



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Obtención de inoculantes bacterianos
y evaluación de su aplicación en procesos
de biorremediación de suelos contaminados
con hidrocarburos policíclicos aromáticos
(PAH) de la Patagonia semiárida

Tesis Doctoral

Laura Madueño

2013

El presente trabajo, para optar al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de la Plata, fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI), Universidad Nacional de La Plata, y en el Centro Regional de Investigación y Desarrollo Científico Tecnológico (CRIDECIT), Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, bajo la dirección de la Dra, Irma Susana Morelli y la codirección del Dr. Héctor Manuel Alvarez.

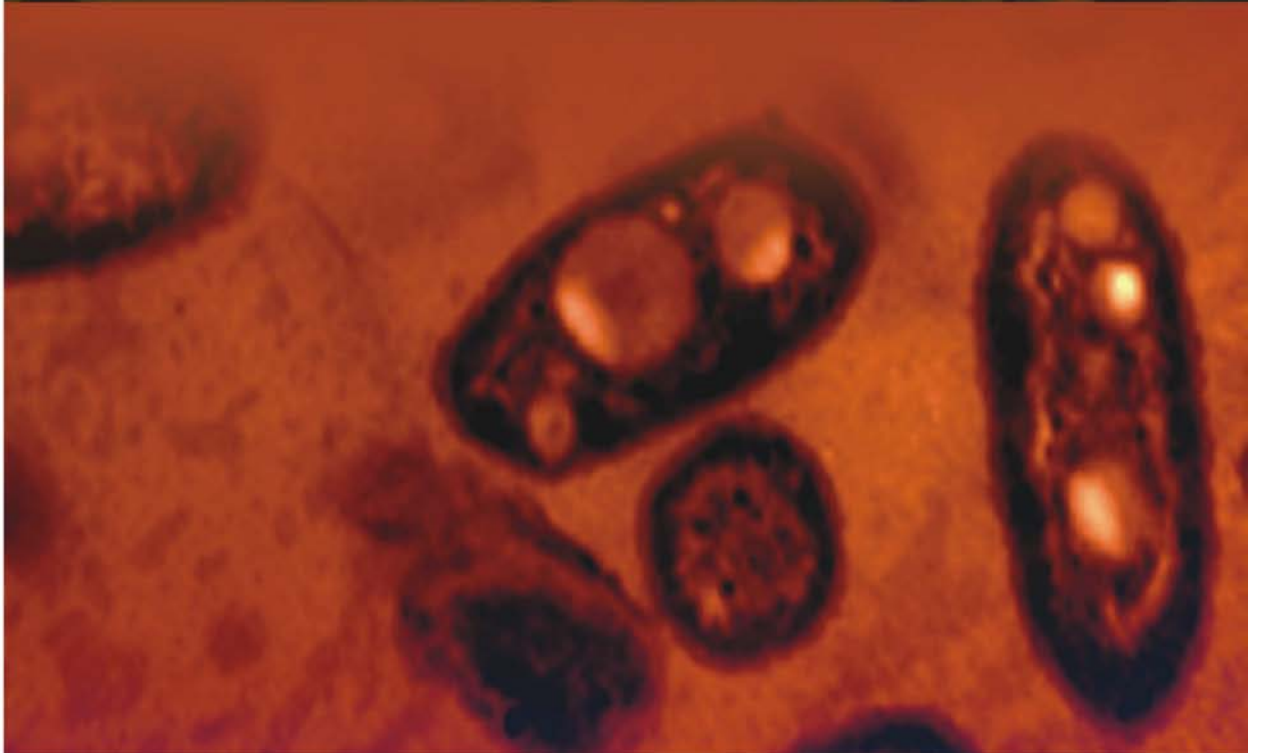
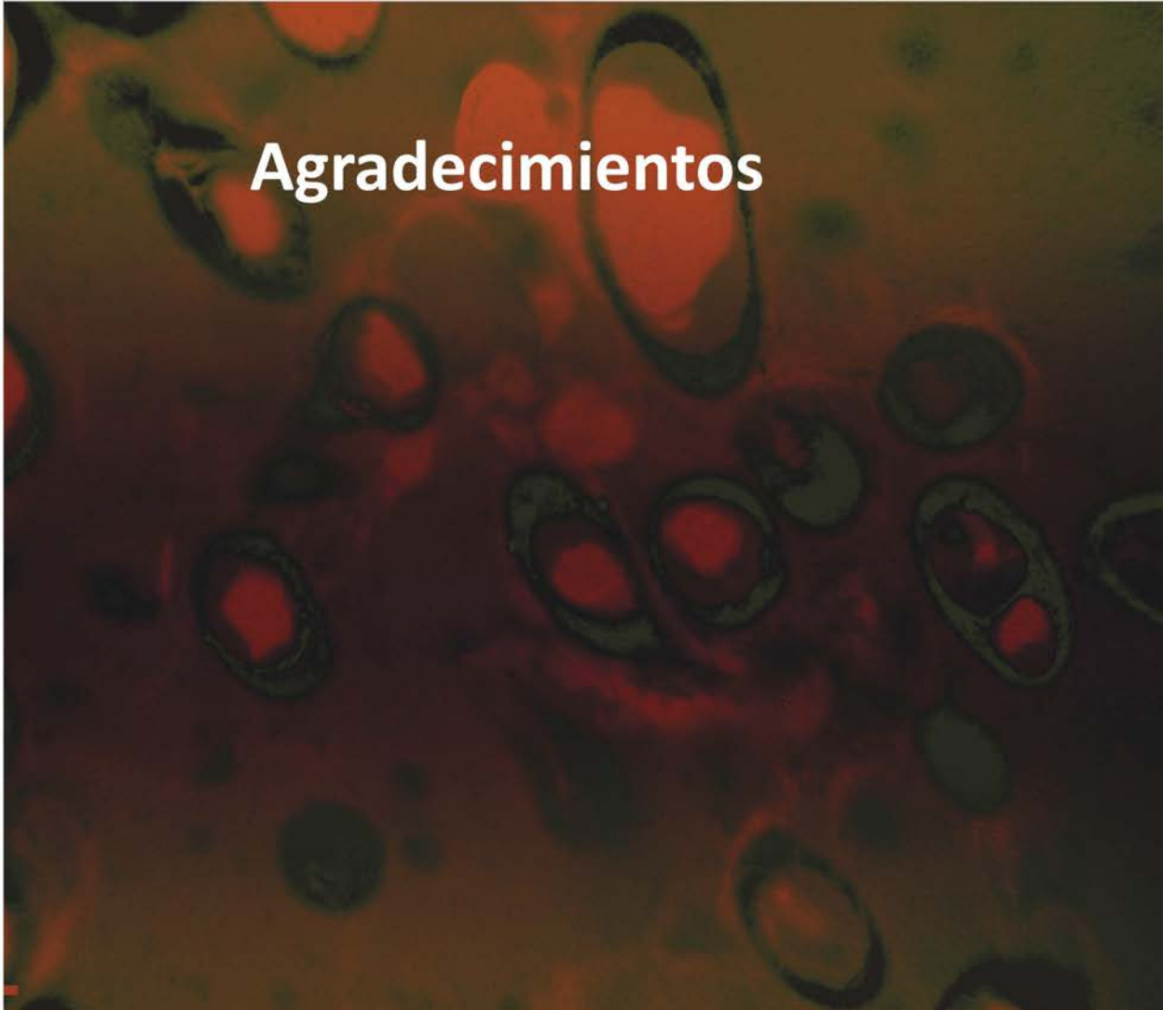
*“Pequeña jugaba,
recuerdo los juegos, recuerdo la playa,
recuerdo a mis padres y el viento en la cara.*

*Recuerdo los azules y los ocres de aquellas regiones,
la aridez, su inmensidad y las crudas estaciones.*

*Creciendo en confianza me fui asentando
y comprendí el camino que me fue acercando.*

*Hoy siento que el tiempo me enseña
que su esencia vivirá en mí”.*

Agradecimientos



A Irma, por ser mi directora, estando siempre presente y atenta durante todo el proceso de mi trabajo, darme el apoyo profesional y humano que necesité, por brindarme todos sus conocimientos y por comprender que más allá de ésta bella profesión uno necesita otras cosas en la vida para sentirse pleno.

A Héctor, por haber confiado en mí sin casi conocerme y por estar presente en momentos fundamentales del trabajo.

Al CONICET por otorgarme las becas para emprender este proyecto.

A la empresa Oil M&S por darme la posibilidad de comenzar con mi tesis y confiar en el proyecto.

Al CINDEFI por darme el espacio físico para llevar a cabo la tesis.

A Migue, por el amor que me da día a día y ser mi compañero en la vida, por ser capaces de formar una familia juntos y acompañarme en la idea de no perder nunca de vista nuestros propios proyectos personales.

A mis padres, porque sin su apoyo, sus consejos y su confianza no hubiera llegado a ser lo que soy. A mi mamá por insistirme en ir a visitar ese famoso laboratorio en Cañadón Seco, y por sobre todo hacer el terrible esfuerzo de manejar en la ruta y llevarme.

A Isita, porque es la alegría de mi vida y me saca todos los días una sonrisa.

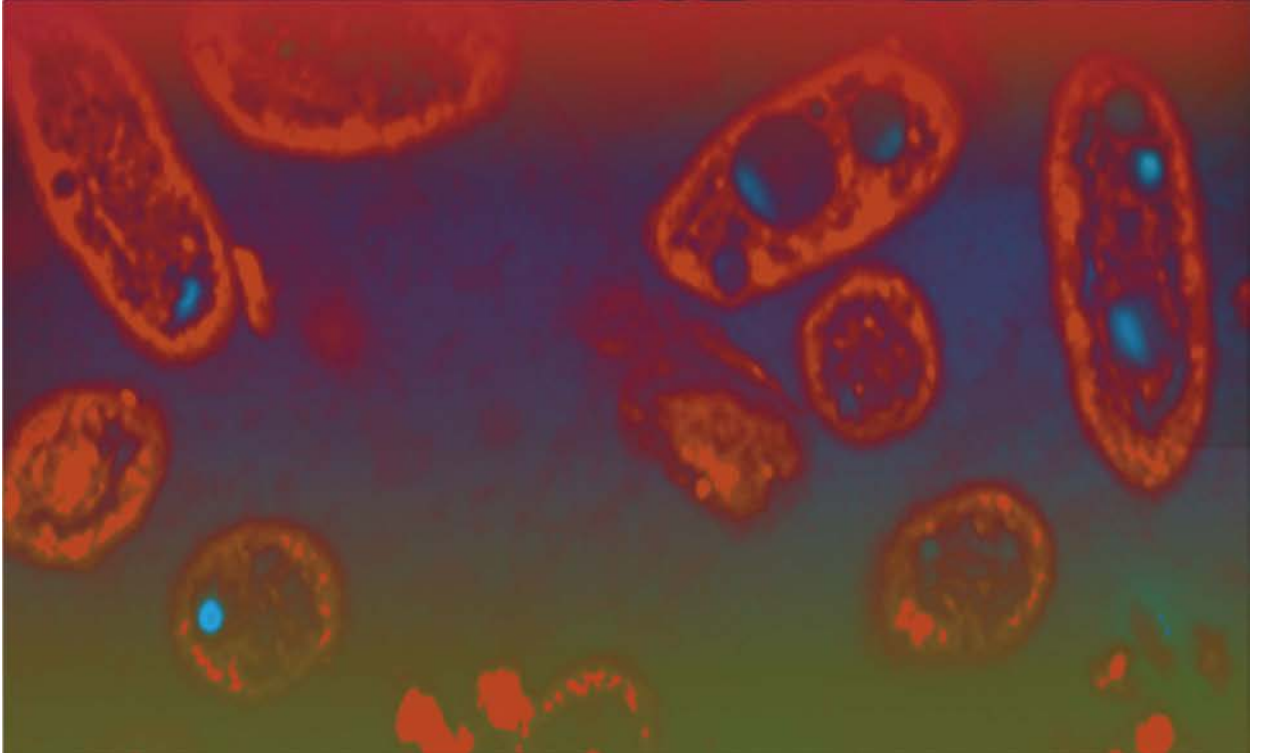
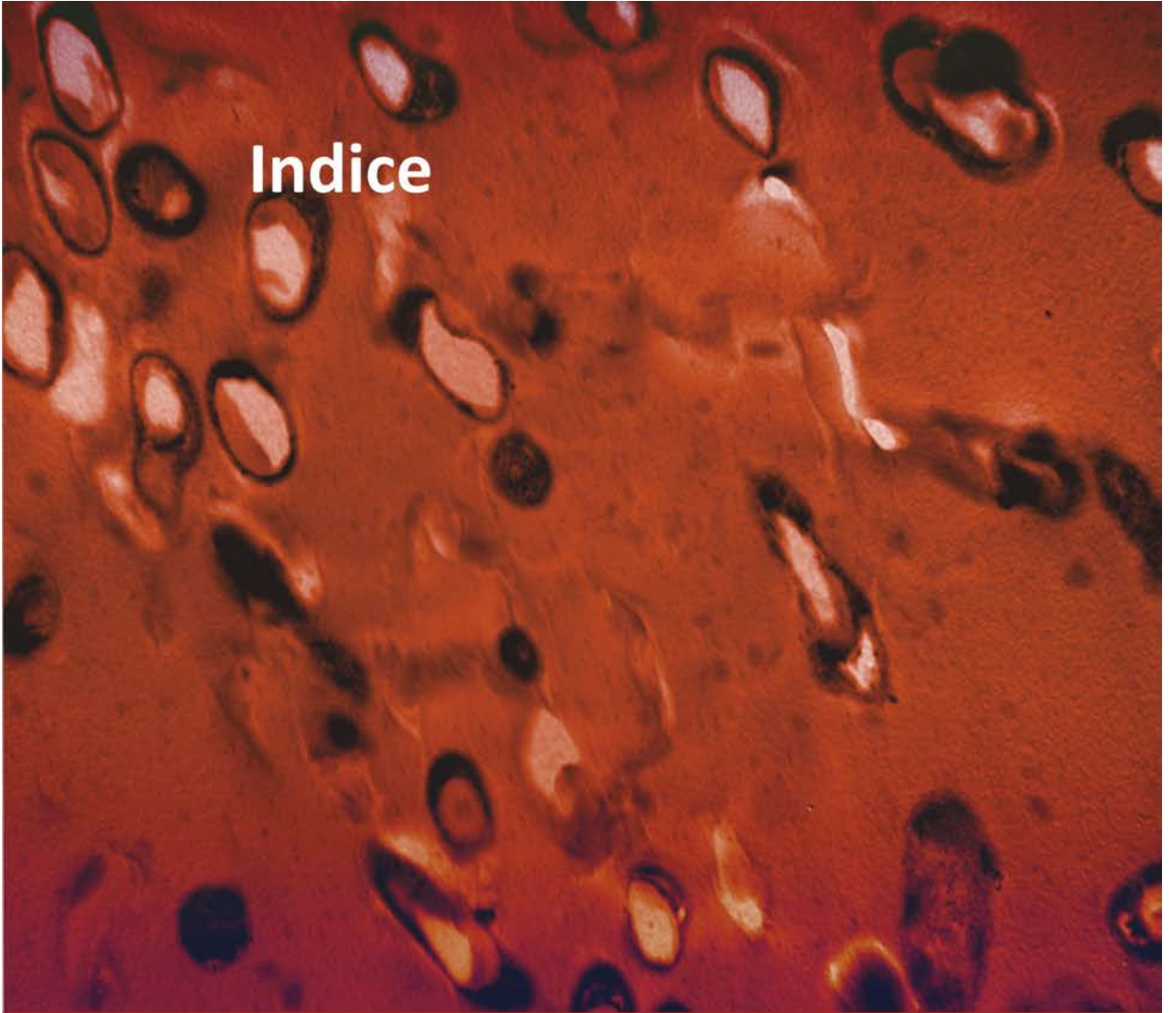
A mi gran amiga Gui, porque la adoro con todo mi corazón y siempre está conmigo incondicionalmente en los momentos que la necesito.

A Yani, Ro, Mara, Miris y Lud por ser mis amigas y por las últimas charlas descargadoras!

A mis compañeros del CINDEFI por poder trabajar en un ambiente agradable, especialmente a mis compañeros y amigos del laboratorio,

- A Bibi, por brindarme todos sus conocimientos aprendidos en el laboratorio y en la vida, por las charlas, los consejos y por ser mi amiga.
- A Agustín y a Manuel, por alegrarme los largos días de los primeros años de mis tesis con su buena onda.
- A Jorge por hacerme reír y ser mi amigo, mi compañero musical y de canto en las mañanas. Por acompañarme, escucharme y ayudarme en muchos experimentos.
- A Clau, porque la adoro y por haber tenido la suerte de compartir aunque sea unos añitos juntas en el L8, y sobre todo por ser mi amiga y acompañarme, junto con Guby, en la idea loca de hacer el mural en el CINDEFI.
- A Anita, Claudita, Sabri y Romi, por estar siempre dispuestas a ayudarme en lo que necesite, por las divertidas y profundas charlas que hemos tenido en muchas ocasiones.
- A Sabri por su buena voluntad y paciencia!
- A Tere por saber que puedo contar con ella para cuando la necesite.

Indice



Indice

I. Introducción

I.1	Hidrocarburos policíclicos aromáticos como contaminantes	13
I.2	Contaminación de los suelos con PAH	15
I.3	Microorganismos degradadores de PAH	15
I.4	Patagonia Central: Semidesierto Argentino con historia de explotación petrolera.....	17
I.5	Biorremediación de suelos contaminados	21
I.6	Importancia de las consideraciones ecológicas en la selección de inoculantes	24
I.6.1	Teoría ecológica de la selección r/k	24
I.7	Estrategia ABA como alternativa de bioaumentación	25
I.8	Biorremediación en regiones áridas	28
I.9	Mecanismos de resistencia a factores ambientales en microorganismos	29

II. Hipótesis y Objetivos

II.1	Objetivos Generales	32
II.2	Objetivos específicos.....	32
II.3	Hipótesis	32

III. Materiales y Métodos

III.1	Materiales.....	34
III.1.1	Medios de cultivo	34
III.1.2	Buffers y Soluciones	37
III.1.3	Muestras de suelo	40
III.2	Métodos	40
III.2.1	Generación de los cultivos de enriquecimiento en microorganismos degradadores de fluoreno	40
III.2.2	Técnicas de Recuentos bacterianos	40
III.2.2.i	Recuentos de bacterias degradadoras de PAH mediante la técnica de NMP (Wrenn y Venosa, 1996)	40
III.2.2.ii	Recuento de bacterias degradadoras de PAH (Bogardt y Hemmingsen, 1992).....	41
III.2.2.iii	Recuentos de bacterias heterótrofas cultivables (BHC) (Reasoner y Geldreich, 1985).....	41
III.2.3	Estrategias de aislamiento de bacterias degradadoras de PAH a partir de las muestras de suelo PT2371 y PT2372 provenientes de la región de Pico Truncado, Patagonia Central	41
III.2.3.i	Estrategia de aislamiento 1: Aislamientos a partir de los recuentos en MMS y MML con 200 o 2000ppm de fluoreno	41
III.2.3.ii	Estrategia de aislamiento 2: Aislamiento de microorganismos adheridos a superficies con fluoreno adsorbido	42
III.2.3.iii	Estrategia de aislamiento 3: Aislamiento directo de microorganismos adheridos muy firmemente a partículas de suelo	42
III.2.3.iv	Estrategia de aislamiento 4: Aislamiento a partir de una suspensión de suelo.....	42
III.2.4	Determinación del espectro de degradación de los aislados.....	42
III.2.5	Caracterización fenotípica de los cultivos aislados y de los aislados degradadores de PAH	43
III.2.5.i	Tinción de Gram	43
III.2.5.ii	Prueba de KOH.....	43
III.2.5.iii	Fermentación de los hidratos de carbono	44

III.2.5.iv	Prueba de reducción de Nitratos	44
III.2.5.v	Prueba de licuefacción de la gelatina	44
III.2.5.vi	Presencia de la enzima catalasa	44
III.2.5.vii	Prueba de la Ureasa	44
III.2.5.viii	Tinción específica para compuestos hidrofóbicos (Burdon, 1946)	45
III.2.6	Caracterización genotípica de los aislados degradadores	45
III.2.6.i	Extracción y aislamiento de ADN total de cultivos bacterianos.....	45
III.2.6.ii	RAPD.....	45
III.2.6.iii	PCR y Secuenciación del gen completo 16S rRNA.....	46
III.2.6.iv	PCR de una porción conservada de gen 16S rRNA y DGGE.....	46
III.2.6.v	DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)	47
III.2.6.vi	Determinación de la presencia de plásmidos	47
III.2.7	Cinética de crecimiento en MML con PAH como única fuente de carbono y energía.....	48
III.2.8	Ensayos de quimiotaxis hacia fenantreno y fluoreno	48
III.2.9	Técnicas utilizadas para la caracterización de propiedades fisiológicas en los aislados bacterianos	49
III.2.9.i	Crecimiento a diferentes pH.....	49
III.2.9.ii	Ensayo de Resistencia al estrés hídrico.....	49
III.2.9.ii.1	Ensayo de salinidad	49
III.2.9.ii.2	Ensayo de resistencia a la desecación	49
III.2.9.iii	Ensayo de Supervivencia en déficit de carbono	50
III.2.9.iv	Ensayo de supervivencia en déficit de Nitrógeno	50
III.2.10	Ensayos de inoculación en sistemas biometers	51
III.2.10.i	Preparación de los inóculos	51
III.2.10.ii	Preparación y protocolo de determinación del CO ₂ producido en los sistemas biometers	51
III.2.10.iii	Cuantificación del fenantreno residual en biometers.....	52
III.2.11	Ensayos de inoculación en microcosmos	52
III.2.11.i	Preparación del inóculo.....	52
III.2.11.ii	Preparación de los microcosmos	53
III.2.11.iii	Recuentos de microorganismos heterótrofos cultivables y degradadores de PAH.....	53
III.2.11.iv	Actividad deshidrogenasa	54
III.2.11.v	Cuantificación del fenantreno residual en microcosmos.....	54
III.2.11.vi	Extracción de ADN total y PCR.....	54
III.2.11.vii	Cálculo de índices de Shannon.....	54
III.2.11.viii	Capacidad de crecer con hidrocarburos no aromáticos como única FCE	
	555	
III.2.12	Condiciones de cultivo para acumular compuestos de reserva.....	55
III.2.13	Condiciones de cultivo para movilizar compuestos de reserva acumulados...	55
III.2.14	Extracción de PHB por metanólisis y cuantificación por cromatografía gaseosa	55
III.2.15	Extracción y cuantificación de glucógeno.....	56
III.2.15.i	Extracción por hidrólisis alcalina	56
III.2.15.ii	Cromatografía en capa delgada (TLC) para evidenciar la presencia de glucógeno.....	57
III.2.15.iii	Hidrólisis enzimática con alfa amilasa y amiloglicosidasa del glucógeno y cuantificación de la glucosa liberada por el método glicemia enzimático.....	57
III.2.16	Ensayo de la cepa 22B sometida a desecación	57
III.2.16.i	Obtención de las células bajo diferentes condiciones de estrés ambiental.....	57
III.2.16.ii	Ensayos experimentales realizados bajo las condiciones Húmeda y de Desecación por 10 h y 4 días	58

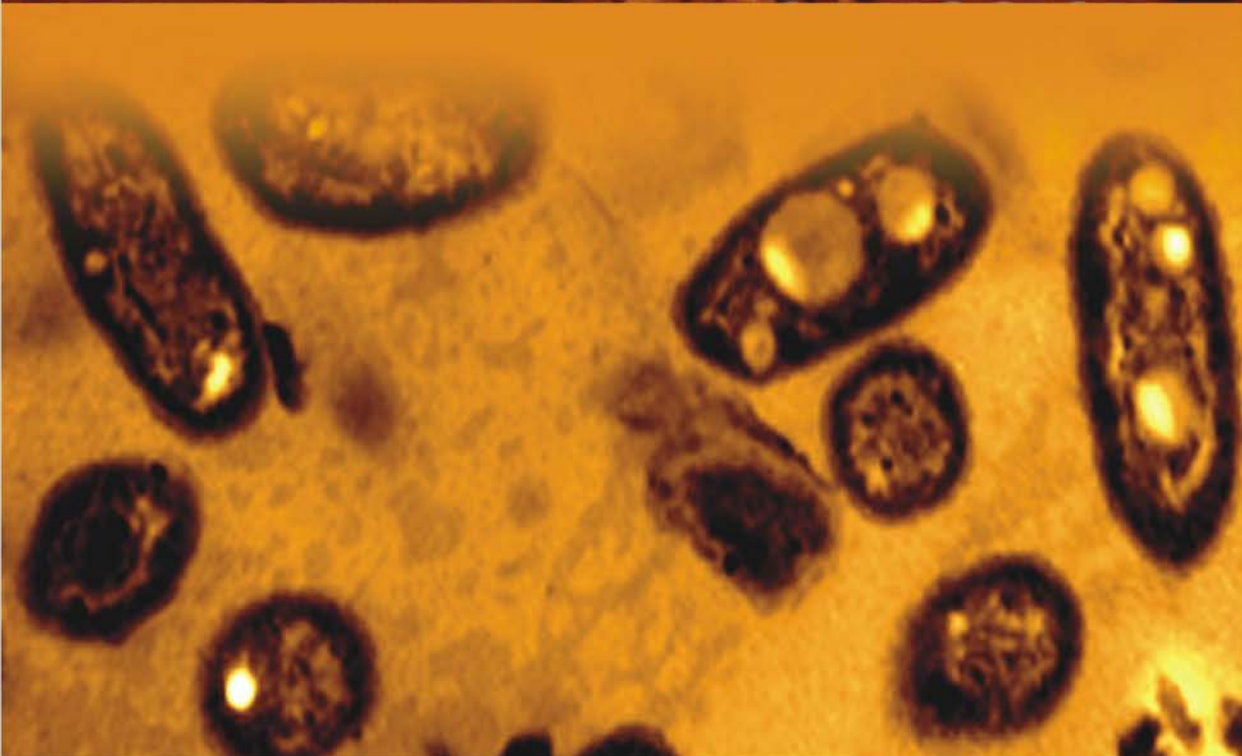
III.2.16.iii	Preparación del lisado celular y solubilización de las proteínas citoplasmáticas.....	58
III.2.16.iv	SDS-PAGE	59
III.2.16.v	Gel bidimensional	59
III.2.16.vi	Tinción Coomassie Blue Coloidal para geles SDS PAGE y Bidimensionales.....	60
III.2.17	Análisis estadístico	60
IV.	Aislamiento y caracterización de bacterias degradadoras de PAH autóctonas de suelos de la Patagonia semiárida.....	62
IV.1	Caracterización física, química y microbiológica de los suelos	62
IV.2	Aislamiento de bacterias degradadoras de PAH a partir de las muestras de suelo PT2371 y PT2372 provenientes de la región de Pico Truncado, Patagonia Central.....	64
IV.2.1	Determinación del espectro de degradación de los aislados.....	70
IV.2.2	Caracterización fenotípica y genotípica de los cultivos aislados seleccionados.....	73
IV.2.3	Secuenciación del gen 16S rRNA y determinación de la relación filogenética de los aislados.....	76
IV.2.4	Curva de crecimiento en MML con PAH como única fuente de carbono y energía....	77
IV.2.5	Ensayos de quimiotaxis hacia fenantreno y fluoreno.....	80
IV.3	Caracterización de propiedades fisiológicas que sugieran la presencia en los aislados de mecanismos de adaptación a las condiciones ambientales de la Patagonia semiárida	82
IV.3.1	Crecimiento a diferentes pH.....	82
IV.3.2	Resistencia al estrés hídrico.....	83
IV.3.2.i	Salinidad	84
IV.3.2.ii	Deseccación	86
IV.3.3	Supervivencia en déficit de carbono.....	87
IV.3.4	Supervivencia en déficit de nitrógeno.....	88
IV.4	Investigación de la presencia de plásmidos.....	91
IV.5	Discusión.....	92
V.	Aplicación de estrategias ABA: ensayos de inoculación en biometers y microcosmos.....	101
V.1	Sistemas biometers: efecto de estrategias ABA sobre la mineralización y eliminación del fenantreno.....	102
V.2	Determinación del espectro de degradación de hidrocarburos e incursión en el estudio de la vía de degradación de fenantreno presente de la cepa <i>Sphingobium sp.</i> 22B	108
V.2.1	Degradación de hidrocarburos lineales y mezclas complejas	108
V.2.2	Ensayo de determinación de compuestos intermediarios de la vía de degradación del fenantreno.....	109
V.3	Ensayos de inoculación con la cepa <i>Sphingobium sp.</i> 22B en microcosmos de suelo Patagónico artificialmente contaminado con fenantreno	110
V.3.1	Condición suelo natural (SN)	110
V.3.2	Condición suelo fertilizado (SF)	115
V.3.3	Condición suelo regado (SR).....	119
V.4	Discusión.....	126
VI.	Estudio de las respuestas fisiológicas y moleculares de <i>Sphingobium sp.</i> 22B frente a diferentes estreses ambientales.....	133

VI.1	Análisis de la presencia de genes involucrados en la acumulación de sustancias de reserva en bacterias de la familia <i>Sphingomonadaceae</i>	134
VI.2	Estudio sobre la capacidad de la cepa 22B para acumular compuestos de reserva	134
VI.3	Estudio sobre la capacidad de la cepa 22B de movilizar el PHB y glucógeno acumulados	137
VI.4	Respuestas fisiológicas y moleculares (Proteoma) de la cepa 22B a la desecación ambiente.....	141
VI.5	Discusión.....	151
VII.	Conclusiones.....	160
VIII.	Bibliografía.....	164



Introducción

CAPÍTULO I



I. Introducción

I.1 Hidrocarburos policíclicos aromáticos como contaminantes




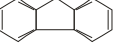
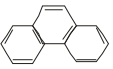
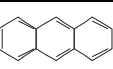
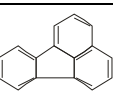
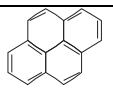
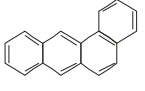
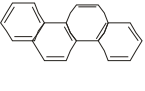
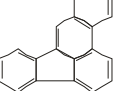
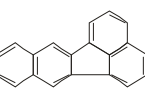
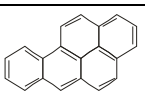
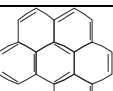
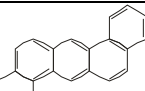
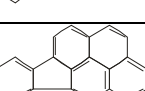
Los hidrocarburos son compuestos orgánicos constituidos únicamente por átomos de carbono e hidrógeno que forman parte de los residuos fósiles, dentro de los cuales se encuentran los hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH) (Commendatore y col., 2012). Los PAH son un grupo de compuestos formados por moléculas que contienen dos o más anillos aromáticos de 6 carbonos fusionados, y son conocidos por su elevada toxicidad, mutagenicidad y carcinogenicidad (Mrozik y Piotrowska-Seget, 2010) y por lo tanto son considerados riesgosos para la salud humana.

Los PAH se producen y liberan al ambiente a partir de fuentes naturales y antropogénicas. Las fuentes naturales incluyen procesos geológicos como la actividad volcánica y la diagénesis temprana (Laflamme y Hites, 1978; Blumer, 1976), la producción por plantas (Azuma y col., 1996) y termitas (Kraus y col., 2005; Wilcke y col., 2003) y la incineración de materia orgánica como madera y arbustos (Freeman y col., 1990). Los pesticidas utilizados para agricultura o para la protección de la madera, e incluso el humo del cigarrillo, son fuentes permanentes de PAH que se liberan al ambiente a una velocidad dependiente de la actividad humana. La producción de PAH por la actividad industrial relacionada con la extracción, refinamiento, combustión, transporte y almacenamiento del petróleo (Peressutti y col., 2000; Berthe-Corti y col., 2007) y la utilización de combustible fósiles para calefacción doméstica contribuyen en mayor proporción a la contaminación global (Freeman y col., 1990; Wild y col., 1995).

Estos compuestos se caracterizan por presentar baja solubilidad en agua, baja constante de Henry¹ y alta hidrofobicidad, representada por la partición n-octanol/agua (log Kow) (Mackay y Callcot, 1998). A medida que se incrementa el peso molecular y el tamaño de la molécula, decrece la solubilidad en agua y aumenta la hidrofobicidad, toxicidad y persistencia en el medio ambiente. Por su carácter lipofílico se pueden bioacumular y adsorber a sedimentos y suelos (Hughes y col., 1997). En base a sus propiedades químicas, su abundancia y su toxicidad, la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA), la Organización Mundial de la Salud (WHO) y la Comunidad Económica Europea (CEE) han considerado a 16 PAH como contaminantes prioritarios (Tabla I.1).

1 Constante de Henry: coeficiente que representa la partición aire/agua

Tabla I.1: Estructura química y características físico químicas de algunos PAHs (Okere y col., 2012)

PAH	Peso molecular	Estructura	Temperatura de melting (°C)	Solubilidad en agua (mg/l)	Log Kow
Naftaleno	128,2		79 – 82	320	3,5
Acenaftaleno	152,2		95	5,3	3,95
Acenaftileno	152,2		72-82	3,93	3,94
Fluoreno	166,2		115 - 16	1,85	4,28
Fenantreno	178,2		99	1,24	5,62
Antraceno	178,2		218	0,64	5,33
Fluorantreno	202,3		110	0,25	4,62
Pireno	202,3		156	0,14	4,47
Benzo(a)antraceno	228,3		158	0,01	5,30
Criseno	228,3		255	0,002	5,30
Benzo(b)fluorantreno	252,3		168	-	5,74
Benzo(k)fluorantreno	252,3		215	-	6,06
Benzo(a)pireno	252,31		179	0,0038	5,74
Benzo(ghi)perileno	276,3		273	0,00026	6,20
Disenzo(ah)antraceno	278,35		262	0,0005	6,84
Indeno(1,2,3,c-d)pireno	276,3		163	Insoluble	6,20

I.2 Contaminación de los suelos con PAH

Los PAH están ampliamente distribuidos en el ambiente siendo detectados en muestras de aire (Freeman y col., 1990), agua (Soclo y col., 2000), sedimentos (Youngblood y col., 1975) y suelos (Jones y col., 1989), donde pueden encontrarse en fase sólida, disueltos en una fase líquida no acuosa (NAPL) (Peters y col., 1999), o como fase libre en aguas subterráneas de sitios contaminados. Los suelos actúan como último repositorio, almacenando más del 90% de los PAH liberados en el ambiente (Wild y col., 1995; Agarwal y col., 2009). En consecuencia, y como resultado de las actividades antropogénicas, la concentración de PAH en los suelos se ha incrementado considerablemente durante el siglo XX (Morelli y col., 2013). La permanencia de éstos compuestos en el suelo afecta a la macro y microbiota que habita en él, causando un notorio desbalance en el equilibrio del ecosistema afectado.

Cuando los PAH llegan al medioambiente pueden seguir un número de procesos físicos, químicos o biológicos. Algunos de estos procesos incluyen la fotooxidación y/o volatilización a la atmósfera, lixiviación hacia aguas subterráneas, sorción irreversible a la materia orgánica del suelo, bioacumulación, adsorción por plantas y degradación microbiana (Okere y col., 2012). El proceso más recurrente es la degradación microbiana, la cual lleva finalmente a la decontaminación de suelos y sedimentos (Cerniglia, 1992). La velocidad a la que ocurren estos procesos depende de un número de factores, incluyendo el tipo de suelo (mineral y contenido de materia orgánica), las propiedades físico-químicas del contaminante, las condiciones climáticas, el potencial redox, la disponibilidad de nutrientes y la composición y actividad de la comunidad microbiana.

El destino del PAH está altamente gobernado por su biodisponibilidad. La disminución de la biodisponibilidad se genera debido a que los PAH interactúan con los componentes orgánicos e inorgánicos de la matriz del suelo: pueden quedar atrapados en los nanoporos del suelo evitando así la difusión de los mismos, pueden unirse a los minerales del suelo mediante uniones iónicas y electrostáticas, oxidarse, unirse covalentemente o generar un equilibrio de partición/disolución con la materia orgánica (Head 1998). La velocidad de biodegradación puede estar limitada por las velocidades de difusión desde los microporos, por la desorción de éstos compuestos y por el coeficiente de partición en la materia orgánica del suelo.

I.3 Microorganismos degradadores de PAH

Numerosos procariotes y eucariotes como eubacterias, levaduras, hongos filamentosos e inclusive cianobacterias y algas han sido aislados y se ha demostrado que metabolizan, mineralizan o cometabolizan PAH. Particularmente las bacterias, se encuentran activamente

involucradas en la degradación de este tipo de compuestos. Se conocen muchas con capacidad de degradar PAH, entre ellas cepas del género *Pseudomonas* (Deziel y col., 1996), *Mycobacterium* (Bastiaens y col., 2000), *Rhodococcus* (Uz y col., 2000), *Sphingomonas* (Fida y col., 2012; Aitken y col., 1998), *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Burkholderia* (Aitken y col., 1998) y *Flavobacterium* (Trzesicka-Mlynarz y col., 1995).

La degradación de los PAHs depende fuertemente de las condiciones ambientales, de la naturaleza y estructura química del compuesto, de la estructura de la molécula, y del tipo y número de microorganismos degradadores (Haritash y col., 2009). Los PAH de bajo peso molecular (LMW-PAHs) son descritos como fácilmente metabolizables por una multitud de especies, debido a su número bajo de ciclos benceno y su mayor solubilidad en agua. Algunos hongos, algas, y especialmente las bacterias pueden utilizar LMW-PAHs como única fuente de carbono y energía (FCE) (Cerniglia y col., 1992). Los PAH de alto peso molecular (HMW-PAHs) son considerados resistentes al metabolismo bacteriano, un hecho que se atribuye a su baja biodisponibilidad (Gibson y Subramanian, 1984; Kanaly y Harayama, 2000). Sin embargo se han aislado especies de *Mycobacteria* que metabolizan y mineralizan PAH de hasta 5 anillos (Kelley y col., 1995). Los LMW-PAHs son frecuentemente metabolizados por muchas enzimas específicas, mientras que los HMW-PAHs son cometabolizados por enzimas extracelulares que poseen una especificidad amplia de sustrato, generando oxidaciones parciales no específicas de la estructura del anillo.

Existen diferentes maneras de iniciar la degradación de un PAH, que dependerá del tipo de microorganismo degradador, y de la utilización o no del oxígeno. Los microorganismos pueden biodegradar los PAH en metabolitos menos complejos, a través de la mineralización aeróbica llegando a H₂O y CO₂ o anaeróbica obteniendo como producto final CH₄ (Haritash y col., 2009). El proceso anaeróbico de biodegradación de PAH suele ser más lento, conociéndose algunas de las rutas metabólicas posibles (Foght, 2009).

Las enzimas bacterianas implicadas en la degradación aeróbica de los PAH suelen ser monooxigenasas, dioxigenasas y deshidrogenasas. Las bacterias utilizan mono o dioxigenasas y los hongos enzimas extracelulares lignolíticas, peroxidasas y lacasas (Haritash y col., 2009).

En el caso de bacterias que utilizan el oxígeno para degradar a los PAHs y adicionan los dos átomos de O₂ a la molécula de PAH, como las bacterias del género *Sphingomonas* (Bünz y col., 1993), el primer paso es el ataque de una dioxigenasa multicomponente (formada por una reductasa, una ferredoxina y una proteína hierro sulfurada) (Harayama y col., 1992), a uno de los anillos aromáticos del PAH que convierte al compuesto en un cis-dihidrodiol; éste es luego oxidado mediante la acción de una deshidrogenasa para formar dihidróxidos (catecol). El intermediario dihidroxilado es procesado por un sistema multienzimático de deshidrogenasas, que luego a través de rutas de orto y metaclivaje se oxidan a un intermediario central del

metabolismo como acetato o succinato, los cuales pueden entrar en el ciclo de Krebs transformándose finalmente en CO₂ (Krivobok y col., 2003). Este tipo de degradación es equivalente a una completa mineralización y detoxificación de la molécula de PAH. En la figura I.1 se muestra un esquema de las rutas de degradación de PAH conocidas que utilizan algunos hongos y bacterias.

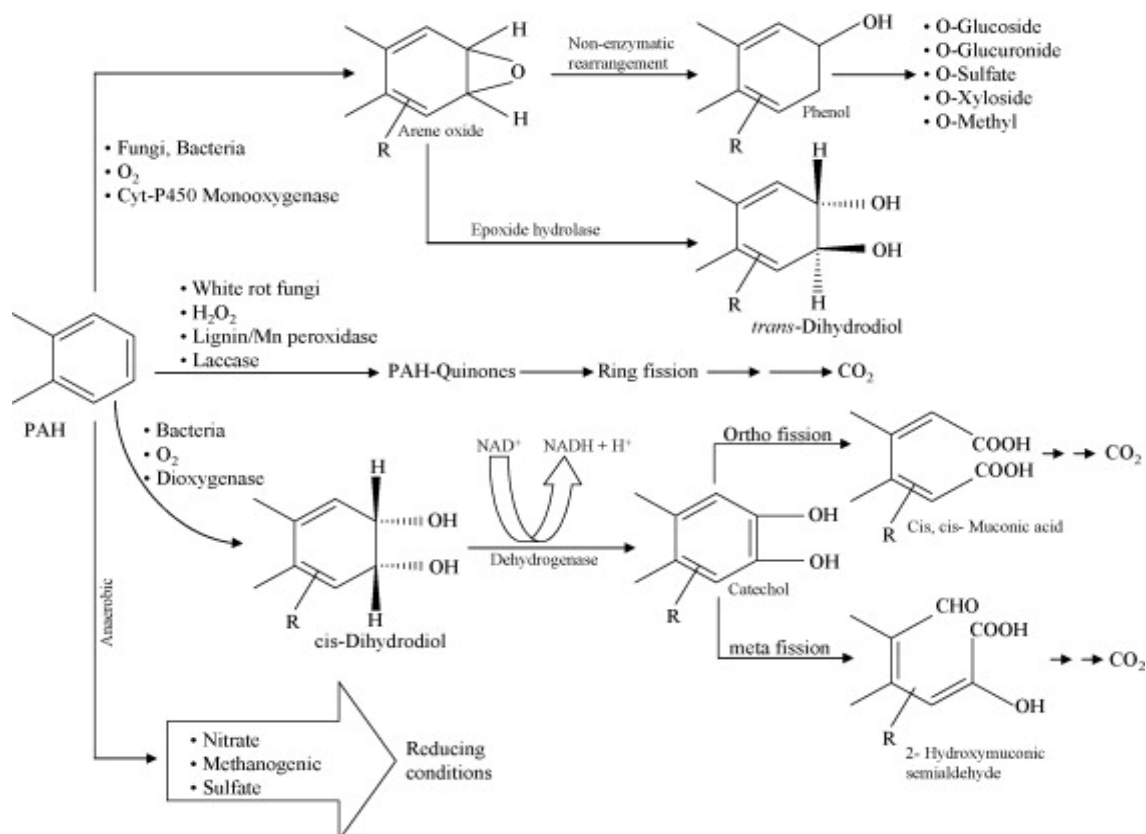


Figura I.1: Rutas metabólicas de degradación de PAH (Haritash y col., 2009).

I.4 Patagonia Central: Semidesierto Argentino con historia de explotación petrolera

La Patagonia central es una región de la Argentina clasificada como semidesértica (Cabrera, 1976). Las lluvias anuales no superan en promedio los 200 mm, y en su mayoría ocurren entre marzo y agosto, existiendo un fuerte déficit de agua en primavera y verano (SMN, <http://www.smn.gov.ar>). Los vientos constantes y generalmente direccionados de oeste a este aumentan la evaporación y la erosión de los suelos (Paruelo y col., 1998). Las escasas precipitaciones junto con el constante viento son los dos factores que contribuyen a la aridez propia de los suelos de la Patagonia Central.

La vegetación de esta región es xerófila, escasa y no cubre completamente la superficie del suelo, está normalmente compuesta de arbustos espinosos, achaparrados, de hojas pequeñas y perennes; algunos de ellos son el Solupe (*Ephedra ochreatea*), el Quilembai (*Chuquiraga*

avellanadae), el Coirón Llama (*Jarava humilis*) y la Zampa (*Atriplex lampa*) (http://www.patagonia_natural.org/attachments/189_Flora%20de%20la%20Estepa.pdf). Estas características de la flora autóctona son las que les permiten soportar déficit hídricos prolongados, y los fuertes y persistentes vientos (de hasta 150km/h) que acechan durante todo el año (Paruelo y col., 1998). Los suelos de ésta región, clasificados a partir del paralelo 39° como *Aridisoles* (FAO, 1979), están expuestos durante largos períodos a la falta de agua para el crecimiento de cultivos o pasturas prolíficas. La mayor parte del tiempo el agua presente es retenida a gran tensión, lo que la hace prácticamente inutilizable para las plantas, o bien es agua salada. No hay períodos superiores a los tres meses en los cuales los suelos presenten humedad disponible, lo que limita extremadamente su posibilidad de utilización. Generalmente los suelos de la región se caracterizan por ser pobres en fósforo y nitrógeno y tener un pH alcalino. Presentan un horizonte superficial claro y pobre en materia orgánica (epipedón ócrico) por debajo del cual pueden aparecer una gran variedad de caracteres morfológicos de acuerdo a las condiciones y a los materiales a partir de los cuales se han desarrollado. Estos caracteres pueden ser el resultado de las actuales condiciones de aridez o heredadas de condiciones anteriores y los procesos involucrados en su génesis incluyen la migración y acumulación de sales solubles, carbonatos y arcillas silicatadas o materiales originales sin evidencias de ninguna acumulación significativa (FAO, 1979).

