.3: Características macroscópicas de los microcosmos Ai (abajo) y SAi (arriba) durante los 280 días de ensayo.

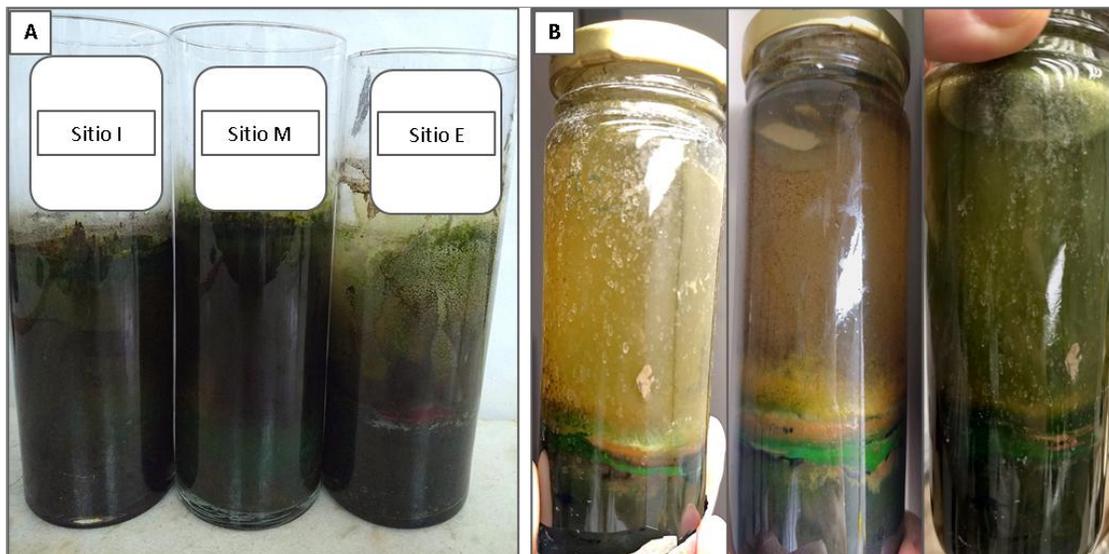


Figura 5.4: A- Columnas de Winogradsky realizadas a partir de los sedimentos de los sitios I, M y E del curso de agua. B- Microcosmos de las distintas condiciones a los 280 días de ensayo.

5.3 Determinación de las actividades enzimáticas en los sedimentos

La actividad metabólica microbiana en Ai y SAi fue estudiada mediante la actividad deshidrogenasa, lipasa, proteasa y ureasa. En las Figuras 5.5 y 5.6 se observa que para ambas condiciones la actividad deshidrogenasa y lipasa aumentan significativamente hacia los 90 días donde presentan un máximo. La actividad deshidrogenasa a los 280 días se encontró incrementada en comparación con el inicio del experimento, a diferencia de la actividad lipasa, que resultó presentar valores similares al final y al inicio del experimento. Para ambas enzimas, no se registraron diferencias significativas entre las condiciones de incubación Ai y SAi.

Las actividades proteasa y ureasa se muestran en la Figura 5.7 y 5.8 respectivamente. En los microcosmos de ambas condiciones se detectó un aumento de actividad proteasa a los 30 días. Los valores de actividad proteasa obtenidos a tiempos más largos estuvieron muy cerca del límite de cuantificación y fueron comparables con los del inicio de experimento. En los microcosmos Ai la actividad proteasa a los 280 días fue significativamente mayor que su actividad inicial y mayor que la determinada en los microcosmos SAi. La actividad ureasa (Figura 5.8) se incrementó significativamente a los 90 días en las dos condiciones, en comparación con el valor obtenido al inicio del experimento. Este incremento de actividad se mantuvo hasta los 280 días.

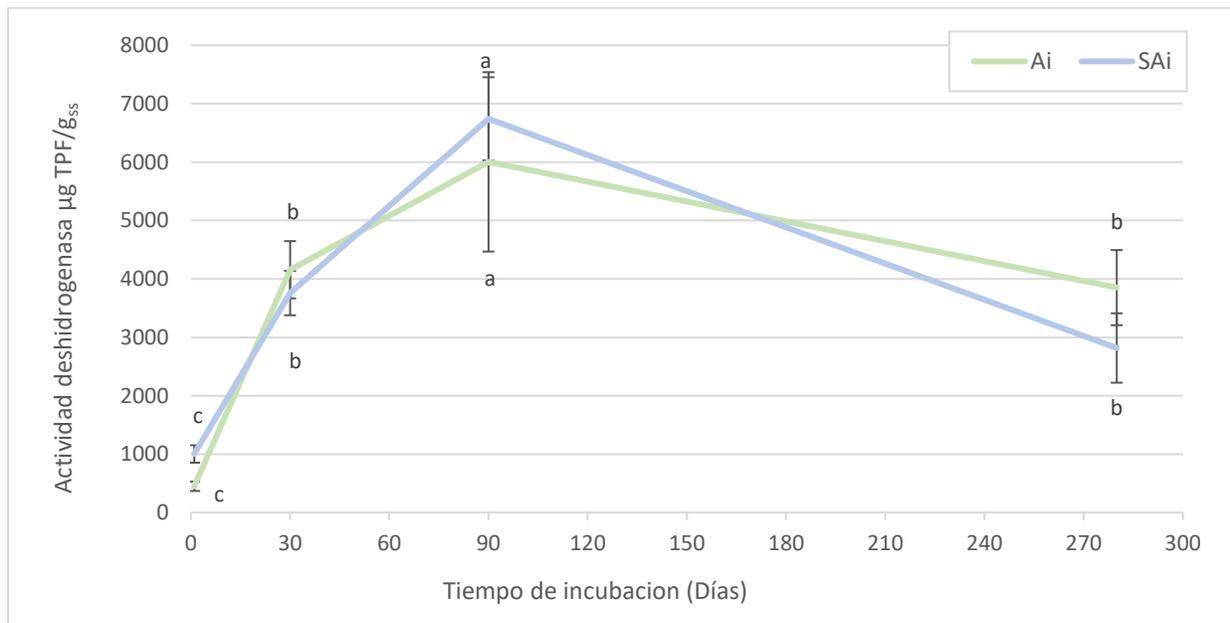


Figura 5.5: Actividad deshidrogenasa (µg TPF/g_{ss}) en sedimento de los microcosmos Ai y SAi. Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA, p < 0,05).

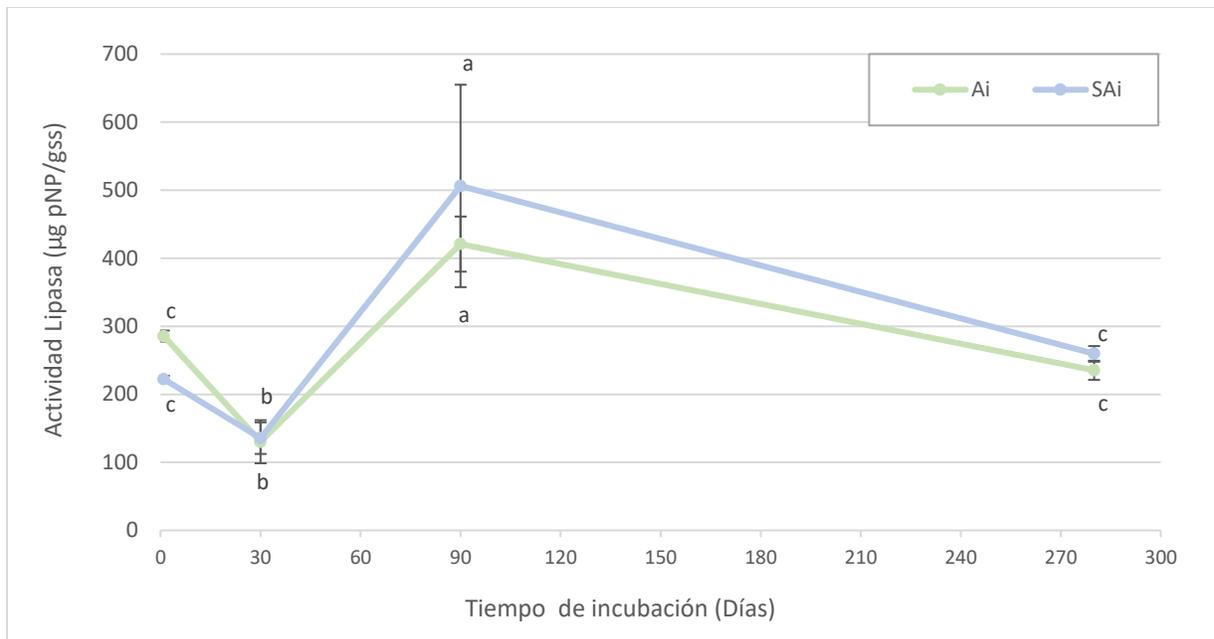


Figura 5.6: Actividad Lipasa ($\mu\text{g pNP/g}_{\text{ss}}$) en el sedimento de los microcosmos Ai y SAi. Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA, $p < 0,05$).

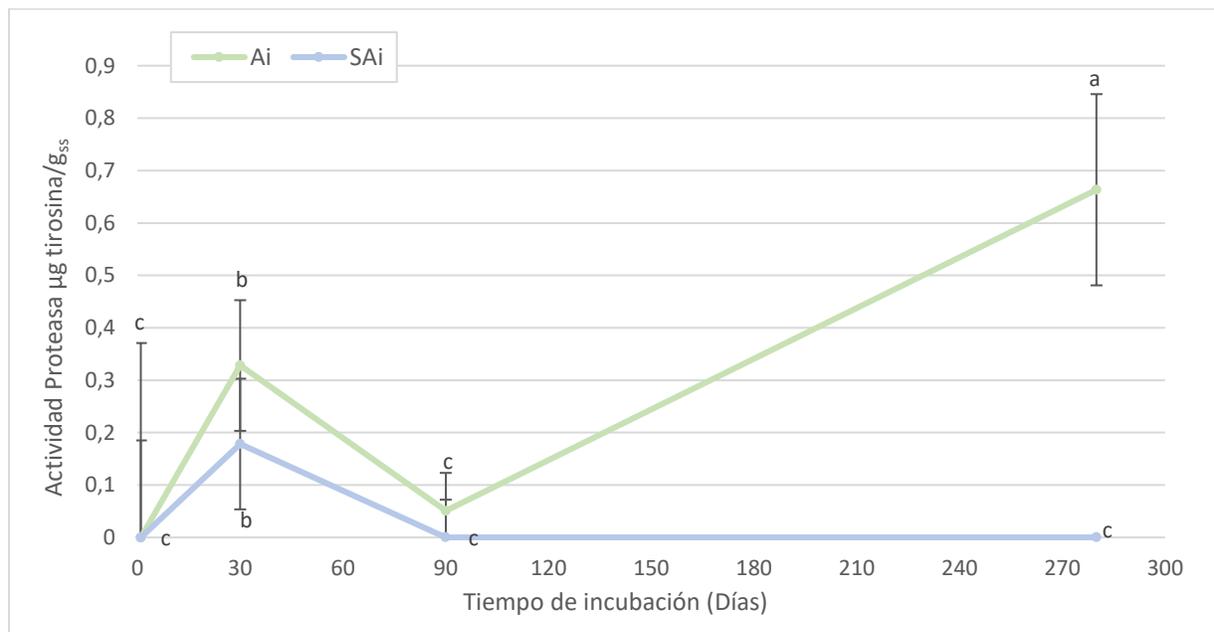


Figura 5.7: Actividad Proteasa ($\mu\text{g tirosina/g}_{\text{ss}}$) en el sedimento de los microcosmos Ai y SAi. Letras diferentes indican diferencias significativas (Kruskal Wallis, $p < 0,05$).

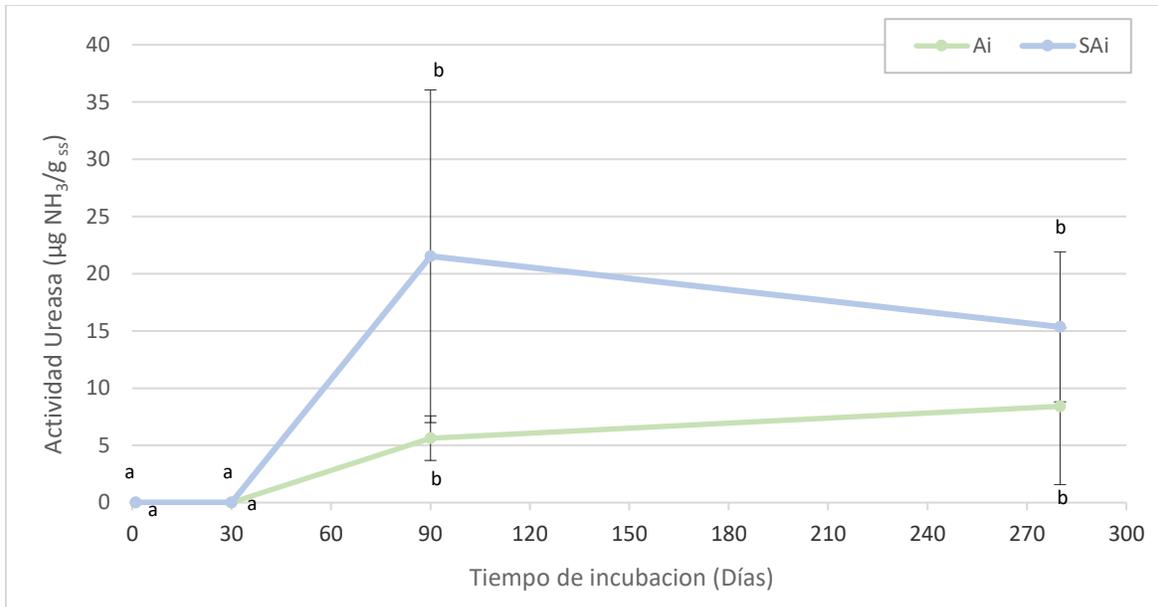


Figura 5.8: Actividad Ureasa ($\mu\text{g NH}_3/\text{g}$ sedimento seco) en el sedimento de los microcosmos Ai y SAi. Letras diferentes indican diferencias significativas (Kruskal Wallis, $p < 0,05$).

5.4 Determinación de la concentración de hidrocarburos totales

La concentración de hidrocarburos totales C10 a C40 (HT), se determinó para cada uno de los tiempos de incubación estudiados en los microcosmos Ai y SAi mediante cromatografía gaseosa (GC-FID) (Sección 3.2.9.4). En la Figura 5.9 se muestran los resultados obtenidos. La concentración de HT en ambas condiciones se mantuvo sin diferencias significativas durante los días 1, 30 y 90 y presentó un aumento hacia los 280 días.

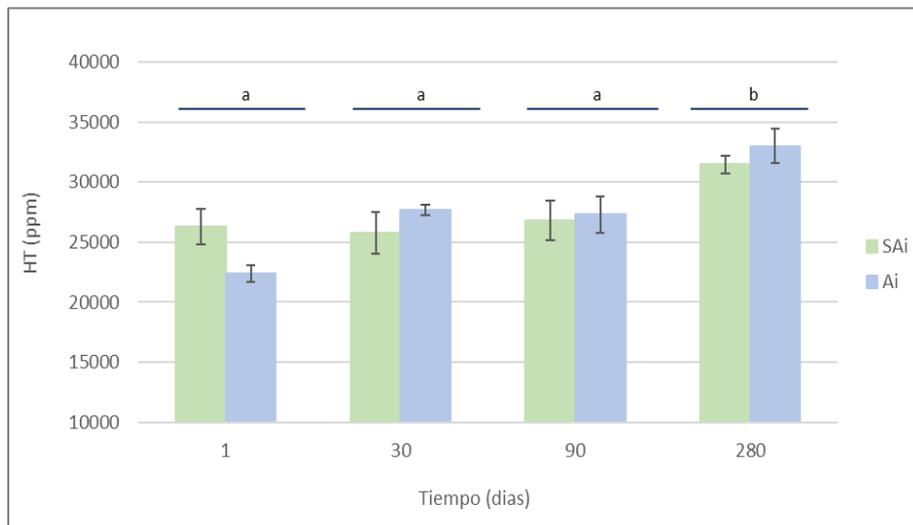


Figura 5.9: Concentración de hidrocarburos totales C10-C40 (HT) (ppm) por cromatografía gaseosa (GC-FID) en el sedimento de los microcosmos Ai y SAi. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tiempos de incubación (ANOVA, $p < 0,05$).

5.5 Cuantificación del gen 16S rRNA y de genes funcionales de degradación de hidrocarburos

A partir del ADN total extraído de los sedimentos de los microcosmos en todos los tiempos del ensayo, se determinó el número de copias del gen 16S rRNA y de los genes funcionales *c230*, *PAHRHD-GN*, *alkB*, *bamA* y *bssA* mediante cuantificación por qPCR. En la Figura 5.10 se muestran los resultados de la cuantificación del número de copias del gen 16S rRNA/ng de ADN extraído. Independientemente de las condiciones de aireación, el número de copias varió levemente, manteniéndose próximo a 1×10^5 copias/ng ADN hasta los 90 días del ensayo. Un incremento significativo fue observado a los 280 días con respecto a los tiempos anteriores para ambas condiciones (Ai y SAi). En la Figura 5.11 A se presentan los resultados de la cuantificación del gen que codifica la enzima catecol 2,3 dioxigenasa (*c230*), la cual participa en el meta clivaje del catecol, en la vía de degradación aeróbica de hidrocarburos aromáticos. Fue posible detectar una disminución significativa del número de copias *c230*/ng ADN en los días 30 y 280 con respecto a la cuantificación inicial. Los resultados de la cuantificación del gen *PAH-RHD α GN*, el cual codifica la subunidad alfa de una enzima dioxigenasa en bacterias Gram negativas, se muestran en la Figura 5.11 B. El número de copias de este gen/ng ADN se mantuvo en valores similares durante todo el ensayo, observando una disminución a los 30 días en comparación con el final del experimento (280 días). Análogamente a lo observado en la cuantificación del gen *c230*, los valores fueron menores a 1×10^2 copias/ng ADN. En la Figura 5.11 C se observan los resultados de la cuantificación de gen *alkB* que codifica una enzima monooxigenasa de la degradación aeróbica de alcanos. El número de copias de este gen, aunque también fue baja en ambas condiciones, disminuye significativamente al finalizar el experimento (280 días) respecto de la cuantificación inicial. Los análisis estadísticos realizados para las cuantificaciones del gen 16S rRNA y de los 3 genes funcionales marcadores de degradación aeróbica, mostraron que existieron diferencias significativas entre los tiempos del ensayo, pero no entre las condiciones Ai y SAi.

A diferencia de los genes seleccionados como marcadores de degradación aeróbica, los genes *bamA* y *bssA* seleccionados como marcadores de degradación anaeróbica, fueron detectados en mayor concentración durante el ensayo. El gen *bamA* codifica la enzima 6-oxociclohex-1-ene-1-carbonilCoA hidrolasa de la ruta de degradación anaeróbica de Benzoil-CoA. En la Figura 5.11 D se observa que el número de copias durante el ensayo varió alrededor de 1×10^3 copias/ng ADN. Durante los tres primeros tiempos de incubación (días 1, 30 y 90), el valor fue significativamente menor en los microcosmos SAi que en los Ai. Luego el número se incrementa significativamente en los SAi respecto de los Ai a los 280 días. A diferencia de las cuantificaciones de los otros genes de degradación, este gen mostró diferencias significativas entre las condiciones de aireación, y no entre los tiempos del ensayo. Finalmente, se cuantificó el gen *bssA* que codifica la subunidad α de la enzima bencilsuccinato sintasa, vinculada con la degradación anaeróbica de hidrocarburos aromáticos. En la Figura 5.11 E se observa que el número de copias/ng ADN, inicialmente detectado en el orden de 1×10^1 , aumenta aproximadamente 3 órdenes de magnitud,

a los 90 días, en ambas condiciones de aireación. No se hallaron diferencias significativas entre las condiciones de incubación de los microcosmos.

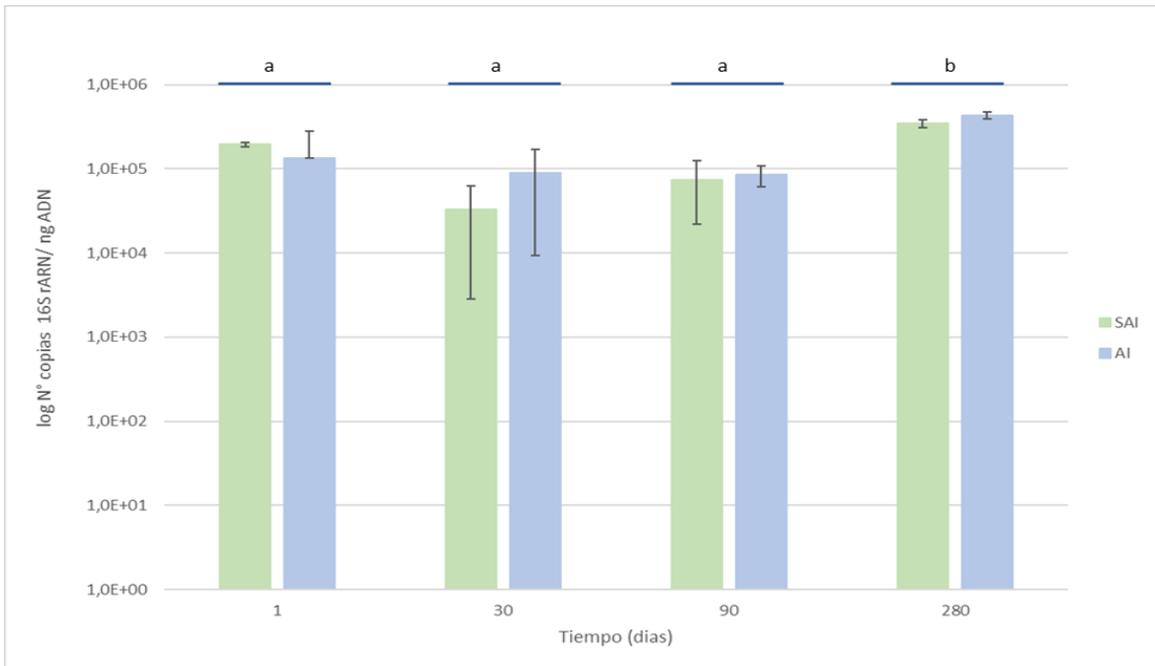


Figura 5.10: Cuantificación del gen 16S rRNA por qPCR en el sedimento de los microcosmos Ai y SAi. Los resultados están expresados en log número de copias del gen16S rRNA/ ng de ADN de sedimento. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre los tiempos de incubación. (ANOVA y prueba de Tukey, $p < 0,05$)

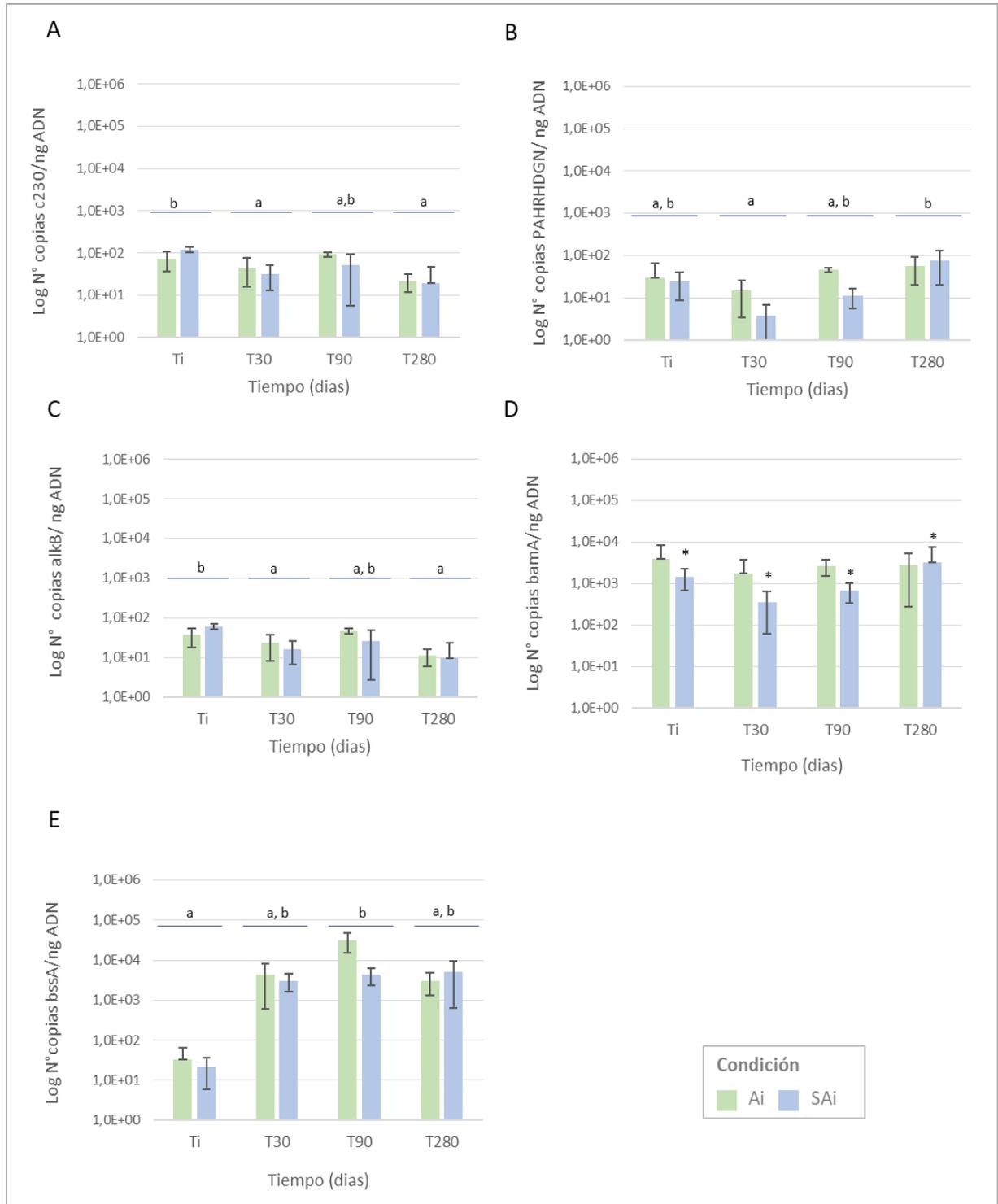


Figura 5.11: Cuantificación de genes de degradación aeróbica *c230* (A), *PAHRHD GN* (B) y *alkB* (C) y anaeróbica *bamaA* (D) y *bssA* (E) por qPCR. Los resultados están expresados como log del promedio N° de copias del gen/ng de ADN de sedimento. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre los tiempos de muestreo mientras que los asteriscos indican diferencias significativas entre condiciones de incubación Ai y SAi (ANOVA, p<0,05).

5.6 Estudio de la diversidad de las comunidades microbianas en los microcosmos

Mediante la secuenciación de la región V4 del gen 16S rRNA se estudió la estructura de la comunidad microbiana de 22 muestras de sedimentos de los microcosmos Ai y SAi, a los días 1, 30, 90 y 280 de incubación. El rango de lecturas obtenidas varió entre 145446 y 78530 que corresponden a un total de 8813 ASVs. Se decidió rarefaccionar al menor número de lecturas (78530) para el posterior análisis de diversidad. Una vez llevadas las muestras al mismo número de lecturas, se mantuvieron 8612 ASVs que representan un 97,7% de las ASVs totales iniciales.

5.6.1 Diversidad alfa

Para el estudio de la diversidad alfa, se calcularon el número de ASVs observados “Observed” y el índice de Chao1, que fueron utilizados para estimar la riqueza en los microcosmos, y los índices de Shannon y Simpson, como estimadores de la diversidad. En todos los índices calculados se observó que no existieron diferencias significativas entre las condiciones Ai y SAi, pero sí entre los tiempos de incubación. La riqueza medida como número de ASVs observados (Observed) en los microcosmos se incrementó a los 30 días en comparación con el inicio y el final del experimento. De manera similar, el índice de riqueza de Chao disminuyó a los 280 días en comparación con el día 30 (Figura 5.12). Los índices de diversidad de Shannon y Simpson están representados en la Figura 5.13, donde puede observarse que la diversidad en los microcosmos a los 30 y 90 días fue mayor con respecto a la diversidad al inicio y al final del experimento.

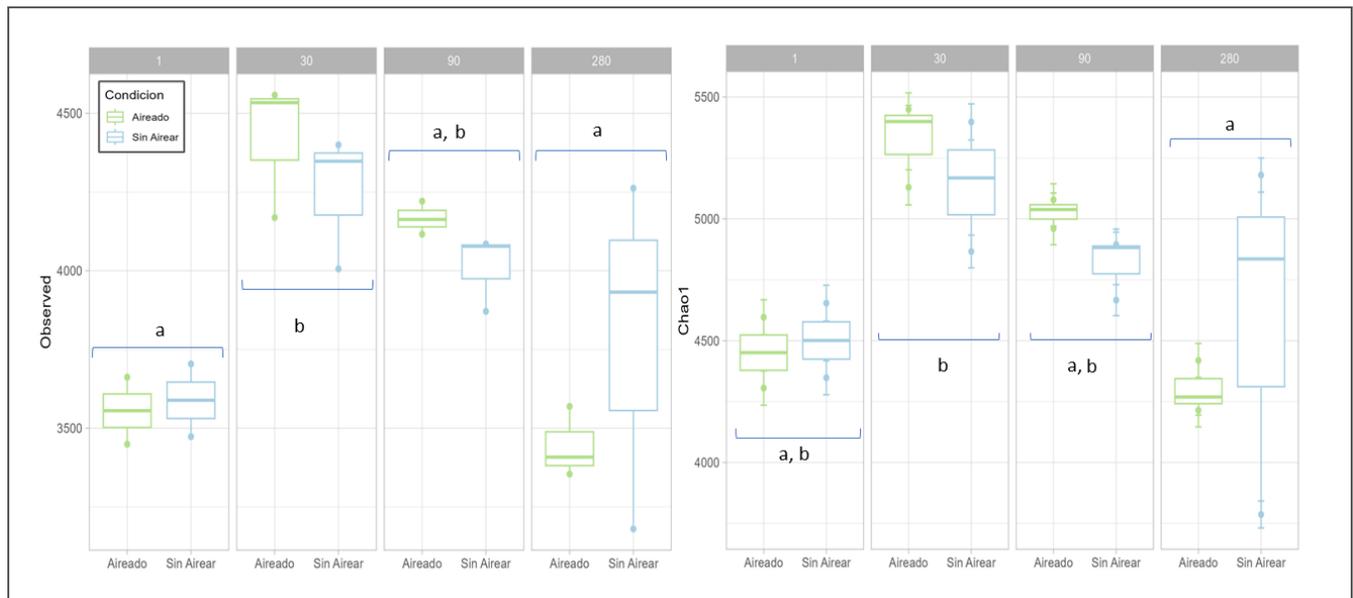


Figura 5.12: Diversidad Alfa. Índices de riqueza “Observed” (número de ASVs en cada muestra) (izquierda) y Chao1(derecha). Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los tiempos de incubación para cada índice (Kruskal Wallis, $p < 0,05$).

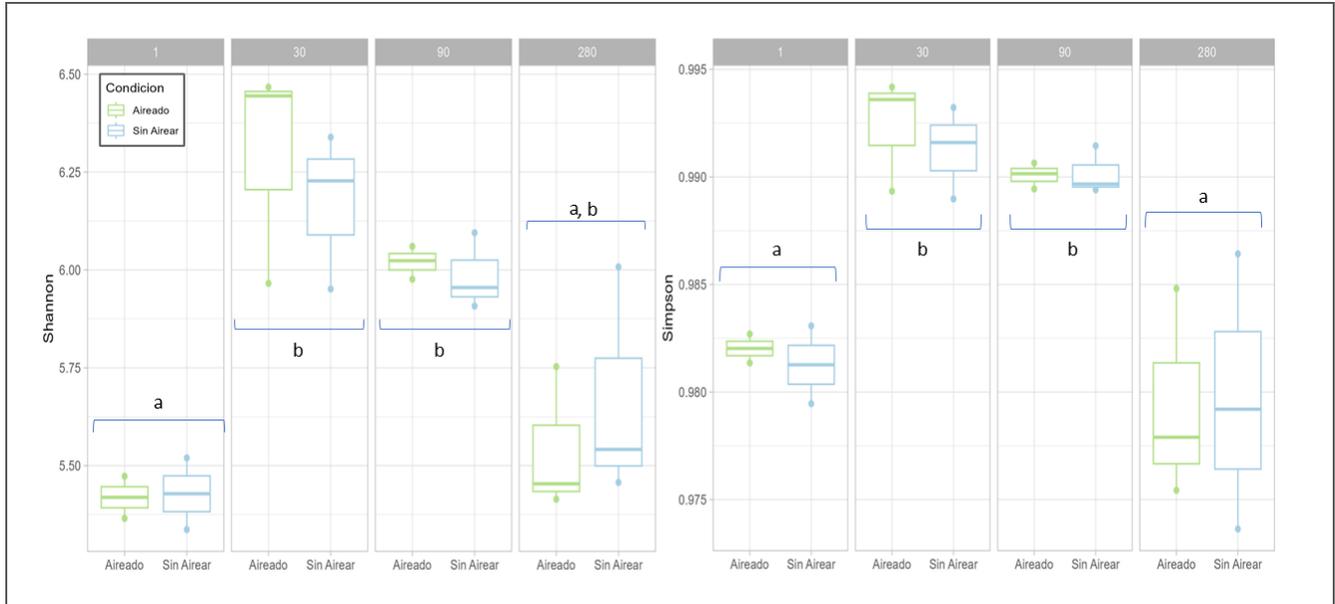


Figura 5.13: Diversidad Alfa. Índices de diversidad de Shannon (derecha) y Simpson (izquierda). Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los tiempos de incubación para cada índice, (Kruskal Wallis, $p < 0,05$).

5.6.2 Diversidad beta

Posteriormente, se estudió la diversidad beta mediante un análisis de coordenadas principales (PCoA) utilizando como medida de disimilitud la distancia de Bray Curtis, cuyo resultado se muestra en la Figura 5.14. Puede observarse que al inicio del experimento las comunidades microbianas desarrolladas bajo ambas condiciones se agruparon en una misma zona del PCoA. Entre los 30 y 90 días, las comunidades resultaron estar próximas entre sí. A los 280 días, se observó mayor separación entre las muestras estudiadas. El análisis estadístico indicó que existían diferencias significativas entre las comunidades microbianas según el tiempo de incubación pero que estas no diferían según la condición de aireación aplicada.

5.6.3 Asignación taxonómica

Se estudió la composición taxonómica de las comunidades en los microcosmos. En la Figura 5.15 se muestran los 12 filos más abundantes. Se puede evidenciar que no hubo grandes diferencias en los filos entre las condiciones de aireación, en ninguno de los tiempos muestreados. En el día 1 los filos predominantes fueron Proteobacteria, seguido en menor abundancia por Chloroflexi, Firmicutes y Acidobacteriota. En los días 30 y 90 el filo Proteobacteria siguió siendo el predominante, sin embargo, su abundancia relativa disminuye respecto del día 1 y las comunidades se enriquecen en los filos Chloroflexi, Bacteroidota, Firmicutes, Desulfobacterota y Caldisericota. Finalmente, a los 280 días los microcosmos presentaron un notable aumento en las abundancias de los filos Bacteroidota, Cyanobacteria y Planctomycetota.

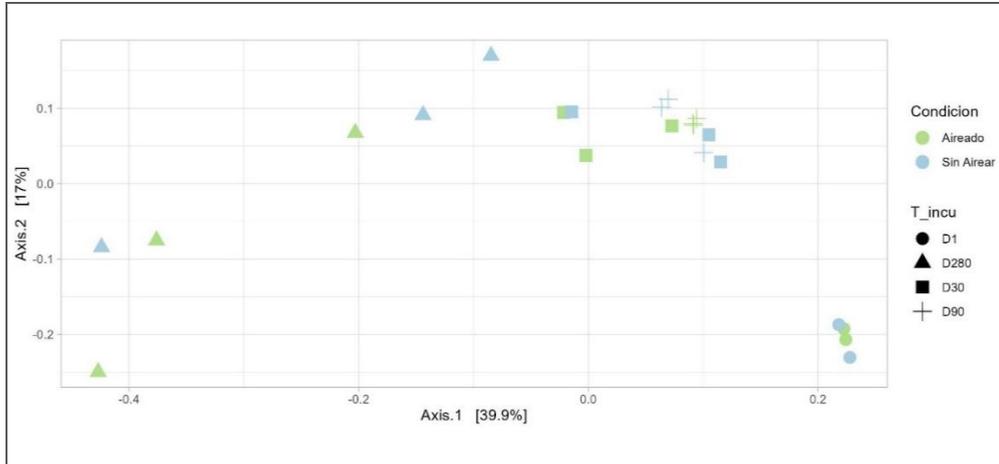


Figura 5.14: Análisis de coordenadas principales (PCoA) basado en la medida de disimilitud de Bray Curtis. Condición Aireado (Ai, en verde), Sin Airear (SAi, en celeste). Los días de incubación se referencian con distintas figuras geométricas. (PERMANOVA, Adonis2, 999 permutaciones).

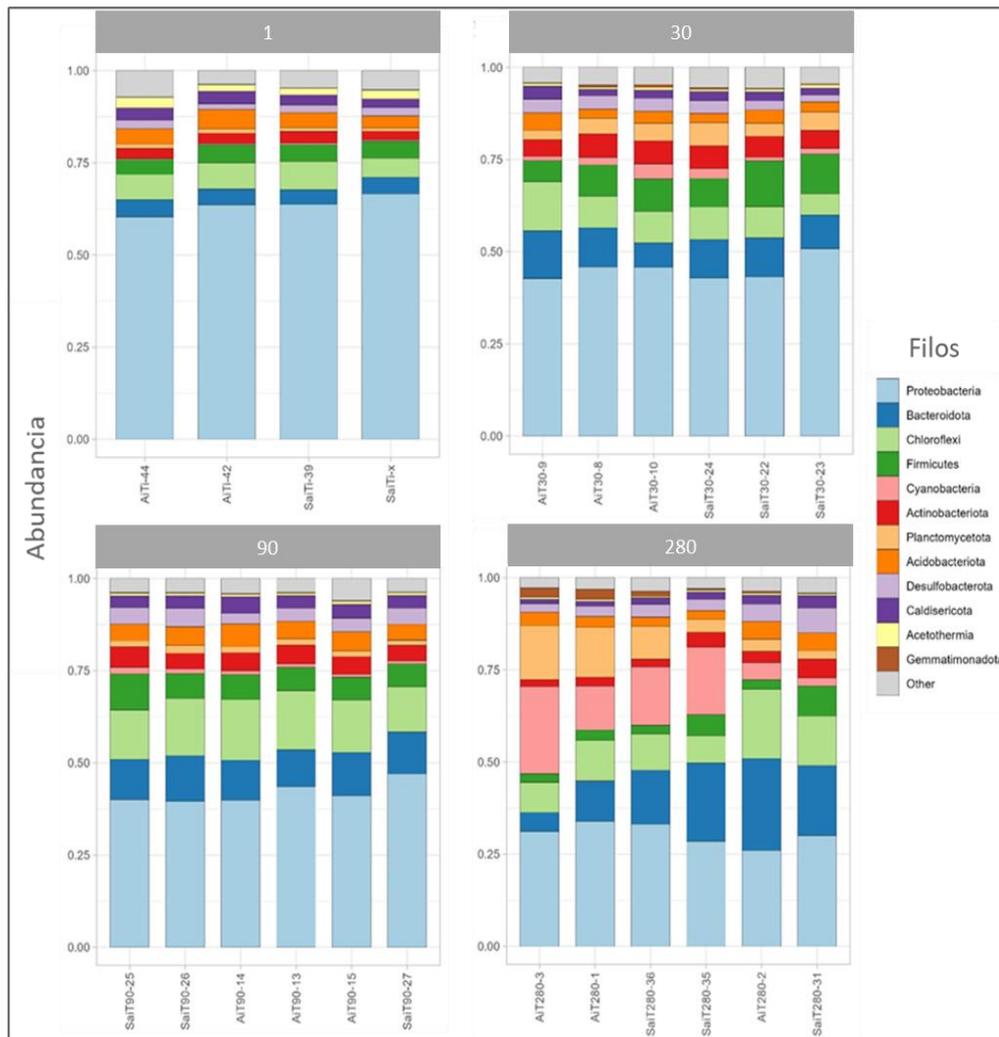


Figura 5.15: Abundancia relativa a nivel filo en los microcosmos Ai y SAI en los días 1, 30, 90 y 280. Se representan los 12 filos más abundantes y el resto se agrupan en la categoría "Other".

Se estudió también la diversidad a nivel de las familias mayores al 5% de abundancia relativa en al menos una muestra. Los resultados de cada tiempo y condición de aireación están representados en la Figura 5.16. Se observa para ambas condiciones de aireación, que a los 30, 90 y 280 días la abundancia relativa de las familias *Anaerolineaceae*, *Flavobacteriaceae*, *Lachnospiraceae* y *Xanthobacteraceae* se incrementaron respecto del día 1 mientras que las familias *Commamonadaceae*, *Rhodocyclaceae* e *Hydrogenophilaceae* disminuyeron. A los 280 días se observó en ambas condiciones un incremento en las familias *Chlorobiaceae*, *Gemmataceae*, *Nodosilineaceae*, *Nostocaceae*, *Phycisphaeraceae* y la familia “*Unknown_Family*” perteneciente a la clase Cyanobacteria orden Oxyphotobacteria_Incerta_Sedis. Las familias *Phormidicaeae*, *Neisseriaceae*, *Microscillaceae*, *JG30-KF-AS9*, *BSV26* y familias del orden Aminicenantales, cuyas abundancias relativas fueron aproximadamente constantes durante todos los tiempos y condiciones.

Dado que no se han hallado diferencias significativas en la diversidad entre las comunidades microbianas de los microcosmos, según la condición de aireación se procedió a estudiar el efecto del tiempo de incubación sobre las comunidades microbianas a nivel de familias. Para esto, se agruparon los microcosmos de cada condición en los distintos tiempos de muestreo y se utilizó la herramienta ANCOM-BC para realizar un análisis de abundancia diferencial a nivel de todas las familias asignadas (Lin y Peddada, 2020). En la Figura 5.17 se muestra un heatmap con los resultados de la abundancia diferencial a nivel de familia en los microcosmos, expresados como el logaritmo de la variación doble (“fold change”) en comparaciones de a pares de los tiempos de ensayo. En color rojo se indican aquellas familias que están aumentadas en alguno de los tiempos de muestreo y en azul oscuro aquellas disminuidas significativamente respecto de otro tiempo. Se puede observar que hubo un aumento diferencial en la abundancia de las familias: *Nostocaceae*, *Oxyphotobacteria_Incerta_Sedis_Unknown_family*, *Chlorobiaceae*, *Microscillaceae*, familias del orden Acetobacterales, *Gemmataceae*, *Chloroflexaceae* y *Om 190* a lo largo del experimento. Además, se observó una disminución diferencial de las familias *Sulfurimonadaceae*, *Aeromonadaceae*, *Rhodocyclaceae*, *Halothiobacillaceae* y *Omnitrophaceae* hacia los 280 días.

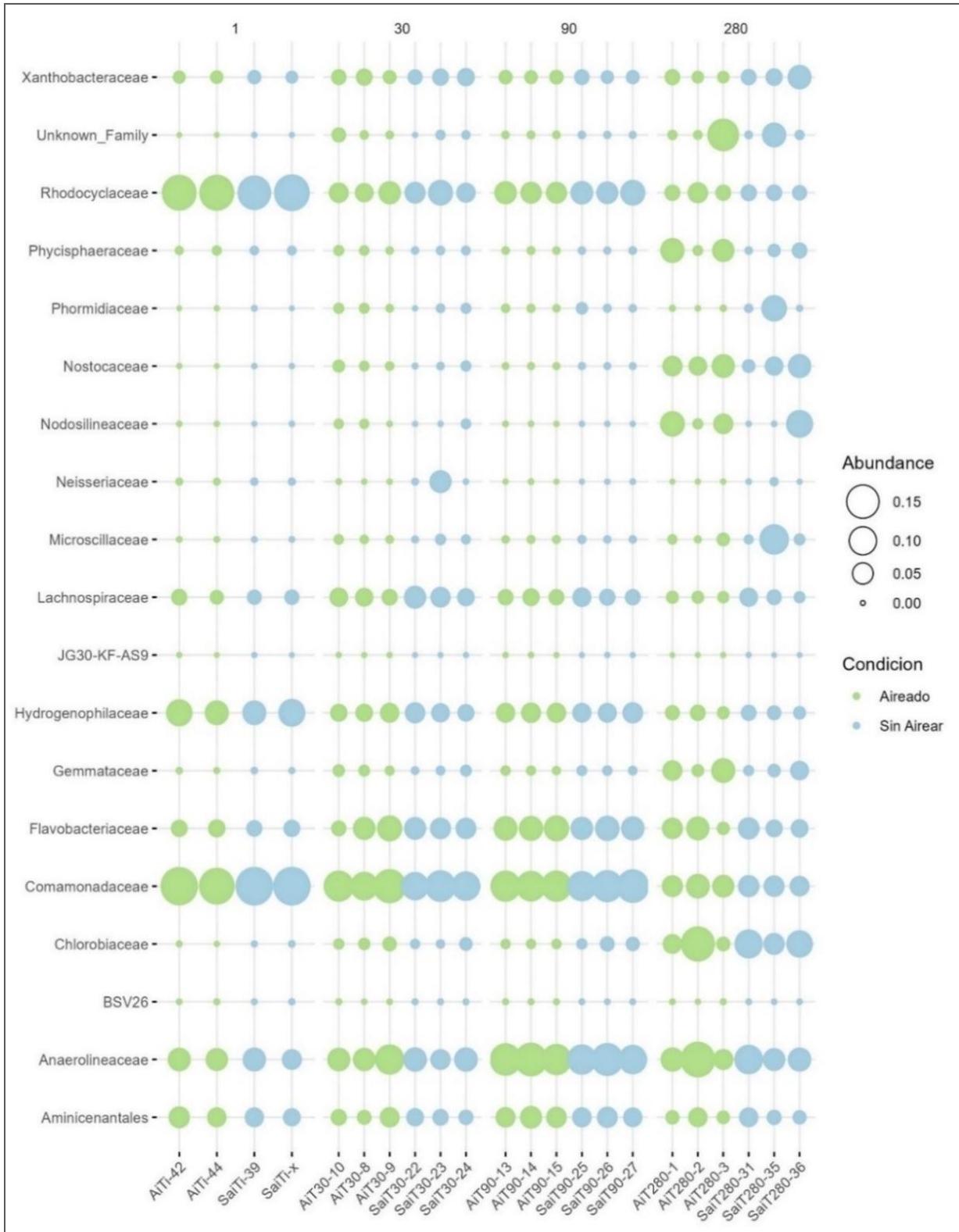


Figura 5.16: Abundancia relativa de las familias mayoritarias (mayores al 5% en al menos una muestra) en los sedimentos de los microcosmos Ai y Sai en los tiempos 1, 30, 90 y 280 de muestreo.

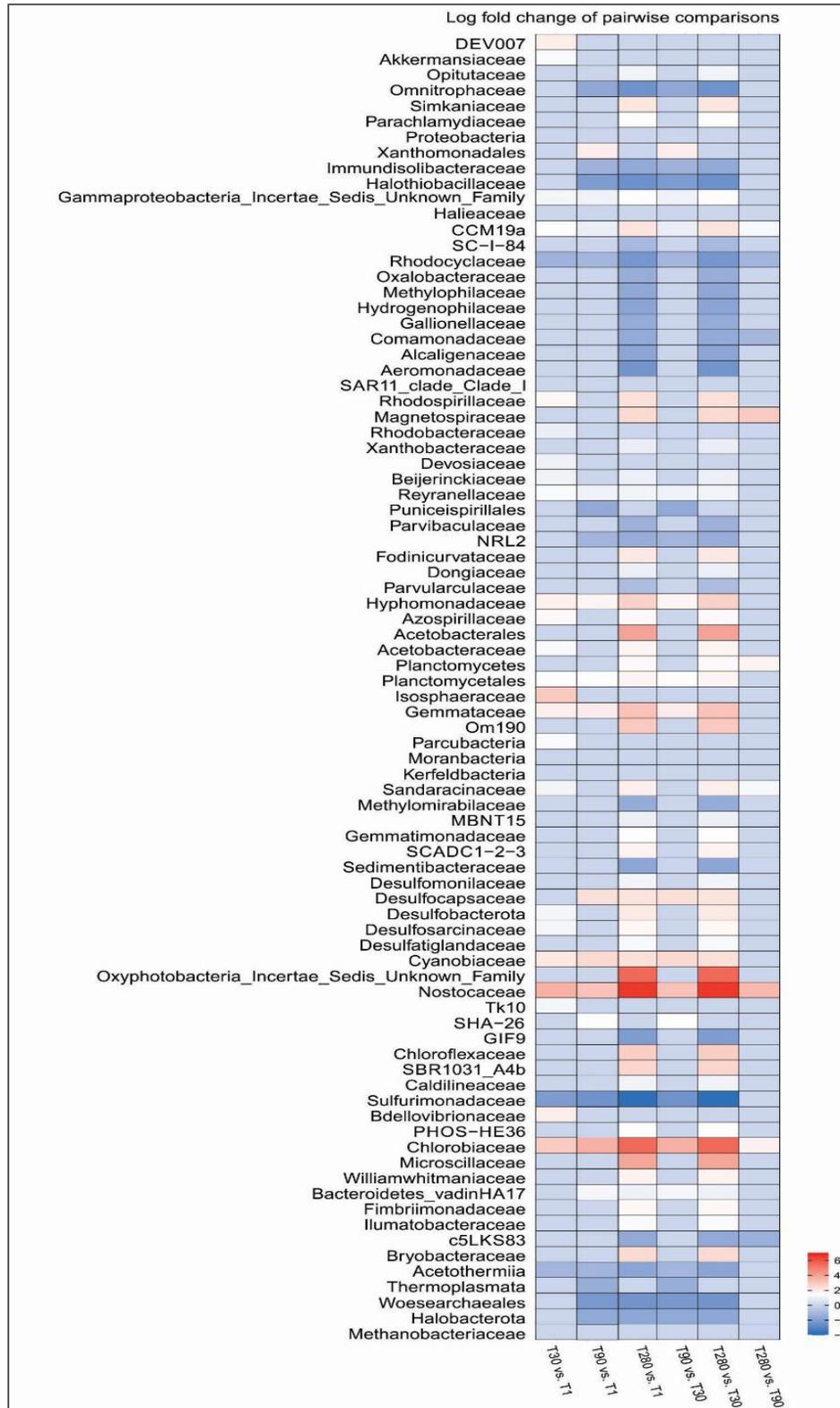


Figura 5.17: Análisis de la abundancia diferencial de las comunidades de los microcosmos nivel de familia calculadas con ANCOM-BC ($p < 0.05$, método de ajuste holm, comparaciones múltiples con test direccional con control mdFDR por método de holm). La intensidad del color refleja la magnitud del logaritmo del fold change (lfc). Cada columna indica el par de tiempos comparado, donde en segundo lugar se indica la condición de referencia para la comparación.

5.7 Predicciones de los KOs de degradación de compuestos xenobióticos

Se utilizó el software PICRUSt2 para obtener predicciones funcionales a partir de los resultados de la secuenciación de amplicones 16S rRNA de los sedimentos de los microcosmos. Los valores de NSTI obtenidos para la mayoría de las 22 muestras estudiadas fueron menores a 0,17, valor incluido entre los considerados típicos de suelos (Tabla anexa TA7). Se predijeron en total 7885 KOs, de los que se seleccionaron aquellos vinculados con la degradación de compuestos xenobióticos. Para tal fin, se confeccionó una lista con los KOs de vías de degradación de xenobióticos (426) obtenidos de KEGG Orthology (KO)¹³, y se realizó un subset a partir de los KOs totales predichos utilizando la herramienta Phyloseq en Rstudio. Una vez seleccionados los KOs de degradación de compuestos xenobióticos, se realizó un análisis de abundancia diferencial con ANCOM-BC procediendo de forma análoga que en la sección anterior (comparando los tiempos de muestreo y no las condiciones). La Figura 5.18 muestra un heatmap de la abundancia diferencial de los 96 KOs de degradación de compuestos xenobióticos con diferencias significativas en los distintos tiempos de incubación de los microcosmos.

Se observaron incrementos o disminuciones significativos hacia el final del experimento (280 días) en los KOs que se detallan a continuación. Se encontró aumentado K00106 y K00129 que codifican la xantina deshidrogenasa/oxigenasa y la enzima aldehído deshidrogenasa vinculada con el metabolismo de xenobióticos a través del citocromo P450, respectivamente. Los grupos ortólogos K01563, K02591 y K02586 relacionados con la degradación de hidrocarburos clorados también se vieron incrementados. El primero codifica la enzima haloalcano-dehalogenasa (gen *dhaA*), mientras que K02591 y K02586 codifican la subunidad alfa y la beta, de la proteína molibdeno-hierro de la enzima nitrogenasa (genes *nifK* y *nifD*) respectivamente. La abundancia de los grupos ortólogos K18067, K18068, K18069 y K04102 también se incrementó a los 280 días. Los primeros dos se incrementaron con respecto al día 90, y en el caso de los dos siguientes con respecto a todos los tiempos de incubación. Estos 4 KOs están vinculados con la degradación de hidrocarburos aromáticos, más precisamente la degradación de ftalato, que en pasos sucesivos genera productos que luego entran en la vía de degradación del benzoato, (Figura 5.18). Codifican las enzimas ftalato 4,5-cis dihidrodiol-deshidrogenasa (*pht4*), ftalato 4,5-dioxigenasa (*pht3*), ftalato 4,5 dioxigenasa reductasa (*pht2*) y 4,5 di-hidroxi-ftalato decarboxilasa (*pht5*) respectivamente. Además, los grupos ortólogos K16515, K14727, K01721 y K04117 se hallaron incrementados a los 280 días con respecto a todos los tiempos (en el caso de K16515) o con respecto de los días 1 y 30 de incubación en el caso de los 3 KOs restantes. Estos se encuentran involucrados en la vía de degradación del benzoato y/o fluoro-benzoato y codifican las enzimas 4-oxalomesaconato hidratasa (*galB*), 3-oxoadipato-enol-lactonasa (*pcaL*), la subunidad alfa de la nitril-hidratasa (*nthA*) en microorganismos aeróbicos, y ciclohexano-carboxil-CoA

¹³ https://www.genome.jp/kegg-bin/get_htext#C150

deshidrogenasa (*aliB*) en microorganismos anaeróbicos respectivamente. Los KOs K11180 y K011181 de las subunidades alfa y beta de la sulfito reductasa (genes *dsrA* y *dsrB* respectivamente) que participa en el metabolismo del azufre (respiración anaeróbica) y en la degradación de nitrotolueno se vieron incrementados a los 280 días con respecto al resto de los tiempos y también a los 90 días respecto de los dos primeros tiempos de incubación. Por otro lado, se observó una disminución significativa de K14580, K14582, K14583 y K00152 vinculados con la degradación aeróbica de naftaleno (genes *nahAd*, *nahC*, *nahB* y *nahF* respectivamente); K14748 y K18092 ligados a la degradación aeróbica de etil-benceno (genes, *etbAa* y *etbD* correspondientemente) y, K08690 y K18088 relacionados con la degradación de dioxinas (genes *bphB* y *bphAd*).

Debido a los incrementos significativos detectados en la concentración de hidrocarburos y de cianobacterias (*Nostocaceae*, *Oxyphotobacteria*_ *Insertae_Sedis_Unknown_family*, *Chlorobiaceae*, *Microcillaceae* y *Om 190*) luego de 280 días de incubación en los microcosmos, y conociendo que las cianobacterias poseen la capacidad de sintetizar hidrocarburos y son las principales contribuyentes al ciclo de los hidrocarburos en los océanos (Lea-Smith et al., 2015; Schirmer et al., 2010), se decidió corroborar si las comunidades microbianas de los microcosmos presentan el potencial para producir alcanos. Las cianobacterias pueden producir alcanos mediante dos vías, ambas vinculadas con el metabolismo de ácidos grasos, se conocen como FAR/FAD y Ols según qué proteínas transportadoras de dicho metabolismo estén participando. La vía más frecuente, FAR/FAD, involucra dos enzimas, la acyl-ACP reductasa (FAR, K14330) y una oxigenasa aldehído deformilante (FAD, K14331). La segunda vía (Ols) ocurre a través de una olefin-sintetasa (*oleC*, K22319)(Lea-Smith et al., 2016). Por lo tanto, los tres KOs que codifican estas enzimas se buscaron mediante la herramienta STAMP. Se hallaron predichas la acyl-ACP reductasa (K14330) y la oxigenasa aldehído deformilante (K14331), siendo su proporción significativamente mayor a los 280 días respecto de los otros tiempos de incubación (Figura 5.19).