En las Figuras I.1 y I.2 se muestra la flora espinosa y achaparrada típica y los suelos desnudos de las regiones aledañas a las ciudades de Pico Truncado y Comodoro Rivadavia, ubicadas ambas en la Cuenca del Golfo San Jorge, en las provincias de Santa Cruz y Chubut respectivamente.



Figura I.1: (A) Región aledaña a la ciudad de Pico Truncado, Santa Cruz. (B) Región de los alrededores de la ciudad de Comodoro Rivadavia, Chubut.

La explotación de hidrocarburos en la Argentina comenzó con el hallazgo de petróleo el 13 de diciembre de 1907 en la ciudad de Comodoro Rivadavia se hacia una perforación en busca de agua. A partir de allí comenzó la explotación petrolera en nuestro país, suscribiendo el Poder Ejecutivo durante la Presidencia de Hipólito Yrigoyen, 15 años después del descubrimiento, un decreto por el cual se daba una nueva estructura a la Explotación del Petróleo Fiscal. Por dicho decreto se creaba la Dirección General de Yacimientos Petrolíferos Fiscales (YPF), a cargo del General Enrique Mosconi (Yacimientos Petrolíferos Fiscales Administración de YPF, año 1924). El descubrimiento del petróleo y su explotación influyó directamente en el crecimiento y la distribución poblacional de la ciudad de Comodoro Rivadavia. Cada vez que se instalaban equipos de perforación, un nuevo campamento se establecía alrededor. Consecuentemente se impulsó el crecimiento poblacional del norte de la Provincia de Santa Cruz y años más tarde el desarrollo de las localidades santacruceñas de Caleta Olivia y Pico Truncado (Prado 2010).

La Cuenca del Golfo San Jorge (C.G.S.J.), la cual se extiende desde el sur de la provincia de Chubut y norte de la provincia de Santa Cruz, alberga muchos de los yacimientos de explotación petrolera ubicados en la Patagonia. En ésta región se ubican las localidades de Comodoro Rivadavia, Sarmiento, Caleta Olivia, Pico Truncado, Cañadón Seco y Las Heras entre otras. La C.G.S.J es una de las más prometedoras del país en la producción de petróleo y gas, debido a su potencial crecimiento tanto en lo referente a recuperación secundaria, y a la explotación de recursos no convencionales (hidrocarburos muy viscosos o que se encuentran atrapados en rocas poco permeables). Continúa después de 105 años aportando de forma ininterrumpida a la matriz energética del país.

En la totalidad de la Cuenca del Golfo San Jorge, entre el año 2010 y 2011 la producción alcanzó los 84,1-93,6 millones de barriles de petróleo crudo (<http://www.elpatagonico.net/nota/114611/>). Estos valores representan aproximadamente 30% del petróleo que se extrae en la Argentina, encontrándose nuestro país en la posición número 26 a nivel mundial en cuanto a extracción de barriles de petróleo por día (<http://www.indexmundi.com/g/r.aspx?v=88&l=es>).

Tras la caída del precio de la lana en las últimas décadas, debido al uso de nuevas fibras sintéticas derivadas del petróleo (Museo Nacional del petróleo) (http://www.mipatagonia.com/regiones/chubut/comodoro_rivadavia/museo_del_petroleo/historia/hist_frames.htm), Comodoro Rivadavia y muchas ciudades de la Cuenca del Golfo San Jorge siguen aún dependiendo casi exclusivamente del petróleo. En la figura I.2 y I.3 se muestran imágenes de la explotación petrolera a principios del siglo XX y en la actualidad.

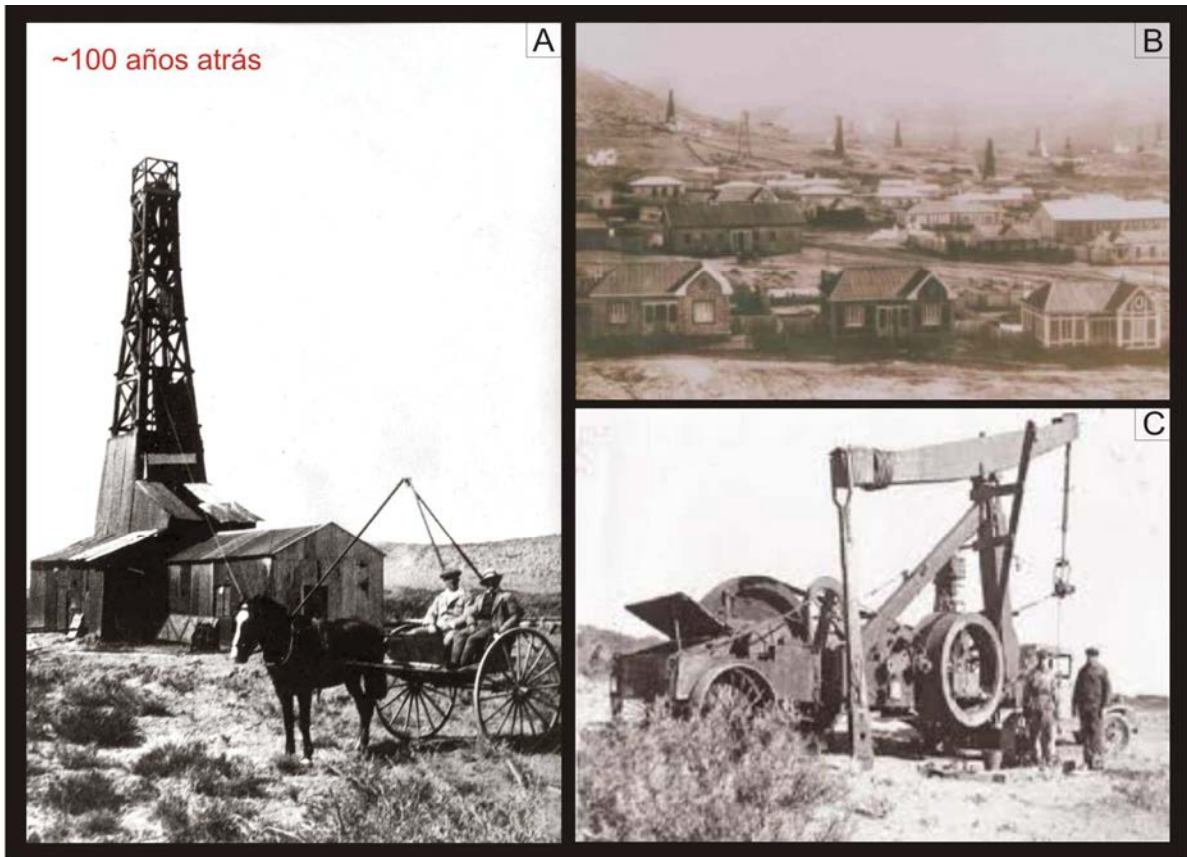


Figura I.2: (A) Primer pozo petrolero en el Yacimiento de Astra. (B) Barrio kilómetro 3 “General Mosconi”, donde se realizó la primer perforación exitosa de petróleo en los inicios del siglo XX. (C) Operarios trabajando en una máquina de bombeo.

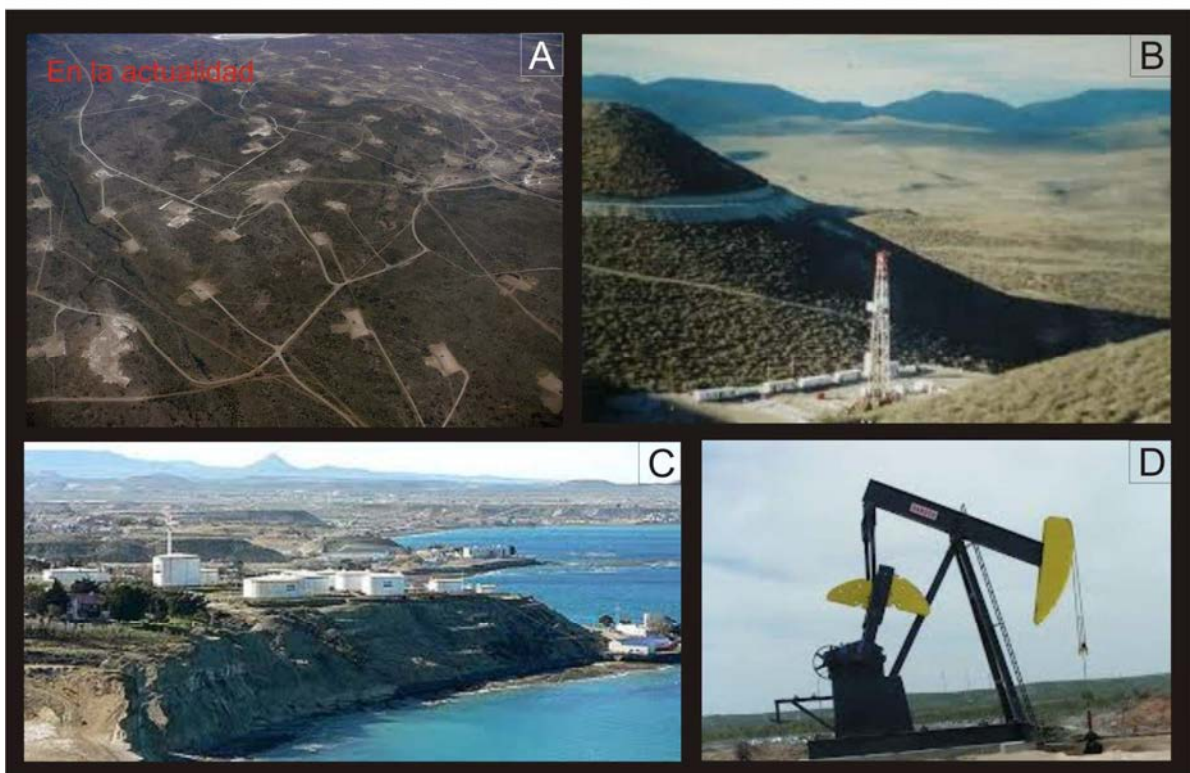


Figura I.3: (A) Imagen aérea en donde se observan los pozos petroleros y los caminos que los unen. (B) Torre de perforación (C) Imagen actual del barrio kilómetro 3 donde se observa tanques de almacenamiento de crudo. (D) Aparato Individual de Bombeo (AIB).

La intensa actividad petrolera desde inicios del siglo XX y hasta la actualidad ha generado y genera derrames de petróleo en muchos lugares de la región. El último desastre ecológico de la zona sucedió en diciembre de 2007 en las proximidades de la localidad chubutense de Caleta Córdova (http://www.nuestromar.org/noticias/ecologia_y_medioambiente_12_2007_derrame_de_petroleo_en_chubut_12926). En la Figura I.4 se muestran imágenes del derrame ocurrido en Caleta Córdova y una imagen de un derrame en suelo cercano a una ruta provincial. Los derrames accidentales de crudo y la ausencia de una legislación adecuada han permitido la acumulación de grandes extensiones de suelos contaminados. Las recientes normas dictadas por los gobiernos provinciales que establecen límites aceptables de hidrocarburos en suelo (2% p/p para el caso de la Provincia de Santa Cruz y 1% p/p en la Provincia de Chubut) (Silva 2008), ha convertido al saneamiento de los suelos en un tema de importancia e interés político, económico y social.



Figura I.4: (A y C) Personal trabajando en la contención del derrame (B) Barreras de contención antes y después de su utilización (D) Imagen de derrame de crudo en las inmediaciones de una ruta provincial.

I.5 Biorremediación de suelos contaminados

La biorremediación es una estrategia que se aplica para eliminar contaminantes de diferentes ambientes. Utiliza métodos biológicos y es considerada una estrategia rentable, ecológica, y ampliamente aceptada por resultar más económica y con menores consecuencias posteriores

(Margesin y Schinner, 2001). Se utilizan organismos vivos (plantas, animales o microorganismos), componentes celulares y/o enzimas libres, con el fin de mineralizar o transformar parcialmente el contaminante en sustancias menos tóxicas o inocuas para el medio ambiente y la salud humana. Los sistemas microbianos son los más utilizados debido a que poseen una gran diversidad metabólica que los capacita para degradar muchos compuestos. A través de los ciclos biogeoquímicos de la materia, los microorganismos del suelo pueden detoxificar, por ejemplo, residuos industriales producidos por la actividad humana (Röling y col., 2002).

Existen diferentes tipos de estrategias de biorremediación, algunas de ellas incluyen la biostimulation, el bioaumentación y la atenuación natural.

La bioestimulación consiste en modificar el ambiente por la adición de un nutriente de forma tal que se estimulen las poblaciones naturales a degradar el contaminante. Aunque la bioestimulación se considera eficaz debido a que las bacterias indígenas degradadoras están lógicamente adaptadas al ambiente que se pretende decontaminar (Rahman y col., 2003), puede ser necesario un tiempo muy largo para eliminar el contaminante, debido a que los microorganismos degradadores suelen estar en bajo número (Hosowaca y col., 2009). Además es necesario conocer y ajustar las propiedades fisicoquímicas del proceso para que el mismo funcione (Swannell y col., 1996).

El bioaumentación se basa en introducir microorganismos degradadores del contaminante dentro del ecosistema como forma de remediación (Scullion 2006; Teng y col., 2010). La tecnología del bioaumentación ha sido considerada una estrategia válida para aumentar la velocidad de degradación de los contaminantes, incrementando su eliminación a través de la actividad del microorganismo introducido (Fernández Luqueño y col., 2011). Puede realizarse con células libres las cuales son introducidas en forma de suspensión (Coppotelli y col., 2008); encapsuladas (Weir y col., 1996) o inmovilizadas en soportes (In Der Wiesche y col., 2003; Del Panno y col., 2005), lo que incrementa la permanencia del inóculo en el suelo; mediante el agregado del microorganismo degradador junto con una planta que promueva el crecimiento del inoculante y sirva como nicho para los microorganismos inoculados (Launen y col., 2002; Anokhina y col., 2004); mediante la adición de nutrientes junto con el inóculo generando un ambiente favorable para el crecimiento y establecimiento del mismo (van Veen y col., 1997); o inoculando cepas modificadas genéticamente con capacidades para transferir genes de degradación a los microorganismos indígenas (De Rore y col., 1994).

A pesar de que el bioaumentación como estrategia para acelerar la biorremediación de ambientes contaminados con PAH se considera una tecnología prometedora, se encuentra todavía en etapa experimental. Existen muchos artículos relacionados con el saneamiento de ambientes contaminados con PAH utilizando la estrategia del bioaumentación que muestran resultados

contradictorios, tanto desde el punto de vista científico como tecnológico. Algunos autores reportaron que es un tratamiento efectivo debido a que logra aumentar la velocidad de biodegradación de los PAH reduciendo el tiempo del proceso de biorremediación (Abbondanzi y col., 2006; Cunliffe y Kertesz 2006; Coppotelli y col., 2008) y que suele ser más eficaz durante las primeras etapas del proceso, tiempo durante el cual la población del inoculante puede ser mantenida en alta concentración (Hosowaca y col., 2009). Sin embargo otros autores detectaron que el bioaumentación puede tener baja efectividad debido a diversos factores. Goldstein y col., 1985 reportaron que la primera etapa del proceso, la cual implica la transferencia del inóculo desde medios ricos con óptimas condiciones de crecimiento hacia un ambiente natural complejo, suele ser estresante para el inoculante, el cual debe readaptarse a las nuevas condiciones para poder sobrevivir en el ambiente. El éxito del bioaumentación dependería entonces de las condiciones de preparación previa del inóculo (Cunliffe y col., 2006; Liang y col., 2011) y de la preferencia del inóculo por otras fuentes de carbono en el suelo en vez del contaminante (Tyagi, 2001). Otros autores han analizado que la supervivencia y capacidad de degradación del inoculante dependen de las condiciones bióticas, como competencia (Thompson y col., 2005; Fantroussi y Agathos, 2005) y predación (Bouchez y col., 2000) del inoculante con y por los microorganismos autóctonos del suelo que se desea descontaminar. Van Veen y col., (1997) sugirieron que el inóculo una vez adicionado en el suelo podría perderse debido a que la dinámica microbiana evoluciona hacia el reestablecimiento de la comunidad original.

Los factores abióticos de suelo influyen también en la supervivencia del inóculo, incluyendo las fluctuaciones o contenidos extremos de minerales, arcilla, concentración de carbono orgánico, nutrientes inorgánicos (Tyagi 2011), pH (Dible y Bartha, 1979), temperatura (Atlas, 1981), tensión del agua (Dibble y Bartha 1979; Leahy y Colwell 1990; Prieto y col., 2011), contaminantes tóxicos potenciales (Liu y col., 2009), acumulación de productos de degradación (Coppotelli y col, 2008) y baja disponibilidad de los PAH (Vogel, 1996). Una estrategia utilizada para evitar los inconvenientes de la pérdida del inóculo por los factores bióticos y abióticos, es la de ajustar de manera intermitente la concentración del inóculo con la adición de más microorganismos (Hosowaca y col., 2009; Coppotelli y col., 2008). Debido a las limitaciones asociadas con la bioestimulación y el bioaumentación, éstas técnicas pueden aplicarse en forma complementaria (Hamdi y col., 2007). La adición del inoculante solo a veces no es suficiente y debe ser acompañado con alteraciones del contenido abiótico del suelo (Leahy y Colwell 1990).

I.6 Importancia de las consideraciones ecológicas en la selección de inoculantes

La selección del inoculante es el primer paso en el proceso de bioaumentación y ha sido considerado el paso clave para que la estrategia de bioaumentación sea exitosa. Desde hace más de 100 años la selección de un inoculante se ha basado exclusivamente en la expresión y la capacidad de degradación del contaminante en cultivos de enriquecimiento (Beijerinck, 1901), sin tener en cuenta la capacidad potencial de las cepas de proliferar y ser activas en los sitios a decontaminar. En la actualidad los procesos de bioaumentación tienden a ser impredecibles, siendo probablemente uno de los factores causales la selección del inoculante. Thompson y col., (2005) han sugerido que las consideraciones ecológicas en la selección del inoculante, como la abundancia relativa y temporal/espacial de las poblaciones autóctonas del suelo a decontaminar y sus posibles capacidades para tolerar las condiciones imperantes en los hábitats de destino, deben ser una prioridad, y ser consideradas en las etapas tempranas de la selección de inoculantes. La abundancia relativa y temporal/espacial podría definir el éxito del proceso, debido a que las cepas seleccionadas como inoculantes que provienen de poblaciones con baja abundancia, o son poblaciones transientes, tienen menos probabilidades de ser exitosas como inóculos, en comparación con aquellas poblaciones que son espacial y temporalmente ubicuas (Thompson y col., 2005). Por lo tanto, el proceso de selección de un inoculante podría ser más efectivo si se tuvieran en consideración las variables ecológicas que influyen luego cuando el microorganismo seleccionado es inoculado en el sitio de destino.

I.6.1 Teoría ecológica de la selección r/k

En el estudio de la ecología de grandes animales se ha descrito la teoría de selección r/k, la cual hipotetiza que las fuerzas evolutivas operan en dos direcciones diferentes: r ó k en relación con la probabilidad de supervivencia de individuos de diferentes especies. El estrategia r, como por ejemplo el ratón, controla y domina la situación cuando los recursos son abundantes, en cambio un estrategia k, como el elefante, tiene éxito en situaciones de limitación de nutrientes (Atlas y Bartha, 1987). Esta teoría ha sido extrapolada a los microecosistemas, donde los microorganismos han desarrollado también estrategias que les permiten vivir en comunidad. La ecuación I.1 describe el crecimiento de poblaciones en condiciones limitadas, como ocurre naturalmente en el ambiente.

$$\frac{1}{x} \cdot \frac{dx}{dt} = r - \left(x \cdot \frac{r}{k} \right)$$

velocidad específica de crecimiento per cápita
velocidad específica de crecimiento capacidad de intercambio con el ambiente

Ecuación I.1: Velocidad específica de crecimiento de una población microbiana en condiciones ambientales limitantes

Analizando la ecuación en cuanto al número de individuos pertenecientes en una población (x) podemos inferir que cuando x es bajo la velocidad de crecimiento de las poblaciones dentro de una comunidad esta dominada por la velocidad específica de crecimiento per cápita (r). Cuando x es alto, la velocidad de crecimiento queda limitada por el factor de la ecuación donde se encuentra la capacidad de intercambio del ambiente, k .

El dogma de la ecología es que los organismos optimicen ya sea su capacidad reproductiva, como en el caso de los estrategas de la r , o bien la conservación de los recursos, como los estrategas de la k : pero no ambas.

En lo que refiere a la selección de inoculantes, los estrategas de la r como *Saccharomyces*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, podrían colonizar el ambiente blanco a niveles bajos de densidad de población y ser capaces de utilizar sustratos a mayores velocidades que los microorganismos de la k . Sin embargo debido a que son oportunistas, podrían no tener las capacidades ecológicas necesarias para poder establecerse dentro de la comunidad, y por lo tanto bajo condiciones desfavorables experimentarían una rápida disminución poblacional. Los estrategas de la k como *Streptomyces*, *Agrobacterium*, *Corynebacterium* y *Basidiomycota*, en cambio dependen de la capacidad de adaptación fisiológica a las condiciones del ambiente y poseen una velocidad de crecimiento más lenta. Como son más estables dentro de la comunidad, y destinan una pequeña porción de los recursos a la división celular, un inoculante con ésta estrategia podría degradar sustratos más lentamente pero prevalecer en la comunidad microbiana donde fue introducido (Atlas y Bartha, 1987).

I.7 Estrategia ABA como alternativa de bioaumentación

Los tratamientos exitosos de bioaumentación dependen muchas veces de la utilización de microorganismos adaptados al sitio que se desea decontaminar. Los microorganismos exógenos del suelo a decontaminar, utilizados en algunas formulaciones de inoculantes, en general no son capaces de competir con los microorganismos indígenas, superar a los predadores y tolerar algunos factores abióticos del suelo. Por lo tanto, podría ser mucho más práctico realizar el bioaumentación con microorganismos aislados del suelo a sanear (Hosowaca y col., 2009).

El bioaumentación con microorganismos autóctonos (ABA, del inglés *autochthonous bioaugmentation*) es una tecnología que utiliza microorganismos aislados o consorcios indígenas del suelo que se pretende decontaminar (Ueno y col., 2007), enriquecidos en gran proporción mediante el cultivo *in vitro*, y mejor adaptados a la contaminación propia del lugar que los microorganismos alóctonos (Hosowaca y col., 2009). La estrategia ABA posee el mismo concepto que el bioaumentación definido por Vogel y Walter (2001), y el mismo ha sido nombrado

también como “reinoculación” (Weber y Corseuil 1994).

Generalmente, el o los microorganismos degradadores son aislados a partir de una muestra ambiental, antes o después de que la contaminación en el lugar haya ocurrido, cultivados *in vitro* de manera de incrementar su concentración, y reinoculados en alta proporción luego de que la contaminación ocurra en el ambiente de donde fue aislado. El enriquecimiento *in vitro* bajo condiciones similares a las ambientales es una de las formas de incrementar el éxito del proceso (Hosokawa y col., 2009). En algunos ensayos ABA se ha utilizado como inoculante una fracción de la muestra ambiental que se desea decontaminar, sin pasar por el proceso de aislamiento, la cual fue enriquecida en microorganismos por la adición de algún bioestimulante (Otte y col., 1994).

La estrategia ABA puede ser aplicada en tierra o aguas contaminadas, posee ciertas ventajas como menor tiempo de tratamiento, mayor eficiencia potencial, menor impacto en el medio ambiente y una mayor facilidad en la obtención de apoyo público (Hosokawa y col., 2009).

A pesar que ABA no es una estrategia nueva (Vecchioli y col. 1990; Weber y Corseuil 1994), solo ha sido utilizada en un número limitado de trabajos publicados, en comparación con otros tipos de tratamientos de bioaumentación. Bento y col. (2005), compararon la atenuación natural, la bioestimulación y el bioaumentación con el fin de eliminar diesel de suelos contaminados, encontrando que la mejor tecnología de biorremediación fue el bioaumentación utilizando microorganismos preseleccionados del sitio contaminado. Aparentemente, los microorganismos indígenas serían más aptos para sobrevivir y propagarse cuando son reintroducidos en el suelo que los microorganismos exógenos (Bento y col., 2005; Thompson y col., 2005). Ueno y col., (2007) aislaron a partir de un microcosmo contaminado con diesel y bioestimulado con caldo Luria Bertani (LB) un microorganismo denominado cepa J, identificado como *Rhodococcus sp.*, comprobando su capacidad degradadora en medios ricos y en medio mineral líquido suplementado con diesel. Con la cepa autóctona J y el microorganismo exógeno *P. aeruginosa* WatG, ambos degradadores de diesel, se realizaron ensayos comparativos de bioaumentación en microcosmos contaminados con diesel y bioestimulados con caldo LB o medio mineral, observando una mayor capacidad degradadora en los microcosmos inoculados con la cepa autóctona J que en los inoculados con *P. aeruginosa* cepa WatG. La estrategia ABA fue aplicada también por Otte y col. (1994) inoculando una fracción del suelo que se deseaba decontaminar, previamente enriquecido en un batch alimentado con pentaclorofenol (PCP) y PAH, sobre suelos contaminados con PCP y PAH. Se observó que la degradación del PCP fue del 50% luego de 36 h, mientras que no se observó mineralización en los suelos no inoculados. La mineralización de fenantreno y pireno en los suelos inoculados fue de 30 a 80 veces más que en los suelos no inoculados. La tabla I.2 agrupa algunos ejemplos de tratamientos que resultaron útiles utilizando la estrategia ABA.

Tabla I.2: Tratamientos exitosos utilizando la estrategia ABA

Cepas o consorcios microbianos	Contaminante	Aislados de	Preparación del inóculo	Eliminación del contaminante	Ref.
<i>Rhodococcus sp.</i> (strain J)	Diesel (artificial)	Paddy soil	Aislamiento en placas luego de cultivos líquidos en LB con la muestra de suelo.	44,5% de degradación ex situ en 7 días	Ueno y col. (2007)
Mezcla de hongos aislados ^a	PAH (crónico)	Suelo	Aislamiento a partir de placas con medio RB (Rosa de Bengal)	100% de degradación ex situ de 1,10-binaftaleno en 30 días	D'Annibal e y col. (2006)
Metanotrofos (Consortio bacteriano)	cis-dicloroetileno (crónico)	Aguas subterráneas	Sin aislamiento	100% de Degradación in situ en 14 días	Takeuchi y col. (2005)
Mezcla de hongos aislados ^b	Cresol (crónico)	Suelo	Aislamiento en placas a partir de cultivos líquidos	84–100% de degradación ex situ en 70 días	Atagana (2004)
Mezcla de hongos aislados ^c	PAH (crónico)	Suelo	Aislamiento en placas con sobrenadantes de mezclas de suelo seco y agar con agua destilada	6.5–27.5% degradación ex situ en 30 días	Potin y col. (2004)
Mezcla de bacterias aisladas ^d	Diesel, PCP, creosote, Oil y sludge (crónico)	Suelo	Aislamientos directos en placas a partir de suelo	74–99% de degradación in situ en 10 meses	Belloso (2003)
Consortio ^e	PCP, PAHs (crónico)	Suelos arenosos y limosos	La suspensión de suelo se añadió directamente al biorreactor (sin aislamiento)	50% de degradación in situ en 1,5 días	Otte y col. (1994)
Mezcla de bacterias aisladas ^f	Benzeno, xileno	Suelos subterráneos	Aislamiento en placas a partir de suelo	50% de degradación in situ en 3 meses	Weber y Corseuil (1994)
Mezcla de bacterias aisladas ^g	Pyreno, carbazol, benzo[a]pireno (crónico)	Suelo	Aislamiento en placas luego de cultivo líquido	55% de degradación in situ en 2 días	Grosser y col. (1991)
Mezcla de bacterias aisladas ^h	Mezcla de hidrocarburos aromáticos (artificial)	Clay loam soil	Aislamiento en placas luego de cultivo líquido	65% de degradación in situ en 30 días	Vecchioli y col. (1990)
Mezcla de bacterias aisladas ⁱ	Diesel (crónico)	Suelo	Aislamientos en placas con diesel como única FCE a partir del tercer cultivo de enriquecimiento con diesel como única FCE.	Ex situ 63–84% entre 10 a 14 días	Bento y col., 2005 Bento y col., 2005 b

^a Contiene a *Allescheriella sp.* cepa DABAC 1, *Stachybotrys sp.* cepa DABAC 3, and *Phelebia sp.* cepa DABAC 9.

- ^b Contiene a *Aspergillus sp.*, *Cladosporium sp.*, *Fusarium sp.*, *Monicillum sp.*, *Penicillium sp.* y *Phanerochaete*.
- ^c Contiene las cepas *Coniothyrium sp.* y *Fusarium sp.*
- ^d Contiene las cepas *Pseudomonas cepecia*, *Pseudomonas stanieri*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas mendocina*, *Zoogloea ramigera*, *Moraxella lacunata*, *Acinetobacter calcoaceticus* y *Bacillus subtilis*.
- ^e Identificada solamente *Pseudomonas luteola*.
- ^f Contiene las cepas *Xanthomonas sp.* y *Arthrobacter sp.*
- ^g Contiene las cepas *Mycobacterium sp.* y *Xanthomonas ampelia*.
- ^h Contiene las cepas *Pseudomonas sp.*, *Alcaligenes sp.*
- ⁱ Contiene las cepas *Bacillus cereus*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus fusiformis*, *Bacillus pumilus*, *Acinetobacter junii* y *Pseudomonas sp.*

I.8 Biorremediación en regiones áridas

En la Patagonia semiárida, como en otras regiones con explotación petrolera, se producen accidentalmente la liberación de hidrocarburos al ambiente durante la extracción, refinamiento, transporte y almacenamiento del petróleo. En los suelos de la Patagonia Central se ha visto una gran persistencia del petróleo que es derramado sugiriendo que la degradación bajo condiciones naturales en suelos semiáridos es muy lenta (Haro y col., 2007). Naturalmente el metabolismo microbiano se encuentra limitado por los factores ambientales y las características de los suelos de la región, lo que indefectiblemente influye en la velocidad y el porcentaje de eliminación del contaminante de los suelos.

En las regiones áridas y semiáridas, el agua es la que controla los procesos bióticos (Prieto y col., 2011). Debido a las condiciones de desecación propias de la región, la falta de conectividad acuosa entre las partículas del suelo puede reducir la difusión de los sustratos y restringir la movilidad de las poblaciones microbianas del suelo (Treves, 2003). El potencial acuoso, equivalente a la actividad acuosa, es la suma del potencial de la matriz, osmótico y gravitacional. En suelos no salinos, como algunos de los suelos patagónicos, el potencial de la matriz es el componente predominante (Chowdhury y col., 2011). Sin embargo, el potencial osmótico es función del potencial de la matriz; cuando un suelo se seca el potencial de la matriz disminuye, la concentración salina se incrementa y en consecuencia el potencial osmótico también disminuye. Por lo tanto los microorganismos deben soportar, además, disminuciones en el potencial osmótico cuando el suelo se seca (Chowdhury et al., 2011).

A pesar de las limitaciones ambientales, algunas estrategias de biorremediación en suelos semiáridos han resultado exitosas. Marin y col., (2005) han realizado ensayos de landfarming en suelos a los que se le adicionaron lodos de refinerías contaminados con petróleo en Murcia, España, bajo condiciones semiáridas naturales de la región. Los suelos de esa región son pobres en nutrientes y materia orgánica, y contienen metales debido a la proximidad de áreas mineras. Los resultados mostraron que 80% de los hidrocarburos fueron eliminados en once meses, ocurriendo a una mayor velocidad de eliminación los tres primeros meses.

En un estudio de bioestimulación en el cual se adicionaron nitrógeno, fósforo y agua sobre 3 suelos patagónicos con diferentes estados de contaminación se observó el incremento en los recuentos bacterianos y una concomitante eliminación de entre 33-88% de hidrocarburos en un tiempo de entre 3 a 7 meses según el suelo (Haro y col., 2007). Se realizó además una evaluación comparativa de los procesos de atenuación natural, bioestimulación y bioaumentación con cepas degradadoras, en procesos de biorremediación *in situ* de suelos contaminados con PAH.. Tanto la bioestimulación como la bioaumentación promovieron más del 90% de eliminación de PAH después de 6 semanas de tratamiento, mientras que la atenuación resultó en una tasa de degradación reducida (67%). Por lo tanto Haro y col., (2007) sugirieron que las comunidades bacterianas autóctonas de los suelos semiáridos de la Patagonia poseen el potencial degradador de hidrocarburos luego de la mejora de las condiciones ambientales desfavorables.

Una estrategia potencialmente aplicable para sanear suelos contaminados con PAH podría ser la utilización de microorganismos autóctonos degradadores con capacidades de resistencia a las condiciones ambientales fluctuantes y áridas de la Patagonia Central. El agua es un recurso natural escaso en nuestra Patagonia y su transporte hacia las regiones contaminadas requiere una logística compleja y costosa. No se han encontrado reportes que utilicen el bioaumento con microorganismos autóctonos adaptados a los factores ambientales, para superar las limitaciones de las condiciones de desecación en ambientes áridos o semiáridos.

I.9 Mecanismos de resistencia a factores ambientales en microorganismos

Los microorganismos autóctonos de regiones semiáridas están regularmente expuestos a la desecación ambiental, al estrés osmótico, al estrés oxidativo, a la escasez de nutrientes y a la presencia de moléculas tóxicas, entre otros. Por lo tanto, la supervivencia bajo estas condiciones requiere una respuesta adaptativa por parte de los microorganismos que colonizan suelos semiáridos. Si bien se conoce poco acerca de los mecanismos presentes en los microorganismos de la Patagonia semiárida, la resistencia a factores ambientales diversos ha sido estudiada ampliamente en distintos géneros bacterianos distribuidos en otras regiones que comparten alguna/as de las características ambientales.

Se han caracterizado algunas respuestas específicas a factores ambientales. En la mayoría de los casos, como primer estrategia los microorganismos pueden censar mediante proteínas específicas los cambios en el ambiente, y luego mediante cascadas de señales intracelulares inhiben o inducen la expresión de genes específicos de resistencia (Ramos, 2001; Browning y col., 2004). En algunas bacterias como *E. coli* y *Bacillus sp.* existe una respuesta general al estrés, donde se induce el mismo mecanismo de respuesta a diversas condiciones poco

favorables para el desarrollo microbiano, como el estrés osmótico, estrés oxidativo, desecación, hambreado de nutrientes, entre otros. Esto puede ser explicado por el hecho de que en muchos microorganismos la expresión de los genes asociados con la tolerancia, la respuesta a condiciones ambientales adversas, o el comienzo de la fase estacionaria, son dependientes de la expresión del factor sigma, subunidad de la ARN polimerasa que le confiere afinidad por los promotores, codificada por el gen *rpoS* (Helman y col., 1988; Hengge-Aronis y col., 1991). Existen también una gran cantidad de reportes en donde se vincula la resistencia a factores ambientales con la capacidad de síntesis de solutos compatibles (Crowe y col., 1987; Welsh y col., 2000; Alvarez y col., 2004). Se ha relacionado la resistencia a diferentes estreses ambientales con la capacidad de esporulación en ciertos microorganismos como *Bacillus* (Setlow, 1995), con la disminución del tamaño y el metabolismo celular en *Vibrio* (Morita y col., 1990), con la capacidad de algunos microorganismos de sintetizar EPS (Roberson y Firestone, 1992; Ophir y Gutnick 1993; Alvarez y col., 2004), con modificaciones en la composición de ácidos grasos en las membranas biológicas (Halverson y col., 2000) y con la capacidad de formar biofilms (Tribelli y col., 2011). Se ha relacionado también la capacidad de sobrevivir y tolerar condiciones ambientales desfavorables con la acumulación de fuentes de carbono endógenas como polihidroxialcanoatos (PHA) en diferentes microorganismos como *Pseudomonas* (Ayub y col., 2004), *Spirillum* (Matin, 1979), *Bacillus* y *Alcaligenes* (López y col., 1995) entre otros.



Hipótesis y Objetivos

CAPÍTULO II

II. Hipótesis y Objetivos

II.1 Objetivos Generales

Contribuir al mejoramiento de los conocimientos básicos que permitan evaluar y mejorar las tecnologías de biorremediación.

II.2 Objetivos específicos

- Aislar a partir de suelos de la Patagonia semiárida, microorganismos degradadores de PAH capaces de resistir condiciones ambientales de la región.
- Evaluar la aplicabilidad de las estrategias ABA de bioaumentación sobre la biorremediación de suelos patagónicos contaminados con PAH y con mezclas complejas de los mismos.
- Estudiar los cambios producidos en la estructura y función de las comunidades microbianas de suelos contaminados por efecto del inoculante y de las variaciones en las condiciones abióticas.
- Incursionar en el estudio de los mecanismos moleculares presentes en las bacterias degradadoras de PAH aisladas de suelos de la Patagonia semiárida y seleccionadas como inoculantes por su adaptación a las condiciones ambientales típicas de la región (resistencia a la desecación, déficit de nutrientes, entre otros).

II.3 Hipótesis

- El bioaumentación es una estrategia que podría ser utilizada para mejorar la biodegradación de los hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH) en suelos contaminados y semiáridos de la Patagonia Central.
- El éxito del bioaumentación depende de la utilización del microorganismo adecuado. El proceso de selección del inoculante debe incluir la capacidad degradadora del contaminante y las capacidades ecológicas de adaptación al ambiente que aseguren su sobrevivencia en ambientes semidesérticos.
- El inoculante autóctono degradador tendría capacidades adaptativas a las condiciones ambientales, podría reestablecerse y eliminar el contaminante en el microecosistema de donde fue aislado.
- El estudio de los mecanismos moleculares de adaptación a condiciones extremas presentes en bacterias autóctonas de la Patagonia semiárida nos permitirá, además de ampliar los conocimientos básicos sobre las respuestas al estrés que pueden presentar los microorganismos, desarrollar en un futuro nuevas estrategias de biorremediación.



Materiales y Métodos

CAPÍTULO III

III. Materiales y Métodos

III.1 Materiales

III.1.1 Medios de cultivo

Tabla III.1: Medios de Cultivo para crecimiento de microorganismos oligotróficos

	Caldo R2 (Reasoner y Geldreich, 1985)	Agar R2 (R2A) (Reasoner y Geldreich, 1985)	Caldo R3 (Reasoner y Geldreich, 1985)	Agar R3 (R3A) (Reasoner y Geldreich, 1985)
	Composición en g/l de agua destilada.			
Extracto de levadura	0,5	0,5	1	1
Proteosa peptona	0,5	0,5	1	1
Acido Casamino	0,5	0,5	1	1
Glucosa	0,5	0,5	1	1
Almidón	0,5	0,5	1	1
Acido Pirúvico	0,3	0,3	0,5	0,5
K₂HPO₄	0,3	0,3	0,6	0,6
MgSO₄	0,05	0,05	0,1	0,1
Agar agar	-----	15	-----	15

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

Tabla III.2: Medios minerales utilizados para crecimientos bacterianos

	Medio mineral líquido (MML) (Vecchioli y col., 1990)	Medio mineral sólido (MMS)	MML sin fuente de Nitrógeno	MML con 0,1g/l de Nitrógeno	MMS-Agarosa* (Bogart y Hemmingsen, 1992)
Composición en g/l de agua destilada.					
NaCl	5	5	5	5	5
K ₂ HPO ₄	1	1	1	1	1
(NH ₄) ₂ HPO ₄	1	1	-----	1,17	1
(NH ₄) ₂ SO ₄	1	1	-----	0,1	1
MgSO ₄	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
KNO ₃	3	3	-----	-----	3
KH ₂ PO ₄	-----	-----	1,67	-----	-----
Agar agar	-----	15	-----	-----	15
Agarosa 1% + 200 µl PAH	-----	-----	-----	-----	5 ml *

El pH del MML se ajustó a 7,0 con una solución de NaOH o HCl 10%, y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos. * MMS-Agarosa: Se agregó a una placa de Petri con MMS una capa superficial de Agarosa (1%) con 200µl de solución del PAH correspondiente en etanol absoluto (8,5mg/ml), que le confiere un aspecto turbio al medio.

Tabla III.3: Medios de cultivo utilizados para caracterización fenotípica de los cultivos aislados

	Fermentación de Hidratos de Carbono	Caldo Nitrato	Prueba de la Gelatina	Medio de Christensen para la Prueba de la Ureasa
Composición en g/l de agua destilada				
Hidrato de carbono	5	-----	-----	-----
Peptona	5	5	5	-----
Extracto de carne	3	3	3	-----
NO ₃ K	-----	1	-----	-----
Gelatina	-----	-----	12	-----
Urea	-----	-----	-----	20
Fosfato monopotásico	-----	-----	-----	9,1
Fosfato disódico	-----	-----	-----	9,5
Extracto de levadura	-----	-----	-----	0,1
Rojo fenol	-----	-----	-----	0,01

El pH del medio para la Prueba de la gelatina y fermentación de hidratos de carbono se llevó a pH 7.

III.1.2 Buffers y Soluciones

Tabla III.4: Soluciones de Tinción de Gram y de Tinción de Compuestos hidrofóbicos (Burdon 1946) utilizando el colorante Sudan Black B para observaciones al Microscopio óptico

	Solución 1	Solución 2	Solución cristal violeta	Solución Safranina Gram	Lugol	Solución alcohol-acetona	Solución diluída de azul de metileno
	Composición en 100 ml						
Sudan Black B	0,3 g	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Safranina	-----	0,5 g	-----	0,025 g	-----	-----	-----
Cristal Violeta	-----	-----	2 g	-----	-----	-----	-----
Agua destilada	40 ml	100 ml	80 ml	-----	-----	-----	-----
Etanol 95%	60 ml	-----	20 ml	1 ml	-----	60 ml	-----
Oxalato de amonio	-----	-----	0,8 g	-----	-----	-----	-----
Yodo	-----	-----	-----	-----	0,33 g	-----	-----
Yoduro de K	-----	-----	-----	-----	0,66 g	-----	-----
Acetona	-----	-----	-----	-----	-----	40 ml	-----
Agua destilada	-----	-----	-----	99 ml	-----	-----	100 ml
Azul de metileno	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0,05 g

Tabla III.5: Buffers y soluciones para la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

	Buffer TBE 1X	Buffer TAE 40X
	Molar	Composición en un litro
TRIS Borato	0,089	-----
Acido Bórico	0,089	-----
EDTA	0,02	74,45 g
TRIS	-----	968 g
Acético Glacial	-----	228,5 ml

Para preparar Buffer TAE 1X: 25ml de buffer 40X se llevan a 1 l con agua destilada.

Tabla III.6: Soluciones para preparación de los geles desnaturizantes urea-formamida de DGGE

	Solución 0%	Solución 80%
	Composición en un litro	
Sol de acril/bisacrilamida 40%	150 ml	150 ml
TAE 1X pH 7,4	25 ml	25 ml
Agua destilada	825 ml	505 ml
Urea	-----	338 g
Formamida	-----	320 ml

La solución de acril-bisacrilamida 40% contiene 389,30g/l Acrilamida y 10,70g/l Bisacrilamida

Tabla III.7: Volúmenes de las soluciones 0 y 80% a utilizar para la preparación del gel desnaturizante urea-formamida 40-70%.

	40%	70%
Solución 0%	5,51 ml	1,38 ml
Solución 80%	5,49 ml	9,62 ml

Las soluciones homogéneas se agregan en un sistema de vasos comunicantes que genera el gradiente desnaturizante en el gel.

Tabla III.8: Buffers y soluciones para los ensayos de Proteómica en la cepa 22B.

	Buffer de solubilización (BS)	Buffer de equilibrio	Buffer 5X Tris-Glicina-SDS	Buffer de Carga 2X
	Composición en 25 ml		Composición en 1000 ml	Composición en 10 ml
Urea	10 g	9 g	-----	-----
Tiourea	3,8 g	-----	-----	-----
DTT	0,5 g	-----	-----	-----
Triton x100	500 µl	-----	-----	-----
Amberlite	0,25 g	-----	-----	-----
Agua destilada	15 ml	-----	-----	4,2 ml
Tris 1 M pH 8	-----	1,25 ml	-----	-----
Glicerol	-----	7,5 ml	-----	0,4 ml
SDS 10 %	-----	5 ml	50 ml	4 ml
TRIS	-----	-----	15,1 g	-----
Glicina	-----	-----	94 g	-----
Tris-HCl pH 6,8	-----	-----	-----	1 ml
EDTA	-----	-----	-----	0,4 ml
Azul de bromofenol	-----	-----	-----	Punta de espátula

Buffer de solubilización (BS): Luego de agregar el amberlite agitar durante 1 h y eliminarla por filtración. El volumen se trasvasa a un matraz y se enrasa en 25ml con agua bidestilada. Alicuotar de a 1 ml en tubos de polipropileno y llevar a -20°C. **Buffer de equilibrio:** Una vez agregados todas las drogas se deja en agitación a temperatura ambiente en un vaso de precipitados hasta completa disolución. Luego se trasvasa a un matraz y se enrasa a 50ml con agua bidestilada.