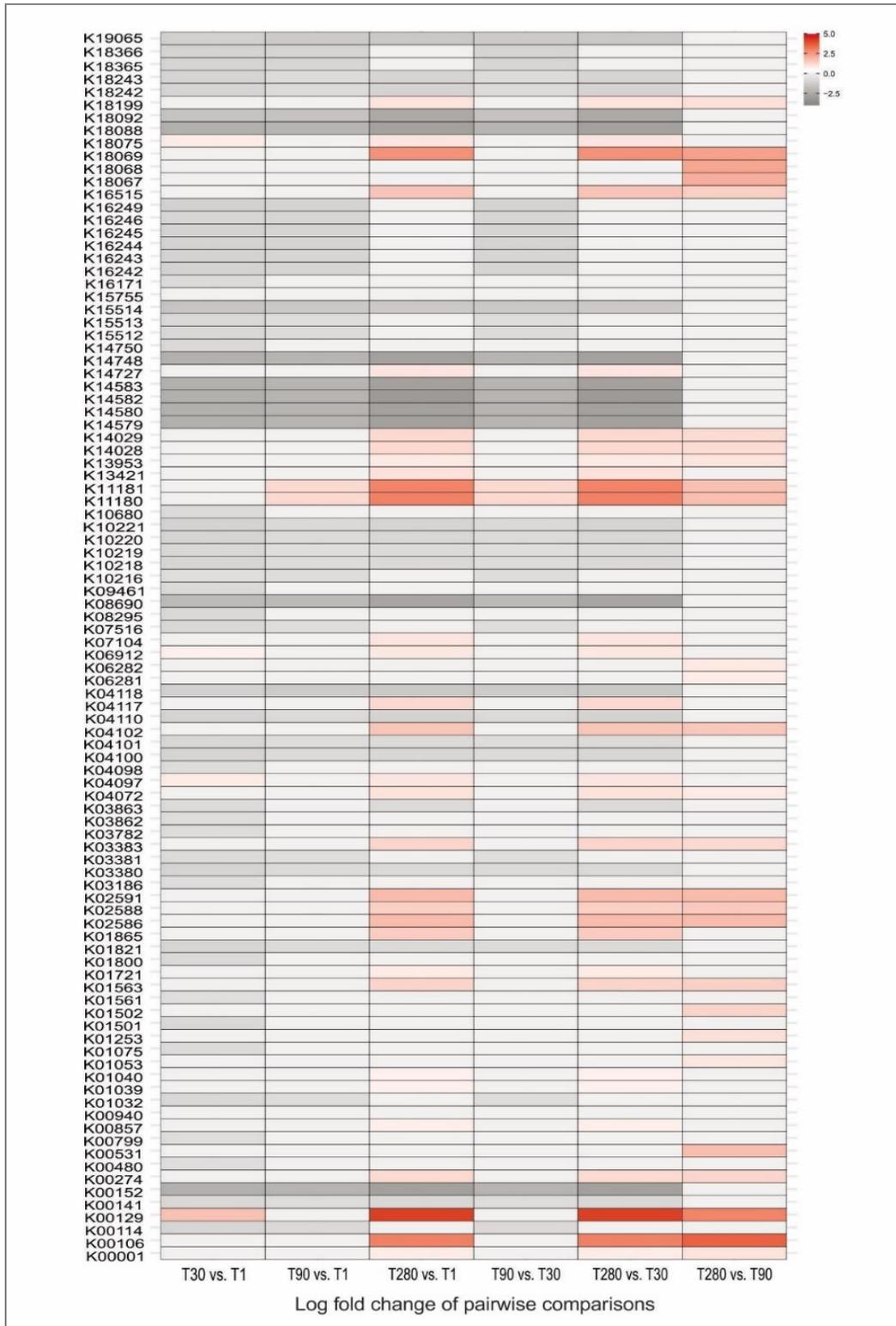


Figura 5.18: Análisis de la abundancia diferencial de los KOs de degradación de compuestos xenobióticos detectados en los sedimentos de los microcosmos, calculada con ANCOM-BC ($p < 0.05$, método de ajuste holm, comparaciones múltiples con test direccional con control mdFDR por método de holm). La intensidad del color refleja la magnitud del logaritmo del fold change (lfc). Cada columna indica el par de tiempos comparado, donde en segundo lugar se indica el tiempo de referencia para la comparación.

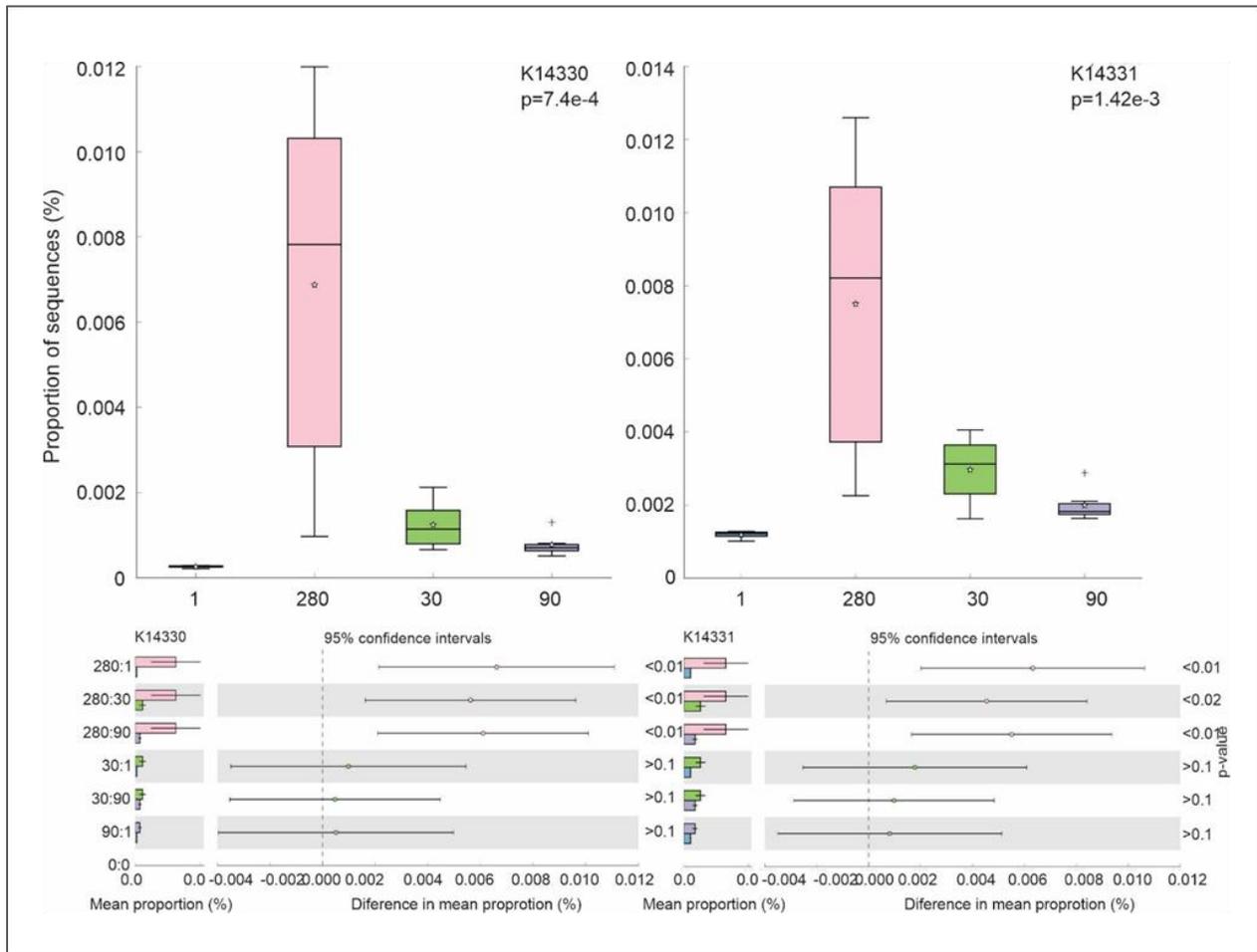


Figura 5.19: Proporción de secuencias de los KOs K14330 y K14331 detectada en los microcosmos a los 1, 30, 90 y 280 días. Arriba: proporción de secuencias (%). Abajo: prueba post – hoc de Tukey-Kramer.

5.7 Discusión

En el estudio de la ecología de las comunidades microbianas de los sedimentos realizado en el capítulo anterior, se concluyó que el metabolismo anaeróbico podría ser el predominante del curso de agua estudiado. Existe evidencia de que los procesos de degradación anaeróbica de hidrocarburos suelen ser más lentos que los aeróbicos, más propensos a la limitación por nutrientes y, a pesar de que en los últimos años ha aumentado el interés por estudiarlos, aún se conoce poco sobre los mecanismos y vías de degradación anaeróbica (Fragkou et al., 2021; Hernández-Ospina et al., 2024; Premnath et al., 2021; Wartell et al., 2021). En el análisis de la eficiencia de un proceso de biorremediación, se deben considerar diversos factores, buscando alcanzar los objetivos de remediación en el menor tiempo y costo posibles. (Kumar y Yadav, 2018). Dado que la disponibilidad de oxígeno es fundamental para la rápida biodegradación de los hidrocarburos, pudiendo condicionar el tiempo de biorremediación (Fragkou et al., 2021), se han desarrollado métodos de aireación forzada/artificial para tratar cuerpos de agua dulce y sedimentos y estimular la biodegradación (Wald et al., 2015; Z. Wang et al., 2022; Zhang et al., 2023). En este sentido, el tratamiento de aireación forzada planteado en el presente trabajo de tesis fue aplicado con el fin de estimular a las poblaciones aeróbicas degradadoras y, en consecuencia, incrementar la velocidad de degradación de hidrocarburos en los sedimentos.

Al inicio del ensayo (día 1), pudo evidenciarse una diferencia en la concentración de oxígeno disuelto en el agua de los microcosmos aireados y sin airear que se mantuvo al menos hasta los 90 días de incubación, lo que demuestra que los aireadores utilizados lograron aumentar el contenido de oxígeno en el agua, diferenciándose de los microcosmos control. Por otro lado, las concentraciones de oxígeno disuelto conseguidas mediante aireación forzada se duplicaron con respecto a las concentraciones que presentaron las aguas del curso de agua en condiciones naturales (Tabla 4.1, Sección 4.1.1).

Se observaron modificaciones macroscópicas en los microcosmos de ambas condiciones a lo largo del tiempo del ensayo, que se percibieron como estratificaciones evidenciadas por cambios en la coloración de los sedimentos (Figuras 5.3 y 5.4) y la formación de biofilm en las aguas (pegados al vidrio). Estos cambios coinciden con los observados en sistemas modelo de estudio de ecosistemas microbianos o “columnas de Winogradsky”, que consisten en cilindros de vidrio transparente dónde se colocan agua y sedimento suplementado con alguna fuente de celulosa, sales de carbonato, sulfato y/o hierro. Los cilindros son dispuestos a la luz solar, y con el tiempo las comunidades microbianas del sedimento crecen en un ecosistema estratificado con una capa superior oxigenada y capas subsuperficiales anóxicas (Rundell et al., 2014). De manera similar a los resultados de este trabajo, Esteban y colaboradores (2015) observaron cambios respecto de la comunidad autóctona de los sedimentos luego de 60 días del ensamblado de las columnas.

Según los resultados de la mayoría de las variables determinadas en los microcosmos, no se lograron evidenciar cambios diferenciales en la estructura ni en la actividad de las comunidades microbianas generados por la técnica de aireación aplicada, cuando se comparan con los microcosmos tomados como referencia (Sin aireación forzada) (Figuras: 5.3, 5.4, 5.7, 5.8, 5.9 A-B-C y E, 5.10, 5.11, 5.12, 5.13 y 5.14). La técnica implementada consistió en utilizar aireadores de pecera conectados a mangueras que llevaban acopladas en sus extremos piedras difusoras. Este diseño pretendió favorecer la difusión del oxígeno, mediante la formación de burbujas pequeñas y así lograr una eficiente oxigenación (Li et al., 2014). Sin embargo, no fue posible mantener un control estricto del flujo, ni del tamaño de las burbujas a lo largo de todo el ensayo. En muchos microcosmos se observó la formación de un biofilm color verde sobre el difusor que impidió la correcta salida del aire y formación de burbujas, por lo que tuvieron que ser reemplazados. En consecuencia, una de las causas de no observar diferencias entre las comunidades microbianas incubadas bajo las diferentes condiciones de aireación puede ser atribuida a la reducida difusión del oxígeno hasta el sedimento debido a la irregularidad y/o tamaño de las burbujas (Fragkou et al., 2021). Posiblemente, realizar un análisis semejante al planteado, pero sobre la estructura de las comunidades microbianas del agua hubiese permitido evidenciar el efecto de la aireación en los microcosmos (Fang et al., 2020; Ma et al., 2021).

Es de destacar el incremento en el contenido de HT cromatografiables (C10 a C40) detectado luego de los 280 días de incubación, independientemente de las condiciones de aireación aplicadas, (Figura 5.7). Un resultado similar ha sido reportado por otros autores durante tratamientos de biorremediación. Algunos lo han adjudicado a la ruptura de moléculas más pesadas de hidrocarburos por acción de microorganismos degradadores, lo que genera nuevos fragmentos de hidrocarburos que poseen cantidades de carbono dentro de los límites de detección de la técnica utilizada (Anza Cruz et al., 2016; Medina, 2017). Por lo tanto, el aumento de HT en los microcosmos podría atribuirse a este mismo efecto. Así mismo, el mezclado de los horizontes realizado para homogeneizar el sedimento, previo al ensamblado de los microcosmos, junto a las condiciones de incubación podrían haber estimulado la degradación de compuestos de alto peso molecular en los microcosmos.

El aumento en la concentración de HT hacia el final del experimento, puede también ser atribuido a la biosíntesis de estos compuestos realizada por cianobacterias. Las familias *Nodosilineaceae*, *Nostocaceae*, *Oxyphotobacteria_Incerta_Sedis_Unknown_Family*, y *Microcillaceae* que resultaron ser más abundantes a los 280 días y que probablemente se observaron con el color verde de las aguas y sedimentos (Figura 5.3 y 5.4), han sido descritas como productoras de alcanos de cadenas de entre C15 y C19 (Lea-Smith et al., 2016; Miglani et al., 2022; Vigneron et al., 2023). La vía de síntesis de alcanos dependiente de las enzimas FAD y FAR, predichas en los microcosmos del tiempo 280, podría ser la utilizada por estos microorganismos (Figura 5.17). Las funciones de los hidrocarburos en las células de cianobacterias aún no han sido totalmente dilucidadas, se ha reportado que

pueden desempeñar un papel en la flexibilidad de las membranas, la división, el tamaño y el crecimiento óptimos de las células, así como en la asociación eficaz de proteínas solubles y unidas a la membrana (Lea-Smith et al., 2016). Durante el proceso de extracción exhaustivo de hidrocarburos a partir de los sedimentos, realizado en este trabajo, se utilizan solventes orgánicos que habrían lisado las células de los organismos allí presentes. Por tal efecto, el contenido de hidrocarburos cuantificado no solo se correspondería con el presente en la matriz, sino que incluiría el aportado por los microorganismos.

El tiempo de incubación bajo las condiciones ensayadas influyó en la estratificación (Figura 5.3 y 5.4), actividad (Figuras 5.5-5.8) y estructura (Figura 5.14) de las comunidades microbianas de los microcosmos, sin evidencias de que la aireación haya generado algún efecto. La estratificación y los cambios de coloración de los sedimentos sugiere un ordenamiento espacial de las comunidades microbianas y un enriquecimiento en ciertos taxones en función de las condiciones del ensayo. En concordancia, Esteban y col., (2015) analizaron los distintos estratos de sedimentos encontrados en las columnas de Winogradsky y observaron que la comunidad superficial se enriquecía en taxones diferentes del sedimento de origen, y concluyeron que los taxones “raros” pueden llegar a ser abundantes en condiciones ambientales adecuadas y que los gradientes ambientales que se desarrollan dentro de la columna crean diversos nichos que permiten el enriquecimiento de bacterias específicas (Esteban et al., 2015). Similarmente, muchos de los taxones enriquecidos hacia los 280 días, no fueron los predominantes en la caracterización del curso de agua realizada en el capítulo 4. En particular, si se analizan las familias previamente propuestas como biomarcadoras de biodegradación *in situ*, se observó que la abundancia relativa de *Rhodocyclaceae* disminuyó durante el tiempo del ensayo y *Syntrophaceae* no fue una de las familias predominantes en las condiciones ensayadas en el laboratorio (Figura 5.6). Hubo familias que si se incrementaron notablemente y que en el sedimento original no eran predominantes, como las bacterias verdes del azufre que realizan fotosíntesis anoxigénica de la familia *Chlorobiaceae* (Kushkevych et al., 2021; Sarahi et al., 2020) y las cianobacterias de la familia *Nostocaceae* (Figura 5.17).

Una estimulación microbiana se observó luego de los 30 y 90 días de incubación debido a un incremento en las actividades enzimáticas (Figuras 5.53-5.86), a una mayor riqueza de ASVs (Figura 5.120) y diversidad microbiana (Figuras 5.131 y 5.153). Este comportamiento puede ser atribuido al mezclado inicial de sedimentos, considerándola como una perturbación por pulso (Shade et al., 2012), la cual estimuló la actividad microbiana generando un cambio en la estructura del sedimento y en la biodisponibilidad de los nutrientes. Este nuevo escenario conllevaría a la generación de nuevos nichos que microorganismos subrepresentados podrían ocupar. Esta estimulación luego disminuye hacia los 280 días, y a excepción de la actividad lipasa, las actividades enzimáticas no vuelven a valores similares a los iniciales, evidenciándose el establecimiento de una comunidad diferente a la detectada al inicio del ensayo, independientemente de las condiciones de aireación (Figura 5.142).

Teniendo en cuenta que la concentración de oxígeno disuelto determinada en ambas condiciones de aireación fue similar (4-5 mg/l), posiblemente otros parámetros del ensayo, tales como el fotoperíodo, la temperatura, el mezclado de los sedimentos hayan condicionado un hábitat propicio para el desarrollo principalmente de cianobacterias. De acuerdo con Shade et al., (2012), las condiciones de incubación estarían generando una perturbación por presión, y en respuesta a esto se habría establecido una nueva comunidad microbiana. La misma tendría una predominancia de microorganismos autótrofos como las cianobacterias, generada por la disponibilidad de luz, nutrientes como N, P, metales y produciendo gracias a la fotosíntesis un incremento en la concentración de oxígeno disuelto en las aguas (Figura 5.2). La capacidad que poseen algunas cianobacterias de fijar nitrógeno atmosférico (N₂), almacenar fósforo (P), secuestrar hierro (Fe) y una serie de metales traza esenciales junto con la disponibilidad de y temperatura son importantes en los eventos de florecimiento o blooms de cianobacterias en aguas eutrofizadas (Paerl y Otten, 2013; Rastogi et al., 2015), por lo que este efecto podría haberse generado y quizás enmascarado otros metabolismos menos predominantes dentro de los microcosmos. Luego de los 280 días de incubación, otros microorganismos autotróficos, diferentes al grupo de las cianobacterias y bacterias verdes del azufre se incrementaron diferencialmente. Entre ellos, familias no cultivables del orden Acetobacterales, al cual pertenecen microorganismos que pueden convertir el etanol a ácido acético y otros acidófilos, entre otros (Esposti et al., 2023). El incremento diferencial de microorganismos heterótrofos fermentadores capaces de reducir nitrato y/o de degradar hidrocarburos anaeróbicamente fue también evidenciado al finalizar el ensayo, representados por miembros de las familias *Gemmataceae* y *Phycisphaeraceae* (Kulichevskaya et al., 2020) (Guibert et al., 2016; Lenferink et al., 2023). Estos microorganismos son los que podrían estar fermentando y degradando las diversas fuentes de carbono, generando ácidos orgánicos que reduzcan el potencial de oxidación y favorezcan la generación de un ambiente anóxico, superando el mezclado inicial que introdujo oxígeno en los sedimentos y la condición de aireación forzada. En concordancia, se observó que la abundancia de las familias que presentan miembros aeróbicos *Hydrogenophilaceae* y *Comamonadaceae* y *Halothiobacillaceae* (Kadnikov et al., 2019; Sarkar et al., 2020; Táncsics et al., 2018; C. Wang et al., 2022) disminuye respecto del día 1 a lo largo del experimento, mientras que aquellos pertenecientes a las familias anaeróbicas *Anaerolineaceae*, *Flavobacteraceae* y *Xantobacteraceae* aumentan levemente respecto del tiempo inicial.

A pesar de que las comunidades aeróbicas no se encontraron favorecidas en los sedimentos, la cuantificación de genes biomarcadores de degradación aeróbica de hidrocarburos, por un lado y la predicción de su presencia por otro, sugirieron la existencia de poblaciones con potencial de degradación aeróbica durante todo el ensayo (Figuras 5.10 y 5.18). Sin embargo, ningún incremento fue detectado en función del cambio en la concentración de oxígeno disuelto (Figura 5.2), lo que estaría sugiriendo que la aireación forzada no logró

estimular la degradación aeróbica de hidrocarburos. El potencial de degradación anaeróbica también fue detectado por cuantificación de genes específicos y predicción de genes ortólogos relacionados con la sulfato reducción y la degradación de hidrocarburos anaeróbica del ftalato, nitrotolueno y benzoato (Figura 5.18). En concordancia, el gen *bssA*, marcador de degradación anaeróbica de hidrocarburos aromáticos, se incrementó entre dos y tres órdenes de magnitud coincidiendo con la mayor actividad enzimática detectada (90 días). Su número se mantuvo incrementado comparando con el tiempo inicial hasta finalizar el ensayo (Figura 5.11 E). Sin embargo, en comparación con la caracterización de los sedimentos del curso de agua realizada en el capítulo 4, el gen podría estar siendo aportado por otra familia diferente a *Syntrophaceae*, debido a que ésta no se observó aumentada con el tiempo de incubación.

La concentración del gen *bamA*, detectado durante todo el ensayo, y en valores superiores a los determinados para los otros genes funcionales, evidenció un mínimo incremento, aunque significativo, a los 280 días, en la condición no aireada. El gen funcional *bamA* se utiliza como marcador de biodegradación de la vía del Benzoil-CoA asociada al metabolismo anaeróbico de una amplia gama de compuestos aromáticos como ácidos húmicos, lignina, aminoácidos y xenobióticos (Porter y Young, 2014). Su constante presencia podría estar relacionada con la degradación de hidrocarburos, como así también con el ciclado de la materia. Esta capacidad degradativa se habría manifestado regularmente durante todo el ensayo, a pesar de los estímulos generados por el mezclado y las condiciones de incubación. Conjuntamente, representantes no cultivables de las familias del orden Aminicenantales, quimioheterótrofos, respiradores anaeróbicos, generadores de hidrógeno y acetato (Kadnikov et al., 2019), se mantendrían a lo largo de todo el experimento.

El hecho de que no se haya podido evidenciar una disminución en la concentración de hidrocarburos al final del ensayo, no es un indicador de que la biodegradación de estos compuestos no esté ocurriendo. Probablemente la ruptura de hidrocarburos de alto peso molecular que conlleva al aumento de la concentración y/o la producción de los mismos por las cianobacterias han logrado “enmascarar” la biodegradación. Debido a que la degradación anaeróbica de hidrocarburos suele ser más lenta, quizás tiempos más largos de incubación y/o fotoperíodos más cortos para controlar la aparición de cianobacterias, podrían evidenciar si efectivamente la concentración de hidrocarburos disminuye.

Capítulo 6



Conclusiones

6. Conclusiones

En este trabajo de tesis se realizaron estudios de caracterización de los sedimentos de un curso de agua dulce afectado por hidrocarburos y de la capacidad degradativa de las comunidades microbianas allí presentes. Los resultados hallados en el capítulo 4 permiten enunciar las siguientes conclusiones generales:

- Las aguas de este sitio se asemejan a las de un curso de agua hipóxico, donde las poblaciones microbianas acuáticas se encontrarían estimuladas por fuentes de carbono externas, lo que generaría la disminución del oxígeno disuelto. Las mismas podrían, además, degradar los hidrocarburos provenientes de los sedimentos, manteniendo sus niveles por debajo del límite de detección.
- La caracterización exhaustiva del sitio permitió evidenciar que los sedimentos superficiales estarían actuando como un biofiltro, participando en los ciclos biogeoquímicos de la materia y degradando activamente los hidrocarburos. Evitando, junto con las poblaciones acuáticas, el pasaje de los hidrocarburos desde los sedimentos al cuerpo agua.
- Las herramientas del Diagnóstico molecular ambiental, utilizadas en este trabajo permitieron evidenciar el potencial de degradación anaeróbica del sitio, siendo los microorganismos *Synthrophus* y *Thauera* algunos de los que se encontrarían activamente degradando estos compuestos. Por lo que se sugiere que la familia *Syntrophaceae* podría utilizarse como bioindicadora de la degradación anaeróbica de hidrocarburos en futuros monitoreos de los sedimentos superficiales de este sitio.
- La información obtenida en la asignación taxonómica y en las predicciones de abundancia diferencial podría utilizarse como herramientas para la búsqueda y diseño de *primers* específicos para genes de vías de degradación aeróbica de hidrocarburos en el caso de querer monitorearlas en el futuro.
- La información obtenida en este capítulo refleja la importancia de incluir al Diagnóstico molecular ambiental como instrumento tanto en la toma de decisiones de selección de técnicas de biorremediación *in situ* como para el seguimiento y monitoreo de los procesos de biorremediación.
- Este trabajo respalda al estudio de la estructura de las comunidades bacterianas como un parámetro fundamental para evaluar el impacto ecológico de las actividades humanas en ambientes de agua dulce.

Por otro lado, se estudió el efecto de la aireación forzada sobre la capacidad degradadora de hidrocarburos de la comunidad microbiana de sedimentos de agua dulce a escala de laboratorio. Los resultados discutidos en el capítulo 5 permiten formular las siguientes conclusiones generales:

- La aireación forzada logró incrementar la concentración de oxígeno disuelto de las aguas, duplicando los valores naturales medidos en el curso de agua. Sin embargo, esta diferencia no generó cambios en la estructura de las comunidades microbianas de los sedimentos, sugiriendo que no fue suficiente o que los cambios podrían verse enmascarados por otros metabolismos predominantes.
- El mezclado de sedimentos de diferentes profundidades del curso de agua, la luz y la temperatura generaron nuevos nichos microbianos lo que provocó un cambio en la estructura original de la comunidad microbiana, incrementándose principalmente el metabolismo autotrófico. Los efectos de esta perturbación inicial conducen a resultados que no son representativos de curso de agua estudiado en las condiciones naturales.
- El ordenamiento de los sedimentos en estratos observables, la presencia de microorganismos autótrofos y heterótrofos sugiere el ciclado de la materia aún en sedimentos afectados con hidrocarburos y metales.
- Mediante predicción y cuantificación de genes marcadores de degradación de hidrocarburos se reconfirmó el potencial de degradación anaeróbica y, a diferencia de lo concluido en el capítulo 4, se evidenció en los sedimentos de los microcosmos el potencial de degradación aeróbica.
- La predicción y el incremento de los genes biomarcadores *bssA* y *bamA* sugieren que la biodegradación de hidrocarburos podría estar ocurriendo, a pesar de que la concentración de estos compuestos no disminuyó a lo largo del ensayo. En la nueva estructura de la comunidad microbiana las familias *Syntrophaceae* y *Rhodocyclaceae* no estarían aportando estos genes.
- En las condiciones estudiadas este sistema no sería el indicado para evaluar la utilización de la aireación forzada como estrategia de bioestimulación en el curso de agua. Posiblemente caracterizar diferencialmente las comunidades de cada estrato de sedimento en los microcosmos, así como también las comunidades del agua podrían arrojar resultados más certeros respecto del tratamiento.
- El florecimiento o “*Bloom*” de cianobacterias asociado a las condiciones de incubación, puede considerarse un indicio de la peligrosidad de realizar perturbaciones en el curso de agua original.

Capítulo 7



Bibliografía

7. Bibliografía

- Abbasian, F., Lockington, R., Mallavarapu, M., Naidu, R., 2015. A Comprehensive Review of Aliphatic Hydrocarbon Biodegradation by Bacteria. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 176, 670–699. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1603-5>
- Adrian, L., Löffler, F.E., 2016. Organohalide- Respiring Bacteria. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-49875-0>
- Algora, C., Vasileiadis, S., Wasmund, K., Trevisan, M., Krüger, M., Puglisi, E., Adrian, L., 2015. Manganese and iron as structuring parameters of microbial communities in Arctic marine sediments from the Baffin Bay. *FEMS Microbiol. Ecol.* 91, 1–13. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiv056>
- Almeida, R., Mucha, A.P., Teixeira, C., Bordalo, A.A., Almeida, C.M.R., 2013. Biodegradation of petroleum hydrocarbons in estuarine sediments: Metal influence. *Biodegradation* 24, 111–123. <https://doi.org/10.1007/s10532-012-9562-9>
- Angel, R., Claus, P., Conrad, R., 2012. Methanogenic archaea are globally ubiquitous in aerated soils and become active under wet anoxic conditions. *ISME J.* 6, 847–862. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.141>
- Antunes, I.M.H.R., Albuquerque, M.T.D., Roque, N., 2018. Spatial environmental risk evaluation of potential toxic elements in stream sediments. *Environ. Geochem. Health* 40, 2573–2585. <https://doi.org/10.1007/s10653-018-0124-x>
- Anza Cruz, H.G., Orantes Calleja, P.D., González Herrera, R., Ruíz Marín, A., Espinoza Medinilla, E., Martínez Salinas, R.I., García Lara, C.M., Vera Toledo, P., 2016. Biorremediación de suelos contaminados con aceite automotriz usados mediante sistema de biopilas. *Rev. Espac. I+D Innovación más Desarrollo.* 5, 49–77. <https://doi.org/10.31644/imasd.12.2016.a04>
- Arias, A.H., Vazquez-Botello, A., Tombesi, N., Ponce-Vélez, G., Freije, H., Marcovecchio, J., 2010. Presence, distribution, and origins of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in sediments from Bahía Blanca estuary, Argentina. *Environ. Monit. Assess.* 160, 301–314. <https://doi.org/10.1007/s10661-008-0696-5>
- Astrahan, P., Lupu, A., Leibovici, E., Ninio, S., 2023. BTEX and PAH contributions to Lake Kinneret water: a seasonal-based study of volatile and semi-volatile anthropogenic pollutants in freshwater sources. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 30, 61145–61159. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-26724-9>
- Aylagas, E., Borja, A., Pochon, X., Zaiko, A., Keeley, N., Bruce, K., Hong, P., Ruiz, G.M., Stein, E.D., Theroux, S., Geraldi, N., Ortega, A., Gajdzik, L., Coker, D.J., Katan, Y., Hikmawan, T., Saleem, A., Alamer, S., Jones, B.H., Duarte, C.M., Pearman, J., Carvalho, S., 2020. Translational Molecular Ecology in practice: Linking DNA-based methods to actionable marine environmental management. *Sci. Total Environ.* 744, 140780. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140780>
- Azadi, D., Shojaei, H., 2020. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons, phenol and sodium sulfate by *Nocardia* species isolated and characterized from Iranian ecosystems. *Sci. Rep.* 10, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78821-1>
- Belfiore, C., Curia, M. V, Farías, M.E., 2018. Characterization of *Rhodococcus* sp . A5 wh isolated from a high altitude Andean lake to unravel the survival strategy under lithium stress. *Rev. Argent. Microbiol.* 50, 311–322. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.07.005>
- Beller, H.R., Kane, S.R., Legler, T.C., Mckelvie, J.R., Lollar, B.S., Pearson, F., Balsler, L., Mackay, D.M., 2008. Comparative assessments of benzene, toluene, and xylene natural attenuation by quantitative polymerase

- chain reaction analysis of a catabolic gene, signature metabolites, and compound-specific isotope analysis. *Environ. Sci. Technol.* 42, 6065–6072. <https://doi.org/10.1021/es8009666>
- Beuters, P., Scherer, H.W., 2012. Modification of the standard method for determination of non-exchangeable NH₄-n in soil. *Plant, Soil Environ.* 58, 557–560. <https://doi.org/10.17221/575/2012-pse>
- Bin Hudari, M.S., Vogt, C., Richnow, H.H., 2020. Effect of Temperature on Acetate Mineralization Kinetics and Microbial Community Composition in a Hydrocarbon-Affected Microbial Community During a Shift From Oxidic to Sulfidogenic Conditions. *Front. Microbiol.* 11, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.606565>
- Bolyen, E., Rideout, J.R., Dillon, M.R., Bokulich, N.A., Abnet, C.C., Al-Ghalith, G.A., Alexander, H., Alm, E.J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J.E., Bittinger, K., Brejnrod, A., Brislawn, C.J., Brown, C.T., Callahan, B.J., Caraballo-Rodríguez, A.M., Chase, J., Cope, E.K., Da Silva, R., Diener, C., Dorrestein, P.C., Douglas, G.M., Durall, D.M., Duvallet, C., Edwardson, C.F., Ernst, M., Estaki, M., Fouquier, J., Gauglitz, J.M., Gibbons, S.M., Gibson, D.L., Gonzalez, A., Gorlick, K., Guo, J., Hillmann, B., Holmes, S., Holste, H., Huttenhower, C., Huttley, G.A., Janssen, S., Jarmusch, A.K., Jiang, L., Kaehler, B.D., Kang, K. Bin, Keefe, C.R., Keim, P., Kelley, S.T., Knights, D., Koester, I., Kosciulek, T., Kreps, J., Langille, M.G.I., Lee, J., Ley, R., Liu, Y.X., Loftfield, E., Lozupone, C., Maher, M., Marotz, C., Martin, B.D., McDonald, D., McIver, L.J., Melnik, A. V., Metcalf, J.L., Morgan, S.C., Morton, J.T., Naimey, A.T., Navas-Molina, J.A., Nothias, L.F., Orchanian, S.B., Pearson, T., Peoples, S.L., Petras, D., Preuss, M.L., Pruesse, E., Rasmussen, L.B., Rivers, A., Robeson, M.S., Rosenthal, P., Segata, N., Shaffer, M., Shiffer, A., Sinha, R., Song, S.J., Spear, J.R., Swafford, A.D., Thompson, L.R., Torres, P.J., Trinh, P., Tripathi, A., Turnbaugh, P.J., Ul-Hasan, S., van der Hooft, J.J.J., Vargas, F., Vázquez-Baeza, Y., Vogtmann, E., von Hippel, M., Walters, W., Wan, Y., Wang, M., Warren, J., Weber, K.C., Williamson, C.H.D., Willis, A.D., Xu, Z.Z., Zaneveld, J.R., Zhang, Y., Zhu, Q., Knight, R., Caporaso, J.G., 2019. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat. Biotechnol.* 37, 852–857. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>
- Bradford, L.M., Vestergaard, G., Táncsics, A., Zhu, B., Schloter, M., Lueders, T., 2018. Transcriptome-Stable Isotope Probing Provides Targeted Functional and Taxonomic Insights Into Microaerobic Pollutant-Degrading Aquifer Microbiota 9, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02696>
- Brzeszcz, J., Kaszycki, P., 2018. Aerobic bacteria degrading both n-alkanes and aromatic hydrocarbons: an undervalued strategy for metabolic diversity and flexibility. *Biodegradation* 29, 359–407. <https://doi.org/10.1007/s10532-018-9837-x>
- Callahan, Benjamin J., McMurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J.A., Holmes, S.P., 2016. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods* 13, 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Callahan, Ben J., Sankaran, K., Fukuyama, J.A., McMurdie, P.J., Holmes, S.P., 2016. Bioconductor workflow for microbiome data analysis: From raw reads to community analyses. *F1000Research* 5, 1–48. <https://doi.org/10.12688/F1000RESEARCH.8986.1>
- Cardoso, S.J., Quadra, G.R., Resende, N. da S., Roland, F., 2019. The role of sediments in the carbon and pollutant cycles in aquatic ecosystems TT - O papel dos sedimentos nos ciclos de carbono e poluentes em ecossistemas aquáticos. *Acta Limnol. Bras.* 31, 1–13.
- Carter, A.M., Blaszczyk, J.R., Heffernan, J.B., Bernhardt, E.S., 2021. Hypoxia dynamics and spatial distribution in a low gradient river. *Limnol. Oceanogr.* 66, 2251–2265. <https://doi.org/10.1002/lno.11751>
- Cavalli, D., Consolati, G., Marino, P., Bechini, L., 2015. Measurement and simulation of soluble, exchangeable, and non-exchangeable ammonium in three soils. *Geoderma* 259–260, 116–125.

<https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2015.05.011>

- Cébron, A., Norini, M.P., Beguiristain, T., Leyval, C., 2008. Real-Time PCR quantification of PAH-ring hydroxylating dioxygenase (PAH-RHD α) genes from Gram positive and Gram negative bacteria in soil and sediment samples. *J. Microbiol. Methods* 73, 148–159. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.01.009>
- Chandran, H., Meena, M., Sharma, K., 2020. Microbial Biodiversity and Bioremediation Assessment Through Omics Approaches. *Front. Environ. Chem.* 1, 1–22. <https://doi.org/10.3389/fenvc.2020.570326>
- Chen, Y., Pan, J., Yun, Y., Zhi, B., Li, G., Li, M., Ma, T., 2020. Halomonas plays a central role in the syntrophic community of an alkaline oil reservoir with alkali-surfactant-polymer (ASP) flooding. *Sci. Total Environ.* 747, 141333. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141333>
- Chiaia-Hernández, A.C., Casado-Martinez, C., Lara-Martin, P., Bucheli, T.D., 2022. Sediments: sink, archive, and source of contaminants. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 29, 85761–85765. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-24041-1>
- Commendatore, M.G., Nieves, M.L., Amin, O., Esteves, J.L., 2012. Sources and distribution of aliphatic and polyaromatic hydrocarbons in coastal sediments from the Ushuaia Bay (Tierra del Fuego, Patagonia, Argentina). *Mar. Environ. Res.* 74, 20–31. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2011.11.010>
- Cubillos, C.F., Aguilar, P., Grágeda, M., Dorador, C., 2018. Microbial Communities From the World's Largest Lithium Reserve, Salar de Atacama, Chile: Life at High LiCl Concentrations. *J. Geophys. Res. Biogeosciences* 123, 3668–3681. <https://doi.org/10.1029/2018JG004621>
- Cupit, C., Lomstein, B.A., Kjeldsen, K.U., 2019. Contrasting community composition of endospores and vegetative Firmicutes in a marine sediment suggests both endogenous and exogenous sources of endospore accumulation. *Environ. Microbiol. Rep.* 11, 352–360. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12679>
- Cupples, A.M., Thelusmond, J.R., 2022. Predicting the occurrence of monooxygenases and their associated phylotypes in soil microcosms. *J. Microbiol. Methods* 193, 106401. <https://doi.org/10.1016/J.MIMET.2021.106401>
- Das, A., Das, N., Rajkumari, J., Pandey, Prisha, Pandey, Piyush, 2024. Exploring the bioremediation potential of *Bacillus* spp. for sustainable mitigation of hydrocarbon contaminants. *Environ. Sustain.* <https://doi.org/10.1007/s42398-024-00309-9>
- Dhar K, Subashchandrabose SR, Venkateswarlu K, Krishnan K, Megharaj M. Anaerobic Microbial Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: A Comprehensive Review. *Rev Environ Contam Toxicol.* 2020;251:25-108. doi: 10.1007/398_2019_29. PMID: 31011832.
- Doong, R.A., Lin, Y.T., 2004. Characterization and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbon contaminations in surface sediment and water from Gao-ping River, Taiwan. *Water Res.* 38, 1733–1744. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2003.12.042>
- Douglas, G.M., Maffei, V.J., Zaneveld, J.R., Yurgel, S.N., Brown, J.R., Taylor, C.M., Huttenhower, C., Langille, M.G.I., 2020. PICRUSt2 for prediction of metagenome functions. *Nat. Biotechnol.* 38, 685–688. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0548-6>
- Esposti, M.D., Guerrero, G., Rogel, M.A., Issotta, F., Rojas-villalobos, C., Quatrini, R., 2023. deranged respiratory enzymes 11.
- Esteban, D.J., Hysa, B., Bartow-McKenney, C., 2015. Temporal and spatial distribution of the microbial

- community of winogradsky columns. *PLoS One* 10, 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134588>
- Fang, J., Yang, R., Cao, Q., Dong, J., Li, C., Quan, Q., Huang, M., Liu, J., 2020. Differences of the microbial community structures and predicted metabolic potentials in the lake, river, and wetland sediments in Dongping Lake Basin. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 27, 19661–19677. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08446-4>
- Feng, L., Zhang, Z., Yang, G., Wu, G.Y., Yang, Q., Chen, Q., 2023. Microbial communities and sediment nitrogen cycle in a coastal eutrophic lake with salinity and nutrients shifted by seawater intrusion. *Environ. Res.* 225, 115590. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.115590>
- Fennel, K., Testa, J.M., 2019. Biogeochemical controls on coastal hypoxia. *Ann. Rev. Mar. Sci.* 11, 105–130. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-010318-095138>
- Ferris, M.J., Muyzer, G., Ward, D.M., 1996. Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 340–346. <https://doi.org/10.1128/aem.62.2.340-346.1996>
- Forootan, A., Sjöback, R., Björkman, J., Sjögreen, B., Linz, L., Kubista, M., 2017. Methods to determine limit of detection and limit of quantification in quantitative real-time PCR (qPCR). *Biomol. Detect. Quantif.* 12, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2017.04.001>
- Fragkou, E., Antoniou, E., Daliakopoulos, I., Manios, T., Theodorakopoulou, M., Kalogerakis, N., 2021. In situ aerobic bioremediation of sediments polluted with petroleum hydrocarbons: A critical review. *J. Mar. Sci. Eng.* 9. <https://doi.org/10.3390/jmse9091003>
- Fujii, N., Kuroda, K., Narihiro, T., Aoi, Y., Ozaki, N., Ohashi, A., Kindaichi, T., 2022. Metabolic Potential of the Superphylum Patescibacteria Reconstructed from Activated Sludge Samples from a Municipal Wastewater Treatment Plant. *Microbes Environ.* 37. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME22012>
- Geng, Y., J. Dighton, y D. Gray. 2012. “*The Effects of Thinning and Soil Disturbance on Enzyme Activities under Pitch Pine Soil in New Jersey Pinelands.*” *Applied Soil Ecology* 62. Elsevier B.V.: 1–7. doi:10.1016/j.apsoil.2012.07.001.
- Ghosh, U., Luthy, R.G., Cornelissen, G., Werner, D., Menzie, C.A., 2011. In-situ sorbent amendments: A new direction in contaminated sediment management. *Environ. Sci. Technol.* 45, 1163–1168. <https://doi.org/10.1021/es102694h>
- Gonzalez-Pimentel, J.L., Martin-Pozas, T., Jurado, V., Miller, A.Z., Caldeira, A.T., Fernandez-Lorenzo, O., Sanchez-Moral, S., Saiz-Jimenez, C., 2021. Prokaryotic communities from a lava tube cave in La Palma Island (Spain) are involved in the biogeochemical cycle of major elements. *PeerJ* 9, 1–30. <https://doi.org/10.7717/peerj.11386>
- Guibert, L.M., Loviso, C.L., Borglin, S., Jansson, J.K., Dionisi, H.M., Lozada, M., 2016. Diverse Bacterial Groups Contribute to the Alkane Degradation Potential of Chronically Polluted Subantarctic Coastal Sediments. *Microb. Ecol.* 71, 100–112. <https://doi.org/10.1007/s00248-015-0698-0>
- Han, X., Wang, F., Zhang, D., Feng, T., Zhang, L., 2021. Nitrate-assisted biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the water-level-fluctuation zone of the three Gorges Reservoir, China: Insights from in situ microbial interaction analyses and a microcosmic experiment, *Environmental Pollution*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115693>
- Hernández-Ospina, D.A., Osorio-González, C.S., Miri, S., Kaur Brar, S., 2024. New perspectives on the anaerobic

- degradation of BTEX: Mechanisms, pathways, and intermediates. *Chemosphere* 361. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2024.142490>
- Huesemann, M.H., Hausmann, T.S., Fortman, T.J., Thom, R.M., Cullinan, V., 2009. In situ phytoremediation of PAH- and PCB-contaminated marine sediments with eelgrass (*Zostera marina*). *Ecol. Eng.* 35, 1395–1404. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2009.05.011>
- Jasmin, C., Anas, A., Tharakan, B., Jaleel, A., Puthiyaveetil, V., Narayanane, S., Lincy, J., Nair, S., 2017. Diversity of sediment-associated Planctomycetes in the Arabian Sea oxygen minimum zone. *J. Basic Microbiol.* 57, 1010–1017. <https://doi.org/10.1002/jobm.201600750>
- Jeanbille, M., Gury, J., Duran, R., Tronczynski, J., Ghiglione, J.-F., Agogué, H., Saïd, O. Ben, Taïb, N., Debroas, D., Garnier, C., Auguet, J.-C., 2016. Chronic Polyaromatic Hydrocarbon (PAH) Contamination Is a Marginal Driver for Community Diversity and Prokaryotic Predicted Functioning in Coastal Sediments. *Front. Microbiol.* 7, 1303. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01303>
- Jroundi, F., Martinez-Ruiz, F., Merroun, M.L., Gonzalez-Muñoz, M.T., 2020. Exploring bacterial community composition in Mediterranean deep-sea sediments and their role in heavy metal accumulation. *Sci. Total Environ.* 712, 135660. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135660>
- Kadnikov, V. V., Mardanov, A. V., Beletsky, A. V., Karnachuk, O. V., Ravin, N. V., 2019. Genome of the candidate phylum Aminicenantes bacterium from a deep subsurface thermal aquifer revealed its fermentative saccharolytic lifestyle. *Extremophiles* 23, 189–200. <https://doi.org/10.1007/s00792-018-01073-5>
- Kandeler, E., Gerber, H., 1988. Short-term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium. *Biol. Fertil. Soils* 6, 68–72. <https://doi.org/10.1007/BF00257924>
- Karatan, E., Duncan, T.R., Watnick, P.I., 2005. NspS, a Predicted Polyamine Sensor, Mediates Activation of *Vibrio cholerae* Biofilm Formation by Norspermidine 187, 7434–7443. <https://doi.org/10.1128/JB.187.21.7434>
- Kielak, A.M., Barreto, C.C., Kowalchuk, G.A., van Veen, J.A., Kuramae, E.E., 2016. The ecology of Acidobacteria: Moving beyond genes and genomes. *Front. Microbiol.* 7, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00744>
- Kolukirik, M., Ince, O., Ince, B.K., 2011. Increment in Anaerobic Hydrocarbon Degradation Activity of Halic Bay Sediments via Nutrient Amendment. *Microb. Ecol.* 61, 871–884. <https://doi.org/10.1007/s00248-011-9825-8>
- Kour, D., Kaur, T., Devi, R., Yadav, A., Singh, M., Joshi, D., Singh, Jyoti, Suyal, D.C., Kumar, A., Rajput, V.D., Yadav, A.N., Singh, K., Singh, Joginder, Sayyed, R.Z., Arora, N.K., Saxena, A.K., 2021. Beneficial microbiomes for bioremediation of diverse contaminated environments for environmental sustainability: present status and future challenges. *Environ. Sci. Pollut. Res.* <https://doi.org/10.1007/s11356-021-13252-7>
- Kulichevskaya, I.S., Ivanova, A.A., Naumoff, D.G., Beletsky, A. V., Rijpstra, W.I.C., Sinninghe Damsté, J.S., Mardanov, A. V., Ravin, N. V., Dedysh, S.N., 2020. *Frigoriglobus tundricola* gen. nov., sp. nov., a psychrotolerant cellulolytic planctomycete of the family Gemmataceae from a littoral tundra wetland. *Syst. Appl. Microbiol.* 43. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2020.126129>
- Kumari, S., Rajput, V.D., Sushkova, S., Minkina, T., 2022. Microbial electrochemical system: an emerging technology for remediation of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil and sediments. *Environ. Geochem. Health.* <https://doi.org/10.1007/s10653-022-01356-z>
- Kushkevych, I., Procházka, J., Gajdács, M., Rittmann, S.K.M.R., Vítězová, M., 2021. Molecular physiology of

- anaerobic phototrophic purple and green sulfur bacteria. *Int. J. Mol. Sci.* 22. <https://doi.org/10.3390/ijms22126398>
- Laboratorios Britania s.a., 2021. *Giolitti Cantoni Medio 2*.
- Ladd, J.N., Butler, J.H.A., 1972. Short-term assays of soil proteolytic enzyme activities using proteins and dipeptide derivatives as substrates. *Soil Biol. Biochem.* 4, 19–30. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(72\)90038-7](https://doi.org/10.1016/0038-0717(72)90038-7)
- Lara, R.J., Asteasuain, A., Rusansky, C., Asteasuain, R., 1995. Distribution of petroleum hydrocarbons in waters of the Bahía Blanca Bay, Argentina. *Mar. Pollut. Bull.* 30, 281–283. [https://doi.org/10.1016/0025-326X\(95\)00046-P](https://doi.org/10.1016/0025-326X(95)00046-P)
- Lea-Smith, D.J., Ortiz-Suarez, M.L., Lenn, T., Nürnberg, D.J., Baers, L.L., Davey, M.P., Parolini, L., Huber, R.G., Cotton, C.A.R., Mastroianni, G., Bombelli, P., Ungerer, P., Stevens, T.J., Smith, A.G., Bond, P.J., Mullineaux, C.W., Howe, C.J., 2016. Hydrocarbons are essential for optimal cell size, division, and growth of Cyanobacteria. *Plant Physiol.* 172, 1928–1940. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01205>
- Legg, T.M., Zheng, V., Simone, B., Radloff, K.A., Mladenov, N., Gonzalez, A., Knights, D., Siu, H.C., Rahman, M.M., Ahmed, K.M., McKnight, D.M., Nemergut, D.R., 2012. Carbon, metals, and grain size correlate with bacterial community structure in sediments of a high arsenic aquifer. *Front. Microbiol.* 3, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00082>
- Lenferink, W.B., Jetten, M.S.M., van Kessel, M.A.H.J., Lüscher, S., 2023. Genomic analysis of the class Phycisphaerae reveals a versatile group of complex carbon- degrading bacteria. *Res. Sq.* 1–22.
- Li, H., Hu, L., Song, D., Lin, F., 2014. Characteristics of Micro-Nano Bubbles and Potential Application in Groundwater Bioremediation. *Water Environ. Res.* 86, 844–851. <https://doi.org/10.2175/106143014x14062131177953>
- Lillis, L., Clipson, N., Doyle, E., 2010. Quantification of catechol dioxygenase gene expression in soil during degradation of 2,4-dichlorophenol. *FEMS Microbiol. Ecol.* 73, 363–369. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00906.x>
- Lin, H., Peddada, S. Das, 2020. Analysis of compositions of microbiomes with bias correction. *Nat. Commun.* 11, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17041-7>
- Lipińska, A., Wyszowska, J., Kucharski, J., 2015. Diversity of organotrophic bacteria, activity of dehydrogenases and urease as well as seed germination and root growth *Lepidium sativum*, *Sorghum saccharatum* and *Sinapis alba* under the influence of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 18519–18530. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5329-2>
- Lofrano, G., Libralato, G., Minetto, D., De Gisi, S., Todaro, F., Conte, B., Calabrò, D., Quatraro, L., Notarnicola, M., 2017. In situ remediation of contaminated marinesediment: an overview. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 5189–5206. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-8281-x>
- Logeshwaran, P., Megharaj, M., Chadalavada, S., Bowman, M., Naidu, R., 2018. Petroleum hydrocarbons (PH) in groundwater aquifers: An overview of environmental fate, toxicity, microbial degradation and risk-based remediation approaches. *Environ. Technol. Innov.* 10, 175–193. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2018.02.001>
- Lueders, T., 2017. The ecology of anaerobic degraders of BTEX hydrocarbons in aquifers 1–13. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw220>

- Ma, K. li, Li, X. kun, Wang, K., Meng, L. wei, Liu, G. ge, Zhang, J., 2017. Establishment of thermophilic anaerobic terephthalic acid degradation system through one-step temperature increase startup strategy – Revealed by Illumina Miseq Sequencing. *Chemosphere* 184, 951–959. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.06.090>
- Ma, S., Tong, M., Yuan, S., Liu, H., 2019. Responses of the Microbial Community Structure in Fe(II)-Bearing Sediments to Oxygenation: The Role of Reactive Oxygen Species. *ACS Earth Sp. Chem.* 3, 738–747. <https://doi.org/10.1021/acsearthspacechem.8b00189>
- Ma, Y., Wang, L., Shao, Z., 2006. Pseudomonas, the dominant polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from Antarctic soils and the role of large plasmids in horizontal gene transfer. *Environ. Microbiol.* 8, 455–465. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00911.x>
- Ma, Y., Zhao, H., Shan, Q., Xu, Y., Yu, M., Cui, J., Liu, T., Qiao, L., He, X., 2021. K-strategy species plays a pivotal role in the natural attenuation of petroleum hydrocarbon pollution in aquifers. *J. Hazard. Mater.* 420, 126559. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126559>
- Madueño, L., Starevich, V.A., Agnello, A.C., Coppotelli, B.M., Laprida, C., Vidal, N.C., Di Marco, P., Oneto, M.E., Del Panno, M.T., Morelli, I.S., 2021. Assessment of Biological Contribution to Natural Recovery of Anthropized Freshwater Sediments From Argentina: Autochthonous Microbiome Structure and Functional Prediction. *Front. Microbiol.* 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.601705>
- Magar, V.S., Chadwick, D.B., Bridges, T.S., Fuchsman, P.C., Conder, J.M., Dekker, T.J., Steevens, J.A., Gustavson, K.E., Mills, M.A., 2009. Monitored Natural Recovery at Contaminated Sediment Sites. *Estcp* 1–276.
- Majone, M., Verdini, R., Aulenta, F., Rossetti, S., Tandoi, V., Kalogerakis, N., Agathos, S., Puig, S., Zanaroli, G., Fava, F., 2015. In situ groundwater and sediment bioremediation: Barriers and perspectives at European contaminated sites. *N. Biotechnol.* 32, 133–146. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2014.02.011>
- Maletić, S.P., Beljin, J.M., Rončević, S.D., Grgić, M.G., Dalmacija, B.D., 2019a. State of the art and future challenges for polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments: sources, fate, bioavailability and remediation techniques. *J. Hazard. Mater.* 365, 467–482. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.11.020>
- Maletić, S.P., Beljin, J.M., Rončević, S.D., Grgić, M.G., Dalmacija, B.D., 2019b. State of the art and future challenges for polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments: sources, fate, bioavailability and remediation techniques. *J. Hazard. Mater.* 365, 467–482. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.11.020>
- Mandic-Mulec, I., Stefanic, P., van Elsas, J.D., 2016. Ecology of bacillaceae. *Bact. Spore From Mol. to Syst.* 59–85. <https://doi.org/10.1128/9781555819323.ch3>
- Marcial Gomes, N.C., Borges, L.R., Paranhos, R., Pinto, F.N., Mendonça-Hagler, L.C.S., Smalla, K., 2008. Exploring the diversity of bacterial communities in sediments of urban mangrove forests. *FEMS Microbiol. Ecol.* 66, 96–109. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00519.x>
- Margesin, R., Feller, G., Hämmerle, M., Stegner, U., & Schinner, F. (2002). A colorimetric method for the determination of lipase activity in soil. *Biotechnology Letters*, 24(1), 27–33. <https://doi.org/10.1023/A:1013801131553>
- Martinez, M.A., Woodcroft, B.J., Ignacio Espinoza, J.C., Zayed, A.A., Singleton, C.M., Boyd, J.A., Li, Y.F., Purvine, S., Maughan, H., Hodgkins, S.B., Anderson, D., Sederholm, M., Temperton, B., Bolduc, B., Saleska, S.R., Tyson, G.W., Rich, V.I., 2019. Discovery and ecogenomic context of a global *Caldiserica*-related phylum active in thawing permafrost, *Candidatus Cryoserica* phylum nov., *Ca. Cryoserica* class nov., *Ca. Cryosericales* ord. nov., *Ca. Cryosericeae* fam. nov., comprising the four species *C. Syst. Appl. Microbiol.*