Tabla III.9: Soluciones de Tinción con Coomasie Blue Coloidal de Geles SDS PAGE y Bidimensionales

	Solución Fijadora	Solución de Tinción
	Composición en 250 ml	
Etanol 96%	75 ml	-----
Metanol	-----	45 ml
Acido fosfórico	5 ml	5 ml
Sulfato de Amonio	-----	42,5 ml
Agua Bidestilada	170 ml	157,5 ml

III.1.3 Muestras de suelo

Los suelos utilizados para el aislamiento de microorganismos degradadores de hidrocarburos policíclicos aromáticos son suelos crónicamente contaminados con hidrocarburos, provenientes de pozos petroleros cercanos a Pico Truncado, Santa Cruz, Argentina. La muestra PT2371 corresponde a suelo muestreado de la Pileta Pozo PT 351, Pico Truncado, y la muestra PT2372 de la Pileta Pozo PT 439, Pico Truncado.

III.2 Métodos

III.2.1 Generación de los cultivos de enriquecimiento en microorganismos degradadores de fluoreno

Se utilizaron sistemas batch con 90ml de MML, 200 o 2000 ppm de fluoreno, 11,2 g de tierra húmeda (12%HR) para la muestra de suelo PT2371, y 11,1g de tierra húmeda para el suelo PT2372 (11%HR). Las muestras de suelo fueron previamente tamizadas con un tamiz de 3 mm de malla. Cada 15 días se realizaron repiques de los sistemas en medio fresco (90ml de MML suplementado con 200ppm o 2000ppm de fluoreno), repicando 10ml del cultivo anterior. Esta metodología de repiques sucesivos se repitió 3 veces hasta el sistema batch 3 (Repique 3). Los sistemas fueron incubados a 28 ± 2°C con agitación (150rpm). Cada sistema se realizó por duplicado.

III.2.2 Técnicas de Recuentos bacterianos

III.2.2.i Recuentos de bacterias degradadoras de PAH mediante la técnica de NMP (Wrenn y Venosa, 1996)

El NMP de bacterias degradadoras de PAH se determinó en placas de microtitulación de 96 pocillos. Se utilizó como sustrato una mezcla de PAHs en pentano (Merck, p.a.). (0,005 g de

fenantreno, 0,005 g de fluoreno, 0,005 g de antraceno y 0,005 g de dibenzotiofeno en 13ml finales de pentano) que se incorporó a razón de 20 µl por pocillo. El pentano se evapora rápidamente, dejando una fina capa de los PAHs en el fondo de cada pocillo.

Se tomaron 100 µl del sistema a cuantificar y se realizaron diluciones seriadas en SF. Posteriormente se cargaron los pocillos con 180 µl del MML y con 20 µl de las diluciones de cada repique. Se sembraron las diluciones seriadas (1/10) por octuplicado. Las placas fueron incubadas a $24 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 21 días. Luego del período de incubación se registraron los pocillos positivos, donde se observó coloración amarilla, naranja, marrón o rosada debido a la acumulación de los productos parciales de la oxidación de los sustratos aromáticos. El resultado se expresó como el NMP de bacterias degradadoras de PAH/g de tierra seca.

III.2.2.ii Recuento de bacterias degradadoras de PAH (Bogardt y Hemmingsen, 1992)

Para preparar la placa conteniendo el PAH, a un tubo con 3,5 ml de agarosa al 1% previamente fundida y mantenida a 40°C se le agregaron 200 µl de una solución etanólica del PAH correspondiente (8,5 mg/ml) y se mezcló con vortex. Luego se volcó el contenido de cada tubo en placas de Petri que contenían una base de MMS. La superficie del medio de cultivo con el PAH como única fuente de carbono y energía se cubrió con 100 µl de dilución con ayuda de una espátula de Drigalsky. Las placas se incubaron por 21 días a $24 \pm 2^\circ\text{C}$. Se contaron las colonias que mostraron un halo transparente de solubilización del PAH. Los resultados son promedio de tres diluciones realizadas cada una por duplicado.

III.2.2.iii Recuentos de bacterias heterótrofas cultivables (BHC) (Reasoner y Geldreich, 1985)

Se utilizó el medio de cultivo R2A. Se tomaron 100 µl del inóculo proveniente de cada cultivo y se realizaron diluciones seriadas en solución fisiológica (SF). La superficie del medio de cultivo R2A se cubrió con 100 µl de dilución con ayuda de una espátula de Drigalsky. Las placas se incubaron por 10 días a $24 \pm 2^\circ\text{C}$. Los resultados son promedio de tres diluciones realizadas cada una por duplicado.

III.2.3 **Estrategias de aislamiento de bacterias degradadoras de PAH a partir de las muestras de suelo PT2371 y PT2372 provenientes de la región de Pico Truncado, Patagonia Central**

III.2.3.i Estrategia de aislamiento 1: Aislamientos a partir de los recuentos en MMS y MML con 200 o 2000ppm de fluoreno

a) Se realizaron recuentos de bacterias degradadoras de fluoreno utilizando la técnica de Bogardt y Hemmingsen (1992). Las diluciones plaqueadas fueron -2, -3, -4. Se tomaron

aquellas colonias que presentaron halo translucido o con color, y mediante aislamientos sucesivos en R3A se llegó a colonia aislada. Una vez aislados los cultivos, se repicaron en R3A inclinado para su posterior caracterización.

b) Se realizaron recuentos de bacterias degradadoras de PAH mediante la técnica de NMP (Wrenn y Venosa, 1996). Se sembraron por pocillo 20 µl de las diluciones -1, -2, -3, -4, y -5. De aquellos pocillos que presentaron color o turbidez se realizaron aislamientos en MMS con fluoreno, y luego en R3A hasta obtener colonias aisladas. Una vez aislados los cultivos, se repicaron en R3A inclinado para su caracterización.

III.2.3.ii Estrategia de aislamiento 2: Aislamiento de microorganismos adheridos a superficies con fluoreno adsorbido

Se tomaron 10 ml del segundo repique con 200 o 2000 ppm de fluoreno y se inocularon en un medio con 90 ml de MML y una membrana hidrofóbica de teflón con fluoreno adsorbido. Luego de 7 días de incubación a 28°C y en agitación (150 rpm) la membrana de teflón con el fluoreno adsorbido fue colocada en MMS con fluoreno, el cual se incubó de 7 a 15 días. A partir de las colonias crecidas se realizaron aislamientos en R3A hasta llegar a cultivos puros, que se conservaron en R3A inclinado para su conservación.

III.2.3.iii Estrategia de aislamiento 3: Aislamiento directo de microorganismos adheridos muy firmemente a partículas de suelo

Se tomaron algunos granitos de las muestras de suelo y se los colocó en MMS con fluoreno. Luego de 5 a 20 días de incubación se repicaron las colonias con halo translúcido o color a R3A. Una vez aislados los cultivos, se repicaron en R3A inclinado para su conservación.

III.2.3.iv Estrategia de aislamiento 4: Aislamiento a partir de una suspensión de suelo

A partir de una suspensión de aproximadamente 10 g de tierra seca en 90 ml SF se realizaron diluciones seriadas que fueron plaqueadas en MMS con fluoreno. Entre los 5 y 15 días se tomaron las colonias que presentaron halo translucido o con color para su posterior aislamiento en R3A. Una vez aislados los cultivos, se repicaron en R3A inclinado para su caracterización.

III.2.4 **Determinación del espectro de degradación de los aislados**

Se evaluó el espectro de degradación de PAH de los cultivos aislados mediante la siembra en estría sobre MMS con el PAH a testear según la técnica utilizada en el recuento de degradadoras de PAH (Bogardt y Hemmingsen, 1992). Los PAHs utilizados fueron antraceno, dibenzotiofeno, fenantreno, pireno y fluoreno. Se consideró un cultivo degradador de PAH

aquel que generó un halo translúcido y/o color, proveniente de los productos de degradación, alrededor de su estría de siembra.

Con el objetivo de corroborar la capacidad degradadora de los cultivos, 20 µl de la suspensión bacteriana fueron inoculados en pocillos de una placa de microtitulación conteniendo el PAH a testear (incorporado previamente 20 µl mediante una solución de 8,5 mg/ml del PAH en pentano; el pentano se evapora rápidamente, dejando una fina capa de los PAHs en el fondo de cada pocillo) y 180 µl de MML. La policubeta se incubó por 21 días a 24°C. Se consideraron cultivos degradadores aquellos en los que se observó turbidez o color en el medio de cultivo. Se tomaron como cultivos degradadores aquellos que tuvieron la capacidad de crecer y degradar los PAHs tanto en MMS como en MML. Los cultivos que crecieron y degradaron en MMS con PAH y no en MML con PAH se consideraron negativos.

III.2.5 Caracterización fenotípica de los cultivos aislados y de los aislados degradadores de PAH

Se caracterizó a todos los aislados mediante observación macro y microscópica, tinción de Gram, prueba de KOH; a los aislados degradadores se les realizó el ensayo de fermentación de hidratos de carbono (manitol, glucosa, xilosa), prueba de la gelatinasa, catalasa, ureasa y ensayo de reducción del nitrato. La pureza de los cultivos fue controlada microscópica y macroscópicamente.

III.2.5.i Tinción de Gram

Se realizó una extensión de las células sobre un portaobjetos y se fijaron a la llama en un mechero Bunsen. El preparado se tiñó luego con la solución de cristal violeta (Tabla III.4) durante 2 minutos, se retiró el exceso de colorante y se aplicó dos veces durante 30 segundos la solución de Lugol (Tabla 4). Se decoloró cuidadosa y rápidamente con solución alcohol-acetona (Tabla 4) y luego se lavó con agua. Finalmente se contra coloreó con solución de safranina (Tabla 4) durante 30 segundos, se lavó y se dejó secar para luego observar al microscopio utilizando objetivo 1000 X y aceite de inmersión.

III.2.5.ii Prueba de KOH

Sobre un portaobjetos se colocó una colonia del cultivo a testear, se agregó varias gotas de una solución de KOH al 30%. Con un anza en anillo se mezclaron los microorganismos con la solución y levantando el anza se verificó la presencia o ausencia de mucosidad. La presencia

de viscosidad corresponde a un cultivo Gram (-), y la ausencia a uno Gram (+).

III.2.5.iii Fermentación de los hidratos de carbono

Para estudiar la capacidad de los microorganismos de fermentar manitol, glucosa o xilosa, se utilizó un medio de cultivo base estéril (Tabla III.3) al cual se le agregó el sustrato filtrado. La concentración final del sustrato fue de 0,5- 1%. Como indicador de pH se agregó azul de bromotimol. Se consideró un cultivo fermentador aquel capaz de virar el indicador de verde a amarillo.

III.2.5.iv Prueba de reducción de Nitratos

Para poner en evidencia la capacidad de reducir el nitrato se empleó 4 ml por tubo de Caldo Nitrato estéril (Tabla III.3). Se sembró un inóculo denso y se incubó 24 h a 24°C. Luego el cultivo se separó en dos alícuotas, sobre una de ellas se determinó la presencia de NH_3 agregando al tubo unas gotas del *reactivo de Nessler* (iodomercuriato de potasio). La presencia de NO_2^- se determinó sobre la alícuota restante agregando gotas del reactivo *Nit-1* (solución acética de ácido sulfanílico) y luego 2 gotas del reactivo *Nit-2* (solución acética de alfa dimetilnaftilamina).

III.2.5.v Prueba de licuefacción de la gelatina

Para determinar la actividad gelatinasa de un cultivo bacteriano se utilizó Caldo Nutritivo solidificado con 12 g/l de gelatina (Tabla III.3). Se sembró por punción y se incubó a 25°C durante 48hs. Se consideró un cultivo con actividad gelatinasa aquel capaz de licuar la gelatina.

III.2.5.vi Presencia de la enzima catalasa

La prueba se realizó a partir de un cultivo del microorganismo en caldo R3, agregando unas gotas de agua oxigenada y observando o no la formación de burbujas. Se consideró un cultivo catalasa positivo aquel en el que se observe la formación de burbujas.

III.2.5.vii Prueba de la Ureasa

Se utilizó el medio de cultivo de Christensen (Tabla III.3) fraccionado a razón de 4 ml por tubo y estéril, recomendado para microorganismos que hidrolizan la urea lentamente, como ocurre generalmente en microorganismos ambientales. Se sembró un inóculo denso y el tubo se

incubó a 35-37 °C por 72 horas. Se consideró un cultivo con actividad ureasa aquel capaz de virar el indicador rojo fenol.

III.2.5.viii Tinción específica para compuestos hidrofóbicos (Burdon, 1946)

Las células fueron extendidas en un portaobjetos que se dejó secar al aire. Se agregó la solución 1 (Tabla III.4) y se dejó 10 minutos en contacto cuidando que siempre el preparado esté cubierto con el colorante. Se lavó con agua cuidadosamente y se agregó la solución 2 (Tabla III.4) por 30 segundos. Mediante observación al Microscopio óptico utilizando el objetivo 1000 X, aceite de inmersión e iluminación directa se observaron los preparados. Las células teñidas de azul-violeta se consideraron positivas (células con gránulos intracelulares teñidos) y las de rosado se consideraron negativas.

III.2.6 **Caracterización genotípica de los aislados degradadores**

III.2.6.i Extracción y aislamiento de ADN total de cultivos bacterianos

El ADN total de los aislados fue extraído por el método del hervido (Sambrook y col., 1989). Se centrifugó 1 ml de cada cultivo crecido 18 a 24 h en caldo R3, y el pellet obtenido fue resuspendido en 1 ml de agua destilada. Las suspensiones se incubaron a 100°C por 10 minutos y los lisados celulares así obtenidos fueron centrifugados a 8000 rpm por 5 minutos. El sobrenadante con el ADN total en solución fue colectado y separado del pellet a nuevos tubos de polipropileno.

III.2.6.ii RAPD

La técnica consistió en realizar PCR utilizando primers dirigidos a porciones no específicas del ADN (Primer 9: IM-2 5'd[CTCAATGGCAGCGGCTATG] 3'; Primer 6: IM-1 5'd[CGAGCTTCGCGTACCACCC] 3'; Primer 10: IM-3 5'd[GTTTCGCTCGATGCGCTACC] 3') en muestras de ADN total de las cepas degradadoras.

La técnica de PCR fue realizada en un volumen final de 25 µl, conteniendo 1 µl de dNTPs, 5 µl de buffer 5X, 0,1 µl de Taq polimerasa, 2,5 µl de una solución de primer 2 µM, 15,4 µl de agua destilada estéril, y 1 µl de muestra.

El programa consistió en 4 ciclos de 5 min a 94°C, 5 min a 40°C y 5 min a 70°C, 30 ciclos de 1 min a 94°C 1 min a 55°C, y 2 min a 70°C; y finalmente 1 ciclo de 10 min a 70°C.

Los productos obtenidos fueron sometidos a una electroforesis a 90 V por 60 min en gel de agarosa al 1,2% preparado con buffer TAE 1X, utilizando TAE 1X como buffer de corrida. El gel

se coloreó con Sybr Gold® (Invitrogen) para evidenciar los productos de amplificación de la PCR. Como marcador de peso molecular se utilizaron fragmentos de ADN doble cadena del fago lambda en un rango de 100 a 1000bp en incrementos de 100bp (CienMarker; Biodynamics S.R.L). Los geles fueron digitalizados en una cámara-CCD, guardado como archivo.tif.

III.2.6.iii PCR y Secuenciación del gen completo 16S rRNA

Los amplicones del gen 16S rRNA completo de las cepas fueron obtenidos utilizando los primers 27 forward primer (50-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-30) y 1492 reverse primer (50TACGGCTACCTTACGACTT-30) en un volumen final de reacción de 30 µl. Se utilizó la enzima GoTaq ADN polimerasa (Promega, Madison, WI). El programa de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) consistió en una desnaturalización inicial a 95°C por 2 min, seguida de 30 ciclos de 95°C por 30 s, 72°C por 35 s, y el paso de extensión final que se realizó a 72°C por 5 min. El termociclador utilizado fue Eppendorf Mastercycler thermocycler (Eppendorf, Hamburg, Germany). Los amplicones obtenidos fueron purificados utilizando PCR purification kit (Qiagen) y fueron secuenciados por el servicio de secuenciación Macrogen, Korea. Las secuencias de nucleótidos fueron comparadas con las bases de datos de secuencias pertenecientes al National Center for Biotechnology Information GenBank, utilizando el programa BLAST. El árbol filogenético se obtuvo utilizando el programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis package (MEGA version 4.0). Las secuencias fueron alineadas mediante la función clustalW y el árbol obtenido por Neighbor-Joining fue construido por el algoritmo Jukes Cantor. La robustez del árbol fue testada mediante el análisis de 500 iteraciones (bootstrap).

Las secuencias obtenidas fueron depositadas en el banco de datos del National Center for Biotechnology Information GenBank, con los siguientes códigos HQ603685 (*Patagonian strain 1A*), HQ603686 (*Patagonian strain 22A*), HQ603687 (*Patagonian strain 22B*) y HQ625564 (*Patagonian strain 36*).

III.2.6.iv PCR de una porción conservada de gen 16S rRNA y DGGE

Se utilizaron primers dirigidos a una porción conservada del rDNA 16S (Primer 341F-GC: CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGGCCCGCCGCCCGCCCCGCCCCCTCCTACGGGAGGCAGCA ; Primer 907-R: CCGTCAATTCCTTTGAGTTT) (Muyzer y col., 2004). La PCR fue realizada utilizando 1 µl de ADN molde con 0,12 µl de enzima ADN polimerasa GoTaq (5 UI/µl), 6 µl de buffer 5X recomendado por el fabricante de la Gotaq polimerasa, 2,4 µl de dNTPs 2,5 mM, 3 µl de primer 907-R 5 µM y de 341-F 5 µM, 0,6 µl de seroalbúmina bovina (BSA) 10 mg/ml, y 13,8

µl de agua destilada estéril, en un volumen final de 30 µl de mezcla de reacción. El Programa de PCR se realizó utilizando el termociclador Mastercycler® Eppendorff y consistió en 1 ciclo de desnaturalización inicial que llevó la muestra a 94°C durante 4 min, se realizaron luego 10 ciclos de 30 s a 94°C, 45 s a 62°C siendo ésta la temperatura de annealing, y 1 min a 72°C. Luego se realizaron 25 ciclos de 30 s a 94°C, 45 s a 57°C, y 1 min a 72°C; y el paso final de extensión de 10 min a 72°C. Se verificó la amplificación de cada muestra mediante electroforesis a 90 V por 1 h en gel de agarosa 1,2%, utilizando TAE como buffer de corrida. El gel se coloreó con SybrGold® (Invitrogen) durante 30 min para evidenciar los productos de PCR.

III.2.6.v DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)

Se prepararon geles de 6% de poliacrilamida con un gradiente desnaturalizante 40-70% de urea-formamida (Tabla II.6 y Tabla II.7). La electroforesis se realizó en buffer TAE 1X (Tabla III.5) en un DGGE-2401 apparatus (C.B.S Scientific Co., Del mar, CA, USA) a una temperatura de 60°C. Se aplicó un voltaje constante de 100 V durante 16 h para la corrida. Luego de la electroforesis, el gel se tiñó durante una hora con SybrGold® (Invitrogen) a fin de evidenciar los resultados obtenidos.

III.2.6.vi Determinación de la presencia de plásmidos

Se resuspendió con 200 µl de solución P1 (Glucosa 50 mM, Tris/HCl 25 mM, EDTA 10 mM) el pellet obtenido a partir 3 ml de un cultivo crecido en caldo R3 durante 24 h. Las células se lisaron con 300 µl de solución P2 preparada en el momento, (mezclando partes iguales de NaOH 0,4 N y 2% de SDS), se mezcló suavemente y se agregó 300 µl de solución P3 (Acetato de Sodio 3 M, pH 4,8). Se centrifugó 10 minutos a máxima velocidad y el sobrenadante se trasvasó a un nuevo tubo al que se le agregó 1 V de isopropanol frío. Luego se centrifugó se lavó el pellet nuevamente con 400 µl de etanol frío, se centrifugó y el pellet se dejó secar en flujo laminar, una vez seco fue resuspendido en 20 µl de agua destilada. En un gel de agarosa 0,8% se sembraron 15 µl de extracto plasmídico y 5 µl de patrón de peso molecular del fago λ digerido con la enzima de restricción Hind III. Se corrió durante 70 minutos a 70 V utilizando buffer TAE 1X como buffer de corrida. El gel se coloreó con SybrGold® (Invitrogen) durante 30 min para evidenciar las bandas correspondientes a los plásmidos.

III.2.7 Cinética de crecimiento en MML con PAH como única fuente de carbono y energía

El ensayo de cinética de crecimiento se llevó a cabo utilizando 26 mg/l de fenantreno o fluoreno como única fuente de carbono y energía en cultivos batch con 50 ml de MML. En un erlenmeyer estéril se colocaron 0,0013 g de fenantreno en 5 ml de acetona que se dejó evaporar 24 h y obtener así microcristales de fenantreno o fluoreno. Luego se agregaron 50ml de MML y 100µl de un inóculo con una DO_{600} 2 (correspondiente a aproximadamente 1×10^7 ufc/ml), crecido en caldo R2 durante 24 h. Los erlenmeyers fueron incubados durante 3 días a 24°C y 150 rpm.

Para analizar la concentración del fenantreno remanente en los cultivos luego de 3 días de incubación, se realizó un método de extracción exhaustivo agregando como solvente de extracción 25 ml de acetato de etilo en los cultivos bacterianos previamente llevados a un pH de 2,5 con HCl 1N. Los cultivos se agitaron vigorosamente durante 30 minutos y la fase acuosa y la orgánica fueron separadas utilizando ampollas de decantación. El proceso de extracción se realizó tres veces y se juntaron los extractos en un matraz, llevándolos a un volumen final de 100 ml.

La concentración de fluoreno o fenantreno en los extractos fue analizada mediante HPLC en fase reversa utilizando el cromatógrafo Waters con una columna Symmetry Waters® C18 (15 cm, 4,6 mm i.d., tamaño de perla 5 mm, tamaño de poro 100 Å).

Se utilizó un gradiente lineal de ácido fosfórico 15 mM preparado en agua nanopura y metanol (20:80 a 15:95, vol vol1) durante 15 min y se utilizó una velocidad de flujo de 1 ml/min. Los espectros de absorción al UV (250,9 nm) se obtuvieron utilizando un detector 2996 photodiode array (WatersR) y se analizaron con el software Empower.

III.2.8 Ensayos de quimiotaxis hacia fenantreno y fluoreno

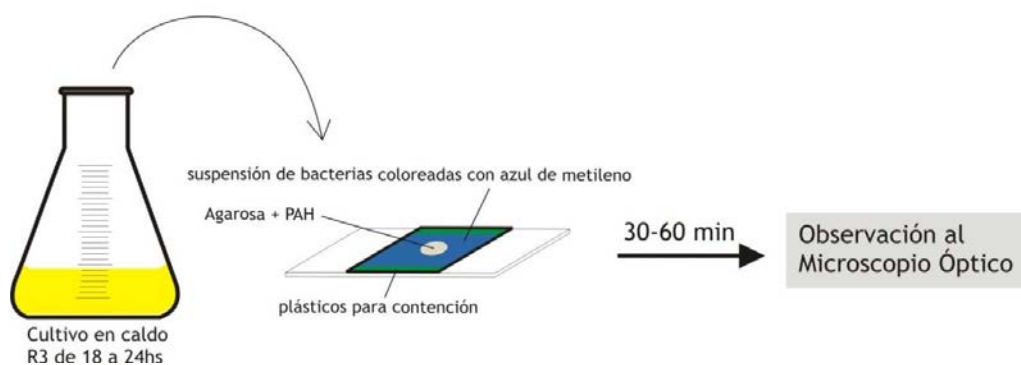


Figura III.1: Esquema general del procedimiento utilizado para el ensayo de quimiotaxis hacia fenantreno y fluoreno.

Para el ensayo de quimiotaxis hacia fenantreno y fluoreno se utilizó el método de la gota de agarosa en cámara (Lanfranconi y col., 2003). En una cámara cuadrada, formada por tiras de plástico de 1 mm de espesor sobre un portaobjetos, se agregó una gota de agarosa al 2% fundida, conteniendo fenantreno, fluoreno o casamino al 1% (control positivo). Luego se tapó con un cubreobjetos y una suspensión bacteriana con una DO_{600} 0,8, teñida previamente con una solución diluida de azul de metileno (Tabla III. 4) se puso en contacto con las diferentes fuentes de carbono inmovilizadas en la gota de agarosa. Pasados los 30 minutos se observó al Microscopio Óptico. Se utilizó como control negativo agarosa al 2%.

III.2.9 Técnicas utilizadas para la caracterización de propiedades fisiológicas en los aislados bacterianos

III.2.9.i Crecimiento a diferentes pH

El análisis del crecimiento a diferentes pH fue realizado utilizando los medios R3 y MML con fenantreno a pH 4, 6, 8, 9 y 10. Se inocularon 0,1 ml de cada suspensión bacteriana crecida en R3 por 24 h en un tubo de ensayo conteniendo 5 ml de MML con fenantreno o caldo R3, a pH 4,6, 8, 9 y 10. Los tubos fueron incubados durante 96 h en agitación. Se tomó como positivo aquellos tubos con turbidez para el medio R3, y turbidez y/o color en el caso del MML con fenantreno.

III.2.9.ii Ensayo de Resistencia al estrés hídrico

III.2.9.ii.1 Ensayo de salinidad

La respuesta a diferentes concentraciones salinas en los aislados bacterianos fue estudiada inoculando 0,1 ml de un cultivo crecido por 24 h en caldo R3, en 50 ml del mismo medio con el agregado de 0,5; 1,5; 2,5 y 5% (P/V) de ClNa. Se realizaron medidas de DO_{600nm} cada una hora durante 18 h en un espectrofotómetro Beckman Du® 640.

III.2.9.ii.2 Ensayo de resistencia a la desecación



Figura III. 2: Esquema general de la metodología aplicada para realizar el ensayo de resistencia al estrés hídrico.

La supervivencia de los aislados a la desecación fue investigada mediante un ensayo en el que se determinó el porcentaje de supervivencia de gotas de suspensiones bacterianas (DO_{600} 4) colocadas en la superficie de cajas de Petri estériles incubadas durante 14 días a 28°C dentro de un desecador con 17-18% de humedad relativa (HR). Las células de las gotas fueron resuspendidas en forma independiente, y a cada una de ellas se les determinó el número de sobrevivientes mediante un recuento en placas con R3A. Este valor fue comparado con el recuento en placas de R3A de la suspensión bacteriana antes de ser sometida al estrés por desecación. El porcentaje de supervivencia (Alvarez y col., 2004) se calculó como:

$$\frac{\log(\text{ufc/ml luego del secado})}{\log(\text{ufc/ml antes del secado})} \times 100$$

Fórmula III.1: Porcentaje de supervivencia a la desecación

III.2.9.iii Ensayo de Supervivencia en déficit de carbono

Se tomaron 500 μl de un cultivo crecido en caldo R3 durante 24 h a 28°C y 150 rpm y se inocularon en 4500 μl de MML con 0,065% de Glucosa, incubándose por 72 h a 28°C y 150 rpm. El cultivo se centrifugó a 8000 rpm por 10 minutos, se lavó dos veces con 5 ml de SF y se midió la DO_{600} en un espectrofotómetro Beckman Du® 640. 1×10^7 ufc/ml se inocularon en 20ml de MML en ausencia de fuente de carbono, que se cultivó durante 85 días en agitación (150 rpm) a 28°C . Periódicamente se determinó el número de unidades formadoras de colonias utilizando el medio R2A.

III.2.9.iv Ensayo de supervivencia en déficit de Nitrógeno

Para investigar la supervivencia de las células en ausencia de fuente de nitrógeno los aislados fueron crecidos en caldo R3 por 24 h a 28°C y 150 rpm, se realizaron dos pasos de lavado con SF, y 1×10^7 ufc/ml se inocularon en 20 ml de MML con 0,5% de Glucosa y ausencia total de fuente de nitrógeno. Los cultivos fueron incubados a 28°C durante 70 días. Periódicamente se determinó la DO_{600} y las ufc/ml en R2A. La aparición de gránulos hidrofóbicos fue testada durante el hambreado de fuente de nitrógeno: 1ml del cultivo se centrifugó y se depositó uniformemente en un portaobjetos que se dejó secar a temperatura ambiente. Las células fueron teñidas con Sudan Black B (Tabla II.4, Sección III.8.H) y observadas al microscopio óptico.

III.2.10 Ensayos de inoculación en sistemas biometers

Se utilizaron sistemas biometers con suelo patagónico sometido a tres condiciones: El Suelo Natural (SN), que posee una relación C:N:P de 100:2,2:0,26 y 10% (P/P) de agua, Suelo Fertilizado (SF), que posee una relación C:N:P de 100:5:2 y 10% (P/P) de agua, y Suelo Regado (SR), con una relación 100:2,2:0,26 de C:N:P y 15% (P/P) de agua.

III.2.10.i Preparación de los inóculos

Las células crecidas durante 24 h a 28°C y 150 rpm en caldo R3 fueron centrifugadas a 6000 rpm y lavadas 2 veces con SF para eliminar la fuente de carbono del medio de cultivo. El pellet se resuspendió en agua destilada, se determinó la DO_{600} , y un volumen de ésta suspensión se inoculó con el fin de obtener $1,17 \times 10^8$ ufc/g de suelo seco ($DO:1$ corresponde a 6×10^8 ufc/ml) y de mantener la humedad del suelo a 10% (P/P) o 15% (P/P) según el tratamiento. El inóculo se distribuyó de forma equidistante y gota a gota utilizando pipeta sobre la superficie del suelo.

III.2.10.ii Preparación y protocolo de determinación del CO_2 producido en los sistemas biometers

El sistema biometer consiste en un erlenmeyer con un tubo de ensayo adosado el cual contiene una trampa de KOH que secuestra el CO_2 producido por los microorganismos cuando mineralizan las fuentes de carbono presentes en el suelo (Figura III.3).



Figura III.3: Sistema Biometer donde se muestran las partes y la ubicación de los componentes que lo forman.

Se utilizaron aproximadamente 50 g de suelo por biometer, los cuales fueron contaminados previamente con 2000 mg/kg de fenantreno disuelto en acetona. Una vez evaporada la acetona, el suelo fue inoculado con $1,17 \times 10^8$ ufc/g suelo seco y colocado en frascos biometers. Se utilizaron 3 condiciones ambientales diferentes para cada inóculo:

Suelo Natural (SN): 50 g de la muestra de suelo PT2372 se llevaron a 10% (P/P) de agua.

Suelo Fertilizado (SF): 50 gramos de la muestra de suelo PT2372 se llevaron a 10% (P/P) de agua y se le agregó 2,73 g del fertilizante comercial Nitrofoska® (BASF, Research Triangle

Park, NC), el cual es un fertilizante compuesto granulado que contiene 12% de nitrógeno, 5% de Fósforo, 14% de Potasio, 3,6% de Calcio, 1,2% de Magnesio y 6% de Azufre.

Suelo Regado (SR): 50 gramos de la muestra de suelo PT2372 se llevaron a 15% (P/P) de agua. Los sistemas permanecieron totalmente cerrados y se colocó sobre el tapón que cubre el erlenmeyer una columna de ascarita para retener el CO₂ atmosférico. Se cuantificó la producción del CO₂ obtenido durante el transcurso de 30-35 días a 24°C, el cual se capturó utilizando 10 ml de 0,4-0,6 M KOH. Cada 3 o 4 días el KOH fue remplazado por solución de KOH fresca. El KOH removido se tituló utilizando una solución de molaridad conocida de HCl y con fenolftaleína como colorante del punto final (Bartha y Pramer 1965). El ensayo se realizó por triplicado para cada inóculo y condición. Para cada condición, un sistema contaminado pero sin inocular fue utilizado como control.

III.2.10.iii Cuantificación del fenantreno residual en biometers

Se cuantificó el fenantreno residual de los sistemas biometers. En un aparato Soxhlet se colocó un sobre de papel de filtro conteniendo 25 g de una muestra de suelo mezclada con 25 g de sulfato de sodio anhidro y acetato de etilo (Dorwil) como solvente de extracción. Los hidrocarburos fueron extraídos durante 6 horas. La concentración de los extractos en acetato de etilo fue analizada en cromatografía líquida de alta presión en fase reversa (HPLC) utilizando un Cromatógrafo Waters y una columna Symmetry Waters_ C18 column (15 cmx4.6 mm de diámetro, tamaño de perlas de 5 mm, tamaño de poro 100 Å) y un detector 2996 photodiode array (WatersR). Los espectros de absorción al UV (250,9nm) se obtenidos se analizaron con el software Empower.

Se utilizó un gradiente lineal de ácido fosfórico 15mM preparado en una solución de agua nanopura y methanol (20:80 a 15:95, vol/vol) que se corrió durante 15 min con una velocidad de flujo de 1ml/min. La detección se realizó a 250,9 nm (Coppotelli y col. 2010).

III.2.11 Ensayos de inoculación en microcosmos

III.2.11.i Preparación del inóculo

Las células crecidas durante 24 h a 28°C y 150rpm en caldo R3 fueron centrifugadas a 600 rpm y lavadas 2 veces con SF. El pellet obtenido se resuspendió en agua destilada, se determinó la DO₆₀₀, y un volumen de ésta suspensión se inoculó con el fin de obtener $1,4 \times 10^8$ ufc/g de suelo seco y de mantener la humedad del suelo a 10% o 15% según el tratamiento. El inóculo se distribuyó gota a gota utilizando pipeta sobre la superficie del suelo y luego se mezcló manualmente utilizando espátula. El mismo volumen de agua destilada fue agregado en los

microcosmos no inoculados para llegar a la misma humedad del suelo, 10% (P/P) o 15% (P/P) según el tratamiento.

III.2.11.ii Preparación de los microcosmos

Para realizar los ensayos de bioaumento en microcosmos de suelo patagónico se utilizó la muestra de suelo PT2372. Los microcosmos se realizaron utilizando 1 kg de tierra tamizada con una malla de 3 mm que se colocó en un recipiente de plástico rectangular con 5 kg de capacidad. Los microcosmos se contaminaron con 2 g de fenantreno por kilogramo de suelo seco. El fenantreno fue distribuido utilizando una solución con acetona (150 mg de fenantreno/ml acetona), se mezcló manualmente con una espátula y se dejó 24 h en aireación para favorecer la evaporación del solvente. Dos tratamientos se llevaron a cabo, cada uno por triplicado: Sistema inoculado "F+22B" y no inoculado "F". Los microcosmos se incubaron por $20 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 250 días. En ambos tratamientos (F y F+22B) se ensayaron tres condiciones ambientales diferentes, en forma consecutiva:

(1) Suelo Natural (SN): Los microcosmos fueron mantenidos a $10 \pm 2\%$ (P/P) de agua sin modificar la relación original C/N/P (100/2/0,3) del suelo.

(2) Suelo Fertilizado (SF): A los 86 días de tratamiento se añadió al suelo 7,45 g/kg de suelo seco del fertilizante comercial Nitrofoska®, llevando la relación C/N/P a 100/5/2. El contenido de agua fue mantenido a 10% (P/P).

(3) Suelo Fertilizado y Regado (SR): A los 150 días de tratamiento, el contenido de agua del suelo fue aumentado y mantenido en $15 \pm 2\%$, con una relación C/N/P de 100/5/2.

Los microcosmos se mezclaron semanalmente para favorecer la aireación y el contenido de humedad fue corregido cuando se necesitó a $10 \pm 2\%$ o $15 \pm 2\%$ agregando agua destilada.

El microcosmo F+22B fue inoculado con $1,4 \times 10^8$ ufc/g de suelo seco a los 2, 86 y 150 días, luego de la adición de fenantreno e inmediatamente después de la modificación de las condiciones ambientales. El mismo volumen de agua destilada fue agregado al microcosmo F de manera de estandarizar el contenido de humedad.

III.2.11.iii Recuentos de microorganismos heterótrofos cultivables y degradadores de PAH

Se tomaron 10 g de suelo húmedo de cada microcosmos y se resuspendieron en 90 ml de SF agitando por 30 min a 250 rpm. A partir del homogenato de suelo se realizaron diluciones seriadas y 100 μl de éstas se plaquearon en R2A para el recuento de heterótrofas cultivables siguiendo el protocolo de Reasoner y Geldreich (1985) (Sección III.5.C). El recuento de degradadoras de hidrocarburos policíclicos aromáticos se determinó

en policubetas de 96 pocillos, de acuerdo con el protocolo de Wrenn y Venosa (1996) (Sección III.2.2).

III.2.11.iv Actividad deshidrogenasa

Se determinó la actividad deshidrogenasa (reducción de tricloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolium, TTC a trifenilformazan, TPF) a los 0, 4, 11, 18, 25, 34, 40, 68, 86, 115, 141, 155, 164, 195 y 254 días de tratamiento siguiendo el protocolo de Thalman (1968). La actividad deshidrogenasa usualmente se relaciona con la densidad celular y los microorganismos viables que poseen la capacidad de oxidar el compuesto (las deshidrogenasas realizan los primeros pasos de oxidación de los anillos aromáticos de los PAH).

III.2.11.v Cuantificación del fenantreno residual en microcosmos

Se cuantificó el fenantreno residual provenientes de muestras de suelo de los microcosmos. Se utilizó el mismo protocolo explicado en la Sección III.2.7

III.2.11.vi Extracción de ADN total y PCR

El ADN total de las muestras de suelo fue extraído y purificado a partir de un gramo de suelo. Se realizaron extracciones a los 0, 11, 62, 90, 120, 157, 173 y 199 días de tratamiento utilizando el Kit comercial E.Z.N.A.TM Soil DNA (Omega Bio-tek, Norcross, GA, USA). Una vez extraídas las muestras de suelo, se amplificó una porción conservada del gen 16S rRNA utilizando el protocolo descrito en la Sección III.9.E. Los productos de PCR fueron evidenciados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,2% para luego ser sembrados en geles de DGGE utilizando un gradiente desnaturante 40-70% (Sección III.9.F).

El gel fue digitalizado en una cámara-CCD, guardado como archivo.tif y analizado utilizando el software GelComparII (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). Las matrices obtenidas a partir de los patrones de bandas fueron realizadas con la ecuación Dice y el dendrograma fue calculado por el método del promedio aritmético no ponderado (UPGMA) (Sokal y Michener, 1958).

III.2.11.vii Cálculo de índices de Shannon

Los datos obtenidos del perfil de bandas a través del GelCompar II fueron utilizados para calcular los índices de diversidad de Shannon ($H' = -\sum (ni/N) \log(ni/N)$). Para éste análisis cada banda fue tratada como una unidad taxonómica independiente (OTU). La intensidad relativa de

cada banda, se expresó como un pico con una altura determinada en una curva densitométrica (ni), y la suma de los picos con diferentes alturas en la curva densitométrica de una determinada muestra (N) fueron utilizados para estimar la abundancia de cada especie (Fromin y col., 2002).

III.2.11.viii Capacidad de crecer con hidrocarburos no aromáticos como única FCE

Se tomaron 0,1 ml de una suspensión bacteriana crecida en caldo R3 durante 24 h y se inocularon en 5 ml de MML con 20 µl de gasoil, hexadecano o petróleo como única fuente de carbono y energía. Los tubos se incubaron durante 15 días a 28°C y 150 rpm. Se consideraron positivos los tubos con turbidez y /o color.

III.2.12 Condiciones de cultivo para acumular compuestos de reserva

Se inocularon 100 ml de MML con 0,1g/l de Nitrógeno (Tabla III.2) y 1% de Glucosa con una suspensión bacteriana lavada dos veces con SF, proveniente de 1,5 ml de un cultivo crecido por 24 h en caldo R3 con DO₆₀₀2. El cultivo se incubó en agitación (150 rpm) a 28°C durante 48 h. Se tomaron muestras para determinar polihidroxibutirato (PHB) y glucógeno en los tiempos 0, 24 h y 72 h del ensayo. El experimento se realizó por triplicado.

III.2.13 Condiciones de cultivo para movilizar compuestos de reserva acumulados

Se inocularon 100 ml de MML con 0,1g/l de Nitrógeno (Tabla III.2) y 1% de Glucosa con una suspensión bacteriana lavada dos veces con SF proveniente de 1,5 ml de un cultivo crecido por 24 hs en caldo R3 con DO₆₀₀2.. El cultivo se incubó en agitación (150 rpm) a 28°C durante 48 h. La suspensión bacteriana así obtenida se centrifugó a 6000 rpm durante 15 minutos, el pellet se lavó dos veces con SF y se reinoculó en 100 ml de MML (Tabla III.2) y en ausencia de fuente de carbono. Se determinaron la DO₆₀₀ y las ufc/ml a lo largo de todo el ensayo. Se tomaron muestras para determinar polihidroxibutirato (PHB) y glucógeno en los tiempos 0, 24 h y 72 h del ensayo. El experimento se realizó por triplicado.

III.2.14 Extracción de PHB por metanólisis y cuantificación por cromatografía gaseosa

El análisis del contenido de compuestos intracelulares hidrofóbicos se realizó mediante CG según el método de (Brandl y col., 1988). Las células crecidas por 48-72 h en MML .con 0,1g/l de Nitrógeno (Tabla III.2) y 1% de Glucosa fueron centrifugadas y liofilizadas (Liofilizador L-3,

provisto por RIFICOR). Entre 5 y 10 mg de las células liofilizadas se colocaron en un tubo de Vidrio Pyrex con tapa rosca. Se agregó al tubo 0,9 ml de cloroformo, 0,1 ml del estándar interno ácido tridecanóico y 1 ml de solución metanol: ácido sulfúrico (85:15) y se dejó durante 3 h a 100°C. Luego los tubos se enfriaron a temperatura ambiente, se agregó 0,5 ml de agua destilada y se agitó vigorosamente durante 20 s. Al separarse las fases, se tomó con cuidado la fase clorofórmica, la cual se pasó a un vial de vidrio. El análisis del contenido de metil 3-hidroxi-butirato se llevó a cabo utilizando un Cromatógrafo Gaseoso capilar con un detector de ionización de llama (FID) y la columna VF-23ms de 30 m x 0,25 mm x 0,39 mm (Varian). La temperatura de la inyección fue de 270°C, la de la columna 120°C y la del detector 300°C. Se inyectaron 0,5 µl de cada muestra y se utilizó hidrógeno como gas carrier a un flujo constante de 100 kPa. Para una separación eficiente de los componentes de la mezcla se utilizó el siguiente programa de temperatura: 1 min a 80°C, incremento de 10°C/min hasta 160°C, incremento de 3°C/min hasta 200°C, y aumento de 30°C/min hasta 240°C. Para purgar el equipo se dejó 5 min a 240°C. Las señales de salida se analizaron mediante el programa de computación provisto por el fabricante.

III.2.15 Extracción y cuantificación de glucógeno

III.2.15.i Extracción por hidrólisis alcalina

Para extraer glucógeno intracelular de cultivos bacterianos se realizó una extracción por hidrólisis alcalina. A 40-140 mg de un pellet liofilizado obtenido a partir de un cultivo crecido durante 48 a 72 h en MML con 0,1g/l de nitrógeno y 1% de Glucosa, se le agregó 1 ml de KOH al 20% y se lo dejó 1 h a 100°C, vorteando cada 5 minutos. Una vez frío, se neutralizó con 150 µl de AcH para evitar la tautomerización y la degradación de azúcares pequeños. Se centrifugó por 5 min. a máxima velocidad y el sobrenadante se trasvasó a un nuevo tubo de vidrio, en donde se agregaron 3 volúmenes de etanol frío. Se estimuló la precipitación del glucógeno llevando el tubo por 15 minutos a 4°C. Al precipitado de glucógeno obtenido se lo lavó con 0,3-0,5ml de etanol 70% para eliminar mono y disacáridos y se lo dejó secar por 24 h a 37°C. Finalmente se resuspendió en 500 µl de agua destilada y el glucógeno en solución fue utilizado para la siembra en cromatografía en capa delgada (TLC) y cuantificación mediante hidrólisis enzimática.

III.2.15.ii Cromatografía en capa delgada (TLC) para evidenciar la presencia de glucógeno

El glucógeno en solución extraído mediante hidrólisis alcalina (Sección III.18.A) fue utilizado para la siembra en TLC. Se sembraron 6 µl de la muestra sobre el punto de siembra de una membrana de sílica gel utilizada como fase estacionaria (TLC sílica gel 60F254 Merck®) previamente llevada por 30 minutos a 100°C. La corrida se llevó a cabo en el interior de un frasco de vidrio el cual fue saturado previamente con 10 ml de fase móvil formada por la proporción 3:2:3:2 de 1-Butanol:2-Propanol:Etanol:Agua.

El revelado se realizó pulverizando sobre la membrana de sílica cantidad suficiente de una solución de H₂SO₄ al 4% en metanol. La membrana con la solución de revelado se llevó por 15-20 minutos a 100°C. Se utilizaron 6µl por corrida de un patrón de glucógeno (2mg/ml) el cual fue sembrado junto con las muestras a ensayar.

III.2.15.iii Hidrólisis enzimática con alfa amilasa y amiloglucosidasa del glucógeno y cuantificación de la glucosa liberada por el método glicemia enzimático

Se utilizaron 100 µl del glucógeno resuspendido en agua destilada al que se le adicionaron 882 µl de buffer AcNa 50mM pH5, 1,93 µl de alfa-amilasa (519 UI) y 15 µl de amiloglucosidasa (129 UI). La mezcla de reacción fue cultivada durante 4 h a 55°C. Se utilizaron 100 µl del producto de hidrólisis enzimática del glucógeno para cuantificar la glucosa liberada mediante Glicemia enzimático AA líquida (Wiever Lab).

III.2.16 Ensayo de la cepa 22B sometida a desecación

III.2.16.i Obtención de las células bajo diferentes condiciones de estrés ambiental

Un ml de un cultivo bacteriano crecido por 24 h en caldo R3, lavado con SF, fue inoculado en 400 ml de MML con 0,1g/l de nitrógeno (Tabla III.2) y 1% de Glucosa. El cultivo se incubó en agitación (150 rpm) a 28°C durante 48 h, donde alcanzó la fase estacionaria y una DO₆₀₀ entre 1,5 y 2. El volumen total del cultivo fue filtrado en fracciones de 20 ml sobre filtros de celulosa con un tamaño de poro de 0,45 µm y 60 mm de diámetro mediante bomba de vacío. Los filtros con las células en su superficie fueron utilizados para someter a las células a las siguientes condiciones:

Condición desecación por 10 hs: 20 filtros se llevaron a un desecador con 18%HR por 10hs.

Condición desecación por 4 días: 20 filtros a 18%HR durante 4 días.

Condición húmeda: 20 filtros se colocaron en un recipiente con 100%HR.

Control: 20 filtros se resuspendieron inmediatamente en agua destilada.

Para cada condición se utilizaron erlenmeyers independientes. El ensayo se realizó por duplicado.

III.2.16.ii Ensayos experimentales realizados bajo las condiciones Húmeda y de Desección por 10 h y 4 días

Se realizaron recuentos en placa en R2A y pesadas de los filtros antes y después de someterlos a la condiciones de desecación por 10 h y 4 días, y a la condición húmeda, con el objetivo de determinar la supervivencia de las células y el porcentaje de agua perdida respectivamente. Las células sometidas a la condición húmeda y condición de desecación por 10h y 4 días fueron teñidas con el colorante hidrofóbico Sudan Black B y se observaron al Microscopio óptico (Sección III.8.H). Se conservaron muestras de las suspensiones bacterianas en glutaraldehído al 1% y a 4°C para realizar cortes ultrafinos y luego observar mediante microscopía electrónica de transmisión (MET). La observación de los preparados con MET se realizó en el Centro de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP, a cargo de la Dra. Susana Jurado. Se tomaron muestras para extraer y cuantificar el glucógeno (Sección III.18) y PHB intracelular (Sección III.17).

El ensayo se realizó por duplicado y todos los ensayos realizados para las diferentes condiciones se compararon con el control.

III.2.16.iii Preparación del lisado celular y solubilización de las proteínas citoplasmáticas

Las células sobre los filtros, luego de las condiciones de estrés, se resuspendieron en agua bidestilada estéril, llevando el cultivo a una DO a 600nm de aproximadamente 20, se agregó 2,5 µl de cóctel de inhibidores de proteasas y 2,5 µl de PMSF por cada 4 ml de cultivo. La suspensión bacteriana fue lisada por ruptura mecánica agregando a la suspensión 1 volumen de perlas de vidrio. Se realizaron 9 ciclos de ruptura durante 30 segundos en un homogeneizador a bolilla (Braun) hasta observar clarificación. El proceso fue constantemente refrigerado inyectando CO₂ comprimido. El sobrenadante obtenido se fraccionó en tubos de polipropileno de 2 ml y se centrifugó dos veces durante 20 minutos a 8000 rpm. Se separó el sobrenadante y las proteínas allí contenidas se solubilizaron agregando 3 volúmenes de BS, que se dejó en contacto por 1 h y en agitación suave. Finalmente se centrifugó 10 min a 15000 rpm para separar la fracción no soluble y el sobrenadante se fraccionó en tubos de polipropileno para determinar la concentración de proteínas por fluorometría (QuBit) y realizar los geles SDS PAGE y geles bidimensionales.

III.2.16.iv SDS-PAGE

El dispositivo para el armado de geles del equipo PROTEAN II xi 2-D cell electrophoresis (Bio-Rad, Hercules, CA) se preparó según las recomendaciones realizadas por el fabricante, colocando los vidrios junto con los dos separadores dentro del equipo de montaje del gel. Se ajustaron los cuatro tornillos de manera que los vidrios se encuentren parejos y luego se volcó la solución homogénea del gel 12% a polimerizar (2,08 ml de Acrilamida-bisacrilamida al 20%, 1,87 ml de Buffer Tris-HCl a pH 8,8, 50 µl de SDS, 964 ml de agua bidestilada, 2,5 µl de Temed y 25 µl de PAS). Se agregó agua hasta llenar el espacio entre los vidrios y se dejó polimerizar por 30-50 min. Una vez polimerizado el gel se descartó el agua y se preparó la solución stacking mezclando en un agitador magnético 325 µl de acril-bisacrilamida al 20%, 312,5 µl de Buffer Tris-HCl a pH 8,8, 25 µl de SDS, 1,875 ml de agua bidestilada, 2,5 µl de Temed y 12,5 µl de PAS. Se colocó el peine y luego la solución stacking, que se dejó polimerizar por 30 minutos. Por último 35 µl de las muestras se sembraron mezclándolas con buffer de carga 12,5 µl de buffer de carga 4X.

La corrida se realizó a 50 V hasta apilar las muestras en el stacking y después se duplicó el voltaje a 100 V.

III.2.16.v Gel bidimensional

Para realizar el isoelectroenfoco se utilizaron strips IPG de 18 cm con un rango de pH 4-7 (Immobiline DryStrips, Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden). El proceso de rehidratación del IPG consistió en colocar en uno de los pocillos del Reswelling Tray, ajustado horizontalmente, 350 µl de muestra mezclada previamente con 1,75 µl de PMSF, 1,75 µl de un cóctel de inhibición de proteasas, 3,5 µl de pharmalyte y una pizca de azul de bromofenol (0,03 g en 10 ml de agua bidestilada). Luego se colocó el strip con el gel hacia abajo para favorecer el contacto con la muestra, y se agregaron 3 ml de aceite Cover fluid para evitar la cristalización de la urea y la evaporación. El IPG se dejó rehidratando con la muestra durante 12 h a temperatura ambiente. La tira rehidratada con la muestra fue colocada en un equipo de electrophoresis Multiphor II (Amersham Biosciences) utilizando el siguiente programa: 500 V por 1 min (Gradiente 1 V/h), 3500 V por 1,30 h (Gradiente, 3000 V/h), 3500 V por 5,40 h (Lineal 3500 V/h), resultando en un voltaje total de 23-30 kV/h. Los strips focalizados se guardaron en un freezer a -20°C hasta su utilización para el próximo paso.

El proceso de reducción y alquilación de los IPG consistió en retirarlos primeramente de -20°C y equilibrarlos en buffer de equilibrio por 15 min a temperatura ambiente, luego se incubaron durante 20 min con 3 ml de buffer de equilibrio con el agregado de 125 mM de DTT (0,05088 g)

a temperatura ambiente. La solución anterior se sustituyó con 3 ml de buffer de equilibrio con el agregado de 300 mM de acrilamida (0,0693 g) y azul de bromofenol (una pizca) y se incubó durante 20 min a temperatura. Finalmente se lavó el IPG en buffer de electroforesis (Tris/Gly/SDS) durante 5 min.

Luego se tomó con pinza el IPG, se cortó el extremo positivo y negativo de la tira y se colocó en el pocillo de un gel SDS-PAGE 12% preparado previamente (Sección III.19.D) sellándolo con agarosa 0,2% con una pizca de azul de bromofenol. En el pocillo pequeño del SDS-PAGE se agregaron 20 μ l de una mezcla conteniendo 16 μ l patrón de PM (21, 40, 55, 205 kDa) y 4 μ l de buffer de siembra 4X, la cual fue previamente incubada a 95°C por 4 min.


La electroforesis fue llevada a cabo en un equipo PROTEAN II xi 2-D cell electrophoresis (Bio-Rad, Hercules, CA), conectado a un equipo de refrigeración Multitemp II (GE Healthcare) a 500V y 12,5 mA hasta el stacking, luego la corriente se incrementó a 25 mA. El buffer de corrida utilizado fue Tris-Gly-SDS (Tabla III.8) y la temperatura de 20°C.

III.2.16.vi Tinción Coomasie Blue Coloidal para geles SDS PAGE y Bidimensionales

Una vez obtenidos los geles las proteínas se fijaron dejando el gel en solución fijadora (Tabla III.9) 24 h. Luego se lavaron 3 veces en agitación lenta durante 30 min con agua destilada y a continuación se agregó la solución de tinción (Tabla III.9) dejando en agitación suave durante una hora. Finalmente se agregaron 0,5 g/l del colorante específico para proteínas Coomasie blue G-250 en la solución de tinción. Se agitó suavemente por 1-2 días y se cortaron con punta de tip, en el caso que correspondió, los spots seleccionados para ser secuenciados por el servicio de secuenciación de la Universidad Complutense de Madrid mediante MALDI-TOF-MS.

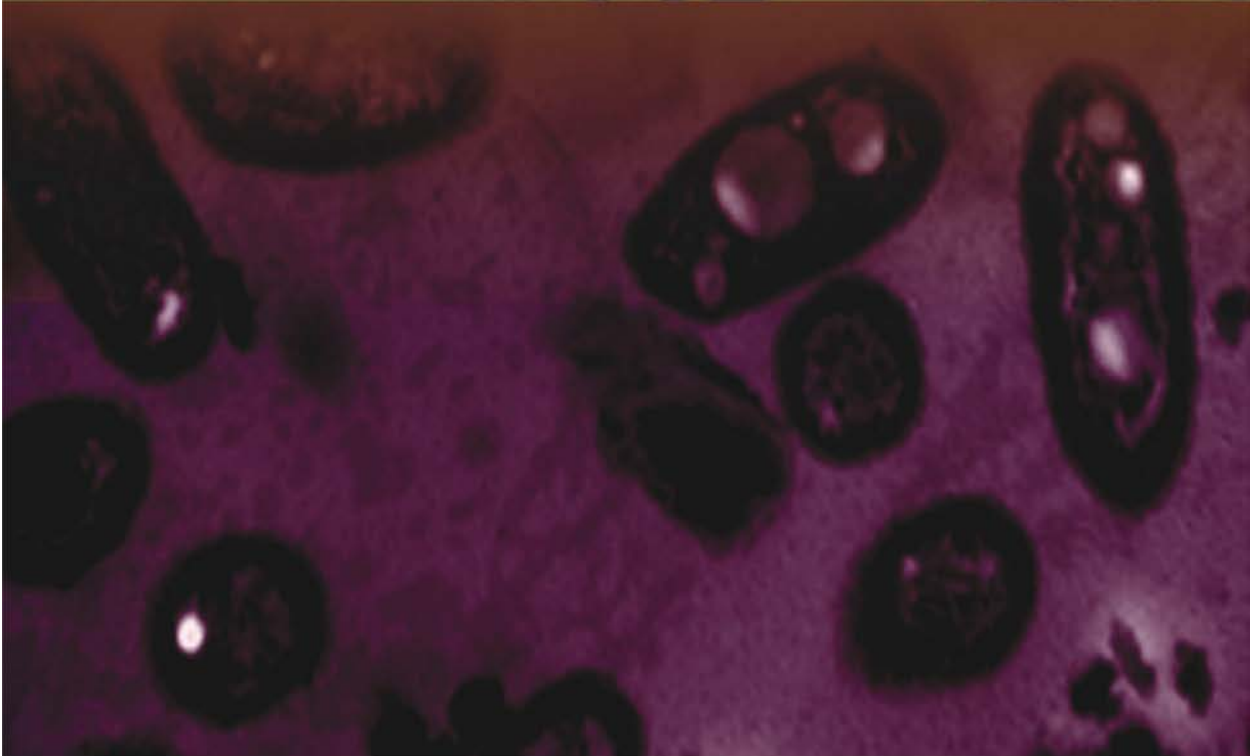
III.2.17 Análisis estadístico

A los experimentos realizados por triplicado se les realizó el test de ANOVA a un nivel de $P \leq 0,05$. Todos los datos estadísticos fueron realizados utilizando el Software SigmaPlot/SigmaStat (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA).



**Aislamiento y caracterización de bacterias
degradadoras de PAH autóctonas de la
Patagonia semiárida**

CAPÍTULO IV



IV. Aislamiento y caracterización de bacterias degradadoras de PAH autóctonas de suelos de la Patagonia semiárida

Las estepas y los semidesiertos patagónicos se encuentran ubicados en la región sudeste de la Argentina. En ella conviven factores ambientales adversos para los organismos superiores y microorganismos, como la falta de agua, los fuertes vientos provenientes del oeste, los suelos pobres en materia orgánica y nitrógeno, los cuales suelen tener pH alcalino y alto contenido de arcillas. Debido a la extracción, explotación y transporte del petróleo en la región, los suelos son expuestos a continuas y múltiples contaminaciones.

La tecnología de bioaumentación ha sido considerada como una valiosa herramienta para aumentar la velocidad y la extensión de los procesos de biorremediación (Coppotelli y col., 2008). En un proceso de bioaumentación, las condiciones ambientales y la competencia con las poblaciones naturales del suelo determinan en gran medida la supervivencia y la habilidad de los microorganismos degradadores introducidos (Vogel y Walter, 2001; van Veen y col., 1997; Vogel, 1996; Gentry y col., 2004). La inoculación con microorganismos autóctonos (ABA) podría superar las limitaciones del bioaumentación.

En el presente capítulo se describen las estrategias utilizadas para aislar y caracterizar bacterias degradadoras de PAH autóctonas del suelo de la Patagonia semiárida, que tendrían la capacidad de sobrevivir bajo condiciones adversas y evitar los problemas a los que se enfrenta un microorganismo exógeno cuando es inoculado.

IV.1 Caracterización física, química y microbiológica de los suelos

Las muestras de suelo PT2371 y PT2372 utilizadas para el aislamiento de microorganismos degradadores de PAH fueron tomadas de los pozos petroleros Pileta Pozo PT 351 y Pileta Pozo PT 439 respectivamente, ubicados en la cercanía de la ciudad de Pico Truncado, por personal de la empresa Oil M&S. Las muestras fueron analizadas en el laboratorio de la empresa Oil M&S S.A. (Cañadón Seco, Santa Cruz, Argentina) un día después de su toma y luego se enviaron por transporte de carga al CINDEFI, La Plata, donde en conjunto con el Centro de Edafología de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la UNLP se completó la caracterización de las mismas.

Los resultados de la caracterización fisicoquímica y microbiológica de las muestras de suelo PT2371 y PT2372 se muestra en la Tabla IV.1.

El análisis de las características fisicoquímicas de los dos suelos mostró que poseían un pH alcalino, baja humedad relativa y presencia de hidrocarburos. El contenido de hidrocarburos totales fue de 1592 mg/kg de suelo seco (0,15%) en el caso de la muestra PT2371 y 7456

mg/kg (0,74%) para PT2372 (Tabla IV.1). Cabe destacar que los límites aceptables de hidrocarburos en los suelos de la provincia de Santa Cruz son de 2% (Silva 2008), por lo que suelos con concentraciones de hidrocarburos totales menores al 2% (20.000 mg/kg de suelo) se consideran suelos remediados. Sin embargo se pudo comprobar la presencia de fluoreno (0,0036mg/l), y fluoreno (0,0017mg/l) y fenantreno (0,0002 mg/l) en los lixiviados de las muestra PT2371 y PT2372 respectivamente (Tabla IV.1).

Los recuentos de bacterias degradadoras de hidrocarburos (NMP/g) y de bacterias aerobias heterótrofas realizados en ambas muestras evidencian la presión de selección ejercida por la presencia de hidrocarburos, encontrándose recuentos de bacterias degradadoras del mismo orden que los recuentos de heterótrofas (Tabla IV.1). Por otro lado la muestra PT2372 que presentó una mayor concentración de hidrocarburos mostró recuentos bacterianos superiores a los encontrados en la muestra PT2371.

Un análisis más exhaustivo de las propiedades fisicoquímicas fue realizado para la muestra de suelo PT2372. El mismo mostró características típicas de suelos de regiones áridas (aridisoles) (FAO, 2008), como bajo contenido de humedad, pH neutro o alcalino y baja proporción de materia orgánica. Además mostró una baja conductividad eléctrica (0,73 dS/m) (Setia y col., 2011), en comparación con los suelos salinos que presentan conductividades eléctricas mayores a 4 dS/m (Fassbender y Bornemisza, 1987). La relación C:N:P fue de 100:2,26:0,003 lo que muestra un desbalance del suelo (suelo balanceado 100:10:1), (Cleveland y Liptzin, 2007) con un marcado déficit de fósforo.

Tabla IV.1: Características fisicoquímicas y microbiológicas de las muestras de suelo PT2371 y PT2372 utilizadas para el aislamiento de microorganismos degradadores de hidrocarburos policíclicos aromáticos.

Propiedades	PT2371	PT2372
pH a los 30 minutos ¹	9,3	8,6
Contenido de humedad (%m/m) ²	10,5	8,6
Materia orgánica (%) ³	ND	3,97
Carbono orgánico (%) ⁴	ND	2,3
Nitrógeno total (mg/kg) ⁵	ND	520
Fósforo disponible (mg/kg) ⁶	ND	6
Capacidad de retención de agua (%) ⁷	ND	61
Sodio [cmolc.kg-1] ⁸	ND	13,6

Conductividad eléctrica [dS.m⁻¹]⁹	ND	0,73
Hidrocarburos totales (mg/kg MS)¹⁰	1592	7456
Fenantreno en lixiviado (mg/l)¹¹	<0,0002	0,0002
Fluoreno en lixiviado (mg/l)¹²	0,0036	0,0017
Bacterias degradadoras de hidrocarburos (NMP/g)¹³	1,82x10 ⁶	1,85x10 ⁷
Bacterias aerobias heterótrofas¹⁴	5,5x10 ⁷	2,06x10 ⁷

1: SM 4500 H+B (Dto. Nac.831/93), 2: ASTM D-2216, 3:MO(%)=1,724xC(%), 4: Método de Walkley &Black, 1934. 5:Digestión húmeda, evaluación por Método de Microkjeldahl (Bremmer 1960), 6: Método Bray Kurtz N°1 (Bray y Kurtz, 1945), 8: Método con Acetato de Amonio pH 7, Fotometría de llama, 9: Medida en el extracto de saturación por conductimetría. 10: EPA 418.1 Mod, 11 y 12: EPA 8310, (www.caslab.com/EPA-Method-8310/), 13 y 14: Diseminación superficial.

IV.2 Aislamiento de bacterias degradadoras de PAH a partir de las muestras de suelo PT2371 y PT2372 provenientes de la región de Pico Truncado, Patagonia Central

Con el objetivo de conocer y aislar microorganismos con diversas estrategias ecológicas para mineralizar los PAH, se utilizaron diferentes estrategias de aislamiento.

Originalmente las estrategias utilizadas para el aislamiento de microorganismos degradadores de PAH se basaban exclusivamente en cultivos de enriquecimiento utilizando medio mineral líquido con PAH como única fuente de carbono y energía. A partir de estos cultivos de enriquecimiento se aislaban, principalmente, microorganismos del tipo estrategias r; caracterizados por poseer velocidades de crecimiento altas y destinar gran parte de los nutrientes al proceso de división celular. A pesar de aislar microorganismos degradadores de PAH utilizando éstos procedimientos, los mismos solo tienen en cuenta la capacidad de los microorganismos de mineralizar el contaminante, sin considerar otras características esenciales para que los inoculantes sean competitivos y efectivos en el ambiente blanco (Thompson y col., 2005). Algunas de éstas características esenciales son la competencia o cooperatividad con los demás microorganismos del suelo, la adaptación a condiciones ambientales, la presencia de propiedades promotoras de la biodisponibilidad de los PAH (capacidad de liberar surfactantes, de adhesión a superficies hidrofóbicas, quimiotaxis), entre otras.

Al utilizar estrategias de aislamiento donde no solo se utilicen cultivos de enriquecimiento, podremos aislar microorganismos del tipo estrategias k, que a diferencia de los r poseen una tasa de reproducción más lenta debido a que destinan una pequeña porción de los recursos a

los procesos de división. Son usualmente más estables dentro de la comunidad debido a que tienden a ser los predominantes en situaciones limitantes de nutrientes, y su permanencia en la comunidad depende de la adaptación fisiológica a los recursos ambientales, o en otras palabras, de la capacidad de intercambio con el ambiente.

La Figura IV.1 muestra un esquema de la metodología aplicada en las estrategias de aislamiento denominadas 1A, 1B, 2, 3 y 4 utilizadas para las muestras de suelo PT2371 y PT2372.

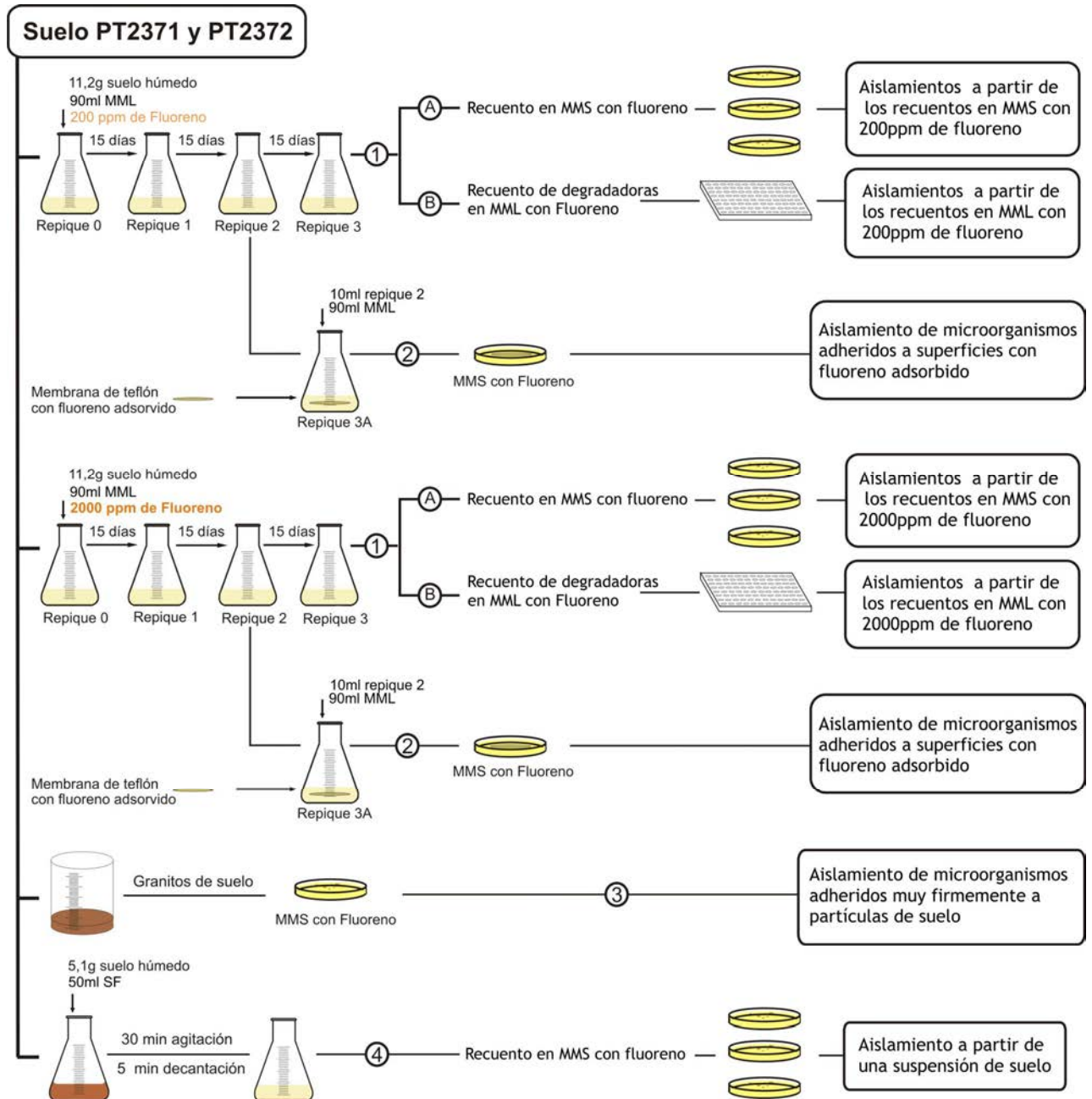


Figura IV.1: Esquema de la metodología aplicada en las estrategias de aislamiento utilizadas para las muestras de suelo PT2371 y PT2372.

Con el objetivo de aislar bacterias degradadoras del tipo estrategias r, se utilizaron las estrategias 1A, 1B y 2, realizando enriquecimientos sucesivos cada 15 días en MML con fluoreno como única fuente de carbono y energía. Se utilizó fluoreno como presión de selección ya que ambas muestras de suelo presentaban fluoreno en sus respectivos lixiviados. Se ensayaron dos concentraciones de fluoreno, 200 y 2000 mg/l.

Los aislados utilizando la estrategia 1A fueron obtenidos a partir del recuento en medio sólido de bacterias degradadoras de fluoreno (Bogardt y Hemmingsen, 1992) correspondiente al tercer cultivo de enriquecimiento y fueron seleccionados debido a que las colonias mostraron evidencias de degradación (halo transparente y/o color). Los aislados con la estrategia 1B se obtuvieron de los mismos cultivos de enriquecimiento pero a partir de los pocillos que mostraron color (productos de degradación) en los recuentos en MML+PAH realizados por la técnica de Wrenn y Venosa, 1996.

La estrategia 2 fue diseñada con el fin de aislar bacterias degradadores del tipo estrategias r adaptadas a ambientes con reducida disponibilidad de PAH, para lo cual en el tercer repique sucesivo el fluoreno se incorporó adsorbido a membranas hidrofóbicas (200 y 2000 mg/kg).

Las estrategias 3 y 4 se basaron en técnicas de aislamiento directo de microorganismos con el fin de recuperar bacterias degradadoras estrategias k, en el primer caso se intentaron aislar bacterias degradadoras de PAH adheridas muy firmemente a partículas de suelo, y en el segundo caso se realizaron aislamientos en MMS con fluoreno a partir de una suspensión de suelo.

A partir de las muestras de suelo PT2371 y PT2372 y utilizando las 4 estrategias descritas se obtuvieron 36 aislados bacterianos. El número de aislados obtenidos con cada estrategia, sus características macro y microscópicas, los resultados de la tinción de Gram y prueba del KOH se muestran en la Tabla IV.2.

Tabla IV.2: Características macroscópicas, microscópicas, tinción de Gram y prueba del KOH de los cultivos aislados

ESTRATEGIA 1A	PT2371	200 ppm fluoreno	MO.	Características macroscópicas	Observación Directa	Gram	KOH
			2A	Translúcida tornasolada, chata, cremosa, no muy redonda, brillante.	Bacilos largos en cadenas móviles, solos.	-	-
			2B	Crema, chata, brillante, no muy redonda, cremosa	Bacilos grandes largos móviles, de a dos, solos, cadenitas	-	-
			8	Translúcida, extendida, deja líneas en el medio cuando se extiende, brillante	<u>No creció en caldo R3</u>	---	---
			9	Blanca tornasolada, bordes poco definidos, cremosa, brillante	<u>No creció en caldo R3</u>	---	---
		2000 ppm fluoreno	17A	Rosa muy tenue, redonda, borde definido, cremosa, mediana, brillante.	Bacilos no móviles, filamentos tabicados y bacilos en forma de v	TI	+
			17B	Amarilla, mediana, redonda, chata, brillante.	<u>No creció en caldo R3</u>	---	---
			17C	Amarilla, chica, redonda, cremosa, brillante.	<u>No creció en caldo R3</u>	---	---
			18	Blanca, redonda, chica, cremosa, brillante.	Bacilos en cadenas, ramificados, con circulotos en las puntas, enrulados	TI	+
			19	Rosa muy tenue, redonda, borde definido, cremosa, mediana, brillante.	Bacilos no móviles, filamentos tabicados.	TI	+

ESTRATEGIA 1A		ESTRATEGIA 1B		ESTRATEGIA 2		
PT2372	200 ppm fluoreno	21	Translucida, extendida, deja líneas cuando se extiende, brillante	Bacilos solos, de a dos, móviles, forma de letras	+	+
		31	Translucida, borde extendido, chata, brillante	Bacilos largos en cadenas, solos o de a dos.	-	-
		32	Tornasolada translucida, borde extendido, chata, brillante	Bacilos largos solos y en cadenas de dos a cuatro.	-	-
	2000 ppm fluoreno	33	Crema, opaca, cerosa, chica, redonda	Cocos en tétradas no móviles	+	+
		36	Amarilla translucida, chica, redonda, cremosa, brillante.	Cocobacilos de a dos móviles	-	
	PT2371	200 ppm fluoreno	37A	Amarilla, grande redonda, cremosa, brillante	<u>No creció en Caldo R3</u>	---
2000 ppm fluoreno		38B	Blanca, mediana, redonda, brillante	<u>No creció en Caldo R3</u>	---	---
		38C	Beige, brillante, redonda, mediana, cerosa.	Bacilos no móviles finos, solos y ramificados	-	+
PT2371	200 ppm fluoreno	1Flu200A b	Blanca, tornasolada, extendida, cremosa.	<u>No creció en Caldo R3</u>	---	---
		1Flu200B c	Beige, mediana, cremosa, brillante	<u>No creció en Caldo R3</u>	---	---

ESTRATEGIA 2	PT2371	2000 ppm fluoreno	1Flu2000 B a	Amarilla, chica, cremosa, redonda, brillante.	<u>No creció en Caldo R3</u>	---	---
			1Flu2000 B b	Blanca, dura, opaca, con textura grumosa, olor a tierra, oscurece el agar.	Bacilos muy ramificados, enredados como hobillos, no móviles, tabicados, con fructificaciones redondas en las puntas.	+	+
			1Flu2000 A a	Blanca, grande, redonda, mucosa, brillante.	<u>No creció en Caldo R3</u>	---	---
			1Flu2000 A b	Amarilla, chica, cremosa, redonda, brillante.	<u>No creció en Caldo R3</u>	---	---
			1Flu2000 B a	Blanca, tornasolada, extendida, brillante.	<u>No creció en Caldo R3</u>	---	---
			1Flu2000 B c	Blanca, mediana, bordes no definidos, opaca.	<u>No creció en Caldo R3</u>	---	---
ESTRATEGIA 3	PT2371		3	Translúcida tornasolada, redonda, cremosa, chata, brillante	<u>No creció en caldo R3</u>	---	---
			5	No creció en el primer aislamiento a R3	<u>No creció en caldo R3</u>	---	---
			6A	Blanca, chica, redonda, grumosa, opaca.	<u>No creció en caldo R3</u>	---	---
			6B	Blancuzca, grande, cremosa, brillante, no muy redonda	Cocos en cadenas no móviles	+	+
ESTRATEGIA 4	PT2372		1B	Amarilla fuerte, mediana, redonda, cremosa, opaca.	<u>No creció en Caldo R3</u>	---	---
			1A	Amarilla translúcida, chica, redonda cremosa, brillante.	Bacilos móviles cortos y filamentos medianos no tabicados	-	-

ESTRATEGIA 4	PT2372	7	Amarilla translúcida, chica, redonda cremosa, brillante.	Bacilos móviles cortos y filamentos medianos no tabicados	-	-
		10A	Anaranjada, chica, redonda, cremosa, opaca.	<u>No creció en caldo R3</u>	---	---
		10B	Blanca, mediana, redonda, cremosa, brillante.	Bacilos pleomórficos curvos, enrutados, no móviles	+	+
		22 ^a	Amarilla translúcida, chica, redonda, cremosa, brillante.	Bacilos pequeños de a dos y solos, móviles	-	-
		22B	Amarilla fuerte, chica, redonda, cremosa, brillante.	Bacilos pequeños, móviles, solos.	-	-

TI: Tinción irregular. Gram: Tinción de Gram, KOH: Prueba del KOH. Los cultivos utilizados para la caracterización fueron crecidos previamente en caldo R3 durante 24 h en agitación.

IV.2.1 Determinación del espectro de degradación de los aislados

Con el objetivo de comprobar y determinar la capacidad de degradar diferentes PAH por parte de los microorganismos aislados, se realizaron repiques de los mismos en MMS y MML suplementado con fenantreno, fluoreno, dibenzotiofeno, antraceno y pireno. Los resultados del espectro de degradación de los aislados en MMS y MML se muestran en la Tabla IV.3. La Figura IV.2 A y B muestra los halos de solubilización de los microorganismos 1A, 21, 22A, 22B y 36 en MMS+fluoreno luego de 10 días de incubación, y la Figura IV.2 C el color observado en los pocillos con PAH y MML en los cultivos 1A, 18, 21, 22A, 22B, 36 y 38C a los 21 días de incubación, debido a la aparición de productos de degradación de los PAH (Tabla IV. 3 y Figura IV.2).

El espectro de degradación en MMS mostró que de los 36 aislados sólo los cultivos 1A, 6B, 7,18, 21, 22A, 22B, 32, 33, 36, 37C y 38C presentaron halo de solubilización con por lo menos uno de los PAH testeados. Cabe destacar que las colonias inicialmente seleccionadas de acuerdo a su capacidad de degradar PAH (Tabla IV.4) fueron posteriormente aisladas y repicadas en medios con diversas fuentes de carbono (Caldo y agar R3). Es sabido que en muchos de los microorganismos degradadores los genes vinculados al catabolismo de los PAH se encuentran en megaplásmidos (Cho y Kim, 2001; Basta y col. 2005; Colquhoun y col., 2012), por lo que en ausencia de presión de selección los genes degradativos pudieron perderse.

Por otra parte se encontró en algunos aislados una falta de correlación entre la aparición de halo en MMS+PAH y la presencia de color en MML con el mismo PAH (Tabla IV.2), esto podría

deberse a que el MMS contiene impurezas del agar-agar, que pueden ser utilizadas por los microorganismos oligotróficos como fuente alternativa de carbono y/o energía (Beruto y col., 1999) y por otro lado a que el halo de solubilización podría sólo estar indicando la capacidad del microorganismo de producir biosurfactantes (Bonilla y col., 2005).

Los aislados 1A, 7, 22A, 22B y 36 fueron seleccionados para los estudios posteriores por su amplio espectro degradador de PAH, evidenciado tanto en MMS como en MML. En la tabla IV.4 se resume el origen y las características de los aislados seleccionados, en donde se observa que todos los aislados seleccionados son bacilos Gram negativo, y fueron aislados de la muestra de suelo PT2372, la cual presentaba la mayor concentración de hidrocarburos. La mayoría de los cultivos fueron aislados por la técnica de aislamiento directo (estrategia 4), siendo solamente el cultivo 36 el aislado por la estrategia que utilizó los cultivos de enriquecimientos (estrategia 1A).

Tabla IV. 3: Espectro de degradación de los cultivos aislados a partir las estrategias de aislamiento 1A, 1B, 2, 3 y 4 en MMS y MML+ PAH (fluoreno, pireno, dibenzotiofeno, fenantreno y antraceno).

	Microorganismo	MMS+PAH/MML+PAH				
		Fluoreno	Pireno	Dibenzotiofeno	Fenantreno	Antraceno
ESTRATEGIA 1A	2A	HT/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	2B	-/ND	-/ND	-/ND	-/ND	-/ND
	8	-/ND	-/ND	-/ND	-/ND	-/ND
	9	-/ND	-/ND	-/ND	-/ND	-/ND
	17A	HT/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	17B	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	17C	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	18	HT/-	-/-	-/-	-/+	-/-
	19	HT/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	21	+/ND	-/ND	-/ND	-/ND	-/ND
	31	-/-	-/-	+/-	+/-	-/-
	32	+/-	+/-	-/-	+/-	-/-
	33	+/-	-/-	-/-	+/-	-/-
	36	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+

ESTRATEGIA 1B	37C	-/+	-/+	+/+	+/+	-/+
	38B	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	38C	-/-	-/-	+/-	-/-	+/+
ESTRATEGIA 2	1Flu200A b	-/ND	-/ND	-/ND	-/ND	-/ND
	1Flu200b c	-/ND	-/ND	-/ND	-/ND	-/ND
	1Flu2000B a	-/ND	-/ND	-/ND	-/ND	-/ND
	1Flu2000B b	HT/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	1Flu2000A a	-/ND	-/ND -	-/ND	-/ND	-/ND
	1Flu2000A b	-/ND	-/ND -	-/ND	-/ND	-/ND
	1Flu2000B a	-/ND	-/ND -	-/ND	-/ND	-/ND
	1Flu2000B c	-/ND	-/ND	-/ND	-/ND	-/ND
ESTRATEGIA 3	3	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	5	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	6A	-/ND	-/ND	-/ND	-/ND	-/ND
	6B	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-
ESTRATEGIA 4	1A	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
	1B	-/ND	-/ND	-/ND	-/ND	-/ND
	7	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
	10A	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	10B	HT/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	22A	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
	22B	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+

HT: cultivos que presentaron halo turbio alrededor de sus colonias a los 10 días. ND: No determinado

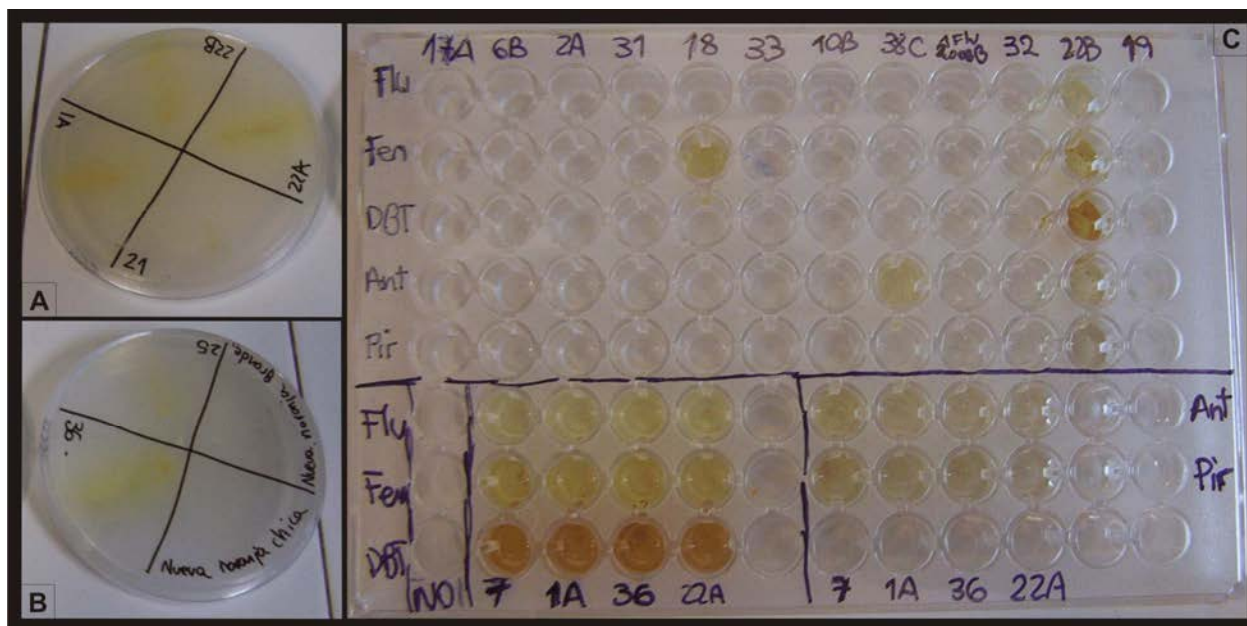


Figura IV.2: (A) y (B): Crecimiento de las cepas 1A, 22A, 22B y 36 en MMS y fluoreno. (C): Crecimiento de las cepas 1A, 22A, 22B, 36, 17A, 6B, 2A, 31, 18,33, 10B, 38C, 1Flu2000B, 32 y 19 en una policubeta con MML+ PAH. DBT: dibenzotiofeno; Flu: fluoreno; Fen: fenantreno; Pir: pireno; Ant: antraceno.

Tabla IV.4: Origen y características de los aislados seleccionados 1A, 7, 22A, 22B y 36 por su amplio espectro degradador.

Microorganismos Degradadores	Protocolo de aislamiento	Muestra de suelo
1A	4	PT2372
7	4	PT2372
22A	4	PT2372
22B	4	PT2372
36	1A , 2000ppm fluoreno	PT2372

IV.2.2 Caracterización fenotípica y genotípica de los cultivos aislados seleccionados

Los microorganismos seleccionados fueron todos aislados de la misma muestra de suelo (Tabla IV.4) y mostraron ser semejantes en sus características macro y microscópica (Tabla IV.2) y en cuanto al perfil de degradación de PAH (Tabla IV.3).

Se realizó una primera caracterización fisiológica utilizando pruebas bioquímicas convencionales. La Tabla IV.5 resume los resultados obtenidos para la caracterización

fenotípica, donde se observa que todos los aislados demostraron actividad catalasa, ausencia de actividad ureasa y gelatinasa, y ninguno fue capaz de fermentar el manitol ni la glucosa. Se observaron diferencias fenotípicas entre los aislados en la capacidad de fermentar la xilosa (aislado 36) y de reducir el nitrato (aislado 22B) (Tabla IV.5).

Se realizó también una caracterización genética utilizando las técnicas PCR-DGGE con primers dirigidos a una porción del gen 16S rRNA y RAPD-PCR utilizando primers al azar; las mismas fueron aplicadas sobre ADN extraído por el método del hervido a partir de los cultivos degradadores seleccionados. La Figura IV.3 muestra los resultados obtenidos a partir de PCR-DGGE, donde se observa que todos los cultivos aislados presentaron la misma posición de la banda correspondiente a una porción del gen 16S rRNA dentro de un gradiente desnaturante de urea-formamida, demostrando que los aislados están filogenéticamente muy relacionados. Los perfiles de la Figura IV.4, obtenidos con la técnica de RAPD utilizando tres primers al azar (IM1, IM2, IM3) muestran que los aislados 1A, 22A y 22B presentan perfiles genómicos diferentes entre sí, a pesar de tener bandas de igual posición en el gel de DGGE. Los aislados 1A y 7 presentaron perfiles de amplificación idénticos con los tres primers testeados, no pudiendo ser diferenciados tampoco en cuanto a sus características macro, microscópicas, perfil de degradación de PAH y características fenotípicas, por lo que fueron considerados como un mismo aislamiento.

No fue posible obtener perfiles de amplificación RAPD a partir del ADN del aislado 36.

Tabla IV. 5 Caracterización fenotípica de los cultivos degradadores 1A, 7, 22A, 22B y 36.

Microorganismo	Manitol	Glucosa	Xilosa	Gelatinasa	Catalasa	Ureasa	Prueba del Nitrato	Movilidad
1A	-	-	+	-	+ (lenta)	-	-	+
7	-	-	+	-	+ (rápida)	-	-	+
22A	-	-	+	-	+ (lenta)	-	-	+
22B	-	-	+	-	+ (lenta)	-	+	+
36	-	-	-	-	+ (lenta)	-	-	+

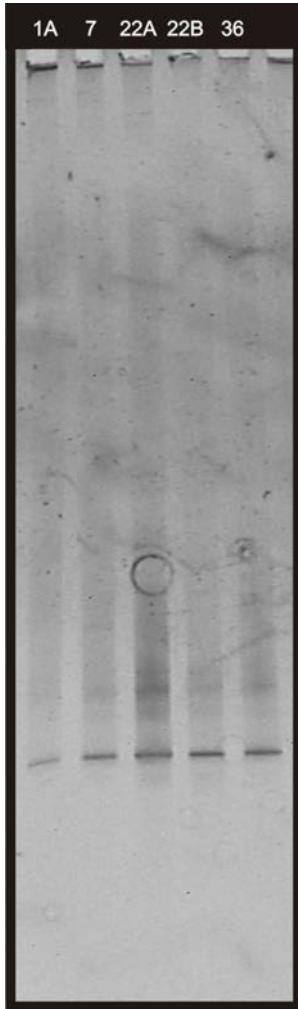


Figura IV.3: Análisis por PCR-DGGE de los cultivos 1A, 7, 22A, 22B y 36.