- 42, 54–66. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2018.12.003>
- Mcveigh, B., 2018. Ecological and Economic Viability of Beneficially Using Dredged Materials for Reclamation Projects. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.34230.75840>
- Meckenstock, R.U., Mouttaki, H., n.d. Anaerobic degradation of non-substituted aromatic hydrocarbons. *Curr. Opin. Biotechnol.* 22, 406–414. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.02.009>
- Medina, R., 2017. Remediación de un suelo crónicamente contaminado con Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos. <https://doi.org/https://doi.org/10.35537/10915/59218>
- Miglani, R., Parveen, N., Kumar, A., Ansari, M.A., Khanna, S., Rawat, G., Panda, A.K., Bisht, S.S., Upadhyay, J., Ansari, M.N., 2022. Degradation of Xenobiotic Pollutants: An Environmentally Sustainable Approach. *Metabolites* 12. <https://doi.org/10.3390/metabo12090818>
- Montecillo, J.A. V., 2023. Phylogenomics and molecular marker-based analyses of the order Nevskiales: proposal for the creation of Steroidobacterales ord. nov. and Peristeroidobacter gen. nov. *Res. Microbiol.* 174, 104057. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2023.104057>
- Mora, V.C., Rosso, J.A., 2022. Treatment of PAH-contaminated soil by persulfate: a review. *Curr. Opin. Chem. Eng.* 37, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.coche.2022.100842>
- Muangchinda, C., Yamazoe, A., Polrit, D., Thoetkiattikul, H., Mhuantong, W., Champreda, V., Pinyakong, O., 2016. Biodegradation of high concentrations of mixed polycyclic aromatic hydrocarbons by indigenous bacteria from a river sediment: a microcosm study and bacterial community analysis. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 4591–4602. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-8185-9>
- Nkanang, A.J., Antai, S.P., Asitok, A.D., Ekpenyong, M., 2018. Hydrocarbonoclastic potentials of Enterobacteriaceae isolated from the crude oil polluted Iko river estuary and freshwater ecosystem of the Niger Delta Region of Nigeria. *GSC Biol. Pharm. Sci.* 2, 038–046. <https://doi.org/10.30574/gscbps.2018.2.1.0058>
- Olaitan, A.O., Morand, S., Rolain, J.M., 2014. Mechanisms of polymyxin resistance: Acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front. Microbiol.* 5, 1–18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00643>
- Olajire AA, E.J., 2014. Aerobic Degradation of Petroleum Components by Microbial Consortia. *J. Pet. Environ. Biotechnol.* 05. <https://doi.org/10.4172/2157-7463.1000195>
- Olaniran, A.O., Balgobind, A., Pillay, B., 2011. Quantitative assessment of the toxic effects of heavy metals on 1,2-dichloroethane biodegradation in co-contaminated soil under aerobic condition. *Chemosphere* 85, 839–847. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.06.091>
- Oliva, A.L., Quintas, P.Y., La Colla, N.S., Arias, A.H., Marcovecchio, J.E., 2015. Distribution, sources, and potential ecotoxicological risk of polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediments from Bahía Blanca Estuary, Argentina. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 69, 163–172. <https://doi.org/10.1007/s00244-015-0169-0>
- Onyena, A.P., Nkwoji, J.A., Chukwu, L.O., Walker, T.R., Sam, K., 2023. Risk assessment of sediment PAH, BTEX, and emerging contaminants in Chanomi Creek Niger Delta, Nigeria. *Environ. Monit. Assess.* 195. <https://doi.org/10.1007/s10661-023-11703-x>
- Palermo, M.R., Schroeder, P.R., Estes, T.J., Francingues, N.R., September, N.R.F., 2008. tabla de contenidos del Technical Guidelines for Environmental Dredging of Contaminated Sediments. *Environ. Lab.* 1–302.
- Parks, D.H., Tyson, G.W., Hugenholtz, P., Beiko, R.G., 2014. STAMP: Statistical analysis of taxonomic and

- functional profiles. *Bioinformatics* 30, 3123–3124. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu494>
- Perelo, L.W., 2010. Review: In situ and bioremediation of organic pollutants in aquatic sediments. *J. Hazard. Mater.* 177, 81–89. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.12.090>
- Polrot, A., Kirby, J.R., Birkett, J.W., Sharples, G.P., 2021. Combining sediment management and bioremediation in muddy ports and harbours: A review. *Environ. Pollut.* 289, 117853. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117853>
- POSTGATE, J.R., 1963. Versatile medium for the enumeration of sulfate-reducing bacteria. *Appl. Microbiol.* 11, 265–267. <https://doi.org/10.1128/am.11.3.265-267.1963>
- Pourret, O., Hursthouse, A., 2019. It's time to replace the term "heavy metals" with "potentially toxic elements" when reporting environmental research. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 16. <https://doi.org/10.3390/ijerph16224446>
- Powell, S.M., Ferguson, S.H., Bowman, J.P., Snape, I., 2006. Using real-time PCR to assess changes in the hydrocarbon-degrading microbial community in Antarctic soil during bioremediation. *Microb. Ecol.* 52, 523–532. <https://doi.org/10.1007/s00248-006-9131-z>
- Premnath, N., Mohanrasu, K., Guru Raj Rao, R., Dinesh, G.H., Prakash, G.S., Ananthi, V., Ponnuchamy, K., Muthusamy, G., Arun, A., 2021. A crucial review on polycyclic aromatic Hydrocarbons - Environmental occurrence and strategies for microbial degradation. *Chemosphere* 280, 130608. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130608>
- Price, M.N., Dehal, P.S., Arkin, A.P., 2010. FastTree 2 - Approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS One* 5. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009490>
- Rabalais, N.N., Wiseman, W.J., Turner, R.E., 1994. Comparison of continuous records of near-bottom dissolved oxygen from the hypoxia zone along the Louisiana coast. *Estuaries* 17, 850–861. <https://doi.org/10.2307/1352753>
- 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. <https://doi.org/10.1128/aem.49.1.1-7.1985>
- Relić, D., Sakan, S., Anđelković, I., Popović, A., Đorđević, D., 2019. Pollution and health risk assessments of potentially toxic elements in soil and sediment samples in a petrochemical industry and surrounding area. *Molecules* 24. <https://doi.org/10.3390/molecules24112139>
- Rosenberg, E., 2013. The prokaryotes: Alphaproteobacteria and betaproteobacteria. *The Prokaryotes: Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria* 1–1012. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-30197-1>
- Rundell, E.A., Banta, L.M., Ward, D. V., Watts, C.D., Birren, B., Esteban, D.J., 2014. 16S rRNA Gene Survey of Microbial Communities in winogradsky columns. *PLoS One* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104134>
- Sabo, M.J., Bryan, C.F., Kelso, W.E., Rutherford, D.A., 1999. Hydrology and aquatic habitat characteristics of a riverine swamp: I. Influence of flow on water temperature and chemistry. *River Res. Appl.* 15, 505–523. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1099-1646\(199911/12\)15:6<505::aid-rrr553>3.0.co;2-v](https://doi.org/10.1002/(sici)1099-1646(199911/12)15:6<505::aid-rrr553>3.0.co;2-v)
- Salazar-Ardiles, C., Caimanque, T., Galetović, A., Vilo, C., Araya, J.E., Flores, N., Gómez-Silva, B., 2020. *Staphylococcus sciuri* Strain LCHXa is a Free-Living Lithium-Tolerant Bacterium Isolated from Salar de Atacama, Chile. *Microorganisms* 8, 668. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8050668>

- Sarahi, A., Garcia, L., Mehrshad, M., 2020. Freshwater Chlorobia exhibit metabolic specialization among Affiliations : bioRxiv 1–21.
- Sarkar, J., Saha, A., Roy, A., Bose, H., Pal, S., Sar, P., Kazy, S.K., 2020. Development of nitrate stimulated hydrocarbon degrading microbial consortia from refinery sludge as potent bioaugmenting agent for enhanced bioremediation of petroleum contaminated waste. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 36, 1–20. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02925-z>
- Sei, K., Asano, K.I., Tateishi, N., Mori, K., Ike, M., Fujita, M., 1999. Design of PCR primers and gene probes for the general detection of bacterial populations capable of degrading aromatic compounds via catechol cleavage pathways. *J. Biosci. Bioeng.* 88, 542–550. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(00\)87673-2](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(00)87673-2)
- Silva Rabelo, C.A.B., Camargo, F.P., Sakamoto, I.K., Varesche, M.B.A., 2023. Metataxonomic characterization of an autochthonous and allochthonous microbial consortium involved in a two-stage anaerobic batch reactor applied to hydrogen and methane production from sugarcane bagasse. *Enzyme Microb. Technol.* 162, 110119. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2022.110119>
- Staats, M., Braster, M., Röling, W.F.M., 2011. Molecular diversity and distribution of aromatic hydrocarbon-degrading anaerobes across a landfill leachate plume. *Environ. Microbiol.* 13, 1216–1227. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02421.x>
- Starevich, V., Madueño, L., Festa, S., Agnello, A.C., Cecotti, M., Layún, M.F., Oneto, M.E., Del Panno, M.T., Morelli, S., I., 2024. Microbial community structure and metabolic profile of anthropized freshwater tributary channels from La Plata River , Argentina , to develop sustainable remediation strategies. *Environ. Monit. Assess.* 1–19. <https://doi.org/10.1007/s10661-024-12713-z>
- Stauffert, M., Cravo-Laureau, C., Duran, R., 2015. Dynamic of sulphate-reducing microorganisms in petroleum-contaminated marine sediments inhabited by the polychaete *Hediste diversicolor*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 15273–15284. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3624-y>
- Sultanpuram, V.R., Mothe, T., 2018. *Thalassorhabdus alkalitolerans* gen. nov., sp. nov., a novel Bacillaceae member isolated from marine sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 68, 2969–2976. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002931>
- Thalman, A. (1968). *Zur Methodik der Bestimmung der Dehydrogenase-Aktivität im Boden*. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde*, 118(1), 65-72.
- Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) Mittels. *Forsch*, 21, 249–258.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731–2739. <https://doi.org/10.1093/molbev/msr121>
- Tamura, K., Stecher, G., Kumar, S., 2021. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol. Biol. Evol.* 38, 3022–3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
- Táncsics, A., Szalay, A.R., Farkas, M., Benedek, T., Szoboszlai, S., Szabó, I., Lueders, T., 2018. Stable isotope probing of hypoxic toluene degradation at the Siklós aquifer reveals prominent role of Rhodocyclaceae. *FEMS Microbiol. Ecol.* 94, 1–11. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy088>
- Varjani, S.J., 2017. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. *Bioresour. Technol.* 223, 277–286. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.037>

- Vautrin, F., Pujic, P., Paquet, C., Bergeron, E., Mouni e, D., Marchal, T., Salord, H., Bonnet, J.M., Cournoyer, B., Winiarski, T., Louzier, V., Rodriguez-Nava, V., 2021. Microbial risk assessment of *Nocardia cyriacigeorgica* in polluted environments, case of urban rainfall water. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 19, 384–400. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.12.017>
- 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. [https://doi.org/10.1016/0269-7491\(90\)90190-N](https://doi.org/10.1016/0269-7491(90)90190-N)
- Verchot, L. V., Borelli, T., 2005. Application of para-nitrophenol (pNP) enzyme assays in degraded tropical soils. *Soil Biol. Biochem.* 37, 625–633. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.09.005>
- Vigneron, A., Cruaud, P., Lovejoy, C., Vincent, W.F., 2023. Genomic insights into cryptic cycles of microbial hydrocarbon production and degradation in contiguous freshwater and marine microbiomes. *Microbiome* 11, 1–12. <https://doi.org/10.1186/s40168-023-01537-7>
- VLMP, 2021. Maximum Dissolved Oxygen Concentration. Missouri Dep. Nat. Resour. 1–3.
- Voogt, P. De, 2020. Reviews of Contamination and Toxicology.
- Wald, J., Hroudova, M., Jansa, J., Vrchotova, B., Macek, T., Uhlik, O., 2015. Pseudomonads rule degradation of polyaromatic hydrocarbons in aerated sediment. *Front. Microbiol.* 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01268>
- Wang, C., Hao, Z., Huang, C., Wang, Q., Yan, Z., Bai, L., Jiang, H., Li, D., 2022. Drinking water treatment residue recycled to synchronously control the pollution of polycyclic aromatic hydrocarbons and phosphorus in sediment from aquatic ecosystems. *J. Hazard. Mater.* 431, 128533. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.128533>
- Wang, H., Liu, X., Wang, Y., Zhang, S., Zhang, G., Han, Y., Li, M., Liu, L., 2023. Spatial and temporal dynamics of microbial community composition and factors influencing the surface water and sediments of urban rivers. *J. Environ. Sci. (China)* 124, 187–197. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2021.10.016>
- Wang, M., Sha, C., Wu, Jian, Su, J., Wu, Jianqiang, Wang, Q., Tan, J., Huang, S., 2021. Bacterial community response to petroleum contamination in brackish tidal marsh sediments in the Yangtze River Estuary, China. *J. Environ. Sci. (China)* 99, 160–167. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2020.06.015>
- Wang, Z., Liu, F., Li, E., Yuan, Y., Yang, Y., Xu, M., Qiu, R., 2022. Network analysis reveals microbe-mediated impacts of aeration on deep sediment layer microbial communities. *Front. Microbiol.* 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.931585>
- Wartell, B., Boufadel, M., Rodriguez-Freire, L., 2021. An effort to understand and improve the anaerobic biodegradation of petroleum hydrocarbons: A literature review. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 157. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2020.105156>
- Wegner, C., Gorniak, L., Riedel, S., Westermann, M., 2020. Lanthanide-Dependent Methylotrophs of the Family. *Appl. Environ. Microbiol.* 86, 1–18.
- Wotanis, C.K., Brennan, W.P., Angotti, A.D., Villa, E.A., Zayner, J.P., Mozina, A.N., Rutkovsky, A.C., Sobe, R.C., Bond, W.G., Karatan, E., 2017. Relative contributions of norspermidine synthesis and signaling pathways to the regulation of *Vibrio cholerae* biofilm formation. *PLoS One* 12, 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186291>

- 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.
- Wunder, L.C., Aromokeye, D.A., Yin, X., Richter-Heitmann, T., Willis-Poratti, G., Schnakenberg, A., Otersen, C., Dohrmann, I., Römer, M., Bohrmann, G., Kasten, S., Friedrich, M.W., 2021. Iron and sulfate reduction structure microbial communities in (sub-)Antarctic sediments. *ISME J.* 15, 3587–3604. <https://doi.org/10.1038/s41396-021-01014-9>
- Xiao, R., Kuang, B., Hu, Y., Wang, Y., Bai, J., Zhang, L., Wang, C., Wei, Z., Zhang, K., Jorquera, M.A., Campos, M., Acuña, J.J., Pan, W., 2023. Ecological risk assessment of glyphosate and its possible effect on bacterial community in surface sediments of a typical shallow Lake, northern China. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 249. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.114445>
- Xie, Y., Wang, J., Wu, Y., Ren, C., Song, C., Yang, J., Yu, H., Giesy, J.P., Zhang, X., 2016. Using in situ bacterial communities to monitor contaminants in river sediments. *Environ. Pollut.* 212, 348–357. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.01.031>
- Xu, S., Zhan, L., Tang, W., Wang, Q., Dai, Z., Zhou, L., Feng, T., Chen, M., Wu, T., Hu, E., Yu, G., 2023. MicrobiotaProcess: A comprehensive R package for deep mining microbiome. *Innovation* 4, 100388. <https://doi.org/10.1016/j.xinn.2023.100388>
- Yamada, K.D., Tomii, K., Katoh, K., 2016. Application of the MAFFT sequence alignment program to large data - Reexamination of the usefulness of chained guide trees. *Bioinformatics* 32, 3246–3251. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw412>
- Yan, Y., Xu, J., Huang, W., Fan, Y., Li, Z., Tian, M., Ma, J., Lu, X., Liang, J., 2024. Metagenomic and Culturomics Analysis of Microbial Communities within Surface Sediments and the Prevalence of Antibiotic Resistance Genes in a Pristine River: The Zaqu River in the Lancang River Source Region, China. *Microorganisms* 12, 911. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12050911>
- Yan, Z., Hao, Z., Wu, H., Jiang, H., Yang, M., Wang, C., 2019. Co-occurrence patterns of the microbial community in polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated riverine sediments. *J. Hazard. Mater.* 367, 99–108. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.12.071>
- Yang, X., Li, E., Liu, F., Xu, M., 2020. Interactions of PAH-degradation and nitrate-/sulfate-reducing assemblages in anaerobic sediment microbial community. *J. Hazard. Mater.* 388, 122068. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122068>
- Yang, Y., Sanford, R., Yan, J., Chen, G., Li, X., 2020. Roles of Organohalide-Respiring Dehalococcoidia in Carbon Cycling 5, 1–12.
- Yi, Y., Lin, C., Wang, W., Song, J., 2021. Habitat and seasonal variations in bacterial community structure and diversity in sediments of a Shallow lake. *Ecol. Indic.* 120, 106959. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.106959>
- Youssef, M., El-Taweel, G.E., El-Naggar, M., El-Hawary, S.E., El-Meleigy, M.A., Ahmed, S.A., 2010. Hydrocarbon degrading bacteria as indicator of petroleum pollution in Ismailia Canal, Egypt. *World Appl. Sci. J.* 8, 1226–1233.
- Yu, X.Y., Yu, X.D., Fu, G.Y., Zhao, Z., Shen, X., Sun, C., Wu, M., 2018. *Marinicaulis flavus* gen. nov., sp. nov., a novel stalked bacterium of the family Parvularculaceae. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 68, 2061–2067. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002795>

- Zakharova, Y.R., Parfenova, V. V., Granina, L.Z., Kravchenko, O.S., Zemskaia, T.I., 2010. Distribution of iron- and manganese-oxidizing bacteria in the bottom sediments of Lake Baikal. *Int. Water Biol.* 3, 313–321. <https://doi.org/10.1134/S1995082910040036>
- Zárate, A., Molina, V., Valdés, J., Icaza, G., Vega, S.E., Castillo, A., Ugalde, J.A., Dorador, C., 2023. Spatial co-occurrence patterns of benthic microbial assemblage in response to trace metals in the Atacama Desert Coastline. *Front. Microbiol.* 13, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1020491>
- Zedelius, J., Rabus, R., Grundmann, O., Werner, I., Brodkorb, D., Schreiber, F., Ehrenreich, P., Behrends, A., Wilkes, H., Kube, M., Reinhardt, R., Widdel, F., 2011. Alkane degradation under anoxic conditions by a nitrate-reducing bacterium with possible involvement of the electron acceptor in substrate activation. *Environ. Microbiol. Rep.* 3, 125–135. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2010.00198.x>
- Zelinkova, Z., Wenzl, T., 2015. The Occurrence of 16 EPA PAHs in Food – A Review. *Polycycl. Aromat. Compd.* 35, 248–284. <https://doi.org/10.1080/10406638.2014.918550>
- Zhang, D., Wang, Y., Yang, H., Lan, S., Chen, C., Dai, B., Wang, C., Li, X., Xie, Y., 2023. Using intermittent moving aeration to repair hypereutrophic pond: nutrient removal efficiency and microbial diversity analysis. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 30, 46697–46710. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-25368-z>
- Zhang, L., Tu, D., Li, X., Lu, W., Li, J., 2020. Impact of long-term industrial contamination on the bacterial communities in urban river sediments. *BMC Microbiol.* 20, 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01937-x>
- Zhang, M., Sun, Q., Chen, P., Wei, X., Wang, B., 2022. How microorganisms tell the truth of potentially toxic elements pollution in environment. *J. Hazard. Mater.* 431, 128456. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.128456>
- Zhou, X., Lennon, J.T., Lu, X., Ruan, A., 2023. Anthropogenic activities mediate stratification and stability of microbial communities in freshwater sediments. *Microbiome* 11, 1–19. <https://doi.org/10.1186/s40168-023-01612-z>
- Zhu, B., Friedrich, S., Wang, Z., Táncsics, A., Lueders, T., 2020. Availability of Nitrite and Nitrate as Electron Acceptors Modulates Anaerobic Toluene-Degrading Communities in Aquifer Sediments. *Front. Microbiol.* 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01867>
- Zhu, H.S., Liang, X., Liu, J.C., Zhong, H.Y., Yang, Y.H., Guan, W.P., Du, Z.J., Ye, M.Q., 2023. Antibiotic and Heavy Metal Co-Resistant Strain Isolated from Enrichment Culture of Marine Sediments, with Potential for Environmental Bioremediation Applications. *Antibiotics* 12. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12091379>
- Ziervogel, K., Joye, S.B., Arnosti, C., 2016. Microbial enzymatic activity and secondary production in sediments affected by the sedimentation pulse following the Deepwater Horizon oil spill. *Deep. Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* 129, 241–248. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2014.04.003>
- Ziervogel, K., Kamalanathan, M., Quigg, A., 2022. Hydrolysis of Methylumbelliferyl Substrate Proxies for Esterase Activities as Indicator for Microbial Oil Degradation in the Ocean: Evidence from Observations in the Aftermath of the Deepwater Horizon Oil Spill (Gulf of Mexico). *J. Mar. Sci. Eng.* 10. <https://doi.org/10.3390/jmse10050583>

Anexo

Tabla Anexa 1A: Descripción Core I.

<i>Core I</i>	<i>Profundidad (cm)</i>	<i>Color húmedo</i>	<i>Color seco</i>	<i>Descripción</i>
H0	0-14	GLEY 1 2.5/10Y	2.5Y 4/2	Fangos coloidales hidrocarbúferos gelificados a fangos negros
H1	14-90	GLEY 1 2.5/5GY	5Y 2.5/1	Fango coloidal hidrocarbúferos gelificado negro verdoso
H2	90-141	GLEY 1 2.5/N	GELY 1 2.5/N	Fangos coloidales hidrocarbúferos color negro viscosos, macizos con escasa participación clástica
H3	141-159.5	GLEY 1 2.5/N	GLEY 1 2.5/10Y	Fangos clásticos, limos arcillosos negros con restos vegetales
H4	159.5-184	GLEY 1 3/N	5Y 5/1	Fangos clásticos, arcillas limosas y limos arcillosos bien consolidados gris oscuro. A los 177 cm presentan lente discreta de arena
H5	184-194	GLEY 1 4/N	5Y 4/1	Fangos clásticos, arcillas limosas grises bien consolidadas gris oscuro algo plásticas granocreciente, moteados y con veteado perceptible
H6	194-213	5Y 3/1	5Y 4/1	Fangos clásticos, arcillas limosas color gris muy oscuro moteadas y veteadas algo plásticas. Hacia el techo presenta arenas finas y limos gruesos

Tabla Anexa 1B: Descripción Core IR.

<i>Core IR</i>	<i>Profundidad (cm)</i>	<i>Color húmedo</i>	<i>Color seco</i>	<i>Descripción</i>
H0	0-31.5	Gley 1 2.5/10Y	2.5Y 4/2	Fangos coloidales hidrocarburíferos gelificados a fangos orgánicos en húmedo negro verdosos
H1	31.5-108	GLEY 1 2.5/5GY	5Y 2.5/1	Fangos coloidales hidrocarburíferos gelificados color negro verdoso, con escasa participación clástica
H2	108-146	GLEY 1 2.5/N	GELY 1 2.5/N	Fangos coloidales hidrocarburíferos color negro viscosos, macizos con escasa participación clástica
H3	146-166.5	GLEY 1 2.5/N	GLEY 1 2.5/10Y	Fangos clásticos negros muy oscuros y con abundantes restos vegetales
H4	166.5-181	GLEY 1 3/N	5Y 5/1	Fangos clásticos, arcillas limosas y limos arcillosos bien consolidados gris oscuro. A los 178 cm se encuentra conchilla de bivalvo indeterminable
H5	181-200	GLEY 1 4/N	5Y 4/1	Fangos clásticos grises oscuros en húmedo, arcillas con limo subordinado bien consolidados, algo plásticas, granocreciente moteados y con veteado perceptible con lentes centimétricas de arcillas grises claras
H6	200-223	5Y 3/1	5Y 4/1	Fangos clásticos gris muy oscuro, arcillas limosas gris claro, moteadas y veteadas algo plásticas. El moteado es poco perceptible. Escasos restos vegetales

Tabla Anexa 1C: Descripción Core M.

<i>Core M</i>	<i>Profundidad (cm)</i>	<i>Color húmedo</i>	<i>Color seco</i>	<i>Descripción</i>
H0	0-9	Gley 1 2.5N	5Y 4/1	Cuña de fangos hidrocarburíferos coloidales negros saturados en agua con muy escasa participación clástica
H1	9-12	Gley 1 2.5/10Y	5Y 4/2	Cuña de fangos clásticos negros verdosos, material arcillo-limoso levemente consolidado
H2	12-25.5	Techo: Gley 1 5/N Base: Gley 1 3/N	10YR 3/1	Fangos clásticos arcillosos bien consolidados, masivos, plásticos con restos vegetales y escaso contenido de limo, moteado color gris oscuro en la base. Pasa transicionalmente al gris en el techo donde aumenta la participación limosa
H3	25.5-37	Gley 2 2.5/5PB	Gley 1 2.5 /N	Limos arcillosos negro -azulino masivos a levemente veteados
H4	37-43.5	2.5Y 4/1	2.5Y 5/1	Fangos clásticos gris oscuro. Arcillas limosas plásticas a limos arcillosos grises claros moteados levemente veteados. Constituye un típico relleno de canal de marea con influencia antrópica y escasa materia orgánica

Tabla Anexa 1D: Descripción Core MR.

<i>Core MR</i>	<i>Profundidad (cm)</i>	<i>Color húmedo</i>	<i>Color seco</i>	<i>Descripción</i>
H0	0-2	Gley 1 2.5/N	2.5Y 4/1	Cuña de fangos hidrocarburíferos coloidales negros saturados en agua con muy escasa participación clástica
H1	2-6.5	Gley 1 2.5/10Y	2.5Y 3/1	Fangos coloidales hidrocarburíferos con moderada participación clástica
H2	6.5-18.8	Gley 1 2.5/N	Techo Gley 1 2.5/N Base 5Y 5/1	Fangos coloidales hidrocarburíferos con moderada participación clástica, presenta residuos de construcción
H3	18.8-24.4	5Y 4/1	10YR 4/2	Fangos clásticos constituidos por limo arcilloso masivo algo consolidado
H4	24.4- 37.5	Gley 1 2.5/N	10YR 4/1	Nivel arcilloso masivo algo moteado
H5	37.5-47	Gley 1 3/N	2.5Y 5/1	Limos arcillosos algo granular, consolidado masivos con restos antrópicos, en húmedo color gris muy oscuro, en seco gris con escasa participación de hidrocarburos. Puede corresponder a un nivel edáfico
H6	47-69	Techo: 2.5Y 4/1 Base:Gley 1 7/10Y	5Y 5/1	Fango clástico. Arcilla limosa gris plástica clara algo veteada, moteada color gris oscuro en el techo que pasa a gris verdoso claro en húmedo y gris en seco, se correlaciona con el nivel H4 del core 8. Presenta en la base 2 cm de restos de origen antrópico y descarte de materiales de construcción

Tabla Anexa 1E: Descripción Core E.