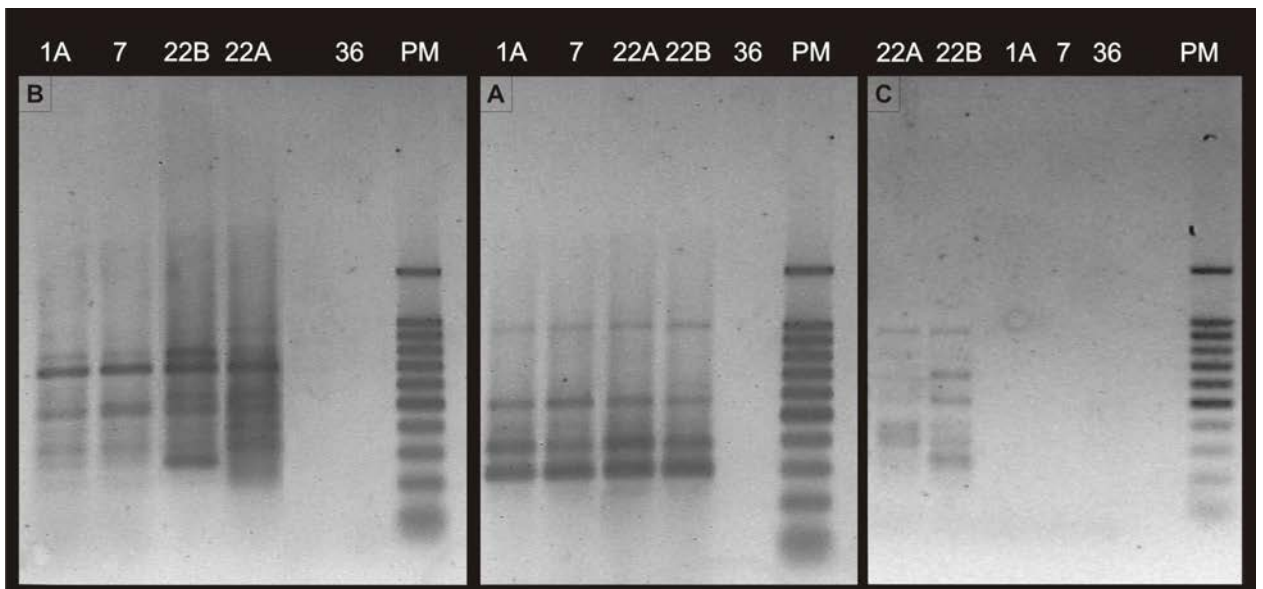


Figura IV.4: Perfiles obtenidos por la técnica RAPD-PCR de los cultivos degradadores 1A, 7, 21, 22A, 22B y 36. (A): Perfil obtenido utilizando el primer 6: IM-1; (B): Perfil obtenido utilizando el primer 9:IM-2; (C): Perfil obtenido utilizando el primer 10: IM-3.

IV.2.3 Secuenciación del gen 16S rRNA y determinación de la relación filogenética de los aislados

Se realizó la secuenciación del gen completo 16S rRNA de las cepas 1A, 22A, 22B y 36. Las secuencias así obtenidas fueron depositadas en el banco de datos GenBank dentro del cual se les asignaron los siguientes números de acceso: *Patagoninan strain* 1A, HQ603685; *Patagonian strain*. 22A, HQ603686; *Patagonian strain* 22B, HQ603687; *Patagonian strain* 36, HQ625564. Los resultados de la comparación de las secuencias obtenidas con las secuencias disponibles en el GenBank se muestran en la Tabla IV.6. Todos los aislamientos mostraron estar filogenéticamente relacionados con la familia *Sphingomonadaceae*. Los microorganismos pertenecientes al grupo *Sphingomonas* son frecuentemente aislados de suelos contaminados y se los considera como uno de los principales géneros cultivables degradadores de PAH (Uyttbroek y col., 2007).

Para determinar la posición filogenética de las cepas degradadoras, las secuencias del gen 16S rRNA fueron alineadas con secuencias conocidas del mismo gen pertenecientes a la familia *Sphingomonadaceae*. El árbol filogenético obtenido a partir de esta comparación se muestra en la Figura IV.5. Los resultados del árbol filogenético muestran que las cepas patagónicas 1A, 22A y 36 están estrechamente relacionadas entre sí y forman parte de un subgrupo que incluye cepas degradadoras de PAH pertenecientes a los géneros *Sphingomonas* y *Sphingobium*. La cepa 22B forma un subgrupo separado del resto de los aislados, junto con la cepa *Sphingomonas wittichii* RW1, degradadora de dioxinas (Nam y col., 2005) y con la cepa *Sphingomonas japonicum* UT26, degradadora de hexaclorociclohexano (Nagata y col., 2006).

Tabla IV.6: Resultados de la secuenciación del gen 16S rRNA y relaciones filogenéticas de las cepas Patagónicas degradadoras de PAH.

Cepa	Número de acceso	Secuencia bacteriana del gen 16srRNA mas relacionada	Similitud	Número de acceso
Patagonian strain 1A	HQ603685	<i>Sphingobium fuliginis</i> strain TKP	1362/1425 95%	DQ092757.1
Patagonian strain 22A	HQ603686	<i>Sphingobium fuliginis</i> strain TKP	1372/1427 90%	DQ092757.1
Patagonian strain 22B	HQ603687	<i>Sphingobium</i> sp. PNB	1384/1390 99%	HM367594.1
Patagonian strain 36	HQ625564	<i>Sphingobium</i> sp. PNB	935/941 99%	HM367594.1

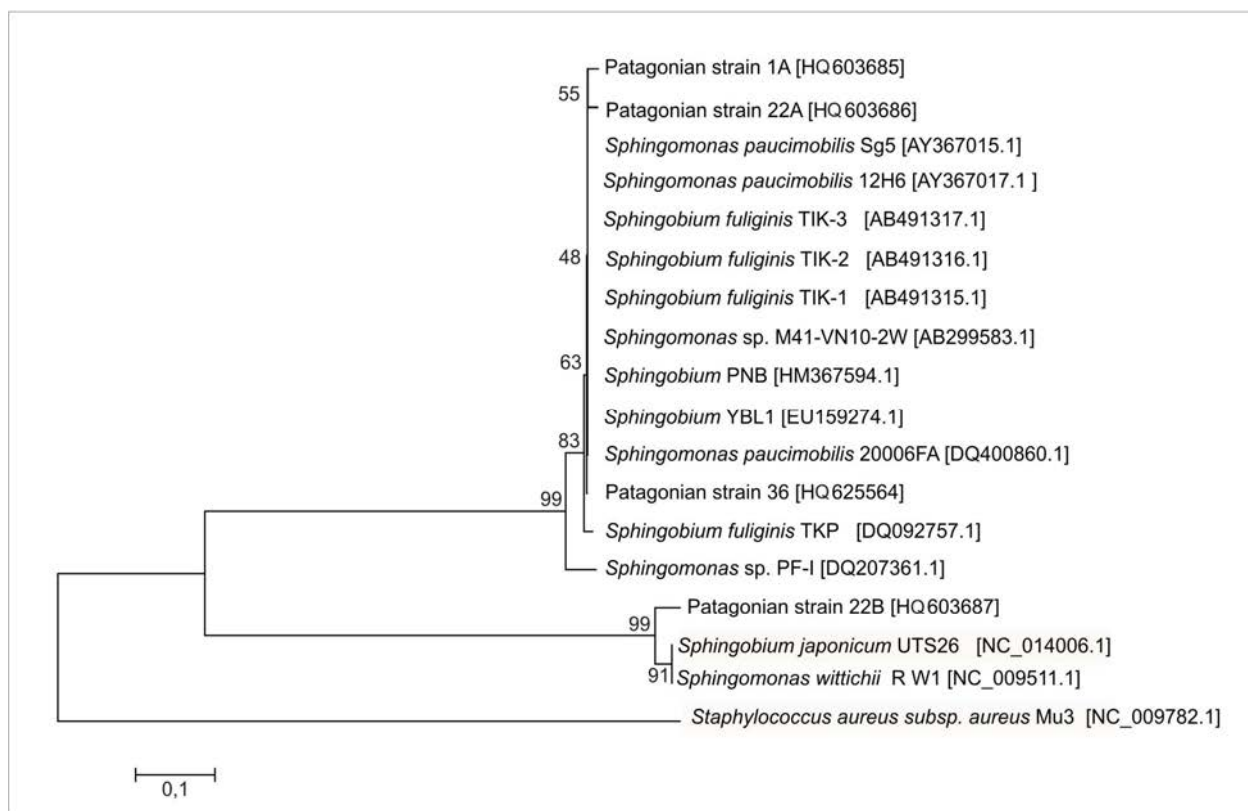


Figura IV.5: Árbol filogenético consenso basado en las matrices de distancia de la secuencia del gen 16S rRNA de las cepas patagónicas degradadoras de PAH, 1A, 22A, 22B y 36. *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Mu3 se utilizó como out-group. El árbol fue construido con secuencias disponibles escogidas del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>) utilizando MEGA software version 4. Los números de cada nodo corresponden al porcentaje de veces que coincidió el agrupamiento (bootstrap). La barra en el inferior izquierdo de la figura indica la distancia que corresponde al 0,1% de la variación. El número de acceso al GenBank de cada cepa bacteriana se indica seguido del nombre.

IV.2.4 Curva de crecimiento en MML con PAH como única fuente de carbono y energía

Se estudió la cinética de crecimiento de los aislados, en medios líquidos suplementados con 26 mg/l de fluoreno o fenantreno. La concentración del PAH fue optimizada utilizando la cepa 36 creciendo en fenantreno. Se eligió esta concentración porque permitía el crecimiento de la cepa, y al mismo tiempo los resultados de eliminación del PAH mostraron ser más sensibles que los obtenidos con mayores concentraciones de PAH.

Con el fin de comparar los comportamientos en cuanto a la degradación de PAH (Secciones IV.2.D y IV.2.E) y a la resistencia a diferentes factores ambientales de los aislados patagónicos (Sección IV.3) patagónicos, se incluyó en los siguientes ensayos a la cepa degradadora de PAH *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA (Sp), aislada a partir de un microcosmo de suelo de la ciudad de La Plata, contaminado con 2000 mg/kg de fenantreno (Coppotelli y col., 2008). Esta

cepa, filogenéticamente relacionada con las cepas Patagónicas (Figura IV.5), ha sido ampliamente caracterizada en nuestro laboratorio (Coppotelli y col., 2010).

Los resultados de las curvas de crecimiento de los aislados 1A, 22A, 22B, 36 y la cepa Sp, obtenidas utilizando fluoreno o fenantreno como única fuente de carbono y energía se muestran en la Figura IV.6 respectivamente.

Finalizada la curva de crecimiento, se realizaron extracciones del PAH remanente, utilizando como solvente de extracción acetato de etilo. Cada medida se realizó por triplicado y la concentración de PAH se determinó por HPLC. Los valores del PAH remanente de cada cinética luego de tres días de incubación se muestran en la Tabla IV.7.

Los resultados obtenidos mostraron que a pesar de que las cepas 1A, 22A, 22B y 36 fueron aisladas de suelos contaminados con fluoreno, y que éste fue utilizado como presión de selección en las distintas estrategias de aislamiento utilizadas, en cultivos puros ninguna de las cepas fue capaz de crecer utilizando el fluoreno como única FCE (Figura IV.6). Sin embargo, todas las cepas patagónicas mostraron un porcentaje de eliminación de fluoreno significativamente mayor ($P < 0,01$) al del control abiótico (Tabla IV.7). Las cepas 1A y 36 mostraron un porcentaje de eliminación del fluoreno significativamente mayor ($P < 0,01$) que las cepas 22A y 22B. Por otra parte fue posible evidenciar la aparición de productos de degradación de fluoreno en los cultivos de las cepas 1A, 22A, 22B y 36 (Figura IV.7). Estos resultados sugieren, que de forma similar a otras cepas bacterianas (Baboshin y col., 2008), las cepas patagónicas aisladas en este trabajo podrían oxidar el fluoreno por cometabolismo.

El cometabolismo es un fenómeno mediante el cual un microorganismo transforma un compuesto, pero no obtiene energía, carbono o ningún otro nutriente a partir del mismo (Atlas y Bartha, 1987). Por lo tanto el microorganismo no puede crecer empleando este compuesto como único sustrato. Esto ocurre cuando la enzima de un sustrato A reconoce a un sustrato no específico B y lo transforma en producto C. Por lo general la siguiente enzima de la vía metabólica no reconoce al producto C, por lo en el caso de un cultivo puro, el producto se acumula no generando beneficio alguno al microorganismo. Sin embargo en cultivos mixtos o en un ambiente adecuado, la transformación cometabólica inicial puede preparar el camino para un ataque posterior del producto C por algún otro microorganismo.

La cepa *S. paucimobilis* 20006FA, no mostró evidencia de degradación de fluoreno, luego de tres días de incubación (Figura IV.6, Tabla IV.7).

Un comportamiento diferente fue observado en el caso del fenantreno. Todas las cepas ensayadas (1A, 22A, 22B, 36 y Sp) fueron capaces de crecer utilizando fenantreno como única FCE (Figura IV.6 y IV.8), llegando a obtener valores de degradación de alrededor del 90%, luego de tres días de incubación (Tabla IV.6).

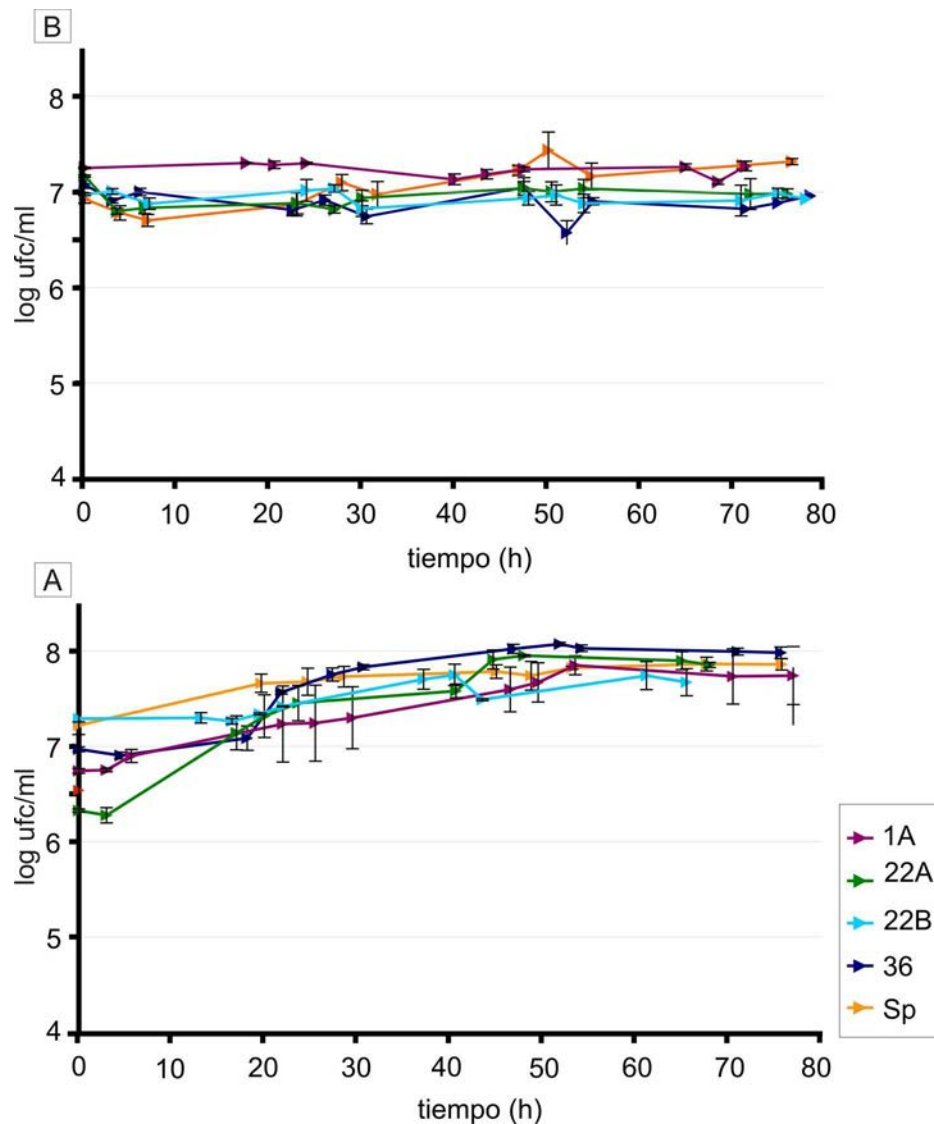


Figura IV.6: Curva de Crecimiento de 1A, 22A, 22B, 25, 36 y Sp en MML suplementado con 26 mg.l⁻¹ de fenantreno (A) y fluoreno (B) como única FCE. Los valores son el promedio de tres medidas independientes. Las barras representan las desviaciones estándar.

Tabla IV.7: Porcentaje de eliminación de fenantreno y fluoreno de las cepas Patagónicas 1A, 22A, 22B, 36 y *S. paucimobilis* 20006FA en cultivos batch con MML y 26 mg/l de PAH luego de tres días de incubación.

Cepa	Fenantreno	Fluoreno
1A	94,00 ± 6,22 ^a	98,32 ± 1,14 ^a
22A	98,00 ± 1,79 ^a	41,1 ± 2,00 ^b
22B	96,20 ± 2,77 ^a	62,20 ± 5,31 ^b

36	^a 97,90 ± 1,52	^a 93,84 ± 5,70
Sp	^a 85,64 ± 8,86	^{b,e} 28,41 ± 10,90
Control abiótico	^b 9,10 ± 0,50	^e 14,00 ± 4,70

Los valores corresponden al promedio de tres experimentos independientes (desviación estándar), los que poseen la misma letra como superíndice no son significativamente diferentes (P <0,01).

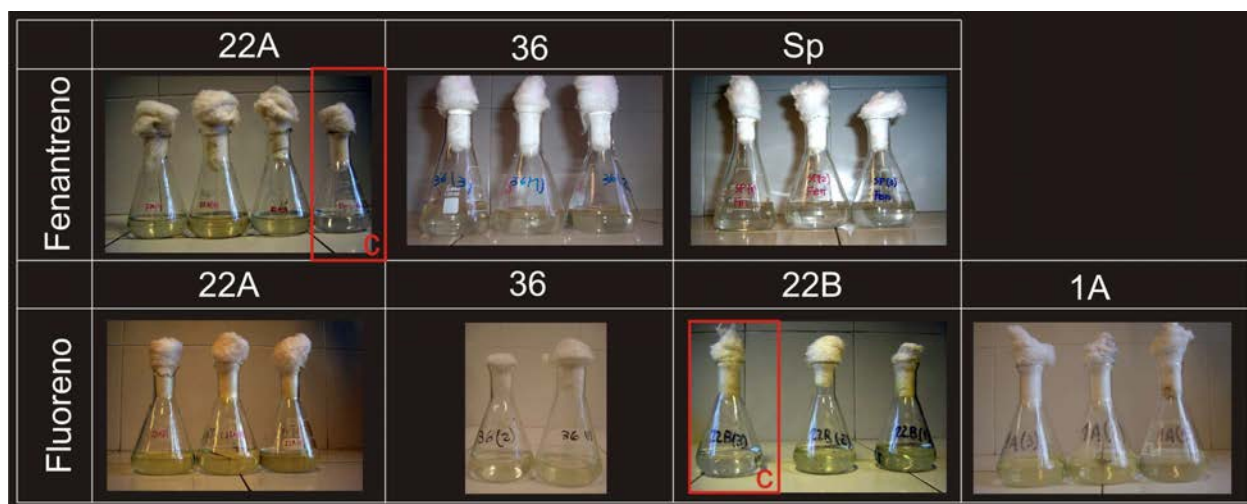


Figura IV.7: Cultivos batch con MML y 26mg/l de fluoreno o fenantreno de las cepas 1A, 22A, 22B, 36 y *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA (Sp) luego de tres días de incubación. **C:** MML sin el agregado del PAH.

IV.2.5 Ensayos de quimiotaxis hacia fenantreno y fluoreno

Una de las estrategias que presentan los microorganismos para aumentar la degradación de compuestos tóxicos en el ambiente es la quimiotaxis. Usualmente los microorganismos degradadores muestran también quimiotaxis hacia el mismo compuesto que degradan, siendo mas eficiente el proceso de degradación en estos que en microorganismos que no poseen ésta característica (Samanta y col., 2002). Por lo tanto se realizaron ensayos de quimiotaxis con las cepas degradadoras 1A, 22A, 22B, 36 y Sp hacia fenantreno y fluoreno, utilizando la técnica de la gota de agarosa (Lanfranconi y col., 2003). El PAH a testear se mezcló con agarosa fundida y una gota de esa mezcla se colocó en el centro de un portaobjetos que fue tapado con un cubreobjetos de manera de formar una cavidad. Una vez solidificada la agarosa se agregó la suspensión bacteriana teñida con azul de metileno que por capilaridad entró en la cavidad y tomó contacto con el PAH inmovilizado. Luego de 30 minutos las muestras fueron observadas al microscopio óptico. Como control negativo se utilizó agarosa resuspendida en agua destilada.

La Figura IV.8 muestra las fotografías obtenidas a partir de las observaciones microscópicas con aumentos de 100 y 400X, donde claramente se observa, con todos los microorganismos estudiados, que las células luego de 30 minutos en contacto con el PAH inmovilizado se ubican alrededor de la superficie de la gota de agarosa+PAH. No se observó el mismo comportamiento en el caso del control, donde las células están dispersas con una distribución al azar. Por lo tanto los resultados muestran que todos los microorganismos testeados (1A, 22A, 22B, 36 y Sp) presentaron quimiotaxis positiva hacia fenantreno y fluoreno.

Es importante destacar que a pesar de que ninguna de las cepas estudiadas fue capaz de crecer con fluoreno como única FCE (Figura IV.6) y en particular la cepa Sp no mostró evidencias de degradación fluoreno (Tabla IV.7), todas las cepas estudiadas mostraron quimiotaxis hacia este compuesto. Esto podría estar sugiriendo un mecanismo de reconocimiento del atrayente no demasiado específico.

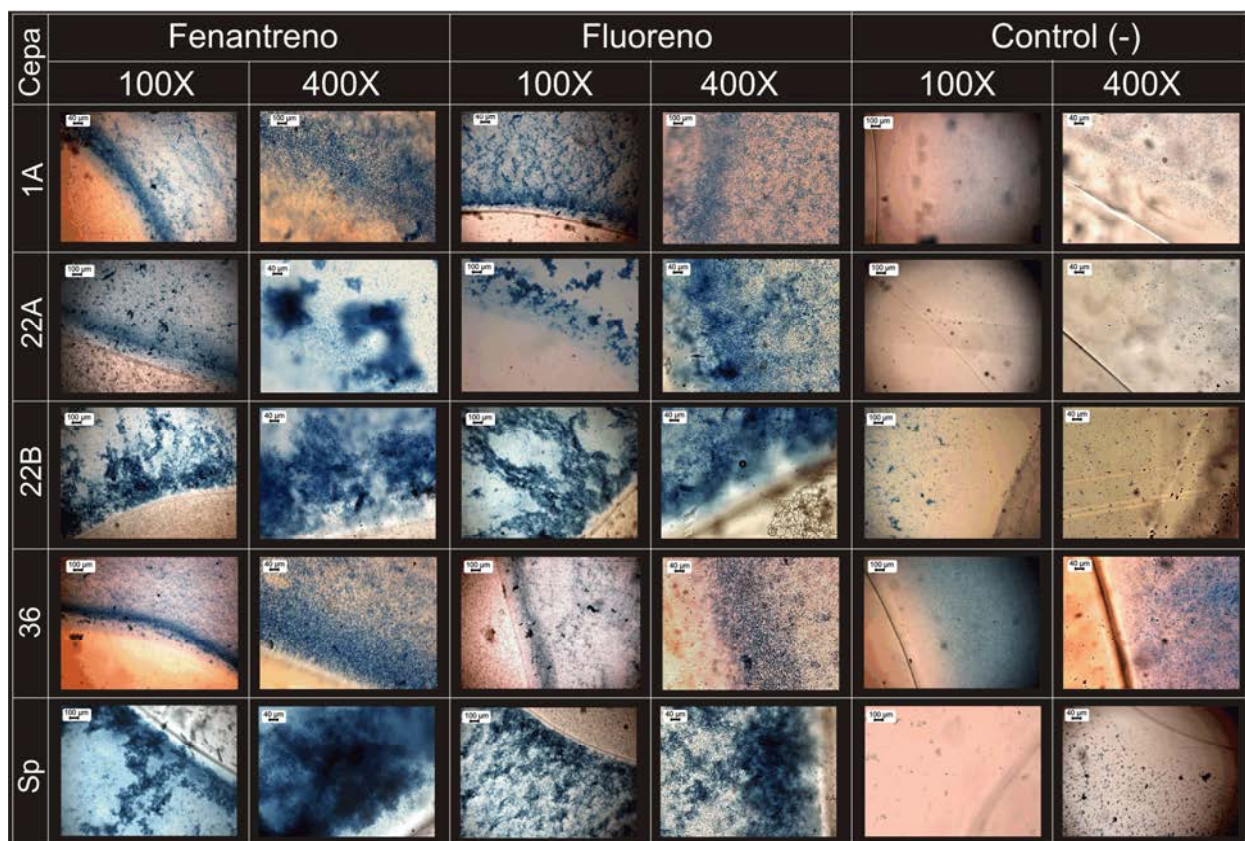


Figura IV.8: Determinación de la respuesta quimiotáctica hacia fenantreno y fluoreno de las cepas degradadoras de PAH 1A, 22A, 22B, 36 y Sp; utilizando el método de la gota de agarosa (Lanfranconi y col., 2003). Control (-): Control negativo, 100X: 100 aumentos, 400X: 400 aumentos.

IV.3 Caracterización de propiedades fisiológicas que sugieran la presencia en los aislados de mecanismos de adaptación a las condiciones ambientales de la Patagonia semiárida

IV.3.1 Crecimiento a diferentes pH

El análisis del crecimiento a diferentes pH fue realizado en medio R3 y MML con fenantreno como única fuente de carbono y energía, ambos medios llevados a pH 4, 6, 8, 9 y 10 con H₂SO₄ o KOH. La aparición de turbidez en R3 fue tomada como indicadora de crecimiento bacteriano; el desarrollo de turbidez y/o color en MML con fenantreno indicó la capacidad de degradar fenantreno al pH estudiado. Los ensayos se realizaron por duplicado. Los resultados del crecimiento a diferentes pH de las cepas degradadoras seleccionadas se muestran en la Tabla IV.8.

Todas las cepas patagónicas fueron capaces de crecer en medio R3 entre pH 4 y 10, a diferencia de la cepa Sp que no desarrolló turbidez a pH 4 (Tabla IV.8). Un comportamiento diferente se observó en el caso del MML con fenantreno como única fuente de carbono y energía; donde las cepas aisladas de suelo patagónico sólo mostraron actividad degradadora entre valores de pH 6 y 9, a excepción de la cepa 36 que además mostró indicios de actividad degradadora a pH 10. Varios autores (Rahman y col., 2002; Meredith y col., 2000) evaluaron el efecto del pH sobre la capacidad degradadora de hidrocarburos, encontrando que a pH extremo existe una influencia negativa sobre la habilidad degradadora de ciertas poblaciones microbianas del suelo. Los resultados de la Tabla IV.8 muestran, en todas las cepas estudiadas, indicios de actividad degradadora a valores de pH similares al pH de la muestra PT2372 (pH 8,6) de donde fueron aisladas las cepas patagónicas.

Un resultado interesante se encontró con la cepa Sp, la cual no evidenció crecimiento en medio R3 a pH 4, pero sin embargo al mismo valor de pH, desarrolló color en MML suplementado con fenantreno. Kim y colaboradores, (2005) encontraron que *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 creciendo en condiciones ácidas tiene la capacidad de hacer su membrana más permeable a moléculas hidrofóbicas como el fenantreno y el pireno, resultando en un incremento en las concentraciones de éstas sustancias en el citosol. Esto podría explicar en parte los resultados observados en este estudio.

Tabla IV.8: Crecimiento de los cultivos aislados 1A, 22A, 22B, 36 y la cepa Sp en medio R3 a pH 4,6, 8, 9 y 10, y en MML+Fenantreno a pH 4, 6, 8, 9 y 10.

Medio R3						MML+Fenantreno				
Cepa	pH 4	pH 6	pH8	pH9	pH10	pH 4	pH 6	pH8	pH9	pH10
1A	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
22A	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
22B	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
36	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Sp	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-

Se tomó como crecimiento positivo (+) la aparición de turbidez en R3 y a la aparición de color y/o turbidez en MML+Fenantreno.

IV.3.2 Resistencia al estrés hídrico

El agua líquida es esencial para todos los procesos bioquímicos. Para los microorganismos, el factor crítico es la disponibilidad de agua líquida (actividad acuosa, a^w) más que la cantidad de agua total presente en el ambiente. Normalmente la mayoría de los microorganismos necesitan valores de a^w por encima de 0,96 para tener un metabolismo activo. Aquellos que crecen a valores de a^w menores se consideran xerotolerantes (*Staphylococcus*, *Halobacterium*) (Atlas y Bartha., 1996).

En los suelos la actividad acuosa puede ser modificada por algunos factores, algunos de ellos son el contenido de solutos presentes, que ordenan el agua en capas de hidratación alrededor de los mismos (iones caotrópicos), y la presencia de superficies sólidas, en donde el agua puede absorberse. Estos dos efectos secuestran moléculas de agua generando fuerzas osmóticas y matrices que generalmente disminuyen la biodisponibilidad de la misma.

En los suelos de la estepa Patagónica pequeñas disminuciones en el contenido de agua pueden disminuir marcadamente la actividad acuosa. Las fuerzas matrices y osmóticas se incrementan cuando disminuye la cantidad de agua que pueden secuestrar los solutos y las superficies sólidas de un suelo. Los microorganismos deben soportar entonces altas fuerzas osmóticas y matrices para poder sobrevivir cuando un suelo se seca (Chowdhury y col., 2011).

A pesar de que la desecación ambiente y la alta concentración salina generan la deshidratación celular, desnaturalización de proteínas, daños del ADN y finalmente pérdida de la viabilidad celular en ciertos microorganismos, existen otros capaces de tolerar tanto uno como otra condición, encontrándose algunos microorganismos capaces de resistir la desecación ambiente

(Potts, 1994) y microorganismos capaces de tolerar altas concentraciones salinas (Chen y col., 2010).

Debido a que los suelos patagónicos suelen contener baja humedad relativa, y por lo tanto los microorganismos autóctonos deben soportar altas fuerzas osmóticas, y que en muchos casos existe una superposición en los mecanismos de resistencia a la desecación y el estrés osmótico (Ramos y col., 2001), fue de nuestro interés estudiar a los cultivos 1A, 22A, 22B, 36 y Sp de acuerdo a su tolerancia a diferentes concentraciones de NaCl y a la desecación ambiente.

A pesar de que el resultado de la conductividad de la muestra de suelo PT2372 se relacionó con un suelo no salino, cabe aclarar que ésta medida se realizó saturando el suelo a su máxima capacidad de retención de agua (WHC), lo que estaría diluyendo el contenido de iones presentes en él y con ello las fuerzas osmóticas, que no son las que realmente in vivo deben resistir los microorganismos para sobrevivir.

IV.3.2.i Salinidad

La respuesta de las cepas a diferentes concentraciones de NaCl se determinó estudiando su crecimiento en medio R3 con 0,5; 1,5; 2,5 y 5% de NaCl. Las curvas de crecimiento obtenidas para cada condición se muestran en la Figura IV.10. La Tabla IV.8 agrupa los valores de las velocidades específicas de crecimiento (μ), tomadas a partir de las pendientes de las curvas de crecimiento, y la cosecha máxima obtenida (X), para cada condición y cada microorganismo. En primer lugar se pudo observar que en las condiciones de 0,5 y 1,5% de NaCl los cultivos de las cepas 22A y 22B alcanzaron valores de X (Tabla IV.8) significativamente menores ($P < 0,05$) a los alcanzados en el caso de las otras cepas estudiadas, lo que estaría indicando que estos microorganismos son menos eficientes para duplicarse en estos medios en comparación con los cultivos 1A, 36 y *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA. Al aumentar más aún la concentración de NaCl, (2,5% y 5%) la cosecha máxima no muestra diferencias significativas entre las cepas estudiadas.

En cuanto a la velocidad de crecimiento todas las cepas mostraron comportamientos similares, observándose una importante disminución de la velocidad de crecimiento en los medios suplementados con 1,5 y 2,5% de NaCl con respecto a las velocidades obtenidas en los cultivos crecidos con 0,5% de NaCl (Tabla IV.9). Ninguno de los cultivos fue capaz de crecer en presencia de 5% de NaCl (Figura IV.10).

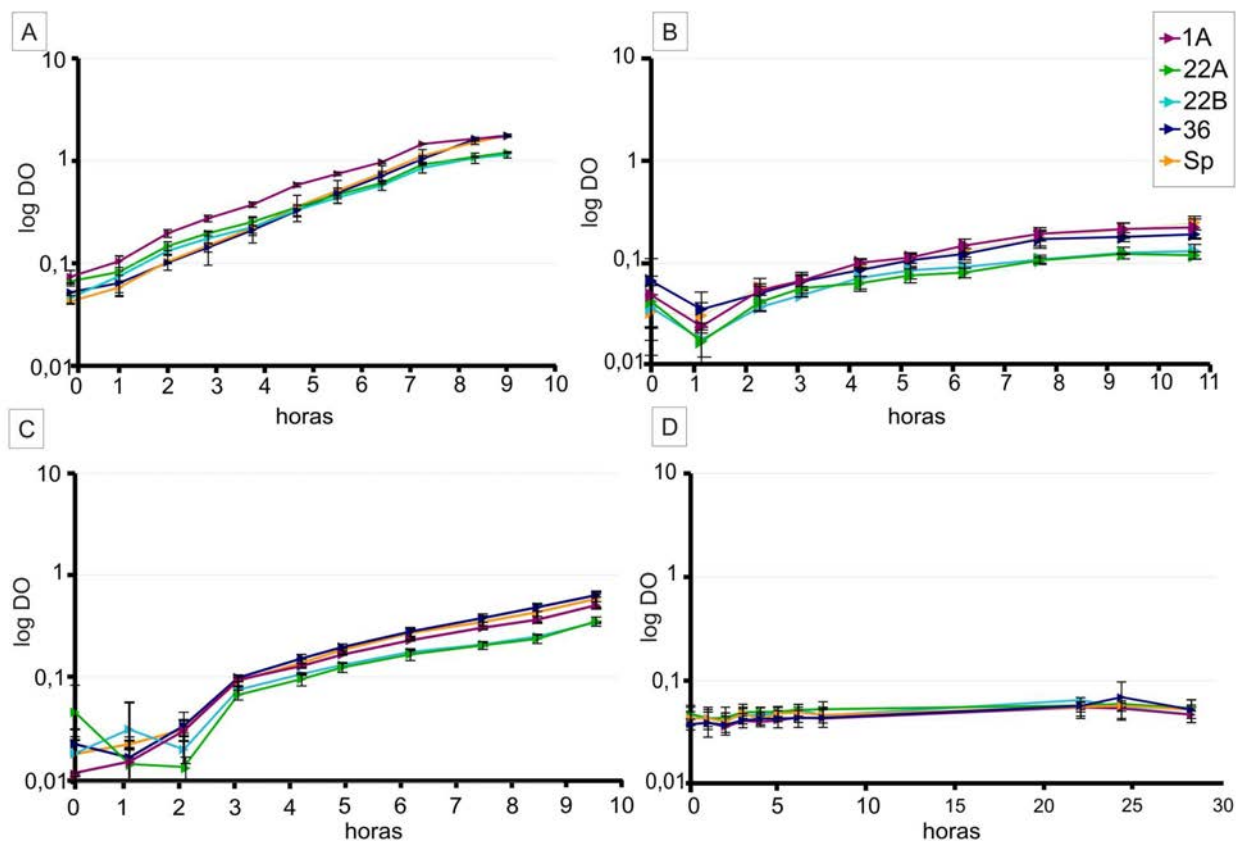


Figura IV.10: Crecimiento de los cultivos 1A, 22A, 22B 36 y Sp determinado por DO a 600 nm en R2 con el agregado de A: 0,5%, C:1,5%, B:2,5% y D: 5% de NaCl. Los valores son el promedio de tres medidas independientes. Las barras representan las desviaciones estándar.

Tabla IV. 9: Efecto de la concentración de NaCl en la curva de crecimiento en cultivos batch con medio R3 de las bacterias degradadoras de PAH aisladas de suelo patagónico 1A, 22A, 22B y 36 y *S. paucimobilis* 20006FA.

Cepa	Concentración de NaCl (p/v)					
	0,50%		1,5%		2,5%	
	$\mu(h^{-1})$	X (DO ₆₀₀)	$\mu(h^{-1})$	X (DO ₆₀₀)	$\mu(h^{-1})$	X (DO ₆₀₀)
1A	0,44	1,725 ± 0,022 ^a	0,25	0,502 ± 0,041 ^a	0,23	0,262 ± 0,070 ^a
22A	0,38	1,204 ± 0,014 ^b	0,23	0,349 ± 0,035 ^b	0,17	0,120 ± 0,009 ^a
22B	0,41	1,146 ± 0,081 ^b	0,22	0,341 ± 0,005 ^b	0,10	0,132 ± 0,021 ^a
36	0,49	1,769 ± 0,056 ^a	0,28	0,631 ± 0,025 ^a	0,20	0,256 ± 0,056 ^a
Sp	0,52	1,769 ± 0,05 ^a	0,28	0,582 ± 0,104 ^a	0,20	0,256 ± 0,107 ^a

μ : velocidades específicas de crecimiento. Los valores son promedio de tres ensayos independientes (desviación estándar), los seguidos con la misma letra no son significativamente diferentes ($P < 0,05$).

IV.3.2.ii Desecación

Sé estudio la resistencia de las cepas patagónicas degradadoras de PAH 1A, 22A, 22B y 36 a condiciones de desecación ambiente típicas de la región patagónica, utilizando la metodología desarrollada por Álvarez y col. (2004). En el ensayo se incluyó la cepa Sp y dos cepas controles: *E.coli* ATCC 25922 como cepa sensible y *S. aureus* ATCC 25923 como resistente a la desecación. La resistencia a la desecación de los aislados fue determinada mediante el cálculo (Fórmula 1, Sección III.12.B.B) del porcentaje de supervivencia de una suspensión de microorganismos dispuesta en gotas en la superficie de cajas de Petri, las cuales se mantuvieron en un desecador a 18%HR y a 28°C durante 14 días. La Tabla IV.10 muestra los resultados de la supervivencia a la desecación de las cepas patagónicas, la cepa Sp y los controles.

Existen claras diferencias en los porcentajes de supervivencia bajo condiciones de desecación ambiente entre las cepas estudiadas. La cepa 22B mostró ser extremadamente resistente a la desecación, con un porcentaje de supervivencia luego de 14 días de incubación, significativamente mayor ($P < 0,01$) que el de las demás cepas testeadas, inclusive de *S. aureus* ATCC 25923, la cual fue utilizada como cepa control resistente a la desecación ambiente. La cepa 22A presentó un comportamiento intermedio, resultando ser significativamente más sensible a la desecación que la cepa 22B, pero más resistente que las cepas claramente sensibles 1A, 36, y Sp.

Los resultados obtenidos ponen en evidencia que los aislados 22A y 22B podrían tener mecanismos de adaptación a las condiciones de desecación propias de la Patagonia semiárida.

Tabla IV.10: Porcentaje de supervivencia bajo condiciones de desecación ambiente (18% Humedad relativa (HR)) de las cepas 1A, 22A, 22B y 36, Sp, *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 25923 luego de 14 días de incubación.

Cepas	Porcentaje de Supervivencia
1A	$\leq 38,5 \pm 3,5$
22A	$72,6 \pm 1,3$ ^a
22B	$82,2 \pm 2,3$ ^d
36	$\leq 49,5 \pm 1,2$
Sp	$45,5 \pm 1,0$ ^b
<i>S. aureus</i> 25923	$81,5 \pm 1,17$ ^c
<i>E.coli</i> ATCC 25922	$53,85 \pm 2,09$ ^b

Los valores son promedio de tres ensayos independientes (desviación estándar), los seguidos con la misma letra no son significativamente diferentes (P <0,01).

IV.3.3 Supervivencia en déficit de carbono

Con el fin de evaluar la supervivencia de las cepas 1A, 22A, 22B, 36 y Sp al déficit de carbono, las mismas fueron inoculadas en MML en ausencia total de FCE incubándose a 28°C y en agitación, durante 85 días. La supervivencia fue monitoreada periódicamente mediante recuentos en placas de R2A.

La Figura IV.11 muestra los valores de recuento de las cepas obtenidos durante los 85 días de hambreado. Dos de los aislados (1A y 36) y la cepa Sp mostraron un patrón de respuesta al déficit de carbono con una marcada reducción en los recuentos a lo largo del ensayo, llegando al final del experimento a un porcentaje de culturabilidad de entre 15 y 1%, en relación con sus valores iniciales de ufc/ml. Las cepas 22A y 22B mostraron un patrón diferente de respuesta al déficit de carbono, con una disminución inicial seguida de un incremento en el número de bacterias cultivables, llegando a un valor que se mantuvo constante hasta los 85 días. Al finalizar el ensayo las cepas 22A y 22B mostraron una culturabilidad del 83,5 y 146,6% respectivamente.

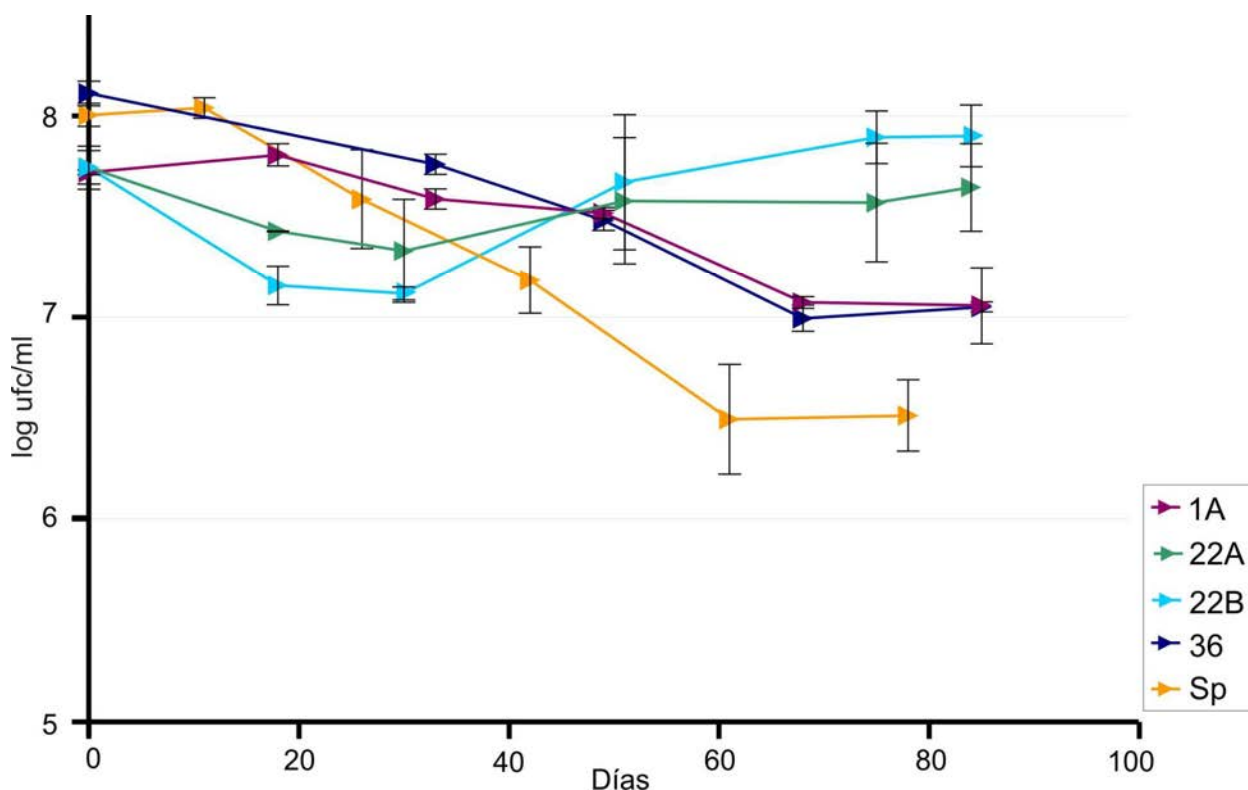


Figura IV.11: Supervivencia de las cepas 1A, 22A, 22B, 36 y *S. paucimobilis* 20006FA (Sp) en ausencia de fuente de carbono. Los resultados muestran el promedio de tres determinaciones independientes. Las barras representan las desviaciones estándar.

IV.3.4 Supervivencia en déficit de nitrógeno

La supervivencia de las cepas 1A, 22A, 22B, 36 y Sp en déficit de nitrógeno fue determinada en MML con 1% de glucosa como única FCE y en total ausencia de fuente de nitrógeno. Los cultivos fueron incubados a 28°C y monitoreados por 70 días mediante recuentos en placas con R2A, medida de DO a 600nm y tinciones con el colorante hidrofóbico Sudan Black B. La Figura IV.12 muestra las variaciones en el número de ufc/ml y DO a 600nm de las cepas durante los 70 días del ensayo. Las fotografías tomadas al microscopio óptico de las tinciones con Sudan Black B a los diferentes tiempos del ensayo se muestran en la Figura IV.13.

Como se observa en la Figura IV.12, todas las cepas testeadas tuvieron un decaimiento inicial en el número de heterótrofas cultivables los primeros 20 días del ensayo. Luego de 20 días de incubación, las reducciones en los valores de los recuentos fueron no significativas ($P < 0,01$) y estuvieron entre 1,14 y 1,17 del valor de log hasta finalizar el ensayo. Se observó un patrón diferente en la determinación de DO a 600nm de los cultivos en déficit de nitrógeno (Figura IV.12). A diferencia de los recuentos, los cuales presentaron un decaimiento inicial los primeros 20 días del ensayo, la DO a 600nm mostró un aumento máximo de entre 2,7 y 7,4 veces al día

6 del ensayo, seguido de un decaimiento gradual hasta el día 20. Estos resultados sugieren el aumento del tamaño de la célula desde el día 1 hasta el día 6, que podría ser causado por la acumulación de compuestos de reserva debido al alto cociente carbono/nitrógeno. Al analizar las fotos obtenidas con la tinción con Sudan Black B (Figura IV.13), se observa la presencia de gránulos hidrofóbicos desde el día 1 del ensayo. A partir del día 12 y hasta el 39 de iniciado el experimento, se observa que conviven células sin gránulos hidrofóbicos (rosas) y con gránulos hidrofóbicos (violetas) (Figura IV.13), y consecuentemente la DO a 600nm también disminuye.

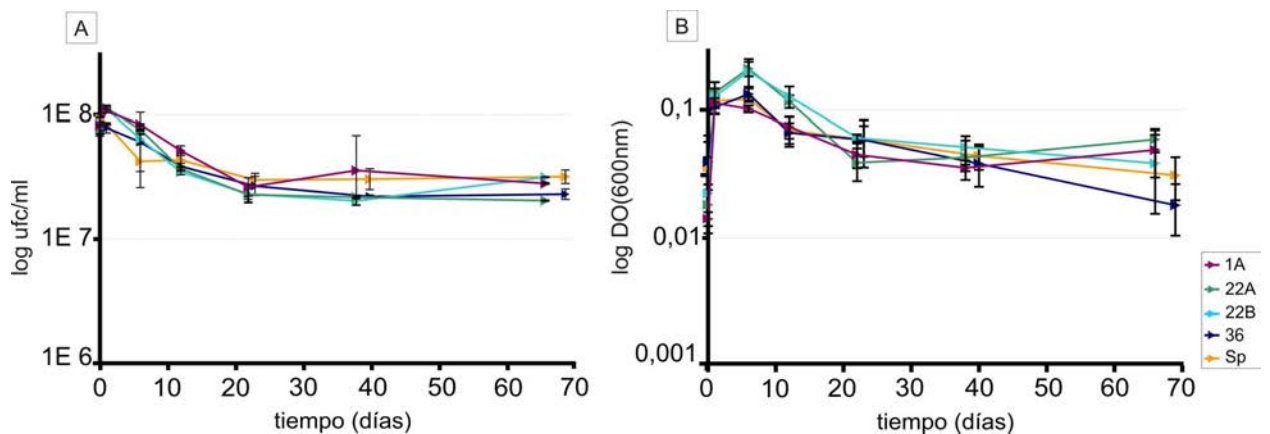


Figura IV.12: Supervivencia de las cepas 1A, 22A, 22B, 36 y *S. paucimobilis* 20006FA (Sp) bajo hambreado de fuente de Nitrógeno. A: Recuentos de bacterias heterótrofas viables. B: Medida de DO a 600 nm. Los resultados muestran el promedio de tres experimentos independientes. Las barras representan la desviación estándar.

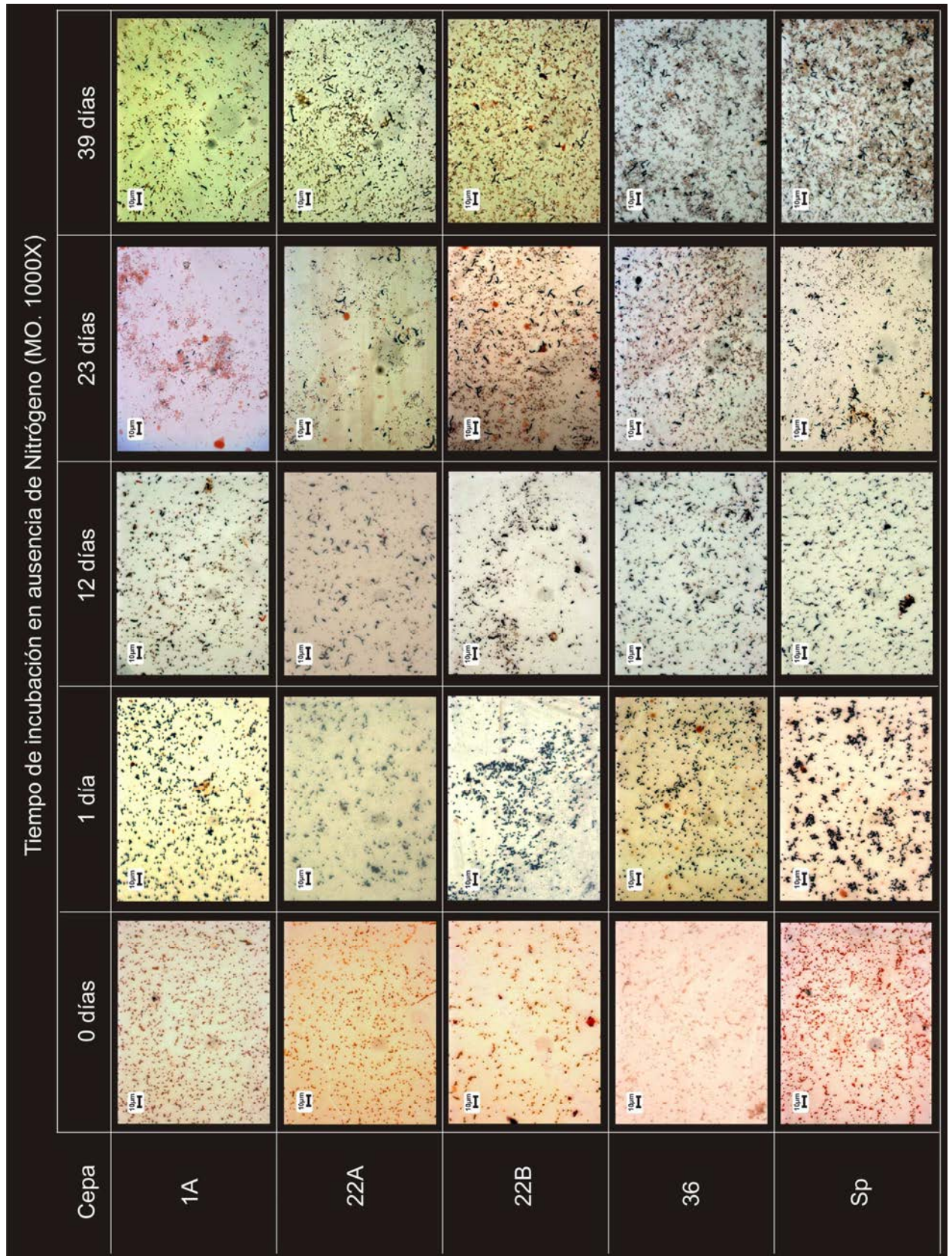


Figura IV.13: Imágenes tomadas al Microscopio óptico (1000X) de las tinciones con Sudán Black B realizadas a las cepas 1A, 22A, 22B, 36 y Sp a los 0, 1, 12, 23 y 39 días de hambreado de fuente de Nitrógeno.

IV.4 Investigación de la presencia de plásmidos

A partir de cultivos crecidos en caldo R3 por 24 h y en agitación, se aplicó la técnica de la minipreparación (Sambrook y col., 1989) con el objetivo de evidenciar la presencia de plásmidos en los cultivos degradadores aislados y en *S. paucimobilis* 20006FA. La Figura IV.14 muestra los resultados obtenidos con la minipreparación; la calle nombrada como pM corresponde al patrón de peso molecular del fago λ digerido con la enzima de restricción Hind III. En la Figura IV.14 se observan en las calles correspondientes a las cepas patagónicas 22B y 1A tres bandas definidas (marcadas con flechas rojas) a la altura de la banda de 23130 pb del marcador de peso molecular. En la calle correspondiente *S. paucimobilis* 20006FA se observa una banda con movilidad semejante a una de las bandas de 1A y 22B. Se realizaron minipreparaciones para las cepas degradadoras patagónicas 22A y 36, observándose tres bandas a la misma altura que las cepas 22A y 1A (datos no mostrados). Estos resultados estarían demostrando que las cepas degradadoras de la Patagonia podrían tener al menos un plásmido.

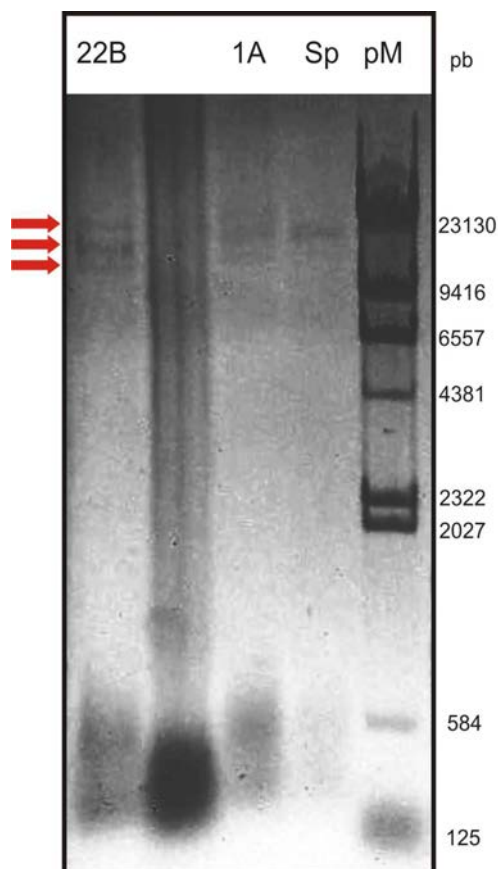


Figura IV.14: Electroforesis en gel de agarosa al 0,8% de los plásmidos presentes en las cepas patagónicas 1A, 22A, 22B, 36 y *S. paucimobilis* 20006FA.

IV.5 Discusión

Con el objetivo de aislar microorganismos degradadores de PAH autóctonos de la Patagonia semiárida, adaptados a las condiciones de hambreado y desecación, y con diversas habilidades para degradar el contaminante, se utilizaron estrategias de aislamiento que tuvieron en cuenta la biodisponibilidad del PAH (Estrategias de aislamiento 1 y 2, Figura IV.1), y la disposición espacial de los microorganismos degradadores dentro del microecosistema del suelo (Estrategias 3 y 4, Figura IV.1). Como resultado se aislaron 8 microorganismos degradadores de PAH, de los cuales 4 fueron seleccionados por presentar el mayor espectro de degradación de PAH. Todas las cepas seleccionadas, 1A, 22A, 22B y 36, pertenecieron al género *Sphingomonas* (*sensu lato*) (Tabla IV.3). La denominación amplia "*sensu lato*" será aplicada a lo largo de todo este capítulo para nombrar a bacterias pertenecientes al género *Sphingomonas*, el cual presenta 4 subgéneros propuestos por Takeuchi, y col. (2001), denominados *Sphingobium*, *Novosphingobium*, *Sphingopyxis* y *Sphingomonas* (*sensu stricto*). *Sphingomonas* es un grupo bacteriano que ha sido aislado a partir de un gran número de muestras ambientales, como suelos prístinos (Kiyohara, 1978; Wada y col., 1989; Coppotelli y col., 2008; Lin y col., 2012) y contaminados (Xia y col., 2005; Vacca y col., 2005; Nagata y col., 2010) de ambientes acuáticos (Nörtemann y col., 1986; Denner y col., 2001), formando parte del plancton marino (Eguchi y col., 1996) y en el trofosoma de un gusano anélido marino (Uchida y col., 2012), en la filósfera (Talá y col., 2013) y rizósfera de plantas (Hashidoko y col., 2007). Se han encontrado además cepas pertenecientes a *Sphingomonas* en muchas muestras de ambientes extremos como los suelos árticos (Thomassin Lacroix y col., 2001) antárticos (Baraniecki y col., 2002), suelos alpinos (Margesin y col., 2012), en costras de suelos de regiones áridas (Reddy & García-Pichel., 2007) y en arena del desierto de Xinjiang, China (An y col., 2011). Han sido descubiertas formando parte de biofilms en agua de bebida (Koskinen y col., 2000), en plantas expuestas a agua contaminada con cobre (Vilchez y col., 2007), e incluso en cortinas de baño (Kelley y col., 2004). Mas aún han sido detectadas en agua de nube (Amato y col., 2007), sobre la Estación Espacial Internacional ISS (Novikova y col., 2006) y en sedimentos a 180-410m por debajo de la superficie terrestre (Fredrickson y col., 1995; Balkwill y col., 1997). Se han encontrado en equipamiento médico (Gomila y col., 2005) y existen algunos reportes sobre infecciones causadas por *Sphingomonas paucimobilis* (Charity y Foukas 2005; Kilic y col., 2007).

Además de la ubicuidad que presentan, el género *Sphingomonas* se caracteriza por su gran diversidad catabólica, siendo capaz de degradar un amplio rango de compuestos aromáticos naturales y de origen antropogénico, como bifenilo, naftaleno, fluoreno, fenantreno, pireno, difeniléter, furano, dibenzo-p-dioxina, carbazol, estradiol, polietileno, glicoles, fenoles (muchos

de éstos pueden estar o no clorados) y diferentes herbicidas y pesticidas (Slotz, 2009). *Sphingomonas* es uno de los principales microorganismos degradadores de PAH presentes en el suelo; siendo aislados con una muy alta frecuencia a partir de cultivos de enriquecimiento realizados con sustratos como PAH como única fuente de carbono y energía (Pinyakong y col., 2000; Mueller y col., 1990; Khan y col., 1996; Baraniecki, 2002; Coppotelli y col., 2008).

Las ventajas metabólicas y/o adaptativas que presentan los microorganismos del género *Sphingomonas* para mineralizar compuestos como PAH podrían tener origen en sus propiedades fisiológicas.

Entre las propiedades fenotípicas que determinaron la separación del género *Sphingomonas*, agrupado anteriormente como *Pseudomonas*, por Yabuuchi y col. (1990) se destacan una benzoquinona particular de cadena larga formada por 10 unidades isoprenoides denominada ubiquinona Q-10, y la presencia única de glicoesfingolípidos en la membrana externa reemplazando a los lipopolisacáridos (LPS) presentes en la mayoría de las bacterias Gram negativo. La parte glicosídica de los glicoesfingolípidos se encuentra orientada hacia afuera de la célula, y es en general mas corta que la correspondiente en los LPS (Kaneko y col., 2000). Morisaki y Eguchi, mediante un ensayo de movilidad electroforética en *Sphingomonas alaskensis* demostraron la poca carga superficial que presenta éste microorganismo (Cavichioli y col., 2003). Basado en estos dos reportes se ha sugerido que la superficie bacteriana en *Sphingomonas* podría ser más hidrofóbica, lo que favorecería la degradación de compuestos hidrofóbicos, como los PAH (Kawahara y col., 1999; Johnsen y Karlson 2004).

Existen algunos reportes en donde se observó que ciertas *Sphingomonas* (*Sphingomonas* sp. A1) poseen una superficie peculiar con grandes pliegues donde las células pueden formar una estructura de “supercanal” la cual permitiría que el microorganismo ingrese compuestos poliméricos tales como alginato (Hashimoto y col., 2005). Aso y col. (2006), incorporando “supercanales” en las membranas de *Sphingomonas* degradadoras de dioxinas y polipropilenglicol (*S. wittichii* RW1 y *S. subarctica* IFO 16058^T respectivamente), mediante ingeniería genética, incrementaron la capacidad de biodegradación de éstos compuestos xenobióticos, sugiriendo que la transferencia de la capacidad de formar esta peculiar estructura podría aumentar la capacidad de biorremediación.

De las 4 cepas de *Sphingomonas* aisladas en el presente trabajo, una de las cepas degradadoras de PAH (36) se aisló a partir cultivos de enriquecimiento, mientras que las 3 cepas restantes, fueron obtenidas mediante aislamiento directo a partir de una suspensión de tierra (1A, 22A y 22B). Utilizando las estrategias que incluyeron cultivos de enriquecimiento con PAH como única fuente de carbono y energía (estrategia 1 y 2) (Figura IV.1) se esperaba encontrar microorganismos del tipo estrategias r, los cuales poseen altas velocidades de crecimiento y se estimulan en ambientes con alta biodisponibilidad y concentraciones de

nutrientes. Mediante la aplicación de técnicas directas de aislamiento (Tabla IV.1) (estrategias 3 y 4) se pretendió recuperar microorganismos estrategas de la k, debido a que suelen ser los predominantes en situaciones de baja biodisponibilidad y limitación de nutrientes.

Los microorganismos pertenecientes al genero *Sphingomonas* se han considerado dentro de los estrategas de la r (Wittman y col., 1998), y se asocian con la degradación en sitios con reciente contaminación con PAH, donde el mismo se encuentra biodisponible y en altas concentraciones (Bastiaens y col., 2000; Friedrich y col., 2000; Grosser y col., 2000; Vanbroekhoven y col., 2004). Muchos autores solo han relacionado géneros bacterianos como *Mycobacterium* como componentes bacterianos mayoritarios en suelos crónicamente contaminados (Leys y col., 2005, Uyttebroek, 2006, Guo y col., 2011); asociando casi exclusivamente a *Sphingomonas* como grupo bacteriano oportunista, presente y de importancia ecológica solo en situaciones de contaminación aguda. La alta frecuencia de aislamientos y predominancia de *Sphingomonas* en suelos contaminados llevó a Leys y col. (2004) a desarrollar una técnica independiente de cultivo la cual le permitió amplificar exclusivamente genes específicos de *Sphingomonas* a partir de suelos crónicamente contaminados con hidrocarburos. Mostró la aparición de cepas de *Sphingomonas* en 5 suelos diferentes, contaminados con altas y bajas concentraciones de PAH, encontrando mayor diversidad de *Sphingomonas* en los suelos con contaminaciones bajas de hidrocarburos. Por otra parte, algunos investigadores han descrito diferentes estrategias presentes en cepas de *Sphingomonas* degradadoras de PAH que podrían incrementar la biodisponibilidad de los mismos. Dentro de éstas estrategias podríamos incluir la capacidad de adhesión a cristales de fenantreno y la producción de biosurfactantes observada en *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA (Coppotelli y col., 2008); la excreción de heteropolisacáridos (sphingans) y formación de biofilms propia de algunas *Sphingomonas* (Johnsen y Karlson 2004; Uyttebroek y col., 2006), y la respuesta quimiotáctica hacia éstos compuestos (Samanta y col., 2002). Si bien no todas éstas propiedades han sido estudiadas en los microorganismos degradadores aislados, se ha comprobado que todos los aislados presentaron quimiotaxis positiva hacia fenantreno y fluoreno (Figura IV.8), propiedad que podría favorecer la biodisponibilidad del contaminante debido a la capacidad de los microorganismos de detectar gradientes químicos y responder a ellos, ubicándose en el mismo de manera de favorecer la degradación del contaminante.

Uyttebroek y col. (2007) estudiaron la estructura y dinámica de comunidades bacterianas en suelos contaminados con PAH, sosteniendo como hipótesis que *Mycobacterium* y *Sphingomonas* ocupan nichos diferentes y que éstos dependen del grado de contaminación, biodisponibilidad, composición y concentración de PAH. Para corroborar el postulado diseñaron dos microcosmos de suelo con condiciones opuestas a las iniciales de acuerdo al perfil y biodisponibilidad de PAH. El suelo que presentaba alta proporción de *Mycobacterium* y PAH

poco biodisponible fue contaminado artificialmente con fenantreno y pireno, y el suelo con un gran número de *Sphingomonas* degradadoras de PAH, un bajo número de *Mycobacterium* y una gran proporción de fenantreno biodisponible fue modificado artificialmente a un suelo con menor biodisponibilidad del contaminante, mediante una extracción que removió la fracción de contaminación biodisponible. En ambos microcosmos, la dinámica de las comunidades de *Sphingomonas* y *Mycobacterium* no siguió lo esperado; evidenciando que la ecología y comportamiento de éstos microorganismos en el suelo es mas compleja que la propuesta inicialmente por estos autores.

Estas observaciones estarían explicando en parte los resultados encontrados en este trabajo de tesis doctoral, donde a partir de suelos de la Patagonia semiárida crónicamente contaminados con PAH, tanto a través de cultivos de enriquecimientos tradicionales como mediante aislamientos directos (Tabla IV.1), todos los aislados degradadores seleccionados pertenecieron al género *Sphingomonas* (Tabla IV.3).

El árbol filogenético obtenido a partir de la comparación de las secuencias del gen 16S rRNA de los aislados seleccionados con secuencias conocidas del mismo gen pertenecientes al género *Sphingomonas* (Figura IV.5) mostró que las cepas patagónicas 1A, 22A y 36 se encuentran filogenéticamente relacionadas, agrupándose en un clúster junto con las cepas degradadoras de fenantreno *Sphingomonas paucimobilis* Sg5 (Vacca y col., 2005), *Sphingomonas paucimobilis* 12H6 (Vacca y col., 2005), *Sphingobium fuliginis* TKP (Prakash y Lal, 2006), *Sphingobium* PNB (Roy y col., 2012) y *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA (Coppotelli y col., 2008); la cepa degradadora de fluoranteno y fenantreno *Sphingomonas* sp. PF-I (Hamann y col., 1999); las cepas degradadoras de 4-ter-butilfenol *Sphingobium fuliginis* TIK-1, TIK-2 y TIK-3 (Toyama y col., 2010); *Sphingobium* YBL1 degradadora del herbicida 3-(4-isopropilfenil)-1,1-dimetilurea (Sun y col., 2008) y *Sphingomonas paucimobilis* M41-VN10-2W degradadora de los ácidos 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y 2,4,5-triclorofenoxiacético (Huong y col., 2007), utilizados como herbicidas.

Sin embargo, los aislados 1A, 22A y 36 mostraron diferencias fisiológicas de resistencia a factores ambientales. Las cepas 1A y 22A fueron aisladas mediante aislamiento directo, y presentaron resistencias considerables a algún o algunos de los factores ambientales estudiados (Tabla IV.10, Figura IV.10, Figura IV.11, Figura IV.12). La cepa 22A fue más resistente al déficit de carbono (Figura IV. 11) y a las condiciones de desecación (Tabla IV.10), y menos eficiente en la degradación de fluoreno (Tabla IV.7), que las demás cepas relacionadas (1A y 36). La cepa 36, aislada utilizando cultivos de enriquecimiento tradicionales (Tabla IV.7), fue la más sensible a las condiciones de desecación (Tabla IV.10) y compartió con la cepa 1A la menor resistencia a las condiciones de hambreado de fuente de carbono, dos de los factores abióticos principales que limitan la biodegradación de las comunidades microbianas en el suelo patagónico. Estos

resultados comprueban lo sugerido por Thompson y col. (2005), que las técnicas de cultivo tradicionales no tienen en cuenta factores ambientales esenciales para que el inoculante sea efectivo en el ambiente blanco.

La cepa degradadora de PAH 22B, aislada mediante aislamiento directo, presentó una posición filogenética diferente que las cepas 1A, 22A y 36 (Figura IV.5), agrupándose en un clúster junto con la cepa *Sphingomonas wittichii* RW1, degradadora de dibenzofurano (Halden y col., 2005), dibenzo-p-dioxina (Wittich y col., 1992) y diaril éter clorados (Wittich y col., 1992; Hong y col., 2002), y con la cepa *Sphingobium japonicum* UT26, degradadora del insecticida recalcitrante γ -hexaclorociclohexano (Nagata y col., 2006). Se comprobó que 22B fue la cepa con mayor resistencia a la desecación ambiental (Tabla IV.10), y que junto con 22A tuvieron una culturabilidad de aproximadamente el 100% al finalizar el ensayo de déficit carbono, indicando una gran resistencia a la ausencia total de fuente de carbono (Figura IV.11). La redundancia de microorganismos degradadores de PAH en el suelo estaría siendo demostrada debido al aislamiento de microorganismos filogenéticamente relacionados con distintas capacidades fisiológicas; la competición por un mismo recurso entre microorganismos estrechamente relacionados se encuentra afectada por las condiciones ambientales del suelo, por lo tanto los competidores con características fisiológicas variadas usualmente pueden coexistir, apoyando la homeostasis del hábitat bajo las condiciones ambientales fluctuantes (Atlas y Bartha 1987).

El grupo bacteriano *Sphingomonas* ha sido caracterizado y aislado de regiones extremas del planeta en las cuales existen condiciones ambientales poco favorables para el desarrollo microbiano (osmótico, hambreado de nutrientes, oxidativo, etc.) (Lester y col., 2007, Baraniecki y col., 2002 Eguchi y col., 1996). Por lo tanto estos microorganismos deben haber sido seleccionados naturalmente a lo largo de la evolución por presentar estrategias para sobrevivir en estos ambientes extremos. A pesar de estas observaciones, pocos autores han estudiado las propiedades metabólicas o fisiológicas que hacen que algunas cepas de la familia de las *Sphingomonas* sean resistentes a factores ambientales.

Los microorganismos pertenecientes al género *Sphingomonas* han sido caracterizados como microorganismos oligotróficos debido a que muchos poseen la capacidad de crecer y sobrevivir en ambientes con bajo contenido de nutrientes (Eguchi y col., 1996; Eguchi y col., 2001; Lauro y col., 2009; Fegatella y Cavichioli 2000; Cavichioli y col., 2003; Vancanneyt y col., 2001; Baraniecki y col., 2002). Se comprobó que tanto los aislados patagónicos degradadores de PAH, y *S. paucimobilis* 20006FA, aislada de suelo de la provincia de Buenos Aires, tuvieron la capacidad de sobrevivir durante 70 días en medios de cultivo con ausencia total de nitrógeno y exceso de fuente de carbono. En concordancia con la resistencia al déficit de nitrógeno encontrada en las cepas degradadoras, Baraniecki y col. (2002) han evidenciado que

Sphingomonas Ant 17 puede crecer y degradar hidrocarburos en suelos de la Antártida, deficientes en fuente de nitrógeno.

Se observó que durante los 85 días de hambreado de fuente de carbono, los cultivos degradadores tuvieron una culturabilidad variable de entre aproximadamente un 20 y 100%, siendo los cultivos 22A y 22B mas resistentes al hambreado y *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA, la cepa mas sensible, obteniendo la menor culturabilidad (3,5%). En analogía, *Sphingomonas sp.* RB2256 ha sido utilizada como modelo de microorganismo oligotrófico, y es sabido que está muy bien adaptado a crecer con bajas concentraciones de nutrientes y resistir grandes períodos de hambreado (Lauro y col., 2009; Eguchi y col., 1996; Cavichioli y col., 2003).

Mediante los ensayos experimentales realizados en el Capítulo IV, pudimos comprobar que algunos de los aislados degradadores de la Patagonia semiárida pertenecientes al género *Sphingomonas* (22A y 22B) mostraron resistencia a la desecación (Tabla IV.10). Los cultivos aislados 1A y 36, al igual que *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA, resultaron ser sensibles a esta condición de estrés. Si bien no se ha analizado la resistencia a la desecación en cepas de *Sphingomonas* estudiadas por otros autores, se han aislado e identificado *Sphingomonas* en muestras de suelo del desierto de Atacama (Lester y col., 2007) y de arena del desierto Xinjiang, en China (An y col., 2011). Sin embargo Baraniecki y col., 2002 han comprobado que *Sphingomonas Ant 17* luego de una hora de exposición a la desecación resultó ser mas sensible que *E.coli*, cepa utilizada como cepa sensible a ésta condición de estrés. Por lo tanto podemos sugerir que la resistencia a la desecación podría ser una propiedad variable, no siendo una característica del género, sino más bien una propiedad beneficiosa adquirida mediante selección natural.

Por otro lado, se ha encontrado que las cepas degradadoras aisladas tuvieron la capacidad de crecer en un rango de pH de 4-10, y dar indicios de degradación del contaminante entre pH 6-9. Mediante búsqueda bibliográfica pudimos corroborar que existen *Sphingomonas* que poseen la capacidad de crecer tanto a pH ácidos (Qu y col., 2006; Talá y col., 2012), ácidos y alcalinos (Huo y col., 2011; Kim y col., 2003; Baraniecki y col., 2002; Zhang, 2010) o a pH alcalinos (Chung y col., 2011).

La resistencia a la salinidad generada por el agregado de diferentes concentraciones de NaCl en el medio R2 se ha evaluado en las cepas degradadoras de PAH aisladas, donde se observó cierta sensibilidad al NaCl debido a una disminución de la velocidad de crecimiento en los medios suplementados con mas de 1,5% de NaCl, sin observar crecimiento alguno con 5% de NaCl. En concordancia *Sphingomonas Ant 17* resultó ser sensible al NaCl suplementado en caldo R2 (Baraniecki y col., 2002). Por otra parte 7 cepas pertenecientes al género *Sphingomonas* se han aislado de los mares de Alaska y se ha visto que pueden crecer con

concentraciones de hasta 3% de NaCl (Vancanneyt y col., 2001). Recientemente Fida y col. (2012) realizaron un estudio del transcriptoma de la bacteria degradadora de fenantreno *Sphingomonas sp.* LH128 en biofilms sometidos a estrés osmótico mediante una solución de 450 mM de NaCl, durante 4 h y 3 días de exposición. Encontraron diferencias en la expresión de genes entre las células recientemente estresadas con respecto a las crónicamente estresadas, sugiriendo que LH128 atraviesa por cambios en la expresión de los genes mientras se adapta al estrés por NaCl.

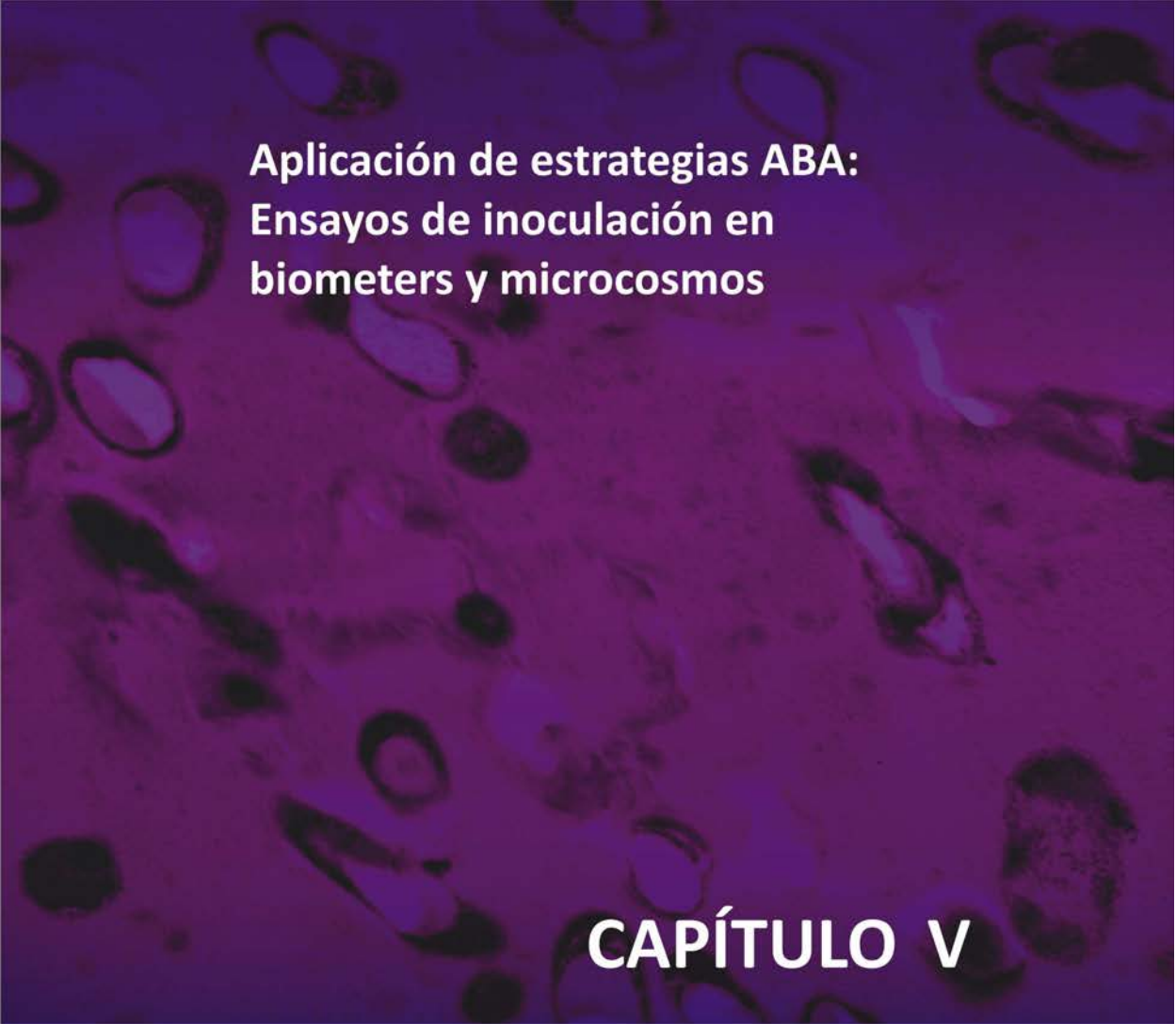
En resumen, los resultados encontrados hasta el momento nos dan indicios que mientras los microorganismos del género *Sphingomonas* podrían ser descritos como genéricamente oligotróficos, presentan capacidades variadas de resistencia a otros factores ambientales y abióticos como la desecación, la salinidad y el pH. Las capacidades de resistencia en su mayoría deben haber sido adquiridas y conservadas en estos microorganismos por las ventajas que les confieren para sobrevivir y desarrollarse en el sitio de donde fueron aisladas.

Hemos visto a lo largo de la discusión que bacterias pertenecientes a *Sphingomonas* han sido aisladas de ambientes extremadamente diversos, y algunos de éstos contaminados con compuestos xenobióticos. Se comprobó que la propiedad de degradar compuestos recalcitrantes se mantiene en un gran número de especies de *Sphingomonas* y que comparten la misma ruta de degradación de PAH (Stolz, 2009). Los genes degradadores de *Sphingomonas* además, están muy poco relacionados con los genes ortólogos pertenecientes a otras bacterias degradadoras como *Pseudomonas*, *Burkholderia*, o *Rhodococcus* (Pinyakong y col., 2003).

Los mecanismos por los cuales las bacterias de la familia de las *Sphingomonas* mantienen la propiedad degradadora y la misma ruta de degradación de PAH, podrían explicarse en parte por la organización de la información genética. Muchas cepas pertenecientes al género *Sphingomonas* poseen grupos de genes para la degradación de PAH muy similares en cuanto a homología de secuencia y organización genética. Los genes degradadores en *Sphingomonas* suelen estar dispersos y dispuestos en forma compleja a través de varios grupos de genes, poco regulados y poco coordinados (Pinyakong y col., 2003, Habe y Omori 2003; Pieper 2005). Se han identificado elementos genéticos de inserción y transposones (IS6100, IS3, IS4, IS21, IS66) (Dogra y col., 2004; Stolz 2009) en *Sphingomonas* degradadoras de xenobióticos los cuales podrían estar involucrados en re-arreglos genéticos observados por Basta y col. (2004) en plásmidos de *Sphingomonas sp.* HH69 y *Sphingomonas sp.* SS3, y en las diferencias de ubicación observadas en genes conservados de *Sphingomonas*. Se ha corroborado que IS6100 está presente en múltiples copias en *S. paucimobilis* degradadoras de hexaclorociclohexano y ausente en *S. paucimobilis* ATCC 29837r no degradadora, y que es importante en la expresión, organización y estabilidad de los genes vinculados con la

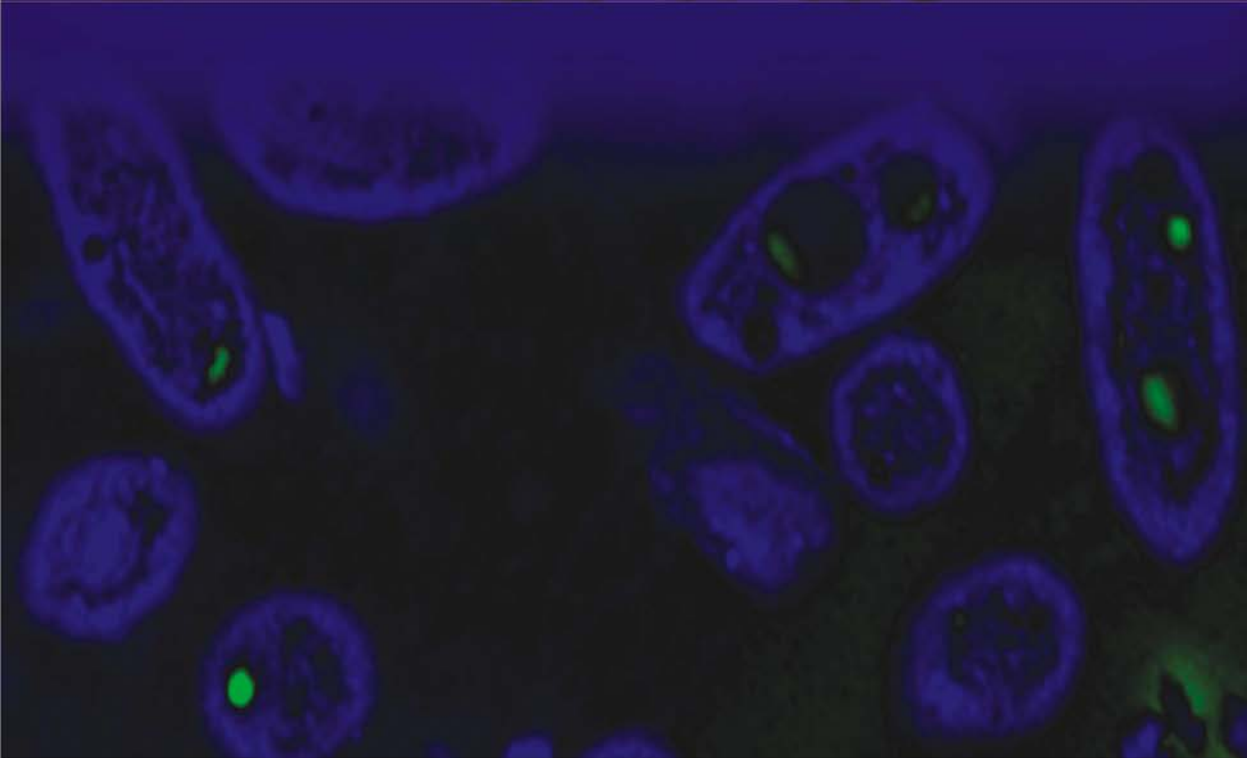
degradación del contaminante (*lin*) (Dogra y col., 2004). Los genes degradadores pueden estar ubicados además en el cromosoma y/o en plásmidos (Basta y col., 2005, Nagata y col., 2010), siendo algunos plásmidos degradativos, conjugativos y específicos para este género bacteriano (Romine y col., 1999; Nagata y col., 2006).

La observación de que los plásmidos degradativos encontrados en cepas de *Sphingomonas* son transferidos por conjugación específicamente a otras *Sphingomonas* disminuiría la transferencia horizontal de genes de *Sphingomonas* a otras bacterias. Esta es una de las razones más importantes de la acumulación de cepas degradadoras de PAH pertenecientes a *Sphingomonas* con gran semejanza entre los genes degradativos y la pobre similitud entre los genes degradativos de otras proteobacterias. Una posible explicación de las restricciones en la transferencia de plásmidos desde *Sphingomonas* a otras *proteobacterias* podría ser la composición de la membrana externa de *Sphingomonas* (Basta y col., 2004). Por lo tanto, se podría sugerir que la propiedad de degradación de PAH en microorganismos del género *Sphingomonas* sería transmitida, frente o no a una presión de selección dada por el contaminante, mediante conjugación desde *Sphingomonas* degradadoras de PAH (donora) hacia *Sphingomonas* con características diversas de resistencia a factores ambientales (acceptora), dando como resultado una gran diversidad de *Sphingomonas* resistentes a factores ambientales, degradadoras de PAH. Si bien no hemos determinado que el o los plásmidos presentes en las cepas patagónicas (Figura IV.14) tengan genes relacionados con la degradación de PAH ni tampoco que sean plásmidos conjugativos, se observaron tres bandas con igual movilidad electroforética en todas las cepas patagónicas degradadoras. Debido a que los plásmidos circulares poseen diferentes grados de superenrollamiento, no se pudo determinar si las bandas corresponden a un plásmido con tres grados diferentes de superenrollamiento o tres plásmidos diferentes. Lo que sí se observó fue que la movilidad/es electroforética/s del o los plásmido/s fueron las mismas en todas las cepas patagónicas degradadoras, que mostraron resistencia variables a distintos factores ambientales.



**Aplicación de estrategias ABA:
Ensayos de inoculación en
biometers y microcosmos**

CAPÍTULO V



V. Aplicación de Estrategias ABA: ensayos de inoculación en biometers y microcosmos

El bioaumentación es una de las estrategias utilizadas en los procesos de biorremediación de suelos contaminados para acelerar la velocidad y el grado de biodegradación de los contaminantes; particularmente la estrategia de bioaumentación ABA utiliza microorganismos degradadores autóctonos (Hosowaca y col., 2009). La estrategia incluye el aislamiento de microorganismos degradadores del contaminante a partir de la misma muestra de suelo a decontaminar, la obtención de biomasa activa de los microorganismos seleccionados mediante crecimiento en medios de cultivo específicos, y finalmente la inoculación en altas concentraciones, una o varias veces, en el suelo a sanear. El objetivo de éste proceso es el de acelerar la eliminación del contaminante evitando las desventajas competitivas con las que se enfrentan los microorganismos exógenos cuando son inoculados en suelos foráneos.

A pesar de que los microorganismos degradadores seleccionados por una estrategia ABA pueden ser prometedores para ser utilizados como inoculantes, el éxito del proceso de biorremediación dependerá de muchos factores, siendo los ambientales unos de los determinantes de la actividad biológica de los microorganismos inoculados. Los factores ambientales se pueden diferenciar en dos categorías generales, los que reducen la actividad microbiana y los que restringen la transferencia de masa de los compuestos hacia los microorganismos (Vogel, 1996). En suelos de la Patagonia semiárida dos de los principales factores ambientales que reducen la actividad microbiana son: la baja actividad acuosa, que además de disminuir la biodisponibilidad del agua genera una alta presión osmótica en los suelos; y el bajo contenido de nutrientes. Las condiciones de desecación típicas de los suelos patagónicos limitarían además la transferencia de masa de los nutrientes hacia los microorganismos.

El objetivo de este Capítulo fue determinar la efectividad de estrategias ABA bajo diferentes condiciones ambientales utilizando los microorganismos aislados en el Capítulo IV, los cuales mostraron propiedades fisiológicas, degradación de PAH y resistencia al hambre de nutrientes y desecación, que permitirían considerarlos como potenciales inoculantes para ser utilizados en suelos de la Patagonia semiárida contaminados con PAH. Los estudios preliminares fueron realizados en sistemas biometers con suelo patagónico, contaminado artificialmente con fenantreno e inoculado con las cepas 1A, 22A y 22B. Los resultados de los ensayos preliminares fueron utilizados en la selección del inoculante más apto para ser desafiado en microcosmos de suelos patagónicos contaminados con fenantreno y mantenidos bajo condiciones semiáridas.

V.1 Sistemas biometers: efecto de estrategias ABA sobre la mineralización y eliminación del fenantreno

Se estudió el efecto de la inoculación con las cepas patagónicas 1A, 22A y 22B, sobre la eliminación del fenantreno y la mineralización inducida por el agregado del mismo, utilizando sistemas biometers con la muestra de suelo PT2372 artificialmente contaminada con 2000 ppm de fenantreno, bajo tres condiciones ambientales:

- Suelo Natural (SN), con una relación C:N:P de 100:2,2:0,26 y 10% (p/p) de agua.
- Suelo Fertilizado (SF), con una relación C:N:P de 100:5:2 y 10% (p/p) de agua.
- Suelo Regado (SR), con una relación C:N:P de 100:2,2:0,26 y 15% (p/p) de agua.

Los sistemas biometers fueron mantenidos por 30 días a 24°C.

En los sistemas donde se corrigieron las condiciones ambientales, las mismas fueron mantenidas en condiciones sub-óptimas. En el caso de la fertilización los sistemas todavía mostraron un déficit de nitrógeno con respecto a la relación C:N 100:10, considerada óptima (Cleveland y col., 2007). En cuanto a los porcentajes de humedad utilizados en estos ensayos, 10 y 15%, los mismos correspondieron respectivamente al 20 y 25% de la capacidad de retención de agua del suelo (WHC). Estos valores se encuentran bastante alejados de los porcentajes de WHC considerados óptimos para procesos de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos (40 al 70%) (Holman y Tsang, 1995; Viñas y col., 2005).

La inoculación con la cepa 36 no se realizó debido a que, según los ensayos descritos en el Capítulo IV, resultó ser sensible a las condiciones ambientales típicas de la Patagonia semiárida.

Los resultados fueron comparados con un ensayo de inoculación realizado bajo las mismas condiciones con el microorganismo exógeno *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA (Sp) (Coppotelli y col., 2008).

Como controles se utilizaron sistemas biometers con la muestra de suelo PT2372 contaminada y sin inocular, en las mismas condiciones ensayadas.

La Tabla V.1 muestra la nomenclatura utilizada para nombrar a cada sistema biometer y detalla las características experimentales de los mismos.