<i>Core E</i>	<i>Profundidad (cm)</i>	<i>Color húmedo</i>	<i>Color seco</i>	<i>Descripción</i>
H0	0-21,5	GLE Y1 2.5/5G	5Y 2.5/1	Fangos orgánicos hidrocarbúferos coloidales gelificados con escaso material clástico y restos vegetales
H1	21,5-48,3	GLE Y1 2.5/5G	5Y 2.5/1	Alternancia de fangos hidrocarbúferos coloidales gelificados con escasa participación y fangos clásticos con hidrocarburos gris oscuro. Presenta un veteado grosero
H2	48,3-98	GLE Y1 2.5/5GY	GLE Y1 2.5/N	Fangos hidrocarbúferos con participación clástica sobresaturado en hidrocarburos de aspecto masivo hacia el techo
H3	98-125,5	GLE Y1 2.5/N	GLE Y1 2.5/N	Fangos hidrocarbúferos clásticos con abundante participación clástica limosa y restos antrópicos y vegetales. Sectores veteados
H4	125,5-164	GLE Y1 2.5/10GY	GLE Y 1 2.5/5GY	Alternancia de fangos hidrocarbúferos con fangos hidrocarbúferos con participación clástica evidenciado con veteado incipiente. Abundantes restos vegetales

Tabla Anexa 1F: Descripción Core ER.

<i>Core ER</i>	<i>Profundidad (cm)</i>	<i>Color húmedo</i>	<i>Color seco</i>	<i>Descripción</i>
H0	0-21,5	GLE Y1 2.5/5G	5Y 2.5/1	Fangos orgánicos a fangos hidrocarburíferos coloidales gelificados con escaso material clástico y restos vegetales
H1	21,5-48,3	GLE Y1 2.5/5G	5Y 2.5/1	Alternancia de fangos hidrocarburíferos coloidales gelificados con escasa participación y fangos clásticos con hidrocarburos gris oscuro. Presenta banco de arenas embebidas
H2	48,3-98	GLE Y1 2.5/5GY	GLE Y1 2.5/N	Alternancia de fangos hidrocarburíferos coloidales gelificados y fangos clásticos arcillosos con abundante hidrocarburo
H3	98-125,5	GLE Y1 2.5/N	GLE Y1 2.5/N	Fangos clásticos limo-arcillosos granocrecientes con hidrocarburos de textura untuosa
H4	125,5-164	GLE Y1 2.5/10GY	GLE Y 1 2.5/5GY	Fangos clásticos arcillosos sobresaturados en hidrocarburos de aspecto veteado y con abundantes restos vegetales

Tabla Anexa 2A: Recuentos Core I. En color violeta los recuentos son menores a ese valor. En color verde recuentos mayores a ese valor.

	Core I						
	H0	H1	H2	H3	H4	H5	H6
Bacterias Heterótrofas Aeróbicas (ufc/ml)	2,83X10 ⁰⁵	4,26X10 ⁰⁴	5,56X10 ⁰⁵	1,14X10 ⁰⁷	8,10X10 ⁰³	ND	ND
Bacterias Heterótrofas Anaeróbicas (NMP/ml)	2,13X10 ⁰⁸	1,97X10 ⁰⁷	2,99X10 ⁰⁶	8,79X10 ⁰⁵	6,33X10 ⁰⁶	3,78X10 ⁰⁶	1,79X10 ⁰⁶
Bacterias Sulfato Reductoras (NMP/ml)	5,63x10 ⁰³	1,55x10 ⁰³	7,17x10 ⁰¹	7,47X10 ⁰²	5,69X10 ⁰¹	5,66X10 ⁰¹	4,61X10 ⁰¹
Bacterias degradadoras de hidrocarburos alifáticos (NMP/ml)	4,84X10 ⁰⁵	2,29X10 ⁰⁵	5,61X10 ⁰⁴	1,74X10 ⁰⁵	5,75X10 ⁰⁴	6,21X10 ⁰⁴	5,12X10 ⁰⁴
Bacterias degradadoras de hidrocarburos aromáticos (NMP/ml)	8,81X10 ⁰⁵	2,67X10 ⁰⁴	1,08X10 ⁰⁴	1,27X10 ⁰⁴	8,26X10 ⁰³	8,92X10 ⁰³	7,17X10 ⁰³

Tabla Anexa 2B: Recuentos Core IR. En color violeta, los recuentos son menores a ese valor. En color verde, recuentos mayores a ese valor.

Recuentos	Core IR						
	H0	H1	H2	H3	H4	H5	H6
Bacterias Heterótrofas Aeróbicas (ufc/ml)	5,43X10 ⁰⁴	1,05X10 ⁰⁴	1,30X10 ⁰⁴	3,07X10 ⁰⁴	1,75X10 ⁰⁴	1,17X10 ⁰⁴	1,73X10 ⁰⁴
Bacterias Heterótrofas Anaeróbicas (NMP/ml)	4,22X10 ⁰⁷	2,02X10 ⁰⁷	1,94X10 ⁰⁷	1,93X10 ⁰⁷	5,35X10 ⁰⁶	3,24X10 ⁰⁶	4,37X10 ⁰⁸
Bacterias Sulfato Reductoras (NMP/ml)	2,30X10 ⁰²	1,73X10 ⁰²	7,04X10 ⁰¹	8,15X10 ⁰¹	5,66X10 ⁰¹	5,55X10 ⁰¹	4,92X10 ⁰¹
Bacterias degradadoras de hidrocarburos alifáticos (NMP/ml)	1,86X10 ⁰⁵	7,70X10 ⁰⁴	7,78X10 ⁰⁴	1,74X10 ⁰⁵	2,23X10 ⁰⁴	5,02X10 ⁰⁶	4,52X10 ⁰⁶
Bacterias degradadoras de hidrocarburos aromáticos (NMP/ml)	2,63X10 ⁰⁵	2,69X10 ⁰⁴	1,06X10 ⁰⁴	1,22X10 ⁰⁴	8,92X10 ⁰³	8,79X10 ⁰³	7,92X10 ⁰³

Tabla Anexa 2C: Recuentos Core M. En color violeta los recuentos son menores a ese valor. En color verde recuentos mayores a ese valor.

Parámetros	Core M				
	H0	H1	H2	H3	H4
Bacterias Heterótrofas Aeróbicas (ufc/ml)	3,68X10 ⁰⁵	1,78X10 ⁰⁵	2,75X10 ⁰³	2,95X10 ⁰⁴	1,81X10 ⁰⁵
Bacterias Heterótrofas Anaeróbicas (NMP/ml)	1,21X10 ⁰⁷	1,17X10 ⁰⁶	2,00X10 ⁰⁷	2,41X10 ⁰⁶	1,08X10 ⁰⁷
Bacterias Sulfato Reductoras (NMP/ml)	1,47X10 ⁰⁴	1,11X10 ⁰⁴	4,46X10 ⁰²	9,30X10 ⁰²	8,86X10 ⁰²
Bacterias degradadoras de hidrocarburos alifáticos (NMP/ml)	1,03X10 ⁰⁵	5,82X10 ⁰⁵	3,33X10 ⁰⁵	8,87X10 ⁰⁴	4,23X10 ⁰⁴
Bacterias degradadoras de hidrocarburos aromáticos (NMP/ml)	2,39X10 ⁰⁵	5,15X10 ⁰⁴	8,48X10 ⁰²	9,55X10 ⁰²	8,77X10 ⁰²

Tabla Anexa 2D: Recuentos Core MR. En color violeta, los recuentos son menores a ese valor. En color verde, recuentos mayores a ese valor.

Parámetros	Core MR						
	H0	H1	H2	H3	H4	H5	H6
Bacterias Heterótrofas Aeróbicas (ufc/ml)	9,60X10 ⁰⁵	7,93X10 ⁰⁴	5,30X10 ⁰⁴	1,20X10 ⁰⁴	1,37X10 ⁰³	3,75X10 ⁰⁵	2,04X10 ⁰⁵
Bacterias Heterótrofas Anaeróbicas (NMP/ml)	1,45X10 ⁰⁶	7,66X10 ⁰⁶	8,93X10 ⁰⁶	2,56X10 ⁰⁶	1,90X10 ⁰⁶	5,72X10 ⁰⁶	6,20X10 ⁰⁵
Bacterias Sulfato Reductoras (NMP/ml)	1,45X10 ⁰²	5,99X10 ⁰¹	5,95X10 ⁰¹	5,76X10 ⁰¹	5,69X10 ⁰¹	2,36X10 ⁰²	6,89X10 ⁰¹
Bacterias degradadoras de hidrocarburos alifáticos (NMP/ml)	1,24X10 ⁰⁷	5,71X10 ⁰⁶	3,00X10 ⁰⁶	5,54X10 ⁰⁵	9,20X10 ⁰⁵	1,18X10 ⁰⁶	1,19X10 ⁰⁵
Bacterias degradadoras de hidrocarburos aromáticos (NMP/ml)	6,99X10 ⁰⁵	1,66X10 ⁰⁴	1,00X10 ⁰³	8,86X10 ⁰²	9,20X10 ⁰³	9,59X10 ⁰²	1,03X10 ⁰³

Tabla Anexa 2E: Recuentos Core E. En color violeta los recuentos son menores a ese valor. En color verde recuentos mayores a ese valor.

Recuentos	E				
	H0	H1	H2	H3	H4
Bacterias Heterótrofas Aerobias (ufc/ml)	2,35X10 ⁰⁴	2,37X10 ⁰⁴	8,96X10 ⁰⁴	2,21X10 ⁰⁴	5,87X10 ⁰³
Bacterias Heterótrofas Anaerobias (NMP/ml)	1,36X10 ⁰⁷	9,86X10 ⁰⁵	7,00X10 ⁰⁵	7,88X10 ⁰⁵	6,95X10 ⁰⁵
Bacterias Sulfato Reductoras (NMP/ml)	7,86X10 ⁰³	4,93x1004	6,61X10 ⁰²	1,75X10 ⁰²	2,70X10 ⁰²
Bacterias degradadoras de alifáticos (NMP/ml)	4,00X10 ⁰⁵	1,15X10 ⁰⁶	4,35X10 ⁰⁴	7,36X10 ⁰⁴	7,04X10 ⁰³
Bacterias degradadoras de aromáticos (NMP/ml)	6,23X10 ⁰⁴	1,64X10 ⁰³	1,06X10 ⁰³	1,21X10 ⁰³	1,10X10 ⁰³

Tabla Anexa 2F: Recuentos Core ER. En color violeta los recuentos son menores a ese valor. En color verde recuentos mayores a ese valor.

Recuentos	ER				
	H0	H1	H2	H3	H4
Bacterias Heterótrofas Aerobias (ufc/ml)	1,44X10 ⁰⁴	8,51X10 ⁰⁴	2,76X10 ⁰³	9,67X10 ⁰³	6,30X10 ⁰³
Bacterias Heterótrofas Anaerobias (NMP/ml)	2,20X10 ⁰⁷	1,98X10 ⁰⁶	7,43X10 ⁰⁵	3,99X10 ⁰⁶	4,98X10 ⁰⁷
Bacterias Sulfato Reductoras (NMP/ml)	8,37X10 ⁰³	1,04X10 ⁰⁴	1,86X10 ⁰³	6,72X10 ⁰⁴	1,02X10 ⁰³
Bacterias degradadoras de alifáticos (NMP/ml)	1,45X10 ⁰⁵	6,83X10 ⁰⁵	4,23X10 ⁰⁴	1,93X10 ⁰⁵	3,15X10 ⁰⁴
Bacterias degradadoras de aromáticos (NMP/ml)	2,05X10 ⁰⁴	1,37X10 ⁰⁴	1,13X10 ⁰³	3,50X10 ⁰⁴	1,35X10 ⁰³

Tabla Anexa 3A: Parámetros fisicoquímicos en base húmeda Cores I e IR.

Parámetros	Unidad	Cores I y IR							
		H0	H1	H2	H3	H4	H5	H6	
Hidrocarburos Totales de C6-C35	mg/kg	15000	30570	157400	88000	8100	9000	176	
Hidrocarburos Totales Rango >nC6 a nC8	mg/kg	< 50.0	< 50.0	70,8	< 50.0	< 50.0	< 50.0	< 50.0	
Hidrocarburos Totales Rango >nC8 a nC10	mg/kg	< 50.0	< 50.0	117	66,0	< 50.0	< 50.0	< 50.0	
Hidrocarburos Totales Rango >nC10 a nC12	mg/kg	574	1219	7277	4643	278	306	< 50.0	
Hidrocarburos Totales Rango >nC12 a nC16	mg/kg	1399	4599	38564	16626	1846	2017	< 50.0	
Hidrocarburos Totales Rango >nC16 a nC21	mg/kg	4575	8126	50252	34002	2973	3390	66,6	
Hidrocarburos Totales Rango >nC21 a nC35	mg/kg	8481	16627	61131	32673	3017	3297	109	
Hidrocarburos Alifáticos: nC6	mg/kg	< 50.0	< 50.0	< 50.0	< 50.0	< 50.0	< 50.0	< 50.0	
Hidrocarburos Alifáticos Rango >nC6 a nC8	mg/kg	< 50.0	< 50.0	< 50.0	< 50.0	< 50.0	< 50.0	< 50.0	
Hidrocarburos Alifáticos Rango >nC8 a nC10	mg/kg	< 50.0	< 50.0	68,6	< 50.0	< 50.0	< 50.0	< 50.0	
Hidrocarburos Alifáticos Rango >nC10 a nC12	mg/kg	337	715	4268	2253	163	179	< 50.0	

Hidrocarburos Alifáticos Rango >nC12 a nC16	mg/kg	721	2297	20618	875	983	1183	< 50.0
Hidrocarburos Alifáticos Rango >nC16 a nC21	mg/kg	3472	4166	26476	17942	1544	1688	< 50.0
Hidrocarburos Alifáticos Rango >nC21 a nC35	mg/kg	2870	8752	32650	18163	1469	1634	< 50.0
Hidrocarburos Aromáticos Rango >nC7 a nC8	mg/kg	< 50.0	< 50.0	< 50.0	< 50.0	< 50.0	< 50.0	< 50.0
Hidrocarburos Aromáticos Rango >nC8 a nC10	mg/kg	< 50.0	< 50.0	< 50.0	< 50.0	< 50.0	< 50.0	< 50.0
Hidrocarburos Aromáticos Rango >nC10 a nC12	mg/kg	151	321	1917	1223	73,3	80,6	< 50.0
Hidrocarburos Aromáticos Rango >nC12 a nC16	mg/kg	369	1712	12160	4081	586	531	< 50.0
Hidrocarburos Aromáticos Rango >nC16 a nC21	mg/kg	1210	3241	15241	8960	783	893	< 50.0
Hidrocarburos Aromáticos Rango >nC21 a nC35	mg/kg	2665	4381	18108	8609	795	869	< 50.0
Benceno	mg/kg	< 0.05	0,25	0,74	< 0.05	ND	ND	ND
Tolueno	mg/kg	< 0.05	0,15	0,26	ND	ND	ND	ND
Etilbenceno	mg/kg	ND	< 0.05	ND	ND	ND	ND	ND
m,p-Xileno	mg/kg	0,07	0,38	0,79	0,31	ND	ND	ND
o-Xileno	mg/kg	< 0.05	0,09	0,23	0,08	ND	ND	ND
Naftaleno	mg/kg	ND						
Acenaftileno	mg/kg	ND						
Acenafteno	mg/kg	< 0.1	0,5	1,4	0,7	< 0.1	0,2	ND
Fluoreno	mg/kg	0,1	1,9	24,4	7,6	0,8	0,8	ND
Fenantreno	mg/kg	0,5	16,9	116	55,1	3,2	2,4	ND
Antraceno	mg/kg	ND	ND	4,0	ND	ND	ND	ND
Fluoranteno	mg/kg	0,1	2,4	6,6	4,2	ND	0,1	ND
Pireno	mg/kg	0,5	12,3	23,0	9,7	0,5	0,4	ND
Benzo(a)antraceno	mg/kg	0,3	13,3	22,8	7,6	0,3	0,3	ND
Criseno	mg/kg	< 0.1	10,7	17,9	4,9	< 0.1	< 0.1	ND
Benzo(b)fluoranteno	mg/kg	0,4	11,1	38,0	6,0	0,4	ND	ND
Benzo(k)fluoranteno	mg/kg	ND						
Benzo(a)pireno	mg/kg	0,6	14,5	26,5	11,0	0,4	ND	ND
Dibenzo(a,h)antraceno	mg/kg	ND						
Benzo(g,h,i)perileno	mg/kg	0,5	5,5	5,2	2,1	0,3	0,4	ND
Indeno(1,2,3-cd)pireno	mg/kg	ND						
Relación C17/ Pristano	---	0,12	0,10	0,03	0,03	0,03	0,07	0,10
Relación C18/ Fitano	---	0,10	0,13	0,06	0,05	0,10	0,12	0,03
pH Relación 1:1	UpH	7,5	7,6	7,7	7,7	7,5	7,7	7,1
Sulfuro Total	mg/kg	287	286	1120	1080	< 50.0	< 50.0	< 50.0
Sulfato Soluble en Medio Acuoso	mmol/l	0,51	1,60	2,57	2,84	1,48	1,02	0,51

Nitrógeno Total Kjeldahl	mg/kg	134	1910	3947	1996	3016	1230	608
Nitrito soluble en medio acuoso	mmol/l	0,17	< 0.02	< 0.02	< 0.02	< 0.02	< 0.02	< 0.02
Amonio Intercambiable/ Extraible KCL	mg/kg	224	336	293	319	233	225	136
Fósforo Total	mg/kg	384	774	495	439	289	233	220
Potencial Redox	mV	320	290	370	278	255	216	369
Aluminio	mg/kg	4010	4890	6870	8180	10600	12700	10400
Antimonio	mg/kg	ND						
Arsénico	mg/kg	< 10.0	< 10.0	< 10.0	< 10.0	< 10.0	< 10.0	< 10.0
Cadmio	mg/kg	ND						
Zinc	mg/kg	395	343	482	194	164	49,4	36,2
Cobre Total	mg/kg	36,8	116	368	484	164	40,6	14,1
Cromo	mg/kg	6,5	8,7	39,4	64,0	37,1	11,6	8,7
Hierro	mg/kg	3460	3090	9690	9820	13200	17900	13200
Manganeso	mg/kg	62,4	61,0	139	110	146	523	234
Níquel	mg/kg	117	112	34,0	12,5	8,4	7,1	5,2
Plata	mg/kg	ND						
Plomo	mg/kg	< 20.0	< 20.0	104	37,0	83,1	25,3	< 20.0
Selenio	mg/kg	ND						
Vanadio	mg/kg	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100
Cobalto	mg/kg	171	303	< 5.0	< 5.0	< 5.0	5,2	5,0
Litio	mg/kg	< 5.0	< 5.0	6,3	8,6	10,0	12,0	8,8
Bismuto	mg/kg	ND						
Estroncio	mg/kg	18,9	20,6	94,8	32,1	33,1	31,6	33,7
Molibdeno	mg/kg	< 5.0	< 5.0	< 5.0	< 5.0	< 5.0	< 5.0	< 5.0
Boro	mg/kg	< 2.0	< 2.0	< 2.0	< 2.0	< 2.0	< 2.0	< 2.0
Humedad	% p/p	84,6	79,6	49,5	56,3	37,2	37,0	31,2

Tabla Anexa 3B: Parámetros fisicoquímicos en base húmeda Core M.

Parámetros	Unidad	Core M				
		H0	H1	H2	H3	H4
Hidrocarburos Totales de C6-C35	mg/kg	104000	58320	54785	39160	4500
Hidrocarburos Totales Rango >nC6 a nC8	mg/kg	50	50	50	112	50
Hidrocarburos Totales Rango >nC8 a nC10	mg/kg	<50	<50	<50	327	50

Hidrocarburos Totales Rango >nC10 a nC12	mg/kg	1460	1403	1036	2542	307
Hidrocarburos Totales Rango >nC12 a nC16	mg/kg	10879	7112	6645	7956	1423
Hidrocarburos Totales Rango >nC16 a nC21	mg/kg	32951	18637	17488	14351	2093
Hidrocarburos Totales Rango >nC21 a nC35	mg/kg	58735	31169	29616	13875	676
Hidrocarburos Alifáticos: nC6	mg/kg	<50	<50	<50	<50	<50
Hidrocarburos Alifáticos Rango >nC6 a nC8	mg/kg	<50	<50	<50	<50	<50
Hidrocarburos Alifáticos Rango >nC8 a nC10	mg/kg	<50	<50	<50	<50	<50
Hidrocarburos Alifáticos Rango >nC10 a nC12	mg/kg	856	76,8	823	150	608
Hidrocarburos Alifáticos Rango >nC12 a nC16	mg/kg	5381	403	4171	1012	3897
Hidrocarburos Alifáticos Rango >nC16 a nC21	mg/kg	18236	609	8932	1550	7257
Hidrocarburos Alifáticos Rango >nC21 a nC35	mg/kg	28450	442	14282	864	15370
Hidrocarburos Aromáticos Rango >nC7 a nC8	mg/kg	<50	<50	<50	<50	<50
Hidrocarburos Aromáticos Rango >nC8 a nC10	mg/kg	<50	<50	<50	<50	<50
Hidrocarburos Aromáticos Rango >nC10 a nC12	mg/kg	385	<50	370	67,5	273

Hidrocarburos Aromáticos Rango >nC12 a nC16	mg/kg	3167	181	1874	754	1951
Hidrocarburos Aromáticos Rango >nC16 a nC21	mg/kg	7183	363	5911	1011	5400
Hidrocarburos Aromáticos Rango >nC21 a nC35	mg/kg	17480	198	9213	633	7804
Benceno	mg/kg	0,08	0,09	0,25	0,66	<0,05
Tolueno	mg/kg	<0,05	<0,05	0,1	ND	<0,05
Etilbenceno	mg/kg	<0,05	ND	ND	ND	ND
m,p-Xileno	mg/kg	0,15	0,16	0,29	1,24	0,06
o-Xileno	mg/kg	0,07	0,08	0,09	0,28	ND
Naftaleno	mg/kg	ND	ND	ND	ND	ND
Acenaftileno	mg/kg	ND	ND	ND	ND	ND
Acenafteno	mg/kg	0,5	0,5	0,6	2	0,3
Fluoreno	mg/kg	4,9	1,6	4,5	7,1	2,2
Fenantreno	mg/kg	31,7	17,3	38,3	50,4	8,7
Antraceno	mg/kg	ND	ND	<0,1	2	ND
Fluoranteno	mg/kg	5,2	3,4	3,4	4,5	0,8
Pireno	mg/kg	33,1	16,8	12,8	9,9	1,5
Benzo(a)antraceno	mg/kg	23,7	13,5	10,4	6,2	0,9
Criseno	mg/kg	25,3	10,6	10,7	0,9	0,4
Benzo(b)fluoranteno	mg/kg	56,6	13	10,5	ND	0,9
Benzo(k)fluoranteno	mg/kg	1,7	0,7	ND	ND	ND
Benzo(a)pireno	mg/kg	36,3	15,4	16,1	5,2	0,9
Dibenzo(a,h)antraceno	mg/kg	ND	ND	ND	ND	ND
Benzo(g,h,i)perileno	mg/kg	10,7	4	3,9	1,1	0,1
Indeno(1,2,3-cd)pireno	mg/kg	ND	ND	ND	ND	ND
Relación C17/ Pristano	---	0,14	0,07	0,09	0,03	0,04
Relación C18/ Fitano	---	0,09	0,08	0,07	0,02	0,1
pH Relación 1:1	UpH	7,4	7,3	7,7	7,2	7,9
Sulfuro Total	mg/kg	116	387	617	<50	<50
Sulfato Soluble en Medio Acuoso	mmol/l	2,1	4,6	0,95	5,5	1,7

Nitrógeno Total Kjeldahl	mg/kg	2848	2058	2493	1703	1103
Nitrito soluble en medio acuoso	mmol/l	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02
Amonio Intercambiable/ Extraible KCL	mg/kg	264	214	309	234	263
Fósforo Total	mg/kg	486	186	217	209	173
Potencial Redox	mV	383	351	328	356	344
Aluminio	mg/kg	6500	11506	14257	11383	11642
Antimonio	mg/kg	ND	ND	ND	ND	ND
Arsénico	mg/kg	<10	<10	<10	<10	<10
Cadmio	mg/kg	ND	ND	ND	ND	ND
Zinc	mg/kg	153	71	111	79,8	50,4
Cobre Total	mg/kg	73,9	88,7	103	152	25
Cromo	mg/kg	6,6	18	19,2	34,2	11,2
Hierro	mg/kg	7640	15361	14648	15233	14742
Manganeso	mg/kg	90,9	252	331	218	195
Níquel	mg/kg	38,8	15,3	12,8	11,8	8,4
Plata	mg/kg	ND	ND	ND	ND	ND
Plomo	mg/kg	<20	<20	36,4	24,9	42,6
Selenio	mg/kg	ND	ND	ND	ND	ND
Vanadio	mg/kg	<100	<100	<100	<100	<100
Cobalto	mg/kg	51,6	5,4	5	5,6	5
Litio	mg/kg	7,1	18,8	20,4	21	20,2
Bismuto	mg/kg	ND	ND	ND	ND	ND
Estroncio	mg/kg	65,7	81,8	119,9	71,3	50,1
Molibdeno	mg/kg	<5	<5	<5	<5	<5
Boro	mg/kg	<2	<2	<2	<2	<2
Humedad	% p/p	62	39	35	44	42

Tabla Anexa 3C: Parámetros fisicoquímicos en base húmeda Cores MR.

Parámetros	Unidad	Core MR						
		H0	H1	H2	H3	H4	H5	H6
Hidrocarburos Totales de C6-C35	mg/kg	2950	7800	14000	66400	10900	5400	340
Hidrocarburos Totales Rango >nC6 a nC8	mg/kg	< 50.0	< 50.0	< 50.0	< 50.0	< 50.0	< 50.0	< 50.0
Hidrocarburos Totales Rango >nC8 a nC10	mg/kg	< 50.0	< 50.0	< 50.0	< 50.0	< 50.0	< 50.0	< 50.0
Hidrocarburos Totales Rango >nC10 a nC12	mg/kg	131	256	484	1317	404	226	< 50.0
Hidrocarburos Totales Rango >nC12 a nC16	mg/kg	687	2066	3526	8010	3170	1521	82,3
Hidrocarburos Totales Rango >nC16 a nC21	mg/kg	1379	3837	7677	25027	5547	2751	170

Hidrocarburos Totales	mg/kg	753	1643	2316	32052	1763	907	89,9
Rango >nC21 a nC35								
Hidrocarburos Alifáticos:	mg/kg	< 50.0	< 50.0	< 50.0	< 50.0	< 50.0	< 50.0	< 50.0
nC6								
Hidrocarburos Alifáticos	mg/kg	< 50.0	66,0	< 50.0	< 50.0	< 50.0	< 50.0	< 50.0
Rango >nC6 a nC8								
Hidrocarburos Alifáticos	mg/kg	< 50.0	192	< 50.0	< 50.0	< 50.0	< 50.0	< 50.0
Rango >nC8 a nC10								
Hidrocarburos Alifáticos	mg/kg	284	1491	772	180	237	133	< 50.0
Rango >nC10 a nC12								
Hidrocarburos Alifáticos	mg/kg	2068	3156	3698	735	1659	795	< 50.0
Rango >nC12 a nC16								
Hidrocarburos Alifáticos	mg/kg	3503	6420	13680	928	2953	1312	89,7
Rango >nC16 a nC21								
Hidrocarburos Alifáticos	mg/kg	1058	7138	15797	396	934	532	52,7
Rango >nC21 a nC35								
Hidrocarburos Aromáticos	mg/kg	< 50.0	< 50.0	< 50.0	< 50.0	< 50.0	< 50.0	< 50.0
Rango >nC7 a nC8								
Hidrocarburos Aromáticos	mg/kg	< 50.0	86,2	< 50.0	< 50.0	< 50.0	< 50.0	< 50.0
Rango >nC8 a nC10								
Hidrocarburos Aromáticos	mg/kg	128	970	347	80,9	106	59,6	< 50.0
Rango >nC10 a nC12								
Hidrocarburos Aromáticos	mg/kg	929	2696	2111	375	1035	401	< 50.0
Rango >nC12 a nC16								
Hidrocarburos Aromáticos	mg/kg	3523	4581	7595	552	1462	825	< 50.0
Rango >nC16 a nC21								
Hidrocarburos Aromáticos	mg/kg	610	3656	9446	178	465	239	< 50.0
Rango >nC21 a nC35								
Benceno	mg/kg	0,06	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	ND
Tolueno	mg/kg	0,08	< 0.05	< 0.05	ND	ND	ND	ND
Etilbenceno	mg/kg	< 0.05	ND	ND	ND	ND	ND	ND
m,p-Xileno	mg/kg	0,11	0,09	0,11	0,14	0,15	< 0.05	< 0.05
o-Xileno	mg/kg	0,07	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	ND
Naftaleno	mg/kg	ND						
Acenaftileno	mg/kg	ND	ND	0,4	0,3	ND	ND	ND
Acenafteno	mg/kg	< 0.1	0,2	0,8	1,7	0,9	0,9	< 0.1
Fluoreno	mg/kg	0,1	1,8	3,3	7,7	1,0	1,3	0,2
Fenantreno	mg/kg	0,4	3,4	34,3	44,3	3,1	3,3	2,0
Antraceno	mg/kg	ND	0,7	0,7	1,8	< 0.1	< 0.1	ND
Fluoranteno	mg/kg	0,1	0,8	0,4	3,8	0,2	0,3	0,3
Pireno	mg/kg	2,0	3,8	9,8	8,1	0,5	0,6	0,5
Benzo(a)antraceno	mg/kg	1,1	2,5	4,8	3,9	0,4	0,4	0,2
Criseno	mg/kg	1,3	2,7	ND	3,9	< 0.1	< 0.1	ND
Benzo(b)fluoranteno	mg/kg	2,2	6,2	ND	ND	0,4	0,4	0,2
Benzo(k)fluoranteno	mg/kg	ND						
Benzo(a)pireno	mg/kg	2,7	4,0	6,7	2,5	0,4	0,5	0,3
Dibenzo(a,h)antraceno	mg/kg	ND						
Benzo(g,h,i)perileno	mg/kg	2,4	1,2	2,0	2,3	0,4	0,5	< 0.1
Indeno(1,2,3-cd)pireno	mg/kg	ND						
Relación C17/ Pristano	---	0,07	0,15	0,09	0,02	0,13	0,04	0,03
Relación C18/ Fitano	---	0,12	0,08	0,10	0,08	0,13	0,10	0,13
pH Relación 1:1	UpH	7,5	7,4	6,7	7,1	7,9	8,2	8,2
Sulfuro Total	mg/kg	< 50.0	447	< 50.0	< 50.0	< 50.0	< 50.0	< 50.0

Sulfato Soluble en Medio Acuoso	mmol/l	1,50	1,70	4,3	3,20	0,31	1,90	0,99
Nitrógeno Total Kjeldahl	mg/kg	1941	1387	1846	1804	1228	1024	872
Nitrito soluble en medio acuoso	mmol/l	< 0.02	< 0.02	< 0.02	< 0.02	< 0.02	< 0.02	< 0.02
Amonio Intercambiable/ Extraible KCL	mg/kg	200	264	225	225	209	215	136
Fósforo Total	mg/kg	195	192	214	206	158	150	146
Potencial Redox	mV	337	398	332	386	295	284	288
Aluminio	mg/kg	8900	15708	13475	13021	13371	12688	11609
Antimonio	mg/kg	ND						
Arsénico	mg/kg	< 10.0	< 10.0	< 10.0	< 10.0	< 10.0	< 10.0	< 10.0
Cadmio	mg/kg	ND						
Zinc	mg/kg	31,2	59,5	50,5	43,6	50,5	44,0	31,8
Cobre Total	mg/kg	28,3	119	163	60,5	45,1	50,9	19,0
Cromo	mg/kg	14,4	17,7	30,3	24,9	15,7	11,7	11,5
Hierro	mg/kg	9500	14979	17612	16777	18332	18508	16187
Manganeso	mg/kg	317	264	256	203	218	223	263
Níquel	mg/kg	8,4	10,3	9,2	7,5	8,2	7,9	7,5
Plata	mg/kg	ND						
Plomo	mg/kg	< 20.0	< 20.0	< 20.0	< 20.0	21,5	23,2	< 20.0
Selenio	mg/kg	ND						
Vanadio	mg/kg	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100
Cobalto	mg/kg	5,9	6,4	< 5.0	< 5.0	5,8	5,9	5,5
Litio	mg/kg	9,5	22,1	22,8	20,4	20,1	20,7	23,1
Bismuto	mg/kg	ND						
Estroncio	mg/kg	167,0	94,2	60,1	54,8	54,5	54,4	54,6
Molibdeno	mg/kg	< 5.0	< 5.0	< 5.0	< 5.0	< 5.0	< 5.0	< 5.0
Boro	mg/kg	< 2.0	< 2.0	< 2.0	< 2.0	< 2.0	< 2.0	< 2.0
Humedad	% p/p	75,2	43,9	40,9	37,4	39,5	41,8	45,5

Tabla Anexa 3D: Parámetros fisicoquímicos en base húmeda Cores E.

Parámetros	Unidad	Core E				
		H0	H1	H2	H3	H4
Hidrocarburos Totales de C6-C35	mg/kg	2534	44364	55828	76164	71115
Hidrocarburos Totales Rango >nC6 a nC8	mg/kg	< 50.0	< 50.0	< 50.0	< 50.0	< 50.0
Hidrocarburos Totales Rango >nC8 a nC10	mg/kg	< 50.0	98,4	66,5	79,8	132
Hidrocarburos Totales Rango >nC10 a nC12	mg/kg	144	2556	3692	4995	3799
Hidrocarburos Totales Rango >nC12 a nC16	mg/kg	610	9140	12195	16933	18653
Hidrocarburos Totales Rango >nC16 a nC21	mg/kg	1112	14743	19000	27688	27233
Hidrocarburos Totales Rango >nC21 a nC35	mg/kg	668	17827	20874	26468	21298

<i>Hidrocarburos Alifáticos: nC6</i>	mg/kg	< 50.0	< 50.0	< 50.0	< 50.0	< 50.0
<i>Hidrocarburos Alifáticos Rango >nC6 a nC8</i>	mg/kg	< 50.0	< 50.0	< 50.0	< 50.0	< 50.0
<i>Hidrocarburos Alifáticos Rango >nC8 a nC10</i>	mg/kg	< 50.0	< 50.0	57,7	53,9	< 50.0
<i>Hidrocarburos Alifáticos Rango >nC10 a nC12</i>	mg/kg	84,5	150	1255	2018	1674
<i>Hidrocarburos Alifáticos Rango >nC12 a nC16</i>	mg/kg	295	550	4831	8973	6152
<i>Hidrocarburos Alifáticos Rango >nC16 a nC21</i>	mg/kg	572	867	7647	13107	9044
<i>Hidrocarburos Alifáticos Rango >nC21 a nC35</i>	mg/kg	245	307	9056	11190	9123
<i>Hidrocarburos Aromáticos Rango >nC7 a nC8</i>	mg/kg	< 50.0	< 50.0	< 50.0	< 50.0	< 50.0
<i>Hidrocarburos Aromáticos Rango >nC8 a nC10</i>	mg/kg	< 50.0	< 50.0	< 50.0	< 50.0	< 50.0
<i>Hidrocarburos Aromáticos Rango >nC10 a nC12</i>	mg/kg	< 50.0	67,5	674	1266	1073
<i>Hidrocarburos Aromáticos Rango >nC12 a nC16</i>	mg/kg	181	241	2408	4530	3613
<i>Hidrocarburos Aromáticos Rango >nC16 a nC21</i>	mg/kg	303	543	3885	6784	5770
<i>Hidrocarburos Aromáticos Rango >nC21 a nC35</i>	mg/kg	196	246	4697	6500	6500
<i>Benceno</i>	mg/kg	0,06	0,50	9,32	2,60	1,17
<i>Tolueno</i>	mg/kg	0,13	0,13	0,72	0,23	0,17
<i>Etilbenceno</i>	mg/kg	ND	ND	ND	0,05	0,12
<i>m,p-Xileno</i>	mg/kg	0,17	0,76	4,31	2,29	1,14
<i>o-Xileno</i>	mg/kg	0,17	0,16	1,42	0,83	0,46
<i>Naftaleno</i>	mg/kg	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Acenaftileno</i>	mg/kg	ND	1,4	2,3	2,1	2,7
<i>Acenafteno</i>	mg/kg	< 0.1	1,8	1,1	5,4	6,3
<i>Fluoreno</i>	mg/kg	ND	6,5	17,9	5,4	31,5
<i>Fenantreno</i>	mg/kg	0,9	46,8	112	12,9	140
<i>Antraceno</i>	mg/kg	ND	1,4	7,3	1,2	15,1
<i>Fluoranteno</i>	mg/kg	0,2	6,1	8,9	1,0	16,3
<i>Pireno</i>	mg/kg	2,0	15,6	18,2	1,6	37,4
<i>Benzo(a)antraceno</i>	mg/kg	1,0	13,9	12,3	3,9	11,6
<i>Criseno</i>	mg/kg	0,8	9,8	11,4	0,5	7,4
<i>Benzo(b)fluoranteno</i>	mg/kg	1,8	9,3	13,0	3,1	7,9
<i>Benzo(k)fluoranteno</i>	mg/kg	ND	ND	ND	0,6	3,6
<i>Benzo(a)pireno</i>	mg/kg	1,8	15,9	24,4	4,3	22,9
<i>Dibenzo(a,h)antraceno</i>	mg/kg	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Benzo(g,h,i)perileno</i>	mg/kg	1,5	3,5	4,4	2,6	4,5
<i>Indeno(1,2,3-cd)pireno</i>	mg/kg	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Relación C17/ Pristano</i>	---	0,12	0,07	0,09	0,04	0,04
<i>Relación C18/ Fitano</i>	---	0,20	0,02	0,04	0,05	0,04
<i>pH Relación 1:1</i>	UpH	7,5	7,7	8,1	8,1	7,6

Sulfuro Total	mg/kg	226	473	510	779	669
Sulfato Soluble en Medio Acuoso	mmol/l	0,44	0,62	0,44	0,52	0,36
Nitrógeno Total Kjeldahl	mg/kg	2177	2240	1927	2126	2470
Nitrito soluble en medio acuoso	mmol/l	0,19	< 0.02	< 0.02	< 0.02	< 0.02
Amonio Intercambiable/ Extraible KCL	mg/kg	278	298	507	342	230
Fósforo Total	mg/kg	323	199	210	357	190
Potencial Redox	mV	246	275	223	207	241
Aluminio	mg/kg	3793	4719	5830	6149	5090
Antimonio	mg/kg	ND	ND	ND	ND	ND
Arsénico	mg/kg	< 10.0	< 10.0	< 10.0	< 10.0	< 10.0
Cadmio	mg/kg	ND	ND	ND	ND	ND
Zinc	mg/kg	148	189	201	258	138
Cobre Total	mg/kg	50,7	64,1	103	606	125
Cromo	mg/kg	< 5.0	14,3	22,6	114	24,2
Hierro	mg/kg	3349	4973	6257	7302	5639
Manganeso	mg/kg	42,0	70,7	98,3	105	60,7
Níquel	mg/kg	19,4	8,5	7,0	14,5	< 5.0
Plata	mg/kg	ND	ND	ND	ND	ND
Plomo	mg/kg	< 20.0	63,9	52,9	64,2	39,3
Selenio	mg/kg	ND	ND	ND	ND	ND
Vanadio	mg/kg	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100
Cobalto	mg/kg	22,6	5,7	< 5.0	< 5.0	< 5.0
Litio	mg/kg	< 5.0	< 5.0	< 5.0	5,6	5,2
Bismuto	mg/kg	ND	ND	ND	ND	ND
Estroncio	mg/kg	16,3	26,9	26,0	43,2	18,6
Molibdeno	mg/kg	< 5.0	< 5.0	< 5.0	< 5.0	< 5.0
Boro	mg/kg	< 2.0	< 2.0	< 2.0	< 2.0	< 2.0
Humedad	% p/p	81,5	63,7	52,6	57,3	50,1

Tabla Anexa 3E: Parámetros fisicoquímicos en base húmeda Cores ER.

Parámetros	Unidad	Core ER				
		H0R	H1R	H2R	H3R	H4R
Hidrocarburos Totales de C6-C35	mg/kg	3591	70982	52078	55021	69236
Hidrocarburos Totales Rango >nC6 a nC8	mg/kg	< 50.0	< 50.0	< 50.0	< 50.0	< 50.0
Hidrocarburos Totales Rango >nC8 a nC10	mg/kg	< 50.0	91,9	82,6	95,1	92,5
Hidrocarburos Totales Rango >nC10 a nC12	mg/kg	256	4805	3193	3232	4173

Hidrocarburos Totales Rango >nC12 a nC16	mg/kg	989	18709	11652	11554	20123
Hidrocarburos Totales Rango >nC16 a nC21	mg/kg	1566	23848	17413	22405	24495
Hidrocarburos Totales Rango >nC21 a nC35	mg/kg	780	23528	19737	17735	20352
Hidrocarburos Alifáticos: nC6	mg/kg	< 50.0	< 50.0	< 50.0	< 50.0	< 50.0
Hidrocarburos Alifáticos Rango >nC6 a nC8	mg/kg	< 50.0	< 50.0	< 50.0	< 50.0	< 50.0
Hidrocarburos Alifáticos Rango >nC8 a nC10	mg/kg	< 50.0	< 50.0	55,8	77,4	54,3
Hidrocarburos Alifáticos Rango >nC10 a nC12	mg/kg	1273	2930	1456	2228	2447
Hidrocarburos Alifáticos Rango >nC12 a nC16	mg/kg	6834	8061	5176	8974	9802
Hidrocarburos Alifáticos Rango >nC16 a nC21	mg/kg	9213	14239	12410	13872	12366
Hidrocarburos Alifáticos Rango >nC21 a nC35	mg/kg	9576	13520	9020	11490	9936
Hidrocarburos Aromáticos Rango >nC7 a nC8	mg/kg	< 50.0	< 50.0	< 50.0	< 50.0	< 50.0
Hidrocarburos Aromáticos Rango >nC8 a nC10	mg/kg	< 50.0	< 50.0	< 50.0	< 50.0	< 50.0
Hidrocarburos Aromáticos Rango >nC10 a nC12	mg/kg	841	1619	952	981	1100
Hidrocarburos Aromáticos Rango >nC12 a nC16	mg/kg	3570	4850	3670	4915	6802
Hidrocarburos Aromáticos Rango >nC16 a nC21	mg/kg	4896	8126	6687	8176	9454
Hidrocarburos Aromáticos Rango >nC21 a nC35	mg/kg	5701	7423	4973	5902	5985
Benceno	mg/kg	< 0.05	1,22	4,45	1,97	< 0.05
Tolueno	mg/kg	< 0.05	0,17	0,19	0,26	< 0.05
Etilbenceno	mg/kg	ND	0,07	ND	0,07	ND
m,p-Xileno	mg/kg	0,13	1,33	1,77	2,38	ND
o-Xileno	mg/kg	0,11	0,40	0,66	0,66	ND
Naftaleno	mg/kg	ND	ND	ND	ND	ND
Acenaftileno	mg/kg	0,2	2,6	2,4	1,8	2,0
Acenafteno	mg/kg	< 0.1	3,1	2,0	5,0	3,5
Fluoreno	mg/kg	0,2	13,2	14,7	16,8	18,5

Fenantreno	mg/kg	1,3	66,5	87,3	76,4	111,0
Antraceno	mg/kg	ND	5,6	4,1	9,9	4,7
Fluoranteno	mg/kg	0,2	8,5	7,0	13,6	4,8
Pireno	mg/kg	0,7	18,7	18,3	44,5	9,9
Benzo(a)antraceno	mg/kg	0,4	17,9	19,0	11,0	6,4
Criseno	mg/kg	< 0.1	8,3	11,7	8,5	4,3
Benzo(b)fluoranteno	mg/kg	0,6	11,4	10,8	10,4	6,7
Benzo(k)fluoranteno	mg/kg	ND	2,5	0,8	2,0	1,3
Benzo(a)pireno	mg/kg	0,8	17,8	16,0	15,7	13,8
Dibenzo(a,h)antraceno	mg/kg	ND	ND	ND	ND	ND
Benzo(g,h,i)perileno	mg/kg	0,8	3,3	2,0	2,3	3,1
Indeno(1,2,3-cd)pireno	mg/kg	ND	ND	ND	ND	ND
Relación C17/ Pristano	---	0,04	0,04	0,08	0,04	0,06
Relación C18/ Fitano	---	0,16	0,07	0,06	0,03	0,09
pH Relación 1:1	UpH	7,5	7,3	7,6	8,0	8,1
Sulfuro Total	mg/kg	350	730	570	377,0	1050
Sulfato Soluble en Medio Acuoso	mmol/l	0,50	2,38	0,44	0,63	0,84
Nitrógeno Total Kjeldahl	mg/kg	2330	2716	3028	2912,0	3063
Nitrito soluble en medio acuoso	mmol/l	0,11	< 0.02	< 0.02	< 0.02	< 0.02
Amonio Intercambiable/ Extraible KCL	mg/kg	255	266	401	313	240
Fósforo Total	mg/kg	372	297	290	352	248
Potencial Redox	mV	211	215	229	255	297
Aluminio	mg/kg	4400	4232	6089	7038	7368
Antimonio	mg/kg	ND	ND	ND	ND	ND
Arsénico	mg/kg	< 10.0	< 10.0	< 10.0	< 10.0	< 10.0
Cadmio	mg/kg	ND	ND	ND	ND	ND
Zinc	mg/kg	185	248	257	175	207
Cobre Total	mg/kg	54,8	407	105	553	132
Cromo	mg/kg	5,6	36,3	17,8	258	9,8
Hierro	mg/kg	3821	5360	6183	7498	7241
Manganeso	mg/kg	47,3	70,9	87,1	99,3	60,2
Níquel	mg/kg	22,8	17,7	6,8	5,9	6,1
Plata	mg/kg	ND	ND	ND	ND	ND
Plomo	mg/kg	< 20.0	55,7	90,1	49,9	61,2

<i>Selenio</i>	mg/kg	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Vanadio</i>	mg/kg	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100
<i>Cobalto</i>	mg/kg	30,6	6,3	< 5.0	< 5.0	< 5.0
<i>Litio</i>	mg/kg	< 5.0	< 5.0	< 5.0	7,0	7,5
<i>Bismuto</i>	mg/kg	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Estroncio</i>	mg/kg	19,9	45,9	31,4	24,4	23,3
<i>Molibdeno</i>	mg/kg	< 5.0	< 5.0	< 5.0	< 5.0	< 5.0
<i>Boro</i>	mg/kg	< 2.0	< 2.0	< 2.0	< 2.0	< 2.0
<i>Humedad</i>	% p/p	80,7	59,7	52,8	54,0	57,9

Tabla Anexa 4A: Parámetros fisicoquímicos en base seca en Cores I e IR. En color marrón se encuentran los valores que fueron informados como menores a un determinado valor de cuantificación. ND no detectado.

Parámetros	Unidad	Cores I e IR						
		H0	H1	H2	H3	H4	H5	H6
Hidrocarburos Totales de C6-C35	mg/kg	97403	149853	311683	201373	12898	14286	256
Hidrocarburos Totales Rango >nC6 a nC8	mg/kg	325	245	140	114	80	79	73
Hidrocarburos Totales Rango >nC8 a nC10	mg/kg	325	245	232	151	80	79	73
Hidrocarburos Totales Rango >nC10 a nC12	mg/kg	3727	5975	14410	10625	443	486	73
Hidrocarburos Totales Rango >nC12 a nC16	mg/kg	9084	22544	76364	38046	2939	3202	73
Hidrocarburos Totales Rango >nC16 a nC21	mg/kg	29708	39833	99509	77808	4734	5381	97
Hidrocarburos Totales Rango >nC21 a nC35	mg/kg	55071	81505	121051	74767	4804	5233	158
Hidrocarburos Alifáticos: nC6	mg/kg	325	245	99	114	80	79	73
Hidrocarburos Alifáticos Rango >nC6 a nC8	mg/kg	325	245	99	114	80	79	73
Hidrocarburos Alifáticos Rango >nC8 a nC10	mg/kg	325	245	136	114	80	79	73
Hidrocarburos Alifáticos Rango >nC10 a nC12	mg/kg	2188	3505	8451	5156	260	284	73
Hidrocarburos Alifáticos Rango >nC12 a nC16	mg/kg	4682	11260	40828	2002	1565	1878	73
Hidrocarburos Alifáticos Rango >nC16 a nC21	mg/kg	22545	20422	52428	41057	2459	2679	73
Hidrocarburos Alifáticos Rango >nC21 a nC35	mg/kg	18636	42902	64653	41563	2339	2594	73
Hidrocarburos Aromáticos Rango >nC7 a nC8	mg/kg	325	245	99	114	80	79	73

Hidrocarburos Aromáticos Rango >nC8 a nC10	mg/kg	325	245	99	114	80	79	73
Hidrocarburos Aromáticos Rango >nC10 a nC12	mg/kg	981	1574	3796	2799	117	128	73
Hidrocarburos Aromáticos Rango >nC12 a nC16	mg/kg	2396	8392	24079	9339	933	843	73
Hidrocarburos Aromáticos Rango >nC16 a nC21	mg/kg	7857	15887	30180	20503	1247	1417	73
Hidrocarburos Aromáticos Rango >nC21 a nC35	mg/kg	17305	21475	35857	19700	1266	1379	73
Benceno	mg/kg	0	1	1	0	ND	ND	ND
Tolueno	mg/kg	0	1	1	ND	ND	ND	ND
Etilbenceno	mg/kg	ND	0	ND	ND	ND	ND	ND
m,p-Xileno	mg/kg	0	2	2	1	ND	ND	ND
o-Xileno	mg/kg	0	0	0	0	ND	ND	ND
Naftaleno	mg/kg	ND						
Acenaftileno	mg/kg	ND						
Acenafteno	mg/kg	1	2	3	2	0	0	ND
Fluoreno	mg/kg	1	9	48	17	1	1	ND
Fenantreno	mg/kg	3	83	230	126	5	4	ND
Antraceno	mg/kg	ND	ND	8	ND	ND	ND	ND
Fluoranteno	mg/kg	1	12	13	10	ND	0	ND
Pireno	mg/kg	3	60	46	22	1	1	ND
Benzo(a)antraceno	mg/kg	2	65	45	17	0	0	ND
Criseno	mg/kg	1	52	35	11	0	0	ND
Benzo(b)fluoranteno	mg/kg	3	54	75	14	1	ND	ND
Benzo(k)fluoranteno	mg/kg	ND						
Benzo(a)pireno	mg/kg	4	71	52	25	1	ND	ND
Dibenzo(a,h)antraceno	mg/kg	ND						
Benzo(g,h,i)perileno	mg/kg	3	27	10	5	0	1	ND
Indeno(1,2,3-cd)pireno	mg/kg	ND						
Relación C17/ Pristano	---	1	0	0	0	0	0	0
Relación C18/ Fitano	---	1	1	0	0	0	0	0
pH Relación 1:1	UpH	49	37	15	18	12	12	10
Sulfuro Total	mg/kg	1864	1402	2218	2471	80	79	73
Sulfato Soluble en Medio Acuoso	mmol/l	3	8	5	6	2	2	1
Nitrógeno Total Kjeldahl	mg/kg	870	9363	7816	4568	4803	1952	884
Nitrito soluble en medio acuoso	mmol/l	1	0	0	0	0	0	0
Amonio Intercambiable/ Extraible KCL	mg/kg	1455	1647	580	730	371	357	198
Fósforo Total	mg/kg	2494	3794	980	1005	460	370	320
Potencial Redox	mV	2078	1422	733	636	406	343	536
Aluminio	mg/kg	26039	23971	13604	18719	16879	20159	15116
Antimonio	mg/kg	ND						
Arsénico	mg/kg	65	49	20	23	16	16	15

Cadmio	mg/kg	ND						
Zinc	mg/kg	2565	1681	954	444	261	78	53
Cobre Total	mg/kg	239	569	729	1108	261	64	20
Cromo	mg/kg	42	43	78	146	59	18	13
Hierro	mg/kg	22468	15147	19188	22471	21019	28413	19186
Manganeso	mg/kg	405	299	275	252	232	830	340
Níquel	mg/kg	760	549	67	29	13	11	8
Plata	mg/kg	ND						
Plomo	mg/kg	130	98	206	85	132	40	29
Selenio	mg/kg	ND						
Vanadio	mg/kg	649	490	198	229	159	159	145
Cobalto	mg/kg	1110	1485	10	11	8	8	7
Litio	mg/kg	32	25	12	20	16	19	13
Bismuto	mg/kg	ND						
Estroncio	mg/kg	123	101	188	73	53	50	49
Molibdeno	mg/kg	32	25	10	11	8	8	7
Boro	mg/kg	13	10	4	5	3	3	3
Humedad	% p/p	85	80	50	56	37	37	31

Tabla Anexa 4B: Parámetros fisicoquímicos en base seca en Core M. En color marrón se encuentran los valores que fueron informados como menores a un determinado valor de cuantificación. ND no detectado.

Core M						
Parámetros	Unidad	H0	H1	H2	H3	H4
Hidrocarburos Totales de C6-C35	mg/kg	275862	95294	84155	70179	7692
Hidrocarburos Totales Rango >nC6 a nC8	mg/kg	133	82	77	201	85
Hidrocarburos Totales Rango >nC8 a nC10	mg/kg	133	82	77	586	85
Hidrocarburos Totales Rango >nC10 a nC12	mg/kg	3873	2292	1591	4556	525
Hidrocarburos Totales Rango >nC12 a nC16	mg/kg	28857	11621	10207	14258	2432
Hidrocarburos Totales Rango >nC16 a nC21	mg/kg	87403	30453	26863	25719	3578
Hidrocarburos Totales Rango >nC21 a nC35	mg/kg	155796	50930	45493	24866	1156
Hidrocarburos Alifáticos: nC6	mg/kg	133	82	77	90	85

<i>Hidrocarburos Alifáticos Rango >nC6 a nC8</i>	mg/kg	133	82	77	90	85
<i>Hidrocarburos Alifáticos Rango >nC8 a nC10</i>	mg/kg	133	82	77	90	85
<i>Hidrocarburos Alifáticos Rango >nC10 a nC12</i>	mg/kg	2271	125	1264	269	1039
<i>Hidrocarburos Alifáticos Rango >nC12 a nC16</i>	mg/kg	14273	658	6407	1814	6662
<i>Hidrocarburos Alifáticos Rango >nC16 a nC21</i>	mg/kg	48371	995	13720	2778	12405
<i>Hidrocarburos Alifáticos Rango >nC21 a nC35</i>	mg/kg	75464	722	21939	1548	26274
<i>Hidrocarburos Aromáticos Rango >nC7 a nC8</i>	mg/kg	133	82	77	90	85
<i>Hidrocarburos Aromáticos Rango >nC8 a nC10</i>	mg/kg	133	82	77	90	85
<i>Hidrocarburos Aromáticos Rango >nC10 a nC12</i>	mg/kg	1021	82	568	121	467
<i>Hidrocarburos Aromáticos Rango >nC12 a nC16</i>	mg/kg	8401	296	2879	1351	3335
<i>Hidrocarburos Aromáticos Rango >nC16 a nC21</i>	mg/kg	19053	593	9080	1812	9231
<i>Hidrocarburos Aromáticos Rango >nC21 a nC35</i>	mg/kg	46366	324	14152	1134	13340
<i>Benceno</i>	mg/kg	0	0	0	1	0
<i>Tolueno</i>	mg/kg	0	0	0	ND	0
<i>Etilbenceno</i>	mg/kg	0	ND	ND	ND	ND
<i>m,p-Xileno</i>	mg/kg	0	0	0	2	0

<i>o</i> -Xileno	mg/kg	0	0	0	1	ND
Naftaleno	mg/kg	ND	ND	ND	ND	ND
Acenaftileno	mg/kg	ND	ND	ND	ND	ND
Acenafteno	mg/kg	1	1	1	4	1
Fluoreno	mg/kg	13	3	7	13	4
Fenantreno	mg/kg	84	28	59	90	15
Antraceno	mg/kg	ND	ND	0	4	ND
Fluoranteno	mg/kg	14	6	5	8	1
Pireno	mg/kg	88	27	20	18	3
Benzo(a)antraceno	mg/kg	63	22	16	11	2
Criseno	mg/kg	67	17	16	2	1
Benzo(b)fluoranteno	mg/kg	150	21	16	ND	2
Benzo(k)fluoranteno	mg/kg	5	1	ND	ND	ND
Benzo(a)pireno	mg/kg	96	25	25	9	2
Dibenzo(a,h)antraceno	mg/kg	ND	ND	ND	ND	ND
Benzo(g,h,i)perileno	mg/kg	28	7	6	2	0
Indeno(1,2,3-cd)pireno	mg/kg	ND	ND	ND	ND	ND
Relación C17/ Pristano	---	0	0	0	0	0
Relación C18/ Fitano	---	0	0	0	0	0
pH Relación 1:1	UpH	20	12	12	13	14
Sulfuro Total	mg/kg	308	632	948	90	85
Sulfato Soluble en Medio Acuoso	mmol/l	6	8	1	10	3
Nitrógeno Total Kjeldahl	mg/kg	7554	3363	3829	3052	1885
Nitrito soluble en medio acuoso	mmol/l	0	0	0	0	0
Amonio Intercambiable/ Extraíble KCL	mg/kg	700	350	475	419	450
Fósforo Total	mg/kg	1289	304	333	375	296
Potencial Redox	mV	1016	574	504	638	588
Aluminio	mg/kg	17241	18801	21900	20400	19901
Antimonio	mg/kg	ND	ND	ND	ND	ND
Arsénico	mg/kg	27	16	15	18	17
Cadmio	mg/kg	ND	ND	ND	ND	ND
Zinc	mg/kg	406	116	171	143	86

Cobre Total	mg/kg	196	145	158	272	43
Cromo	mg/kg	18	29	29	61	19
Hierro	mg/kg	20265	25100	22501	27299	25200
Manganeso	mg/kg	241	412	508	391	333
Níquel	mg/kg	103	25	20	21	14
Plata	mg/kg	ND	ND	ND	ND	ND
Plomo	mg/kg	53	33	56	45	73
Selenio	mg/kg	ND	ND	ND	ND	ND
Vanadio	mg/kg	265	163	154	179	171
Cobalto	mg/kg	137	9	8	10	9
Litio	mg/kg	19	31	31	38	35
Bismuto	mg/kg	ND	ND	ND	ND	ND
Estroncio	mg/kg	174	134	184	128	86
Molibdeno	mg/kg	13	8	8	9	9
Boro	mg/kg	5	3	3	4	3
Humedad	% p/p	62	39	35	44	42

Tabla Anexa 4C: Parámetros fisicoquímicos en base seca en Core MR. En color marrón se encuentran los valores que fueron informados como menores a un determinado valor de cuantificación. ND no detectado.