Tabla V.1: Detalle de las características experimentales de los sistemas biometer

Sistema Biometer	Cepa inoculada	Humedad relativa porcentual	Fertilizante
SN-1A	1A	10	----
SN-22A	22A	10	----
SN-22B	22B	10	----
SN-Sp	Sp	10	----
SN-C	-----	10	----
SF-1A	1A	10	SI
SF-22A	22A	10	SI
SF-22B	22B	10	SI
SF-Sp	Sp	10	SI
SF-C	-----	10	SI
SR-1A	1A	15	----
SR-22A	22A	15	----
SR-22B	22B	15	----
SR-Sp	Sp	15	----
SR-C	-----	15	----

SN-C, SF-C y SR-C se utilizaron como biometers control. -----: no agregado

Los resultados del efecto de la inoculación con las cepas patagónicas degradadoras de PAH 1A, 22A y 22B y la cepa exógena Sp, sobre la mineralización inducida por fenantreno bajo las tres condiciones ambiente SN, SF y SR se muestra en la Figura V.1.

La Tabla V.2 agrupa los valores de porcentaje de eliminación de fenantreno y producción total de CO₂ (µmoles CO₂/g suelo seco) obtenidos en los biometers luego de 30 días de incubación.

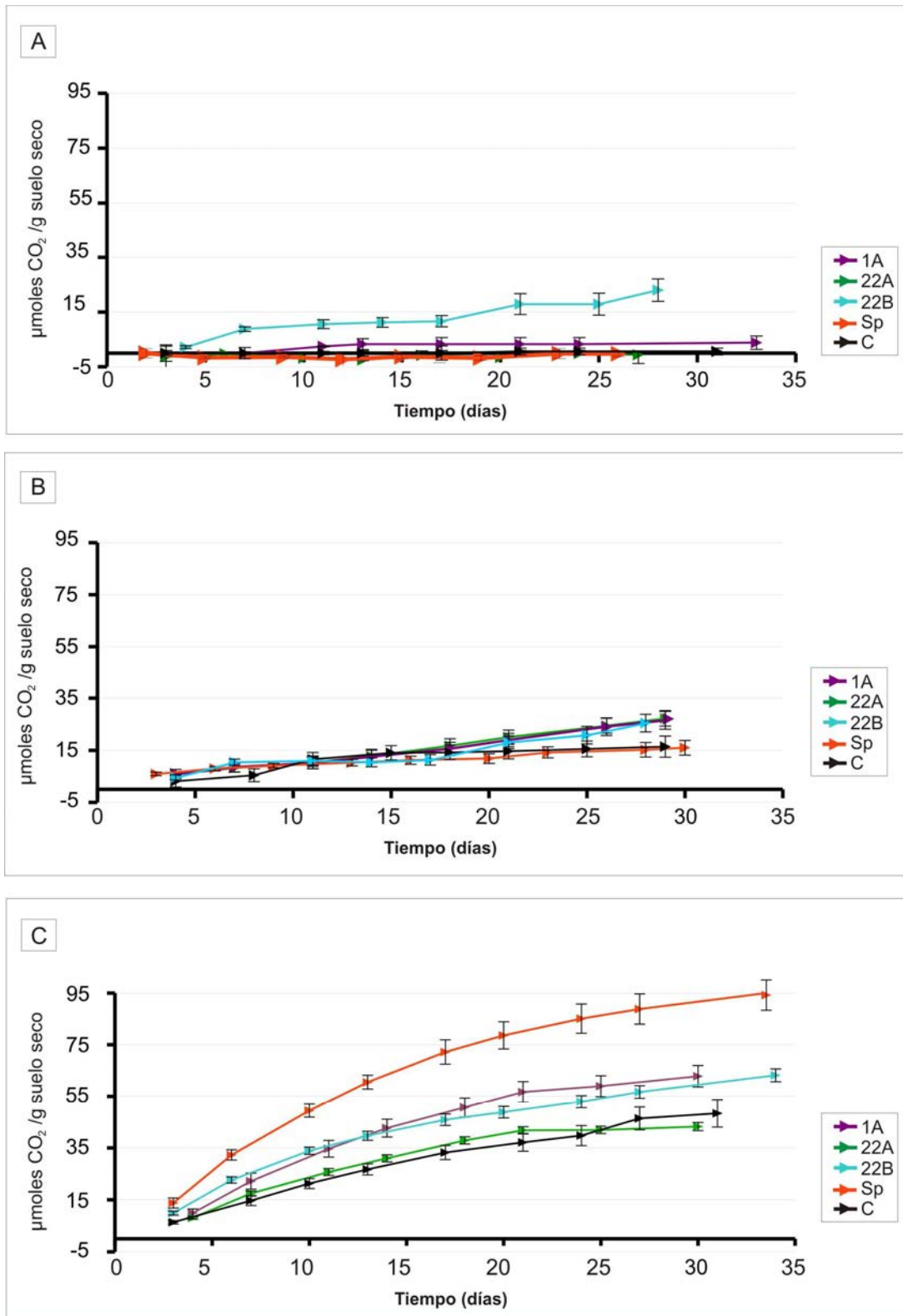


Figura V.1: Efecto de la inoculación con las cepas patagónicas degradadoras de PAH 1A, 22A y 22B y la cepa Sp en la mineralización inducida por fenantreno bajo las tres condiciones ambiente SN, SF y SR. **(A):** Condición SN. **(B):** Condición SF. **(C):** Condición SR. Los resultados del sistema no inoculado (C) se utilizaron como control del proceso. Los valores así obtenidos provienen del promedio de tres ensayos independientes. Las barras sobre los puntos representan las desviaciones estándar.

Tabla V.2: Porcentaje de eliminación de fenantreno y producción total de CO₂ (µmoles CO₂/g suelo seco) luego de 30 días de incubación de las cepas 1A, 22A, 22B y Sp en sistemas biometers, sometidos a las diferentes condiciones ambiente SN, SF y SR.

Sistema Biometer	Porcentaje de eliminación de fenantreno	µmoles CO ₂ /g suelo seco
SN-C	17,59 ± 1,45 ^a	2,24 ± 1,57 ^a
SN-1A	21,18 ± 3,65 ^a	4,17 ± 2,43 ^a
SN-22A	12,14 ± 0,79 ^a	1,74 ± 1,23 ^a
SN-22B	13,8 ± 5,17 ^a	23,01 ± 4,05 ^b
SN-Sp	17,15 ± 3,5 ^a	3,62 ± 0,85 ^a
SF-C	ND	16,41 ± 4,02 ^c
SF-1A	ND	26,49 ± 3,41 ^b
SF-22A	ND	27,23 ± 2,99 ^b
SF-22B	ND	25,47 ± 3,39 ^b
SF-Sp	ND	15,95 ± 2,80 ^c
SR-C	32,48 ± 7,22 ^d	48,35 ± 5,31 ^e
SR-1A	56,85 ± 10,71 ^{b, c}	62,79 ± 4,17 ^d
SR-22A	36,59 ± 5,19 ^d	43,24 ± 1,58 ^e
SR-22B	72,98 ± 11,13 ^b	63,15 ± 2,46 ^d
SR-Sp	51,29 ± 13,00 ^c	95,46 ± 5,99 ^f

ND: No determinado. Los valores son promedio de tres ensayos independientes (desviación estándar). El análisis estadístico fue realizado entre los biometers pertenecientes a la misma condición ambiente y entre los biometers inoculados con la misma cepa bajo las diferentes condiciones ambiente. Los valores seguidos con la misma letra no son significativamente diferentes, P>0,05.

En el sistema SN-C, típicamente bajo condiciones de desecación y déficit de N y P, la eliminación de fenantreno fue menor al 20% (Tabla V.2). En concordancia se observó una baja producción de CO₂, luego de 30 días de tratamiento (Figura V.1 (A); Tabla V.2). La inoculación de las cepas 1A, 22A y Sp, bajo estas mismas condiciones ambientales, no produjo cambios significativos en la producción de CO₂ (Tabla V.2). Sí se observó un efecto estimulador significativo ($P < 0,05$) en la mineralización inducida por la incorporación del fenantreno en el sistema SN-22B (Tabla V.2), aunque éste efecto no se vio acompañado con un aumento en el porcentaje de eliminación de fenantreno, el cual no presentó diferencias significativas ($P > 0,05$) con el control ni con los sistemas SN-1A, SN-22A y SN-Sp. (Tabla V.2).

Los resultados de los sistemas FPS mostraron que la incorporación de N y P al suelo patagónico causó un efecto estimulador significativo ($P < 0,05$) en la mineralización inducida por el fenantreno en los sistemas biometer SF-1A, SF-22A y SF-C, al compararlos con los respectivos sistemas en condiciones naturales (SN). La fertilización no modificó significativamente ($P > 0,05$) los valores del CO₂ total producido en SF-22B con respecto a SN-22B. En estas condiciones (SF) todos los sistemas inoculados con las cepas patagónicas llegaron a obtener valores de CO₂ total producido significativamente mayores al biometer SF-C.

La cuantificación del porcentaje de eliminación de fenantreno no pudo determinarse en los sistemas biometer SF debido a inconvenientes experimentales. Se consideró innecesario realizar nuevamente el ensayo debido a que los $\mu\text{moles CO}_2/\text{g}$ suelo seco formados en los sistemas SF fueron similares a los obtenidos con el biometer SN-22B, el cual obtuvo un porcentaje de eliminación de fenantreno muy bajo y similar a su respectivo control (Tabla V.2).

Un importante efecto estimulador se observó en la mineralización inducida por el contaminante para todos los sistemas, incluyendo el sistema control SR-C, cuando el contenido de agua fue incrementado al 15% (p/p). En éstas condiciones la producción de CO₂ total y el porcentaje de eliminación de fenantreno, luego de 30 días de incubación, fueron significativamente mayores ($P < 0,05$) a los valores obtenidos para los correspondientes sistemas SN y SF.

Cuando el estrés hídrico fue parcialmente corregido, la producción de CO₂ de los sistemas SR-Sp, SR-1A y SR-22B fue significativamente mayor ($P < 0,05$) que la obtenida en los sistemas SR-C y SR-22A. En concordancia, los sistemas SR-1A, SR-22B y SR-Sp mostraron un porcentaje de eliminación de fenantreno significativamente mayor ($P < 0,05$) que los sistemas SR-C y SR-22A (Tabla V.2).

A pesar que el sistema biometer SR inoculado con la cepa degradadora *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA (SR-Sp) mostró una mayor producción de CO₂ que el sistema SR inoculado con la cepa patagónica 22B (SR-22B), el porcentaje de eliminación de fenantreno fue significativamente mayor en el sistema biometer SR-22B.

A partir de los resultados mostrados en la Tabla V.2, la ecuación estequiométrica de mineralización del fenantreno (Ecuación V.1) y considerando que la mineralización del 60% de la molécula de fenantreno por parte un microorganismo degradador se aproximaría al consumo total de la misma (García-Junco y col., 2003) (el 40% del carbono restante se destina para la formación de biomasa); se calculó para los sistemas biometers la cantidad de CO₂ teórico en función de la degradación de fenantreno determinada y se lo comparó con la cantidad de CO₂ obtenida experimentalmente (Tabla V.3).



Los resultados de la Tabla V.3 muestran que a excepción del sistema SR-22B, en todos los biometers en donde el estrés hídrico fue parcialmente corregido, los valores de CO₂ obtenidos experimentalmente fueron mayores que los valores teóricos esperados. En la Tabla IV.1 se observa que la muestra de suelo PT2372 utilizada para la preparación de los sistemas biometers tenía una contaminación crónica basal de 7456 mg/kg de hidrocarburos, por lo que podríamos inferir que tanto en el sistema control, como en los sistemas inoculados con las cepas 1A, 22A y Sp, la incorporación de agua estimuló el consumo de otras fuentes de carbono presentes en el suelo, además del fenantreno agregado artificialmente, tanto por la comunidad microbiana indígena como por los inoculantes.

El sistema SR-22B mostró un comportamiento diferente, ya que el valor CO₂ obtenido experimentalmente fue menor al calculado teóricamente. Los 139 mg de CO₂ obtenidos experimentalmente en este sistema corresponderían estequiométricamente a la mineralización del 55% del fenantreno consumido. Si bien se necesitan futuros estudios para aclarar estos aspectos, los resultados podrían sugerir que en el sistema inoculado con la cepa 22B, el CO₂ obtenido provendría exclusivamente de la degradación de fenantreno, y por lo tanto la inoculación con la cepa 22B produciría un cambio en la comunidad microbiana del suelo hacia una comunidad altamente especializada en la degradación de fenantreno.

Tabla V.3: Miligramos de CO₂ por biometer obtenidos experimentalmente y calculados teóricamente según la estequiometría de la ecuación 2 y considerando un 60% de mineralización de la molécula de fenantreno.

Sistema biometer	mg CO ₂ teórico	mg de CO ₂ experimental
SR-1A	117,6	138,1
SR-22A	76,2	95,1
SR-22B	151,6	139
SR-Sp	106,5	210
SR-C	67,2	110

V.2 Determinación del espectro de degradación de hidrocarburos e incursión en el estudio de la vía de degradación de fenantreno presente de la cepa *Sphingobium sp. 22B*

V.2.1 Degradación de hidrocarburos lineales y mezclas complejas

La cepa 22B fue inoculada en medios de cultivo líquidos suplementados con hexadecano, (tomado como modelo de hidrocarburo lineal), gasoil y petróleo (mezclas complejas de hidrocarburos), como única fuente de carbono y energía. Los cultivos se mantuvieron por 21 días en agitación a 28°C.

Los cultivos con hexadecano e inoculados con la cepa 22B no mostraron ningún indicio de crecimiento (turbidez) luego de 21 días de incubación.

Se observó la aparición de color anaranjado-pardo en los medios de cultivo suplementados con gasoil y petróleo. En los medios con gasoil además se apreció la aparición de turbidez propia del crecimiento microbiano. Es sabido que tanto el petróleo como muchos de sus derivados como el gasoil, contienen mezclas de hidrocarburos policíclicos aromáticos, siendo su proporción variable de acuerdo al origen del yacimiento, por lo tanto podríamos suponer que el color observado en los medios de cultivos provendría de los productos de degradación de los PAH.

Con los resultados observados se consideró que la cepa 22B fue capaz de crecer en mezclas complejas de hidrocarburos como gasoil y petróleo utilizando probablemente los PAH contenidos en los mismos, pero no de desarrollar crecimiento en medios de cultivos

suplementados con el hidrocarburo lineal hexadecano como única fuente de carbono y energía.

V.2.2 Ensayo de determinación de compuestos intermediarios de la vía de degradación del fenantreno

Con el objetivo de incursionar en la vía de degradación del fenantreno presente en la cepa *Sphingobium sp.*22B ésta fue inoculada en MML con 100 mg/l de fenantreno como única fuente de carbono y energía. Luego de 24 h de incubación a 30°C se realizó una extracción neutra utilizando acetato de etilo para extraer el fenantreno y los posibles productos de degradación, y luego el mismo cultivo se llevó a pH 2,5 y se realizó una segunda extracción con acetato de etilo con el fin de extraer productos de degradación ácidos. Se cuantificó mediante HPLC el contenido de fenantreno, ácido salicílico y ácido 1-hidroxi-2-naftóico en los extractos. El mismo ensayo fue realizado para los cultivos control (100 mg/l de fenantreno en MML).

Se realizó un cultivo en MML utilizando salicilato de sodio como única fuente de carbono para evidenciar la presencia de una ruta de mineralización completa del fenantreno en la cepa 22B.

Los resultados mostraron en el extracto neutro la presencia de $35,1 \pm 10,0$ mg/l de fenantreno (35% del fenantreno adicionado), a diferencia del sistema control que contenía $96,8 \pm 2,8$ mg/l de fenantreno (96,8% de la concentración inicial).

La suma de ácido 1-hidroxi-2-naftóico extraído en el extracto neutro y ácido dio un total de $14,1 \pm 2,4$ mg/l. El análisis del extracto ácido mostró la presencia de $2,3 \pm 0,4$ mg/l de ácido salicílico, producto de degradación derivado de la ruta de metaclivaje que presente en la mayoría de las bacterias Gram negativo (Seo y col., 2006).

Por otro lado, se comprobó el crecimiento de la cepa 22B en cultivos con salicilato como única fuente de carbono y energía mediante la aparición de turbidez.

Los resultados obtenidos demuestran que *Sphingobium sp.* 22B, al igual que la mayoría de las cepas de *Sphingomonas* degradadoras de PAH estudiadas hasta el momento (Martínez, 2010) degradan el fenantreno vía ácido 1-hidroxi-2-naftóico, siguiendo la degradación de este compuesto a través de la ruta del metaclivaje y llegando hasta ácido salicílico. La capacidad de la cepa de crecer con salicilato como UFC sugiere que la cepa es capaz de mineralizar el fenantreno.

V.3 Ensayos de inoculación con la cepa *Sphingobium sp.* 22B en microcosmos de suelo Patagónico artificialmente contaminado con fenantreno

Los resultados de la resistencia a la desecación ambiente, al déficit de carbono y nitrógeno (Sección IV.3.B.B, IV.3.C, IV.3.D), y el incremento significativo en la mineralización inducida por el fenantreno en los biometers NS-22B (Sección V.1.A), demostrarían que la cepa patagónica 22B posee ventajas adaptativas frente a las condiciones ambientales de la Patagonia semiárida. Estas observaciones junto la presencia de una vía de degradación completa de fenantreno, sugirieron que *Sphingobium sp.* 22B podría ser un buen inoculante para ser utilizado en suelos de la Patagonia semiárida contaminados con PAH.

La falta de eliminación del fenantreno observada en los biometers inoculados con la cepa 22B bajo condiciones naturales (SN-22B) (Sección V.1.A), podría deberse a la limitada aireación que poseen éstos sistemas, lo que suele generar valores subestimados en la eliminación del contaminante. Por lo tanto, y para independizarnos del posible error creado por el diseño experimental en los biometers, se estudió la capacidad de eliminar el contaminante por parte de la cepa 22B en microcosmos de suelo patagónico contaminado con fenantreno.

V.3.1 Condición suelo natural (SN)

Se utilizó la muestra de suelo PT2372, la cual fue contaminada con 2000 ppm de fenantreno, con una relación C:N:P de 100:2,2:0,26 y 10% (p/p) de agua e inoculada con la cepa *Sphingobium sp.* 22B ($1,4 \times 10^8$ ufc/g de suelo seco) (F+22B). El ensayo se realizó por triplicado utilizando como control microcosmos contaminados no inoculados (F), incubados bajo idénticas condiciones ambientales. Los microcosmos fueron monitoreados mediante recuentos de bacterias heterótrofas cultivables y degradadoras de PAH, extracción y cuantificación de la concentración de fenantreno remanente y actividad deshidrogenasa. Se estudió además, el efecto del fenantreno, la inoculación y la condición ambiental sobre la dinámica de las comunidades bacterianas del suelo de los microcosmos F y F+22B mediante perfiles de PCR-DGGE.

Los resultados de los recuentos de bacterias heterótrofas cultivables y degradadoras de PAH en los microcosmos F y F+22B durante el tiempo del ensayo se muestran en la Figura V.2. Se observó que ni la adición de fenantreno ni la inoculación con la cepa 22B provocaron aumentos significativos en los recuentos de heterótrofas cultivables en los microcosmos F y F+22B, bajo la condición SN. Los recuentos de bacterias degradadoras de PAH (Figura V.2) mostraron un importante e inmediato incremento (cerca de tres órdenes de magnitud), en el microcosmo inoculado (F+22B); seguido de una rápida disminución a los 9 días de incubación. En el día 9

del ensayo el número de degradadoras de PAH en el microcosmos F+22B llegó a un valor de entre 10^3 - 10^4 NMP ml^{-1} el cual se mantuvo constante durante el tiempo del ensayo.

Se observó que en el caso del microcosmo sin inocular F, hubo un incremento en el número de bacterias degradadoras de PAH a los 8 días de agregado del fenantreno. Luego de los 8 días de incubación las poblaciones degradadoras de PAH en el microcosmo F disminuyeron a valores significativamente menores que el microcosmo F+22B.

La Figura V.3 muestra los resultados de la concentración de fenantreno en los microcosmos F y F+22B. Se observa que luego de 60 días de incubación bajo la condición SN no hubo eliminación de fenantreno, ni en el microcosmo control, ni en el inoculado.

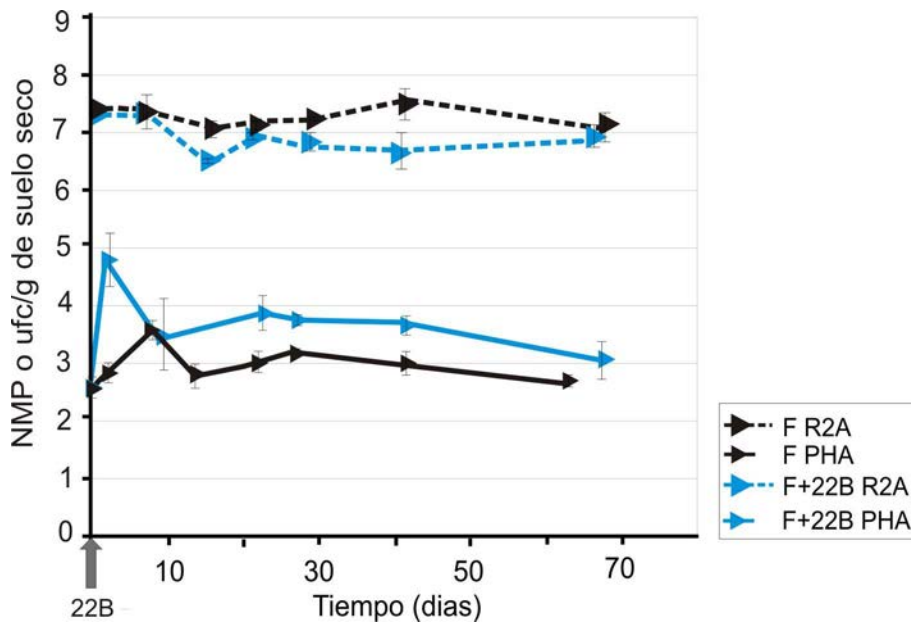


Figura V.2: Recuentos de bacterias degradadoras de PAH (NMP/g) y de heterótrofas cultivables (ufc/g) en los microcosmos F y F+22B, bajo las condición ambiente SN. El valor obtenido es el promedio de tres determinaciones independientes. Las barras representan las desviaciones estándar.

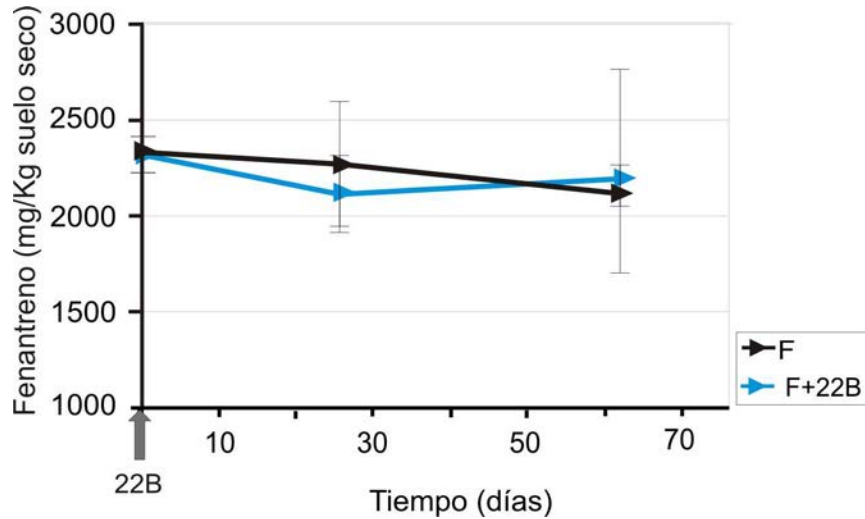


Figura V.3: Concentración de fenantreno en los microcosmos F y F+22B bajo la condición SN. La concentración fue determinada por HPLC. El valor obtenido es el promedio de tres determinaciones independientes. Las barras representan las desviaciones estándar.

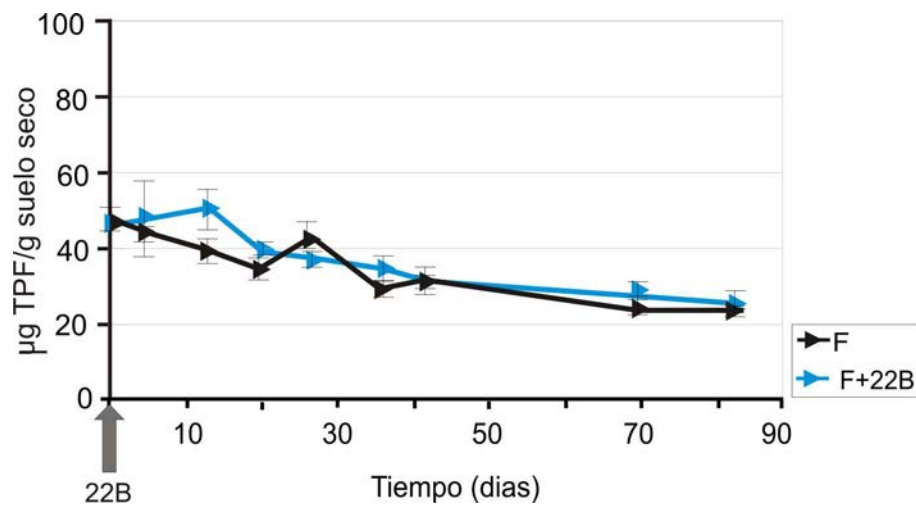


Figura V.4: Actividad deshidrogenasa (μg de TPF por g suelo seco) determinada por el análisis de la reducción del TTC a TPF de los microcosmos F y F+22B bajo las condición SN. El valor obtenido es el promedio de tres determinaciones independientes. Las barras representan las desviaciones estándar.

La Figura V.4 muestra la actividad deshidrogenasa en los microcosmos F y F+22B sometidos a la condición SN. Ambos microcosmos mostraron que la incorporación de fenantreno no causó un efecto estimulador en la actividad deshidrogenasa, contrariamente se observó un decrecimiento constante en la actividad deshidrogenasa durante los 85 días de incubación, tanto en el sistema inoculado como en el no inoculado.

El análisis de la dinámica de las comunidades bacterianas en los microcosmos F y F+22B a los 0, 11 y 62 días de incubación se muestran en los perfiles PCR-DGGE de la Figura V.5. Los patrones de DGGE obtenidos fueron utilizados para estimar los índices de diversidad de Shannon (H') agrupados en Tabla V.4.

La inspección visual de los perfiles de DGGE del microcosmos F muestra que la incorporación de fenantreno no produjo cambios detectables en la diversidad genética de las comunidades bacterianas del suelo bajo la condición SN (Figura V.5), en concordancia los índices de diversidad de Shannon (H') para los distintos tiempos del ensayo fueron muy similares entre sí y con respecto al perfil del suelo patagónico (Tabla V.4).

La inoculación con la cepa 22B generó pocos cambios en el perfil de DGGE del microcosmos F+22B, con respecto al microcosmos no inoculado (F), en la imagen del gel se puede observar que el perfil y el número de bandas que contiene el sistema inoculado (SN 22B) es muy similar al perfil y el número de bandas correspondientes al sistema SN sin inocular. La modificación mas importante observada fue la aparición de una banda intensa que mostró la misma posición en el gel de DGGE que la cepa 22B (Figura V.5). Esto causó una disminución aparente del índice de diversidad de Shannon (Tabla V.4), debido a que éste índice considera tanto el número de unidades taxonómicas (OTUs) (en este caso bandas) presentes en una comunidad, como el número de individuos de cada OTU (intensidad de la banda). La banda intensa que apareció en el microcosmos inoculado fue cortada, reamplificada y clonada, y su secuencia parcial del gen 16S rRNA reveló un 99% de similitud filogenética con la secuencia de la cepa *Sphingomonas* sp. 22B.

Bajo condiciones áridas ni la contaminación con fenantreno ni la inoculación, produjeron cambios drásticos en la estructura de las comunidades del suelo en los microcosmos F y F+22B (Figura V.5), a diferencia de los resultados encontrados en otros ensayos de bioaumentación que utilizaron estrategias de inoculación similares (Coppotelli y col., 2008; Ibarrolaza y col., 2009), bajo condiciones óptimas de humedad relativa.

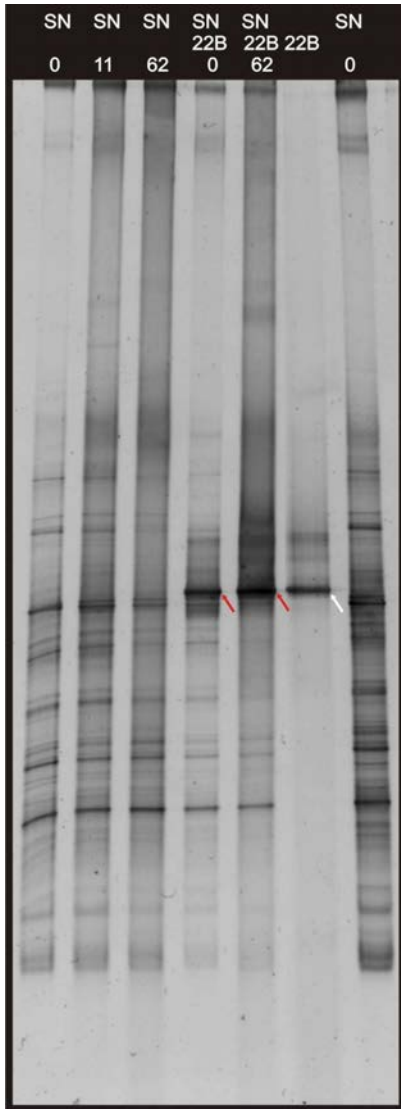


Figura V.5: Perfiles PCR-DGGE de las comunidades bacterianas de los microcosmos F y F+22B bajo la condición ambiental SN a los 0, 11 y 62 días de ensayo. 22B: Cepa 22B. La flecha blanca indica la banda perteneciente al inóculo y las flechas rojas indican las bandas que corrieron a la misma altura que la del inóculo, la cual fue cortada del gel, reamplificada y clonada. La secuencia parcial del gen 16S rRNA reveló que posee 99% de similitud filogenética con la secuencia de *Sphingomonas* sp. cepa 22B.

Tabla V.4: Diversidad genética (H') de las comunidades bacterianas del suelo a los 0, 11, 62, bajo la condición ambiental SN

Sistema	Tiempo de incubación (días)	Indice de diversidad de Shannon (H')	
		F	F+22B
SN	0	5,20	--
	11	5,29	4,60
	62	5,16	4,46

V.3.2 Condición suelo fertilizado (SF)

Fue necesario diseñar una nueva estrategia modificando algunas de las condiciones ambientales del ensayo, debido a la ausencia de eliminación del fenantreno observada en los microcosmos F y F+22B sometidos a la condición SN.

Una de las estrategias ampliamente conocida y utilizada como estrategia de biorremediación es la bioestimulación (Miller, 2010; Tyagi y col., 2011). Debido a que el suelo patagónico utilizado en los ensayos de microcosmos era deficiente en fósforo y nitrógeno, y basándonos en reportes de autores donde demuestran que la bioestimulación con nutrientes deficientes en el suelo puede acelerar la eliminación del PAH por parte de las poblaciones autóctonas (Scullion 2006, Atagana 2006; Fernández-Luqueño y col., 2008), y en nuestro caso, por parte del inoculante autóctono 22B, se modificó el contenido de fósforo y nitrógeno en los microcosmos F y F+22B agregando un fertilizante comercial (Nitrofosca®), el cual llevó la relación C:N:P a un valor sub-óptimo de 100:5:2. El contenido de agua de los microcosmos se mantuvo en un 10% (p/p) y se realizó una nueva inoculación de la cepa 22B ($1,4 \times 10^8$ ufc/g de suelo seco) para estimular y acelerar la degradación del contaminante. La adición del fertilizante y la re-inoculación se realizaron sobre los mismos microcosmos F y F+22B bajo la condición de suelo natural (SN), por lo tanto las gráficas de los resultados obtenidos para la nueva condición FS (líneas negra y turquesa) incluyen los valores obtenidos con la condición SN (líneas grises).

Los microcosmos bajo la nueva condición SF fueron monitoreados mediante recuentos de bacterias heterótrofas cultivables y degradadoras de PAH, concentración de fenantreno remanente, actividad deshidrogenasa y perfiles de PCR-DGGE, durante aproximadamente 60 días (entre los 86 y 149 días de incubación de los microcosmos).

Los resultados de los recuentos de bacterias heterótrofas cultivables en los microcosmos F y F+22B se muestran en la Figura V.6. Allí se observa que la adición del fertilizante y la re-inoculación con la cepa 22B en el suelo no provocaron un aumento en los recuentos de heterótrofas cultivables en los microcosmos bajo la condición FS.

Se observó que la fertilización produjo una disminución inicial en el número de bacterias cultivables degradadoras de PAH en el microcosmos F. El número de degradadoras de PAH en el microcosmos F+22B permaneció en los mismos valores que en la condición SN (10^3 - 10^4 NMP ml⁻¹), a pesar de la re-inoculación realizada y del agregado de fertilizante (Fig. V.6).

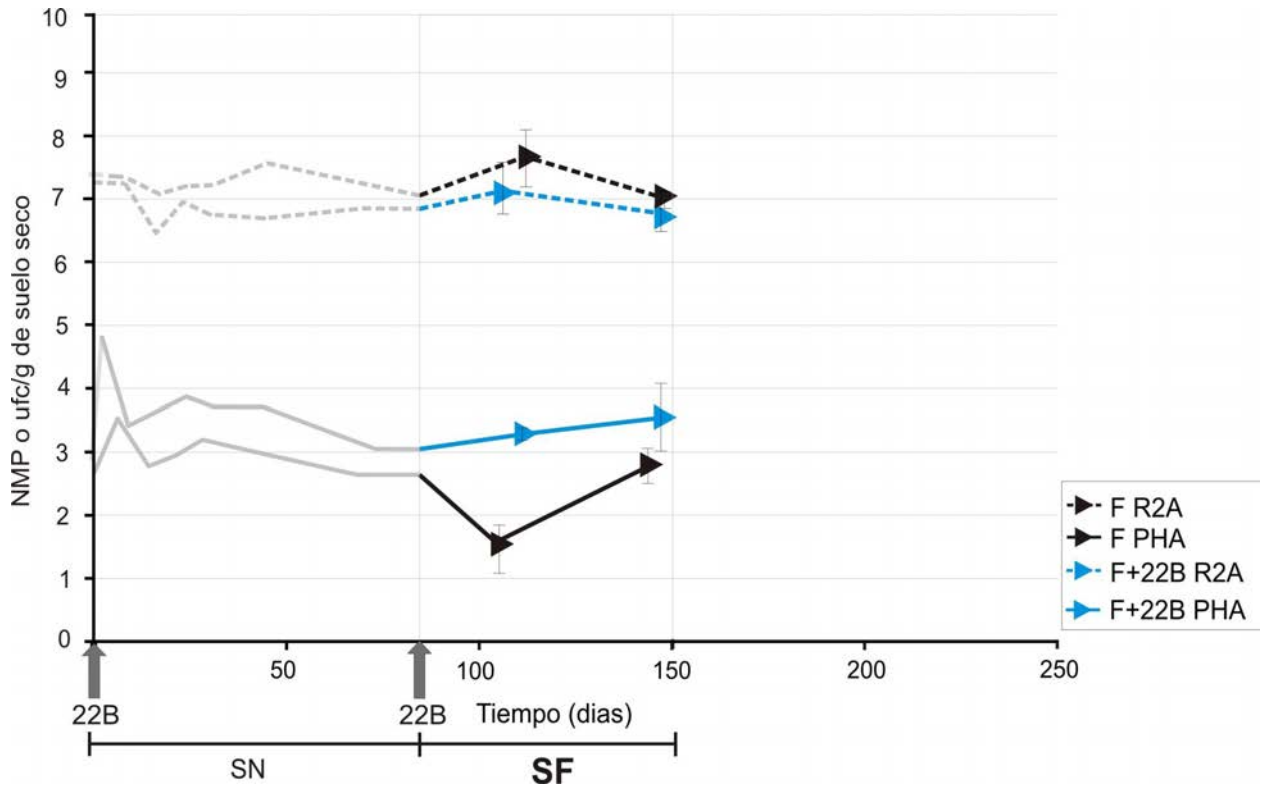


Figura V.6: Recuentos de bacterias degradadoras de PAH (NMP/g suelo seco) y de heterótrofas cultivables (ufc/g suelo seco) en los microcosmos F y F+22B, bajo las condiciones SN y SF durante 149 días de tratamiento. Las líneas en gris muestran los valores en la condición SN y las líneas turquesa y negra en la condición SF. El valor obtenido es el promedio de tres determinaciones independientes. Las barras representan las desviaciones estándar.

La Figura V.7 muestra los resultados de la concentración de fenantreno en los microcosmos F y F+22B bajo las condición SF. Al igual que en los microcosmos sometidos a la condición SN, entre los 86 y 149 días de tratamiento con el fertilizante, no se observó eliminación de fenantreno ni en el microcosmo control, ni en el inoculado.

En la Figura V.8 se observan los resultados de la actividad deshidrogenasa en los microcosmos F y F+22B sometidos a la condición SF. La corrección parcial de la relación C:N:P (de 100:2,2:0,26 a 100:5:2) causó un incremento en la actividad deshidrogenasa de los microcosmos F y F+22B.

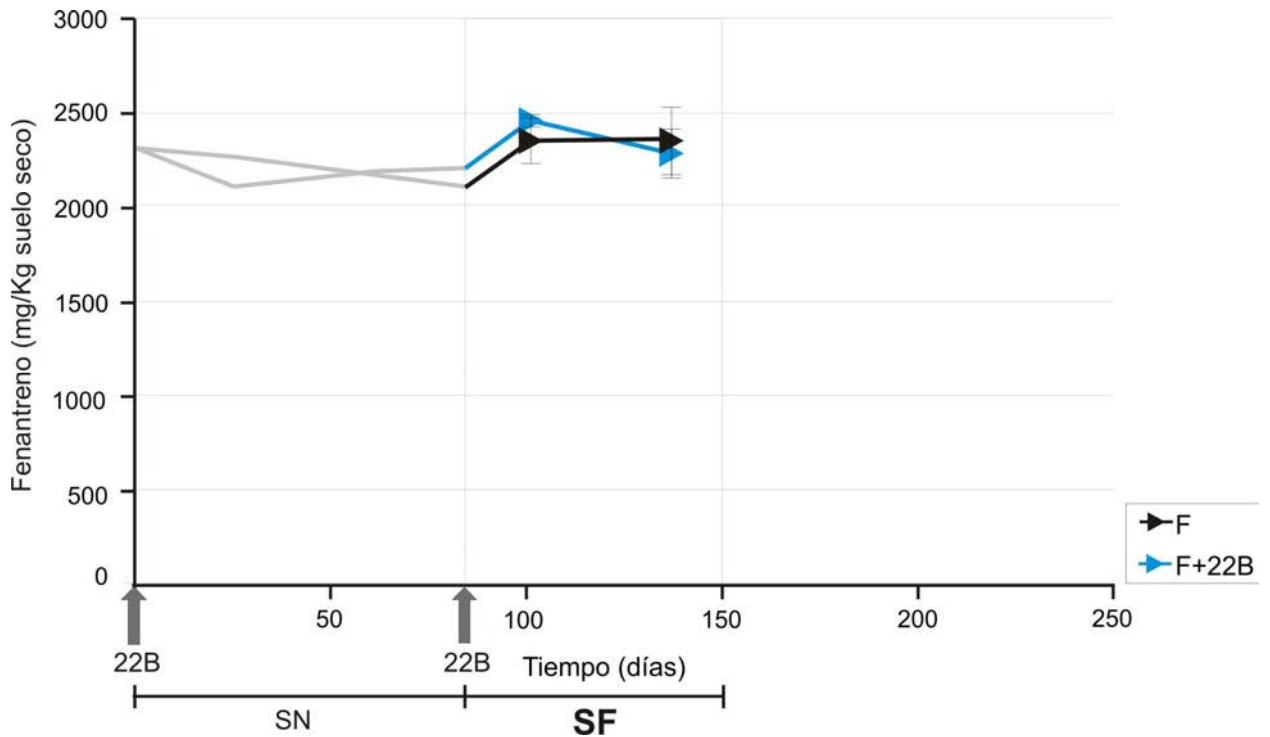


Figura V.7: Concentración de fenantreno en los microcosmos F y F+22B bajo las condiciones SN y SF durante 149 días de tratamiento. Las líneas en gris muestran los valores en la condición SN y las líneas turquesa y negra en la condición SF. La concentración fue determinada por HPLC. El valor obtenido es el promedio de tres determinaciones independientes. Las barras representan las desviaciones estándar.

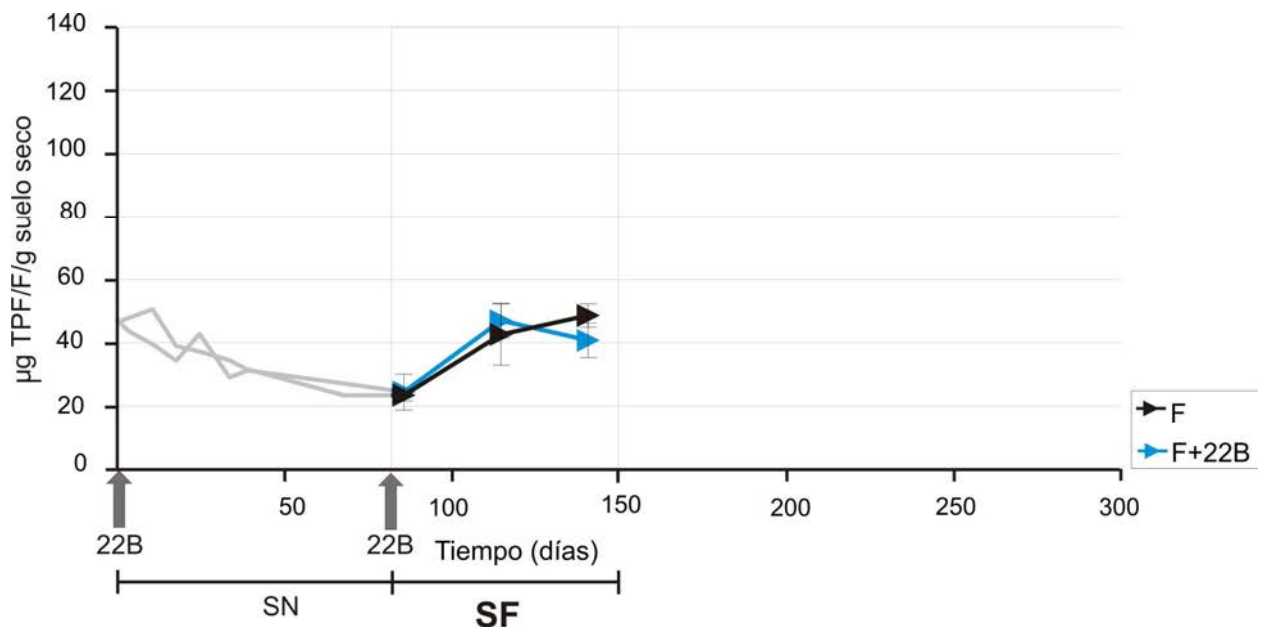


Figura V.8: Actividad deshidrogenasa determinada por el análisis de la reducción del TTC a TPF (μg de TPF/g suelo seco) de los microcosmos F y F+22B bajo las condiciones SN y SF durante 149 días de tratamiento. Condición SN (líneas grises) y condición SF (líneas turquesas). El valor obtenido es el promedio de tres determinaciones independientes. Las barras representan las desviaciones estándar.

El efecto del fertilizante, junto con la contaminación con fenantreno y la re-inoculación de la cepa 22B sobre la estructura y dinámica de las comunidades bacterianas del suelo en los microcosmos F y F+22B fue analizada mediante perfiles de PCR-DGGE. La Figura V.9 muestra los perfiles obtenidos a los 90 y 120 días del ensayo en ambos microcosmos, y los valores de diversidad genética calculados mediante el índice de Shannon (H') se agrupan en la Tabla V.5. La tabla V.5 y la inspección visual de la imagen del gel (Figura V.9) muestran la notable disminución en el índice H' y en el número de bandas en el microcosmos F y en mayor medida en el F+22B, al comparar los valores y la imagen obtenida con el suelo natural (SN) contaminado al tiempo 0 (Tabla V.4, Figura V.5). Por otro lado, en el microcosmos inoculado (SF+22B) (Figura V.9) se observó la aparición de una banda intensa con la misma movilidad electroforética que la cepa inoculada, siendo los perfiles del microcosmos fertilizado e inoculado menos diversos que el microcosmos fertilizado (Tabla V.5 y Figura V.9).

La bioestimulación utilizando nitrógeno y fósforo (SF) y la re-inoculación produjeron cambios notables en la composición bacteriana de las comunidades del suelo en los microcosmos F y F+22B, estos cambios no fueron acompañados por una estimulación de la actividad degradadora de fenantreno (Figura V.6).