Parámetros	Unidad	Core MR						
		H0	H1	H2	H3	H4	H5	H6
Hidrocarburos Totales de C6-C35	mg/kg	11895	13904	23689	106070	18017	9278	624
Hidrocarburos Totales Rango >nC6 a nC8	mg/kg	202	89	85	80	83	86	92
Hidrocarburos Totales Rango >nC8 a nC10	mg/kg	202	89	85	80	83	86	92
Hidrocarburos Totales Rango >nC10 a nC12	mg/kg	528	456	819	2104	668	388	92
Hidrocarburos Totales Rango >nC12 a nC16	mg/kg	2770	3683	5966	12796	5240	2613	151
Hidrocarburos Totales Rango >nC16 a nC21	mg/kg	5560	6840	12990	39979	9169	4727	312
Hidrocarburos Totales Rango >nC21 a nC35	mg/kg	3036	2929	3919	51201	2914	1558	165
Hidrocarburos Alifáticos: nC6	mg/kg	202	89	85	80	83	86	92
Hidrocarburos Alifáticos Rango >nC6 a nC8	mg/kg	202	118	85	80	83	86	92
Hidrocarburos Alifáticos Rango >nC8 a nC10	mg/kg	202	342	85	80	83	86	92

<i>Hidrocarburos Alifáticos Rango >nC10 a nC12</i>	mg/kg	1145	2658	1306	288	392	229	92
<i>Hidrocarburos Alifáticos Rango >nC12 a nC16</i>	mg/kg	8339	5626	6257	1174	2742	1366	92
<i>Hidrocarburos Alifáticos Rango >nC16 a nC21</i>	mg/kg	14125	11444	23147	1482	4881	2254	165
<i>Hidrocarburos Alifáticos Rango >nC21 a nC35</i>	mg/kg	4266	12724	26729	633	1544	914	97
<i>Hidrocarburos Aromáticos Rango >nC7 a nC8</i>	mg/kg	202	89	85	80	83	86	92
<i>Hidrocarburos Aromáticos Rango >nC8 a nC10</i>	mg/kg	202	154	85	80	83	86	92
<i>Hidrocarburos Aromáticos Rango >nC10 a nC12</i>	mg/kg	516	1729	587	129	175	102	92
<i>Hidrocarburos Aromáticos Rango >nC12 a nC16</i>	mg/kg	3746	4806	3572	599	1711	689	92
<i>Hidrocarburos Aromáticos Rango >nC16 a nC21</i>	mg/kg	14206	8166	12851	882	2417	1418	92
<i>Hidrocarburos Aromáticos Rango >nC21 a nC35</i>	mg/kg	2460	6517	15983	284	769	411	92
<i>Benceno</i>	mg/kg	0	0	0	0	0	0	ND
<i>Tolueno</i>	mg/kg	0	0	0	ND	ND	ND	ND
<i>Etilbenceno</i>	mg/kg	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>m,p-Xileno</i>	mg/kg	0	0	0	0	0	0	0
<i>o-Xileno</i>	mg/kg	0	0	0	0	0	0	ND
<i>Naftaleno</i>	mg/kg	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Acenaftileno</i>	mg/kg	ND	ND	1	0	ND	ND	ND
<i>Acenafteno</i>	mg/kg	0	0	1	3	1	2	0
<i>Fluoreno</i>	mg/kg	0	3	6	12	2	2	0
<i>Fenantreno</i>	mg/kg	2	6	58	71	5	6	4
<i>Antraceno</i>	mg/kg	ND	1	1	3	0	0	ND
<i>Fluoranteno</i>	mg/kg	0	1	1	6	0	1	1
<i>Pireno</i>	mg/kg	8	7	17	13	1	1	1
<i>Benzo(a)antraceno</i>	mg/kg	4	4	8	6	1	1	0
<i>Criseno</i>	mg/kg	5	5	ND	6	0	0	ND
<i>Benzo(b)fluoranteno</i>	mg/kg	9	11	ND	ND	1	1	0
<i>Benzo(k)fluoranteno</i>	mg/kg	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Benzo(a)pireno</i>	mg/kg	11	7	11	4	1	1	1
<i>Dibenzo(a,h)antraceno</i>	mg/kg	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

<i>Benzo(g,h,i)perileno</i>	mg/kg	10	2	3	4	1	1	0
<i>Indeno(1,2,3-cd)pireno</i>	mg/kg	ND						
<i>Relación C17/ Pristano</i>	---	0	0	0	0	0	0	0
<i>Relación C18/ Fitano</i>	---	0	0	0	0	0	0	0
<i>pH Relación 1:1</i>	UpH	30	13	11	11	13	14	15
<i>Sulfuro Total</i>	mg/kg	202	797	85	80	83	86	92
<i>Sulfato Soluble en Medio Acuoso</i>	mmol/l	6	3	7	5	1	3	2
<i>Nitrógeno Total Kjeldahl</i>	mg/kg	7827	2472	3124	2882	2030	1759	1600
<i>Nitrito soluble en medio acuoso</i>	mmol/l	0	0	0	0	0	0	0
<i>Amonio Intercambiable/ Extraible KCL</i>	mg/kg	806	471	381	359	345	369	250
<i>Fósforo Total</i>	mg/kg	786	342	362	329	261	258	268
<i>Potencial Redox</i>	mV	1359	709	562	617	488	488	528
<i>Aluminio</i>	mg/kg	35887	28000	22800	20800	22101	21801	21301
<i>Antimonio</i>	mg/kg	ND						
<i>Arsénico</i>	mg/kg	40	18	17	16	17	17	18
<i>Cadmio</i>	mg/kg	ND						
<i>Zinc</i>	mg/kg	126	106	85	70	83	76	58
<i>Cobre Total</i>	mg/kg	114	212	276	97	75	87	35
<i>Cromo</i>	mg/kg	58	32	51	40	26	20	21
<i>Hierro</i>	mg/kg	38306	26701	29800	26800	30301	31801	29701
<i>Manganeso</i>	mg/kg	1278	471	433	324	360	383	483
<i>Níquel</i>	mg/kg	34	18	16	12	14	14	14
<i>Plata</i>	mg/kg	ND						
<i>Plomo</i>	mg/kg	81	36	34	32	36	40	37
<i>Selenio</i>	mg/kg	ND						
<i>Vanadio</i>	mg/kg	403	178	169	160	165	172	183
<i>Cobalto</i>	mg/kg	24	11	8	8	10	10	10
<i>Litio</i>	mg/kg	38	39	39	33	33	36	42
<i>Bismuto</i>	mg/kg	ND						
<i>Estroncio</i>	mg/kg	673	168	102	88	90	93	100
<i>Molibdeno</i>	mg/kg	20	9	8	8	8	9	9
<i>Boro</i>	mg/kg	8	4	3	3	3	3	4
<i>Humedad</i>	% p/p	75	44	41	37	40	42	46

Tabla Anexa 4D: Parámetros fisicoquímicos en base seca en Core E. En color marrón se encuentran los valores que fueron informados como menores a un determinado valor de cuantificación. ND no detectado.

Parámetros	Unidad	CORE E				
		H0	H1	H2	H3	H4
Hidrocarburos Totales de C6-C35	mg/kg	13697	122215	117781	178370	142515
Hidrocarburos Totales Rango >nC6 a nC8	mg/kg	270	138	105	117	100
Hidrocarburos Totales Rango >nC8 a nC10	mg/kg	270	271	140	187	265
Hidrocarburos Totales Rango >nC10 a nC12	mg/kg	778	7041	7789	11698	7613
Hidrocarburos Totales Rango >nC12 a nC16	mg/kg	3297	25179	25728	39656	37381
Hidrocarburos Totales Rango >nC16 a nC21	mg/kg	6011	40614	40084	64843	54575
Hidrocarburos Totales Rango >nC21 a nC35	mg/kg	3611	49110	44038	61986	42681
Hidrocarburos Alifáticos: nC6	mg/kg	270	138	105	117	100
Hidrocarburos Alifáticos Rango >nC6 a nC8	mg/kg	270	138	105	117	100
Hidrocarburos Alifáticos Rango >nC8 a nC10	mg/kg	270	138	122	126	100
Hidrocarburos Alifáticos Rango >nC10 a nC12	mg/kg	457	413	2648	4726	3355
Hidrocarburos Alifáticos Rango >nC12 a nC16	mg/kg	1595	1515	10192	21014	12329
Hidrocarburos Alifáticos Rango >nC16 a nC21	mg/kg	3092	2388	16133	30696	18124
Hidrocarburos Alifáticos Rango >nC21 a nC35	mg/kg	1324	846	19105	26206	18283
Hidrocarburos Aromáticos Rango >nC7 a nC8	mg/kg	270	138	105	117	100
Hidrocarburos Aromáticos Rango >nC8 a nC10	mg/kg	270	138	105	117	100
Hidrocarburos Aromáticos Rango >nC10 a nC12	mg/kg	270	186	1422	2965	2150
Hidrocarburos Aromáticos Rango >nC12 a nC16	mg/kg	978	664	5080	10609	7240
Hidrocarburos Aromáticos Rango >nC16 a nC21	mg/kg	1638	1496	8196	15888	11563
Hidrocarburos Aromáticos Rango >nC21 a nC35	mg/kg	1059	678	9909	15222	13026
Benceno	mg/kg	0	1	20	6	2
Tolueno	mg/kg	1	0	2	1	0
Etilbenceno	mg/kg	ND	ND	ND	0	0

<i>m,p-Xileno</i>	mg/kg	1	2	9	5	2
<i>o-Xileno</i>	mg/kg	1	0	3	2	1
<i>Naftaleno</i>	mg/kg	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Acenaftileno</i>	mg/kg	ND	4	5	5	5
<i>Acenafteno</i>	mg/kg	1	5	2	13	13
<i>Fluoreno</i>	mg/kg	ND	18	38	13	63
<i>Fenantreno</i>	mg/kg	5	129	236	30	281
<i>Antraceno</i>	mg/kg	ND	4	15	3	30
<i>Fluoranteno</i>	mg/kg	1	17	19	2	33
<i>Pireno</i>	mg/kg	11	43	38	4	75
<i>Benzo(a)antraceno</i>	mg/kg	5	38	26	9	23
<i>Criseno</i>	mg/kg	4	27	24	1	15
<i>Benzo(b)fluoranteno</i>	mg/kg	10	26	27	7	16
<i>Benzo(k)fluoranteno</i>	mg/kg	ND	ND	ND	1	7
<i>Benzo(a)pireno</i>	mg/kg	10	44	51	10	46
<i>Dibenzo(a,h)antraceno</i>	mg/kg	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Benzo(g,h,i)perileno</i>	mg/kg	8	10	9	6	9
<i>Indeno(1,2,3-cd)pireno</i>	mg/kg	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Relación C17/ Pristano</i>	---	1	0	0	0	0
<i>Relación C18/ Fitano</i>	---	1	0	0	0	0
<i>pH Relación 1:1</i>	UpH	41	21	17	19	15
<i>Sulfuro Total</i>	mg/kg	1222	1303	1076	1824	1341
<i>Sulfato Soluble en Medio Acuoso</i>	mmol/l	2	2	1	1	1
<i>Nitrógeno Total Kjeldahl</i>	mg/kg	11768	6171	4065	4979	4950
<i>Nitrito soluble en medio acuoso</i>	mmol/l	1	0	0	0	0
<i>Amonio</i>	mg/kg	1503	821	1070	801	461
<i>Intercambiable/ Extraible KCL</i>						
<i>Fósforo Total</i>	mg/kg	1746	548	443	836	381
<i>Potencial Redox</i>	mV	1330	758	470	485	483
<i>Aluminio</i>	mg/kg	20503	13000	12300	14400	10200
<i>Antimonio</i>	mg/kg	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Arsénico</i>	mg/kg	54	28	21	23	20
<i>Cadmio</i>	mg/kg	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Zinc</i>	mg/kg	800	521	424	604	277
<i>Cobre Total</i>	mg/kg	274	177	217	1419	251
<i>Cromo</i>	mg/kg	27	39	48	267	48
<i>Hierro</i>	mg/kg	18103	13700	13200	17101	11301
<i>Manganeso</i>	mg/kg	227	195	207	246	122
<i>Níquel</i>	mg/kg	105	23	15	34	10
<i>Plata</i>	mg/kg	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Plomo</i>	mg/kg	108	176	112	150	79
<i>Selenio</i>	mg/kg	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Vanadio</i>	mg/kg	541	275	211	234	200
<i>Cobalto</i>	mg/kg	122	16	11	12	10
<i>Litio</i>	mg/kg	27	14	11	13	10
<i>Bismuto</i>	mg/kg	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Estroncio</i>	mg/kg	88	74	55	101	37
<i>Molibdeno</i>	mg/kg	27	14	11	12	10
<i>Boro</i>	mg/kg	11	6	4	5	4
<i>Humedad</i>	% p/p	82	64	53	57	50

Tabla Anexa 3E: Parámetros fisicoquímicos en base seca en Core ER. En color marrón se encuentran los valores que fueron informados como menores a un determinado valor de cuantificación. ND no detectado.

Parámetros	Unidad	CORE ER				
		H0R	H1R	H2R	H3R	H4R
Hidrocarburos Totales de C6-C35	mg/kg	18606	176134	110335	119611	164456
Hidrocarburos Totales Rango >nC6 a nC8	mg/kg	259	124	106	109	119
Hidrocarburos Totales Rango >nC8 a nC10	mg/kg	259	228	175	207	220
Hidrocarburos Totales Rango >nC10 a nC12	mg/kg	1326	11923	6765	7026	9912
Hidrocarburos Totales Rango >nC12 a nC16	mg/kg	5124	46424	24686	25117	47798
Hidrocarburos Totales Rango >nC16 a nC21	mg/kg	8114	59176	36892	48707	58183
Hidrocarburos Totales Rango >nC21 a nC35	mg/kg	4041	58382	41816	38554	48342
Hidrocarburos Alifáticos: nC6	mg/kg	259	124	106	109	119
Hidrocarburos Alifáticos Rango >nC6 a nC8	mg/kg	259	124	106	109	119
Hidrocarburos Alifáticos Rango >nC8 a nC10	mg/kg	259	124	118	168	129
Hidrocarburos Alifáticos Rango >nC10 a nC12	mg/kg	6596	7270	3085	4843	5812
Hidrocarburos Alifáticos Rango >nC12 a nC16	mg/kg	35409	20002	10966	19509	23283
Hidrocarburos Alifáticos Rango >nC16 a nC21	mg/kg	47736	35333	26292	30157	29373
Hidrocarburos Alifáticos Rango >nC21 a nC35	mg/kg	49617	33548	19110	24978	23601
Hidrocarburos Aromáticos Rango >nC7 a nC8	mg/kg	259	124	106	109	119
Hidrocarburos Aromáticos Rango >nC8 a nC10	mg/kg	259	124	106	109	119
Hidrocarburos Aromáticos Rango >nC10 a nC12	mg/kg	4358	4017	2017	2133	2613
Hidrocarburos Aromáticos Rango >nC12 a nC16	mg/kg	18497	12035	7775	10685	16157
Hidrocarburos Aromáticos Rango >nC16 a nC21	mg/kg	25368	20164	14167	17774	22456

Hidrocarburos Aromáticos Rango >nC21 a nC35	mg/kg	29539	18419	10536	12830	14216
<i>Benceno</i>	mg/kg	0	3	9	4	0
<i>Tolueno</i>	mg/kg	0	0	0	1	0
<i>Etilbenceno</i>	mg/kg	ND	0	ND	0	ND
<i>m,p-Xileno</i>	mg/kg	1	3	4	5	ND
<i>o-Xileno</i>	mg/kg	1	1	1	1	ND
<i>Naftaleno</i>	mg/kg	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Acenaftileno</i>	mg/kg	1	6	5	4	5
<i>Acenafteno</i>	mg/kg	1	8	4	11	8
<i>Fluoreno</i>	mg/kg	1	33	31	37	44
<i>Fenantreno</i>	mg/kg	7	165	185	166	264
<i>Antraceno</i>	mg/kg	ND	14	9	22	11
<i>Fluoranteno</i>	mg/kg	1	21	15	30	11
<i>Pireno</i>	mg/kg	4	46	39	97	24
<i>Benzo(a)antraceno</i>	mg/kg	2	44	40	24	15
<i>Criseno</i>	mg/kg	1	21	25	18	10
<i>Benzo(b)fluoranteno</i>	mg/kg	3	28	23	23	16
<i>Benzo(k)fluoranteno</i>	mg/kg	ND	6	2	4	3
<i>Benzo(a)pireno</i>	mg/kg	4	44	34	34	33
<i>Dibenzo(a,h)antraceno</i>	mg/kg	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Benzo(g,h,i)perileno</i>	mg/kg	4	8	4	5	7
<i>Indeno(1,2,3-cd)pireno</i>	mg/kg	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Relación C17/ Pristano</i>	---	0	0	0	0	0
<i>Relación C18/ Fitano</i>	---	1	0	0	0	0
<i>pH Relación 1:1</i>	UpH	39	18	16	17	19
<i>Sulfuro Total</i>	mg/kg	1813	1811	1208	820	2494
<i>Sulfato Soluble en Medio Acuoso</i>	mmol/l	3	6	1	1	2
<i>Nitrógeno Total Kjeldahl</i>	mg/kg	12073	6739	6415	6330	7276
<i>Nitrito soluble en medio acuoso Amonio</i>	mmol/l	1	0	0	0	0
<i>Intercambiable/ Extraible KCL</i>	mg/kg	1321	660	850	680	570
<i>Fósforo Total</i>	mg/kg	1927	737	614	765	589
<i>Potencial Redox</i>	mV	1093	533	485	554	705
<i>Aluminio</i>	mg/kg	22798	10501	12900	15300	17501
<i>Antimonio</i>	mg/kg	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Arsénico</i>	mg/kg	52	25	21	22	24
<i>Cadmio</i>	mg/kg	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Zinc</i>	mg/kg	959	615	544	380	492
<i>Cobre Total</i>	mg/kg	284	1010	222	1202	314
<i>Cromo</i>	mg/kg	29	90	38	561	23
<i>Hierro</i>	mg/kg	19798	13300	13100	16300	17200
<i>Manganeso</i>	mg/kg	245	176	185	216	143
<i>Níquel</i>	mg/kg	118	44	14	13	14
<i>Plata</i>	mg/kg	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Plomo</i>	mg/kg	104	138	191	108	145

<i>Selenio</i>	mg/kg	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Vanadio</i>	mg/kg	518	248	212	217	238
<i>Cobalto</i>	mg/kg	159	16	11	11	12
<i>Litio</i>	mg/kg	26	12	11	15	18
<i>Bismuto</i>	mg/kg	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Estroncio</i>	mg/kg	103	114	67	53	55
<i>Molibdeno</i>	mg/kg	26	12	11	11	12
<i>Boro</i>	mg/kg	10	5	4	4	5
<i>Humedad</i>	% p/p	81	60	53	54	58

Tabla Anexa 5: Metadata cualitativa utilizada para los análisis de diversidad. Se calculó el promedio de cada uno de los parámetros fisicoquímicos y se los clasifico como L (bajo) si estaban por debajo del valor promedio o como H (alto) si estuvieron por encima del promedio. En el caso del pH se clasificaron como AL (alcalino) o AC (ácido).

	HT	HA	HAr	BTEX	PAH	pH	S ²	SS	NT	NIS	AI	PT	P REDOX	PROF	Li	Pb	Fe	Mn
IH0	L	L	L	L	L	AL	L	L	L	L	L	H	H	S	L	L	L	L
IH1	L	L	L	L	L	AL	L	L	L	L	H	H	L	D	L	L	L	L
IH2	H	H	H	H	H	AL	H	H	H	L	H	H	H	D	L	H	L	L
IH3	H	H	H	L	H	AL	H	H	L	L	H	H	L	D	L	L	L	L
IH4	L	L	L	L	L	AL	L	L	H	L	L	H	L	D	L	L	H	L
IH5	L	L	L	L	L	AL	L	L	L	L	L	L	L	D	H	L	H	H
IH6	L	L	L	L	L	AL	L	L	L	L	L	L	H	D	L	L	H	H
IRH0	L	L	L	L	L	AL	L	L	L	L	L	H	H	S	L	L	L	L
IRH1	L	L	L	L	L	AL	L	L	L	L	H	H	L	D	L	L	L	L
IRH2	H	H	H	H	H	AL	H	H	H	L	H	H	H	D	L	H	L	L
IRH3	H	H	H	L	H	AL	H	H	L	L	H	H	L	D	L	L	L	L
IRH4	L	L	L	L	L	AL	L	L	H	L	L	H	L	D	L	L	H	L
IRH5	L	L	L	L	L	AL	L	L	L	L	L	L	L	D	H	L	H	H
IRH6	L	L	L	L	L	AL	L	L	L	L	L	L	H	D	L	L	H	H
MH0	H	H	H	L	H	AL	L	H	H	H	H	H	H	S	L	L	L	L
MH1	H	L	L	L	H	AL	L	H	H	H	L	L	H	D	H	L	H	H
MH2	H	H	H	L	H	AL	H	L	H	H	H	L	H	D	H	L	H	H
MH3	L	L	L	H	L	AL	L	H	L	H	L	L	H	D	H	L	H	H
MH4	L	H	H	L	L	AL	L	H	L	H	L	L	H	D	H	L	H	H
MRH0	L	L	L	L	L	AL	L	L	L	H	L	L	H	S	L	L	L	H
MRH1	L	L	L	L	L	AL	H	H	L	H	H	L	H	D	H	L	H	H
MRH2	L	H	H	L	L	AC	L	H	L	H	L	L	H	D	H	L	H	H
MRH3	H	L	L	L	L	AL	L	H	L	H	L	L	H	D	H	L	H	H
MRH4	L	L	L	L	L	AL	L	L	L	H	L	L	L	D	H	L	H	H
MRH5	L	L	L	L	L	AL	L	H	L	H	L	L	L	D	H	L	H	H
MRH6	L	L	L	L	L	AL	L	L	L	H	L	L	L	D	H	L	H	H
EH0	L	L	L	L	L	AL	L	L	H	L	H	H	L	S	L	H	L	L
EH1	H	L	L	L	H	AL	H	L	H	H	H	L	L	D	L	H	L	L

<i>EH2</i>	H	H	L	H	H	AL	H		L	H	H	L	L	D	L	H	L	L
<i>EH3</i>	H	H	H	H	L	AL	H	L	H	H	H	H	L	D	L	L	L	L
<i>EH4</i>	H	H	H	H	H	AL	H	L	H	H	L	L	L	D	L	L	L	L
<i>ERH0</i>	L	H	H	L	L	AL	L	L	H	L	L	H	L	S	L	H	L	L
<i>ERH1</i>	H	H	H	H	H	AL	H	H	H	H	H	H	L	D	L	H	L	L
<i>ERH2</i>	H	H	H	H	H	AL	H	L	H	H	H	H	L	D	L	H	L	L
<i>ERH3</i>	H	H	H	H	H	AL	L	L	H	H	H	H	L	D	L	L	L	L
<i>ERH4</i>	H	H	H	L	H	AL	H	L	H	H	L	L	H	D	L	L	L	L

Tabla Anexa 6: Valores de NSTI (*Nearest Sequenced Taxon Index*), indicador de la precisión de las predicciones funcionales de PICRUST2 en los sedimentos del curso de agua estudiado. Los valores de NSTI tienen una relación inversa con la precisión de la predicción. En muestras de suelo los NSTI típicamente rondan los 0,17.

<i>Muestra de sedimento</i>	<i>NSTI</i>	<i>Muestra de sedimento</i>	<i>NSTI</i>
<i>IH0</i>	0,17	<i>MH4</i>	0,01
<i>IH1</i>	0,22	<i>MRH0</i>	0,16
<i>IH2</i>	0,27	<i>MRH1</i>	0,01
<i>IH3</i>	0,25	<i>MRH2</i>	0,01
<i>IH4</i>	0,04	<i>MRH3</i>	0,03
<i>IH5</i>	0,03	<i>MRH4</i>	0,01
<i>IH6</i>	0,13	<i>MRH5</i>	0,02
<i>IRH0</i>	0,17	<i>MRH6</i>	0,01
<i>IRH1</i>	0,14	<i>EHO</i>	0,16
<i>IRH2</i>	0,18	<i>EH1</i>	0,16
<i>IRH3</i>	0,23	<i>EH2</i>	0,15
<i>IRH4</i>	0,02	<i>EH3</i>	0,02
<i>IRH5</i>	0,00	<i>EH4</i>	0,06
<i>IRH6</i>	0,01	<i>ERH0</i>	0,17
<i>MH0</i>	0,18	<i>ERH1</i>	0,17
<i>MH1</i>	0,03	<i>ERH2</i>	0,14
<i>MH2</i>	0,03	<i>ERH3</i>	0,15
<i>MH3</i>	0,02	<i>ERH4</i>	0,07

Tabla Anexa 7: Valores de NSTI (*Nearest Sequenced Taxon Index*), indicador de la precisión de las predicciones funcionales de PICRUST2 en los microcosmos Ai y SAi. Los valores de NSTI tienen una relación inversa con la precisión de la predicción. En muestras de suelo los NSTI típicamente rondan los 0,17.

<i>Microcosmo</i>	<i>NSTI</i>	<i>Microcosmo</i>	<i>NSTI</i>
<i>Ai TI-42</i>	0,12	<i>SAi T90-26</i>	0,15
<i>Ai Ti-44</i>	0,14	<i>SAi T90-27</i>	0,14
<i>SAi Ti- 39</i>	0,13	<i>Ai T90-14</i>	0,16
<i>SAi Ti-X</i>	0,12	<i>Ai T90-13</i>	0,16
<i>SAi T30-22</i>	0,14	<i>Ai T90-15</i>	0,17
<i>SAi T30-23</i>	0,12	<i>SAi T280-31</i>	0,16
<i>SAi T30-24</i>	0,16	<i>SAi T280-35</i>	0,16
<i>Ai T30-8</i>	0,15	<i>SAi T280-36</i>	0,17
<i>Ai T30-9</i>	0,15	<i>Ai T280-1</i>	0,22
<i>Ai T30-10</i>	0,16	<i>Ai T280-2</i>	0,15
<i>SAi T90-25</i>	0,15	<i>Ai T280-3</i>	0,21