Tabla V.5: Diversidad genética (H') de las comunidades bacterianas del suelo a los 90 y 120 días de ensayo, bajo la condición ambiental SF

Sistema	Tiempo de incubación (días)	Índice de diversidad de Shannon (H')	
		F	F+22B
SF	90	3,97	3,42
	120	4,07	3,15

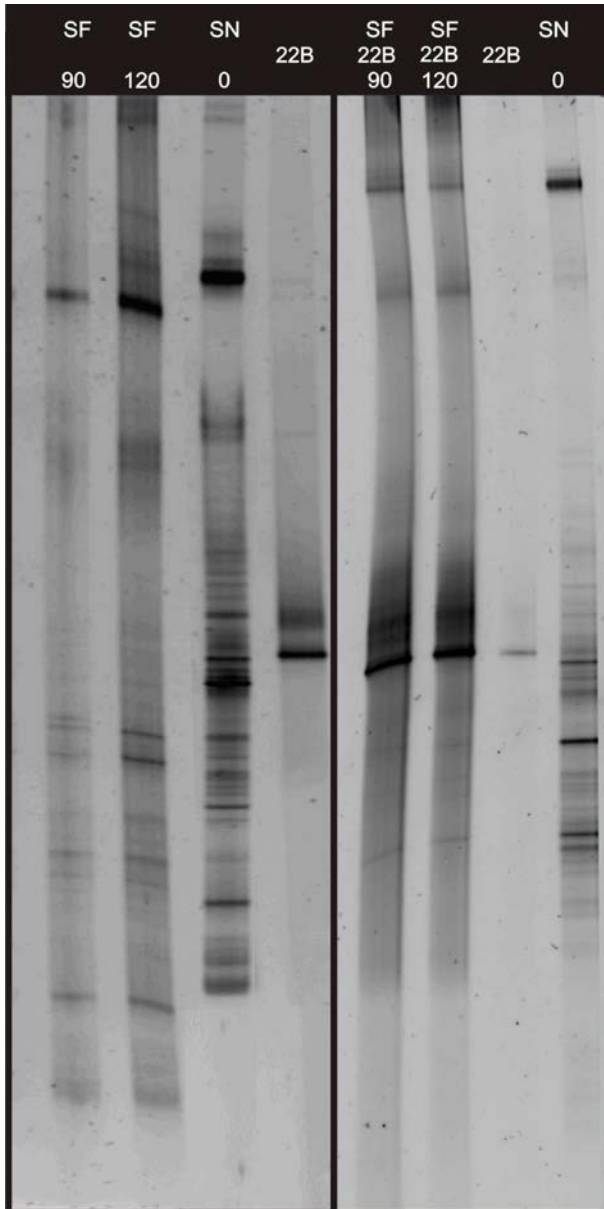


Figura V.9: Perfiles PCR-DGGE de las comunidades bacterianas de los microcosmos F y F+22B bajo la condición ambiental SF a los 90 y 120 días de ensayo. 22B: Cepa 22B. SN 0:

V.3.3 Condición suelo regado (SR)

El mismo inconveniente que nos llevó a utilizar la bioestimulación como alternativa para eliminar el contaminante fue encontrado nuevamente en los microcosmos fertilizados.

Los resultados encontrados por Holman y Tsang (1995) y Viñas y col., (2005) determinaron que la velocidad de eliminación de los PAH es dependiente del contenido de agua presente en el suelo. Por otra parte, es sabido que la baja actividad acuosa presente en los suelos, como naturalmente contienen los suelos de la Patagonia semiárida, determina la actividad microbiana de los microorganismos.

Por lo tanto fue necesario diseñar otra nueva estrategia modificando esta vez el contenido de agua. Junto con el incremento en el contenido de agua (15% p/p) se realizó una nueva inoculación de la cepa 22B ($1,4 \times 10^8$ ufc/g de suelo seco) en el microcosmo F+22B. Las gráficas

de ésta sección muestran las tres condiciones ambientales juntas (SN, SF y SR), en forma consecutiva, con líneas grises las condiciones SN y SF, y con línea turquesa (F+22B) y negra (F) la condición SR. El tiempo cero fue tomado, al igual que para la condición SF, al inicio del experimento (Condición SN).

El ensayo se realizó por triplicado utilizando como control microcosmos contaminados y fertilizados no inoculados (F) con 15% (p/p) del agua. Los microcosmos fueron monitoreados mediante recuentos de bacterias heterótrofas cultivables y degradadoras de PAH, concentración de fenantreno remanente, actividad deshidrogenasa y PCR-DGGE, durante los siguientes 149 a 250 días de tratamiento.

Los resultados de los recuentos de bacterias heterótrofas cultivables en los microcosmos F y F+22B bajo las condiciones ambiente SN, SF y SR durante el tiempo total del ensayo se muestran en la Figura V.10. Se observa que el agregado de agua a los 149 días del tratamiento produjo un importante incremento (aproximadamente dos órdenes de magnitud) en el número de bacterias heterótrofas cultivables en ambos microcosmos. A pesar de que el microcosmo F+22B fue inoculado tres veces, y una de ellas al mismo tiempo que la adición de agua, el incremento del número de bacterias cultivables no fue significativamente diferente al microcosmo F ($P > 0.05$).

El agregado de fertilizante y el incremento en el contenido de agua (Fig. V.10) no modificó el número de bacterias degradadoras de PAH en el microcosmos F+22B, el cual permaneció entre 10^3 - 10^4 NMP ml^{-1} hasta el final del experimento. Cuando el contenido de agua fue aumentado a 15%, las curvas se invirtieron y el número de bacterias degradadoras de PAH en el microcosmo F superó los valores obtenidos en el microcosmos F+22B (Figura V.10).

La Figura V.11 muestra los resultados de la concentración de fenantreno en los microcosmos F y F+22B durante el tiempo total del ensayo. Se observó una rápida eliminación del fenantreno en ambos microcosmos al incrementar el contenido de agua a los 149 días. Luego de 11 días de corregido parcialmente el contenido de agua (161 días de tratamiento), la concentración de fenantreno en el microcosmos F+22B alcanzó valores significativamente menores ($P < 0,05$) que en el microcosmos F. Luego de 200 días de tratamiento, tanto el microcosmo inoculado como el no inoculado llegaron a obtener valores de concentración de fenantreno por debajo de los permitidos por la Ley Nacional Argentina 24051.

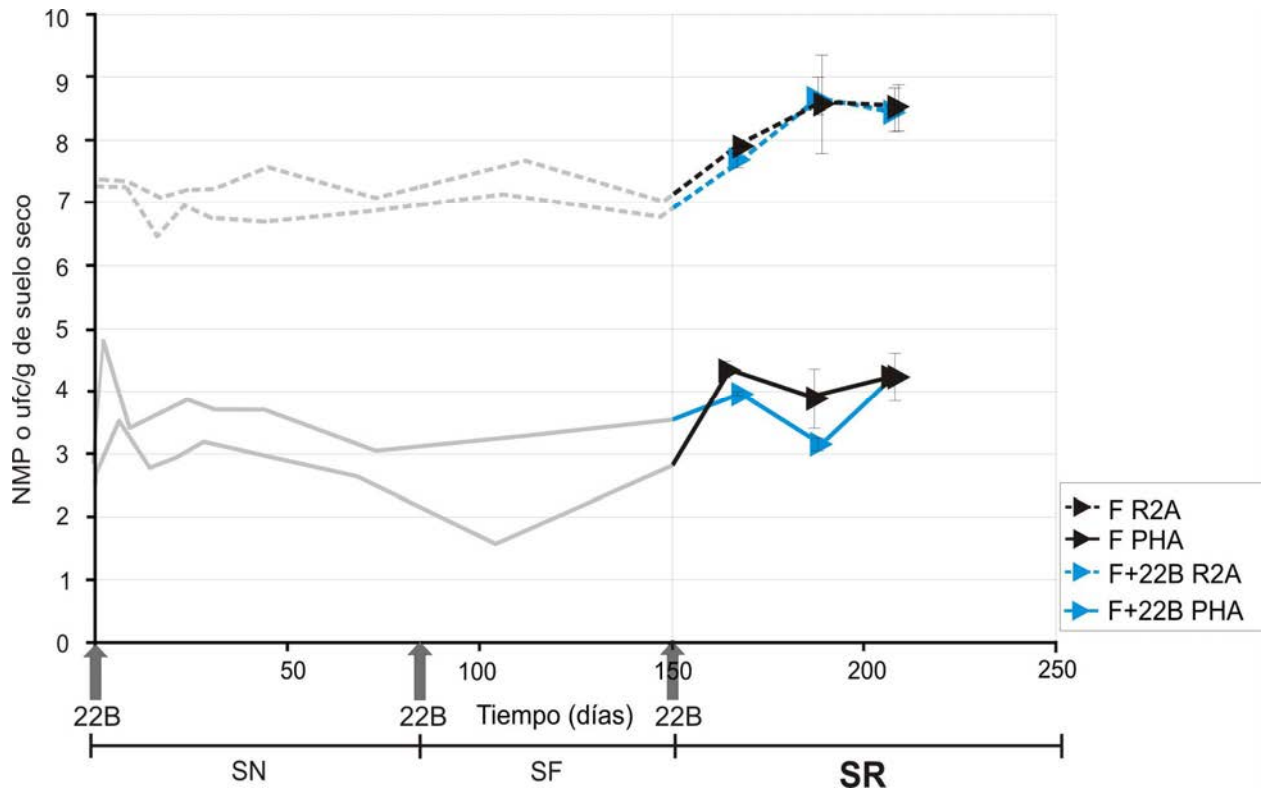


Figura V.10: Recuentos de bacterias degradadoras de PAH (NMP/g suelo seco) y de heterótrofas cultivables (ufc/g suelo seco) en los microcosmos F y F+22B, bajo las condiciones SN, SF y SR. Las líneas en gris muestran los valores en la condición SN y SF y las líneas turquesa y negra en la condición SR. El valor obtenido es el promedio de tres determinaciones independientes. Las barras representan las desviaciones estándar.

En la Figura V.12 se observa los resultados de la actividad deshidrogenasa durante el tiempo total del ensayo. El microcosmo F+22B mostró un significativo aumento en la actividad deshidrogenasa luego de que la humedad del suelo fue corregida parcialmente a 15% y la tercer inoculación fue realizada, el cual no fue observado en el microcosmo F bajo las mismas condiciones de humedad; sin embargo ambos microcosmos mostraron una rápida biodegradación del fenantreno bajo la condición SR (Figura V. 10). Estos resultados están en concordancia con otros autores que observaron que el nivel de actividad deshidrogenasa no es un indicador confiable del potencial degradador de la comunidad microbiana del suelo (Grosser y col., 1991).

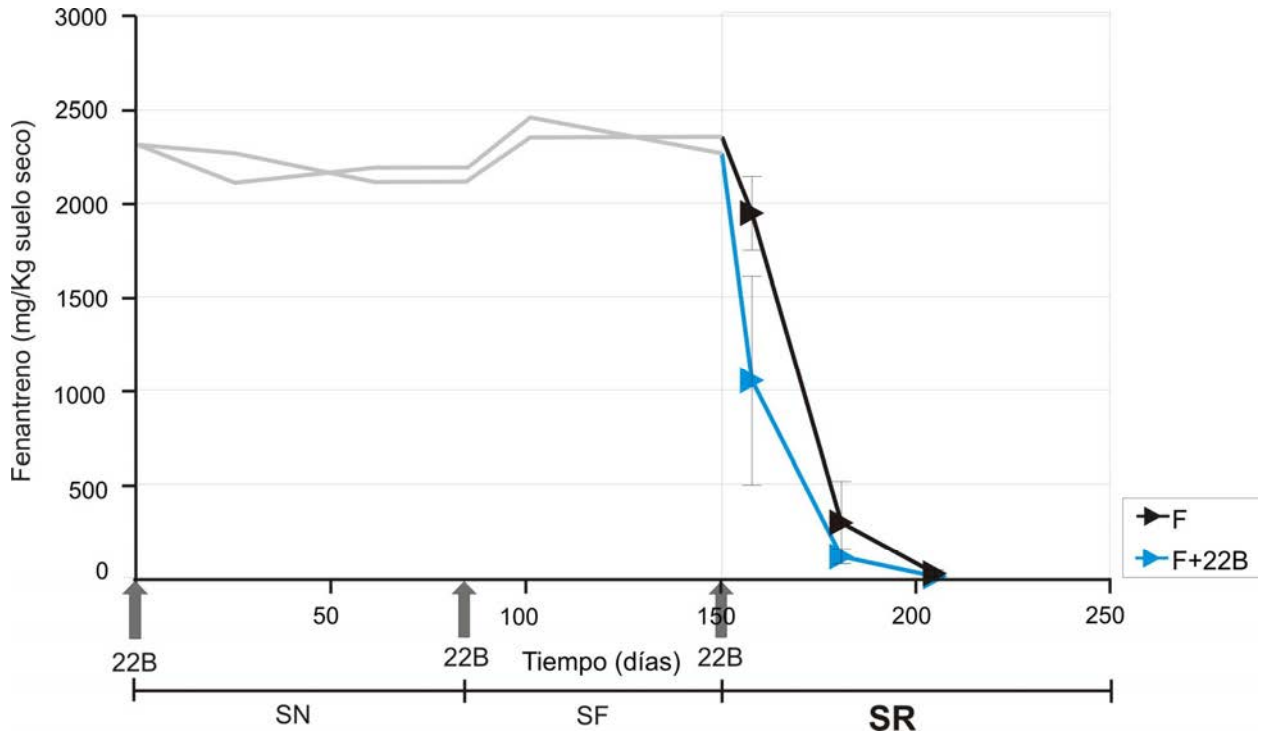


Figura V.11: Concentración de fenantreno en los microcosmos F y F+22B bajo las condiciones SN, SF y SR. La concentración fue determinada por HPLC. Las líneas en gris muestran los valores en la condición SN y SF y las líneas turquesa y negra en la condición SR. El valor obtenido es el promedio de tres determinaciones independientes. Las barras representan las desviaciones estándar.

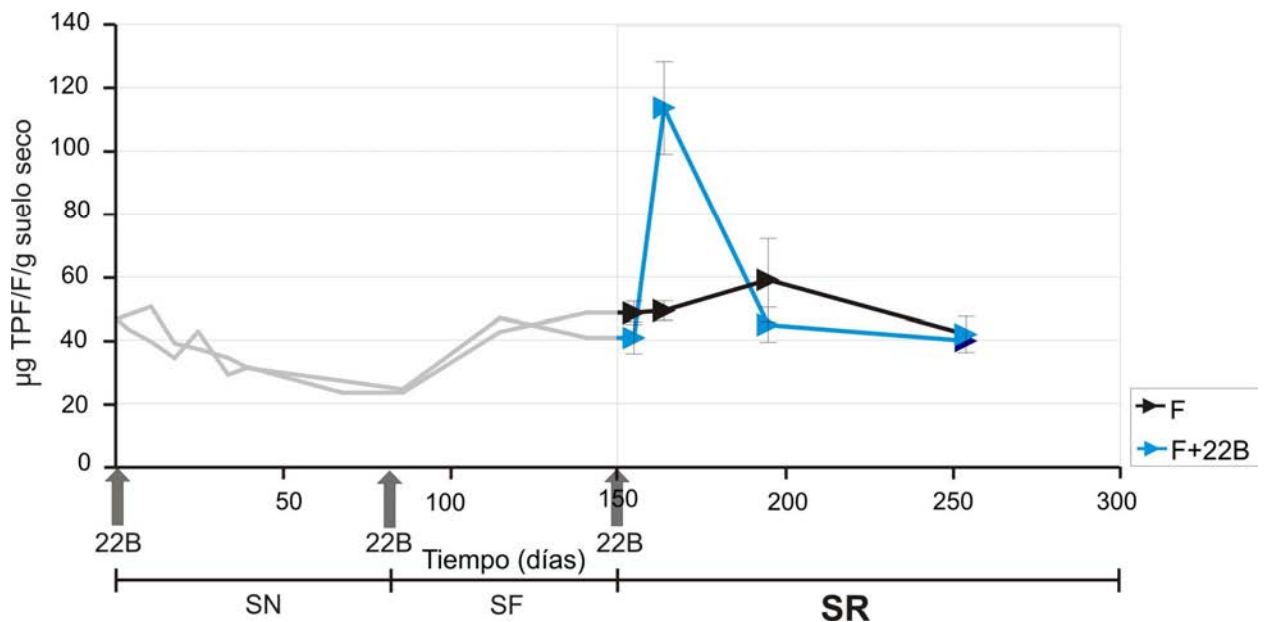


Figura V.12: Actividad deshidrogenasa (μg de TPF por g suelo seco) determinada por el análisis de la reducción del TTC a TPF de los microcosmos F y F+22B bajo las condiciones SN, SF y SR durante 250 días de tratamiento. Las líneas en gris muestran los valores en la condición SN y SF y las líneas turquesa y negra en la condición SR. El valor obtenido es el promedio de tres determinaciones independientes. Las barras representan las desviaciones estándar.

Las imágenes de los perfiles de PCR-DGGE obtenidos para la condición SR a los 157, 173 y 199 de tratamiento, se muestran en la Figura V.13. La Tabla V.6 muestra los valores de índices de diversidad de Shannon obtenidos a partir del análisis de los perfiles.

Las diferencias en los perfiles de DGGE de los microcosmos F y F+22B en la condición SR son claramente observables en la imagen del gel (Figura V.13). Se observó un incremento en el índice de diversidad de Shannon H' de los microcosmos F y F+22B con la adición de agua, en comparación con los microcosmos sometidos a la condición SF (Tabla V.5 y Tabla V.6), y la persistencia de una banda intensa con igual movilidad electroforética que la cepa inoculada en los perfiles de los microcosmos F+22B. Se observó que la inoculación con la cepa 22B produjo la disminución de la diversidad observada por otros autores (Coppotelli y col., 2008; Ibarrolaza y col., 2011, Gomes y col., 2005).

Tabla V.6: Diversidad genética (H') de las comunidades bacterianas del suelo a los 157, 173 y 199 días de ensayo, bajo la condición ambiental SR

Sistema	Tiempo de incubación (días)	Índice de diversidad de Shannon (H')	
		F	F+22B
SR	157	5,14	4,12
	173	5,18	4,52
	199	5,04	4,42

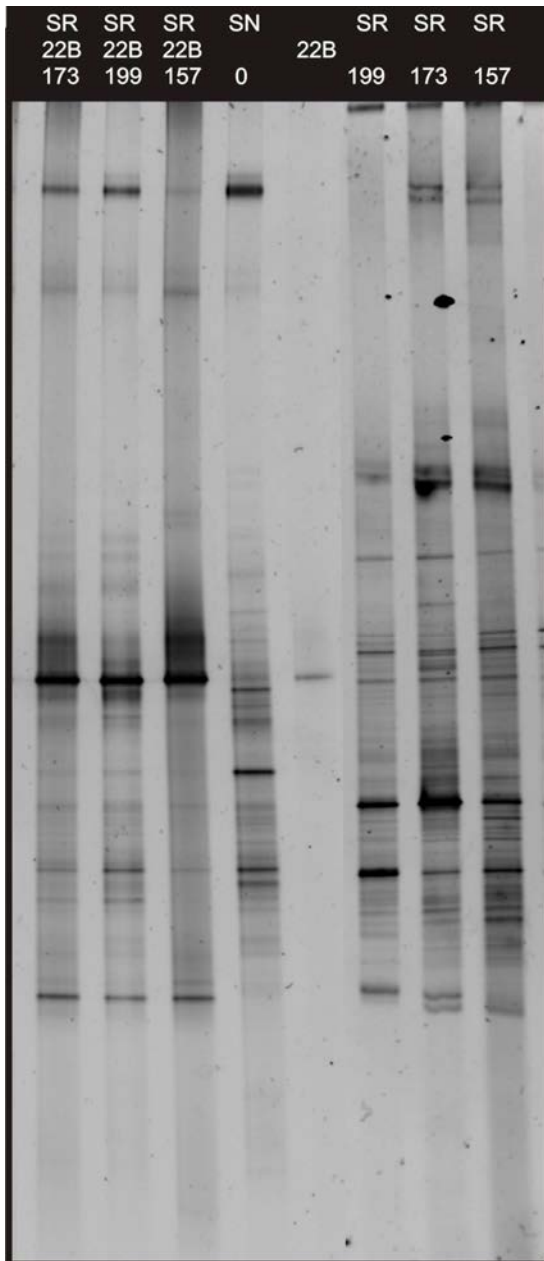


Figura V.13: Perfiles PCR-DGGE de las comunidades bacterianas de los microcosmos F y F+22B bajo la condición ambiental SR, a los 157, 173 y 199 días Del ensayo. Cepa 22B. SN 0: Microcosmos F sometido a la condición SN en el tiempo cero.

En la Figura V.14 se muestra un dendrograma realizado a partir de los patrones de DGGE obtenidos a partir de los microcosmos sometidos a las diferentes condiciones ambiente a los 0, 11, 62, 90, 120, 157, 163 y 199 días. Los cálculos se realizaron utilizando la correlación Dice y UPGMA.

Se observa en la Figura V.14 que los microcosmos con mayores diferencias entre sí y con respecto a los microcosmos sometidos a las condiciones SN y SR, fueron los microcosmos fertilizados (SF y SF 22B). Los perfiles del microcosmos F+22B fertilizado (SF 22B) se agruparon en un clúster separado con apenas un 35,4% de similitud con las otras condiciones ambientales; el microcosmos F fertilizado (SF) concentró los perfiles a los 90 y 120 días del ensayo en otro clúster con un 42,6% de similitud con respecto a las condiciones SF y SR.

Los perfiles DGGE de los microcosmos F y F+22B bajo las condiciones SR y SN se agruparon formando un gran clúster que compartió mas del 58% de similitud. Dentro de éste gran clúster se observó un subclúster que agrupó con un 68,3% de similitud exclusivamente a los tiempos del microcosmos inoculado bajo la condición SR (SR 22B). Con un 67,4% de similitud se agruparon separadamente los microcosmos F y F+22B sometidos a la condición SN (SN y SN 22B) (clúster de 71,7% de similitud) junto con los tiempos del microcosmos F bajo la condición SR (clúster de 83,7% de similitud). El análisis conjunto de los perfiles DGGE permitió determinar que la fertilización y el agregado del inoculante en el microcosmo regado fueron los factores que produjeron cambios importantes en la estructura de la comunidad microbiana del suelo.

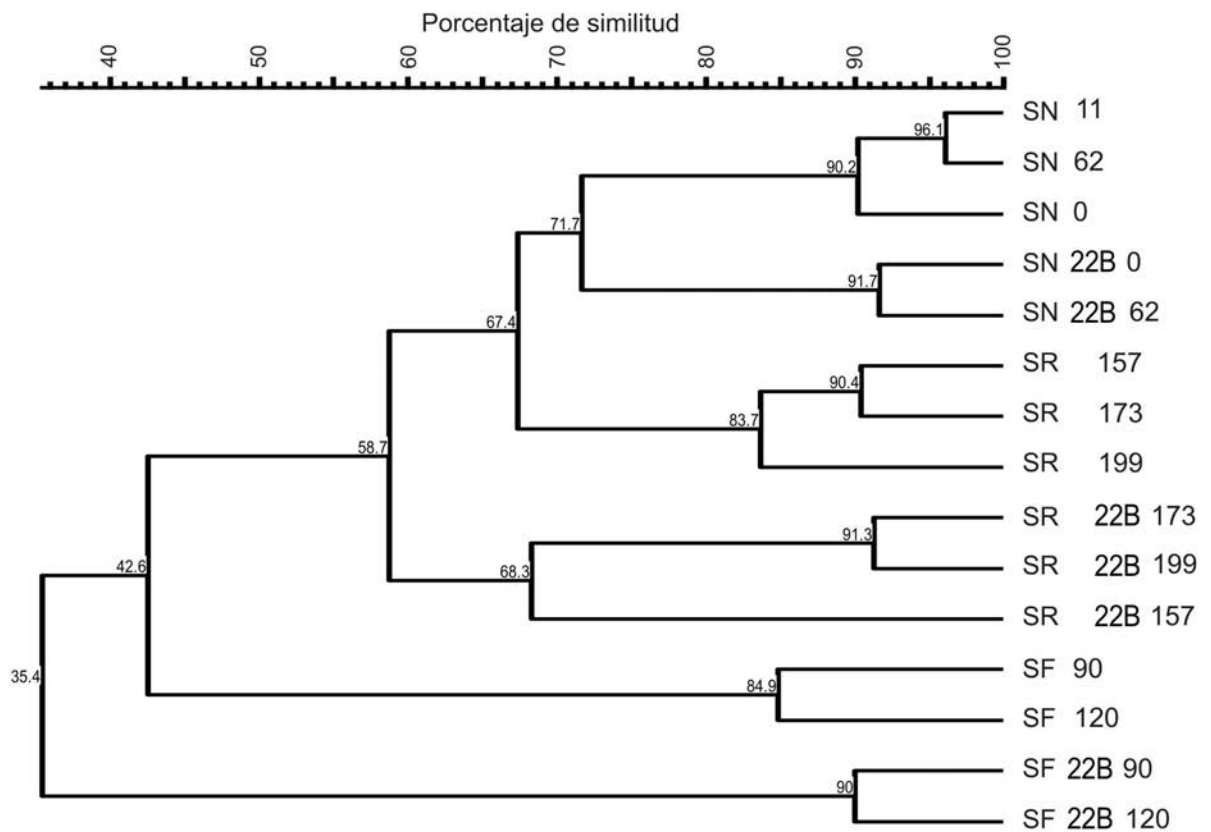


Figura V.14: Dendrograma de los clusters basados en los patrones de DGGE obtenidos a partir de los microcosmos sometidos a las diferentes condiciones SN, SF y SR a los a los 0, 11, 62, 90, 120, 157, 163 y 199 días. Los cálculos se realizaron utilizando la correlación Dice y UPGMA. Las diferencias entre los perfiles obtenidos mediante PCR-DGGE se indican en el dendrograma como porcentaje de similitud.

V.4 Discusión

Los estudios realizados en las cepas degradadoras de PAH autóctonas de la Patagonia semiárida sobre el espectro de degradación de PAH (Tabla IV.7, Figura IV.6, Figura IV.8), resistencia a hambreado de nutrientes (Figura IV.11 y Figura IV.12) y desecación (Tabla IV.10) evidenciaron la potencialidad que presentan para ser utilizadas en ensayos de bioaumentación sobre suelos de la Patagonia semiárida contaminados con PAH. El estudio de la capacidad de eliminación del contaminante bajo condiciones ambientales similares al sitio blanco es uno de los factores fundamentales a estudiar para que el proceso de bioaumentación sea exitoso.

En esta sección se realizaron ensayos de bioaumentación con la estrategia ABA utilizando cepas degradadoras del género *Sphingomonas*, autóctonas de la Patagonia semiárida, que fueron seleccionadas en el capítulo IV (1A, 22A, 22B y 36). El género bacteriano *Sphingomonas* ha sido utilizado ampliamente como inoculante para sanear suelos contaminados con PAH, debido a la gran versatilidad catabólica, selección y repetidos aislamientos a partir de muestras vinculadas con contaminación de hidrocarburos. Se han reportado ensayos donde la remoción del contaminante en suelos ha sido exitosa debido a la inoculación con cepas de *Sphingomonas*. En estudios de bioaumentación sobre suelos prístinos (Coppotelli y col., 2008) y sedimentos marinos (Shi y col., 2001) artificialmente contaminados con fenantreno, y suelos co-contaminados con metales y mezclas de PAH (Colombo y col., 2011; Ibarrolaza y col., 2011), la inoculación con cepas pertenecientes a éste género ha aumentado la velocidad de mineralización del contaminante. Sin embargo, existen trabajos publicados en los que la inoculación con *Sphingomonas sp.* no ha sido de gran utilidad. Van Herwijnen y col., (2006) realizando estudios de bioaumentación con cepas conocidas degradadoras de PAH pertenecientes al género *Sphingomonas* (*Sphingomonas sp. strain* LB126, *Sphingomonas sp. strain* LH128) (Bastiaens y col., 2000) y a *Mycobacterium sp.* (D.Springael, unpublished results) en quimiostatos limitados en fuente de carbono contaminados con PAH y/o carbono fácilmente asimilables (EUC), han encontrado que la degradación del contaminante no se vio incrementada en comparación con los quimiostatos no bioaumentados.

Los ensayos utilizando la estrategia ABA fueron realizados de forma preliminar en sistemas biometers con suelo patagónico contaminado crónicamente con hidrocarburos y artificialmente contaminado con fenantreno. Estos ensayos tuvieron como objetivo evidenciar, mediante la mineralización inducida por el fenantreno, la cepa o las cepas más aptas para ser utilizadas como inoculantes sobre suelos de la Patagonia semiárida contaminados con PAH.

Los biometers fueron sometidos a tres condiciones ambientales diferentes: la condición de suelo natural (SN) se consideró la menos favorable para el desarrollo microbiano y próxima a las condiciones ambientales naturales de la Patagonia semiárida. En la condición de suelo

fertilizado (SF) se intentó suavizar el hambreado de nitrógeno y fósforo, incorporando al suelo un fertilizante comercial; y en la condición de suelo regado (SR) se incrementó el contenido de agua de manera de disminuir el estrés hídrico. Aun así los biometers fertilizados y regados no llegaron a los valores considerados óptimos para un proceso de biorremediación (Cleveland y col., 2007; Holman y Tsang, 1995; Viñas y col., 2005).

Los ensayos en biometers demostraron que valores cercanos al 20% WHC (10% p/p de agua) inhibieron drásticamente la degradación de fenantreno, independientemente de la adición o no de un inoculante; mientras que sólo cuando el contenido de agua fue aumentado al 25% WHC (15% de p/p de agua) la actividad degradadora de la comunidad microbiana del suelo fue recuperada (Tabla V.2). Claramente es el estrés hídrico, y no la limitación de N y P, el factor ambiental que controla tanto la actividad microbiana de los microorganismos inoculados como la de la comunidad microbiana del suelo patagónico. En el mismo sentido Ronen y col. (2000) encontraron que la degradación del tribromofenol (TBP) se vio limitada en suelos con 10% de contenido de humedad y que la humedad del suelo determina la sobrevivencia de un inoculante bacteriano degradador de TPB. Por otro lado, Mashreghi y Prosser (2006) demostraron que el contenido de agua en el suelo afectó la supervivencia y la actividad degradadora de una cepa de *Pseudomonas stutzeri* inoculada en un suelo contaminado con fenantreno. Resultados similares fueron observados con la cepa *S. paucimobilis* 20006FA, en un trabajo previo se demostró que esta cepa fue capaz de establecerse en un suelo contaminado con fenantreno con un 20% p/p de agua, causando un incremento significativo en la velocidad de producción de CO₂ por la microflora del suelo (Coppotelli y col., 2008). Sin embargo, la inoculación con *S. paucimobilis* 20006FA no produjo un efecto estimulador significativo en la mineralización inducida por el fenantreno (Figura V.1 A) ni en la degradación del fenantreno (Tabla V.2) en suelos con 10% p/p de agua.

Por otro lado pudimos determinar que el efecto de la inoculación sobre la producción de CO₂, utilizado como indicador de la actividad microbiana, no tuvo relación con la eliminación de fenantreno. La inoculación con la cepa autóctona 22B produjo un incremento significativo en la mineralización inducida por el fenantreno cuando fue inoculada en los sistemas SN (Figura V.1 A); sin embargo no se observó el correspondiente aumento en la eliminación del fenantreno (Tabla V.2). La desecación de los suelos genera efectos fisiológicos adversos asociados con la deshidratación celular, pero también produce una limitación en la difusión de los sustratos suplementados; en condiciones de potenciales hídricos bajos la difusión del sustrato sería el factor limitante primario para las poblaciones degradadoras de contaminantes (Stark y Firestone, 1995).

Por otro lado, cuando el estrés hídrico fue parcialmente corregido, los sistemas SR inoculados con la cepa *S. paucimobilis* 20006FA produjeron el mayor efecto estimulador sobre la

mineralización inducida por el fenantreno (Figura V.1 C), sin embargo mostraron una eliminación de fenantreno significativamente menor a la observada en los biometers inoculados con la cepa 22B (Tabla V.2). En consecuencia los valores de CO₂ determinados en los biometers SR-Sp fueron mayores que los calculados estequiométricamente de acuerdo a la ecuación de mineralización del fenantreno (Ecuación V.1). Este mismo resultados fue observado en los biometers SR inoculados con las cepas patagónicas 1A, 22A y 36. La no correlación entre la producción de CO₂ y la eliminación de fenantreno sugirió el consumo de otras fuentes de carbono provenientes del suelo. La preferencia del inóculo por otras fuentes de carbono en vez del contaminante ha sido descrita por algunos autores como uno de los problemas observados en los procesos de bioaumentación en suelos contaminados (Tyagi y col., 2011). Por lo tanto las cepas patagónicas 1A, 22A y 36 y la cepa *Shingomonas paucimobilis* 20006FA podrían no ser tan selectivas en la degradación del contaminante blanco.

Los biometers SR inoculados con la cepa 22B mostraron un comportamiento diferente, debido a que la producción de CO₂ correspondió estequiométricamente con el fenantreno consumido, sugiriendo que el CO₂ proviene exclusivamente del fenantreno adicionado y no de otras fuentes de carbono presentes en el suelo. En concordancia, los ensayos de crecimiento de la cepa 22B utilizando como única fuente de carbono y energía diferentes hidrocarburos (Sección V.2.A) mostraron que la cepa no fue capaz de crecer a expensas de hidrocarburos lineales como hexadecano, pero si en mezclas complejas de hidrocarburos como petróleo y gasoil, utilizando probablemente los PAH contenidos allí. Se comprobó además que 22B posee la ruta de completa de mineralización del fenantreno (Sección V.2.B).

Estos resultados sugieren que *Sphingobium sp.* 22B posee la capacidad de mineralizar específicamente el fenantreno en condiciones subóptimas y por lo tanto fue la cepa indicada para ser desafiada en ensayos de inoculación en microcosmos de suelo patagónico contaminados bajo condiciones semiáridas.

Los ensayos de bioaumentación con la cepa 22B en microcosmos de suelo patagónico crónicamente contaminado y artificialmente contaminado con fenantreno fueron los ensayos a seguir para comprobar si efectivamente *Sphingobium sp.* 22B era capaz de mineralizar el contaminante en condiciones ambientales subóptimas. Por otro lado los ensayos en microcosmos tuvieron como objetivo estudiar el efecto de la inoculación de la cepa *Sphingobium sp.* 22B sobre la estructura y dinámica de la comunidad microbiana del suelo.

Durante los 85 días de tratamiento en que los microcosmos F y F+22B fueron mantenidos bajo la denominada condición natural (20% WHC) y aún después de que fueran fertilizados (entre los 86 y 149 días de tratamiento), no se observó eliminación de fenantreno (Figura V.7). Esto confirma los resultados encontrados en los biometers, demostrando claramente que las condiciones áridas de los suelos patagónicos es el principal factor que limita la biodegradación

de fenantreno, y que la inoculación con una cepa autóctona, caracterizada por su resistencia a la desecación, no logra superar el efecto inhibitorio. Viñas y col. (2005) también determinaron que bajo las mismas condiciones establecidas en éste estudio (20% WHC) se inhibió fuertemente la biodegradación de los PAH en un suelo contaminado con creosota. Estos resultados nos permiten establecer que es condición necesaria mantener los valores de humedad por arriba de este límite para que los procesos de biodegradación ocurran.

El estudio de la estructura y dinámica de la comunidad bacteriana del suelo, a través de los perfiles de DGGE, nos permitió determinar que bajo las condiciones SN ni la incorporación del fenantreno ni la inoculación con la cepa 22B produjeron cambios drásticos en la diversidad genética de la comunidad microbiana del suelo (Figura V.5 y Tabla V.4), agrupándose los perfiles de DGGE de los microcosmos F y F+22B en un mismo subcluster (71,7% de similitud) (Figura V.14). En concordancia, además de la falta de degradación (Figura V.3), ambos microcosmos mostraron comportamientos similares en cuanto a la ausencia de respuesta en la actividad deshidrogenasa (Figura V.4) y en los recuentos bacterianos (Figura V.2). Sin embargo los perfiles de DGGE sugieren que la cepa 22B fue capaz de establecerse y mantenerse durante por lo menos 62 días bajo condiciones de estrés hídrico (Figura V.5). Estos resultados sugieren que bajo potenciales hídricos bajos, la limitación en la difusión del fenantreno y el aislamiento espacial de las poblaciones microbianas, producido por la falta de conectividad acuosa entre las partículas del suelo (Treves, 2003), podría evitar que el fenantreno y la inoculación actúen como presión de selección sobre la estructura de la comunidad bacteriana, así como también estaría inhibiendo la actividad del microorganismo inoculado y su competencia con la flora autóctona del suelo.

La bioestimulación con N y P (SF) produjo cambios drásticos en la composición de la comunidad bacteriana del suelo en los microcosmos F y F+22B (Figura V.9), a pesar de no observarse cambios en la eliminación del fenantreno (Figura V.7), como tampoco en los recuentos de las poblaciones cultivables (Figura V.6). Nuevamente se pudo observar en los perfiles DGGE la permanencia de la banda correspondiente a la cepa inoculada (Figura V.9). En ambos microcosmos la fertilización produjo la disminución en el índice de diversidad H' (Tabla V.5) y un leve incremento en la actividad deshidrogenasa (Figura V.8). El impacto sobre las comunidades bacterianas producido por la bioestimulación podría ser atribuido al incremento de la salinidad causado por la adición de los nutrientes (Braddock y col., 1997; Rhykerd y col., 1995). En circunstancias de bajo potencial hídrico o baja actividad acuosa en la matriz del suelo, la incorporación de sales podría tener una marcada influencia en el potencial osmótico. La composición de las comunidades microbianas podrían estar afectadas por la salinidad debido a que los genotipos microbianos difieren de acuerdo a su tolerancia al estrés osmótico (Wichern y col., 2006). Más aún, se ha establecido que los mecanismos de

adaptación al estrés osmótico son energéticamente demandantes, lo que podría explicar el aumento en la actividad deshidrogenasa, afectando la eficiencia en la utilización del carbono por los microorganismos del suelo (Setia y col., 2011). Por lo tanto, bajo estas condiciones, serían los cambios en el potencial osmótico, y no la contaminación con fenantreno ni la inoculación, la principal fuerza motriz de los cambios observados en la comunidad microbiana. Luego de que el contenido de humedad relativa de los microcosmos fue incrementado, a los 150 días de tratamiento, se observó una rápida eliminación del fenantreno en ambos microcosmos (Figura V.11). A los 158 días de tratamiento la concentración de fenantreno en el sistema F+22B fue significativamente menor a la encontrada en el microcosmo sin inocular, demostrando la efectividad del inoculante bajo condiciones de humedad que todavía resultan subóptimas (25% WHC). Luego de 200 días de tratamiento, tanto el microcosmo inoculado como el no inoculado llegaron a obtener valores de concentración de fenantreno por debajo de los permitidos por la Ley Nacional Argentina 24051.

Una observación importante es que, a pesar de la larga permanencia del fenantreno en los microcosmos del suelo (149 días) la biodisponibilidad del mismo no fue afectada, de un modo irreversible, permitiendo una rápida y total eliminación del fenantreno (98%) luego de que el contenido de agua fue incrementado. En el suelo, solamente una pequeña fracción de los contaminantes orgánicos se encuentran biodisponibles, mientras que una gran fracción es secuestrada, siendo no biodisponible y por lo tanto no degradable, debido a la fuerte interacción con la materia orgánica del suelo o debido a la difusión a escala de nanoporos en los cuales los microorganismos no tiene acceso (Barriuso y col., 2008). Ma y col. (2012) mostraron que la proporción de fenantreno capaz de ser desorbido disminuía de 82% a 65% luego de 150 días producida la contaminación. Sin embargo, el secuestro de PAH está fuertemente afectado por el contenido de materia orgánica, siendo los suelos patagónicos típicamente pobres en contenido de materia orgánica.

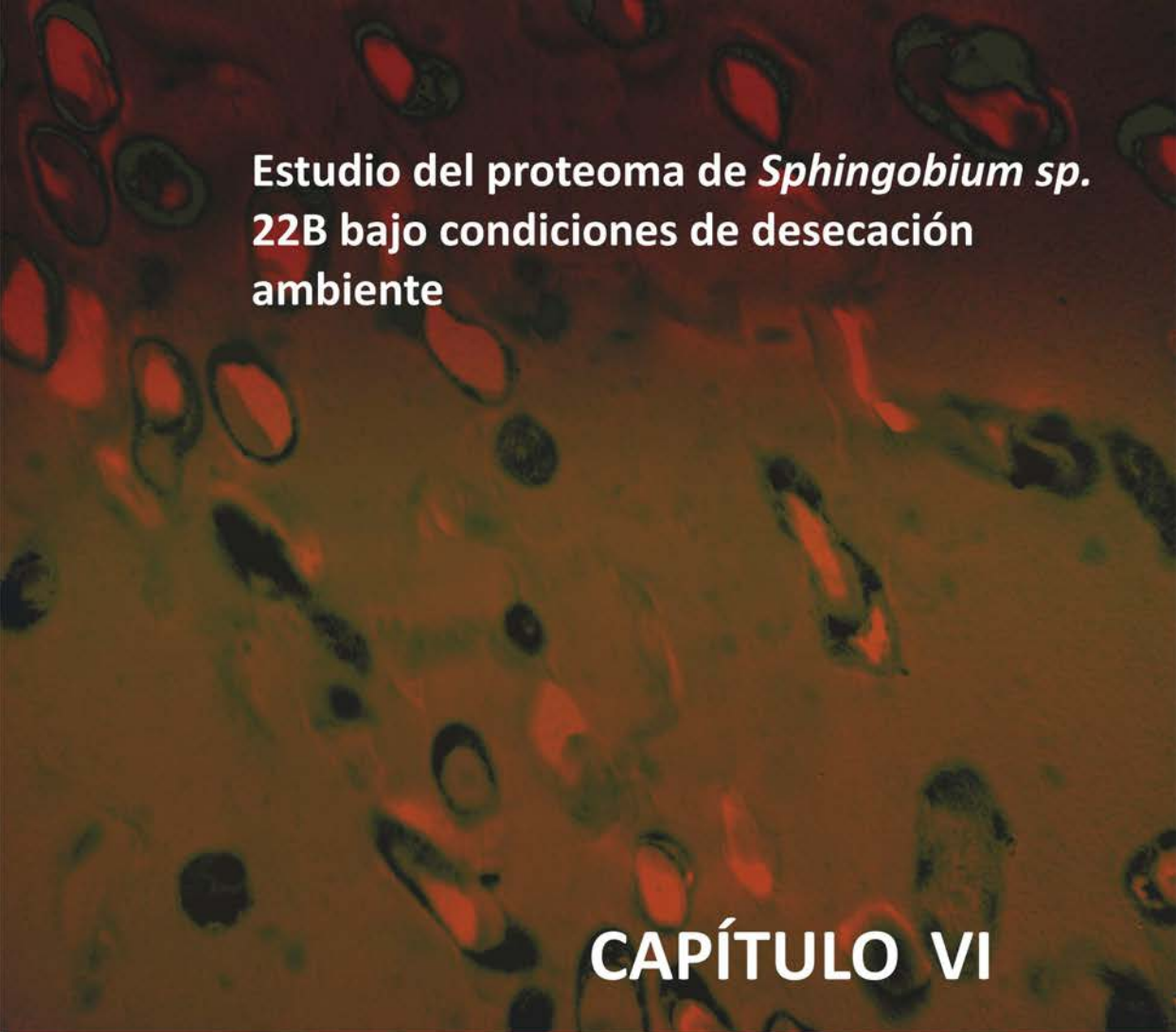
El incremento en el potencial de la matriz por la adición de agua, causó un nuevo proceso de sucesiones en las comunidades del suelo de ambos microcosmos (Figura V.5). En consecuencia los perfiles de DGGE de los microcosmos F y F+22B bajo la condición SR se agruparon en un clúster que compartió mas del 58% de similitud con los perfiles de la condición SN, siendo marcadamente diferentes a los microcosmos bajo la condición SF (Figura V.14). La adición de agua produjo el aumento en el índice de diversidad H' en ambos microcosmos, con respecto a los mismos sometidos bajo la condición SF (Tabla V.5 y V.6). Estos resultados estarían sugiriendo que los cambios en los perfiles de DGGE causados por la adición de agua podrían ser parcialmente atribuidos a la reducción de estrés osmótico generado por la adición de nutrientes.

Analizando el clúster superior del dendrograma es posible observar que independientemente

del tiempo de incubación, los perfiles de DGGE de los microcosmos F y F+22B bajo la condición SR formaron subclusters separados entre sí y separados de los respectivos microcosmos bajo las condiciones SN (Figura V.14). Las diferencias en los perfiles de DGGE de los microcosmos F y F+22B bajo la condición SR con respecto a la condición SN son claramente visibles en la imagen del gel (Figuras V.5 y V.13). Estos resultados estarían demostrando que el incremento en el potencial de la matriz aumentó la biodisponibilidad del fenantreno, evidenciado por su rápida eliminación (Figura V.11), la cual fue acompañada por el incremento en el número de bacterias heterótrofas cultivables (Figura V.10); permitiendo al mismo tiempo que el fenantreno (en el microcosmos F y F+22B) y la inoculación (en el microcosmos F+22B) generen cambios selectivos en la estructura de la comunidad bacteriana del suelo. En consecuencia, los microcosmos F y F+22B mostraron comunidades microbianas notablemente diferentes a nivel de estructura genética (Figura V.13) y actividad deshidrogenasa (Figura V.12).

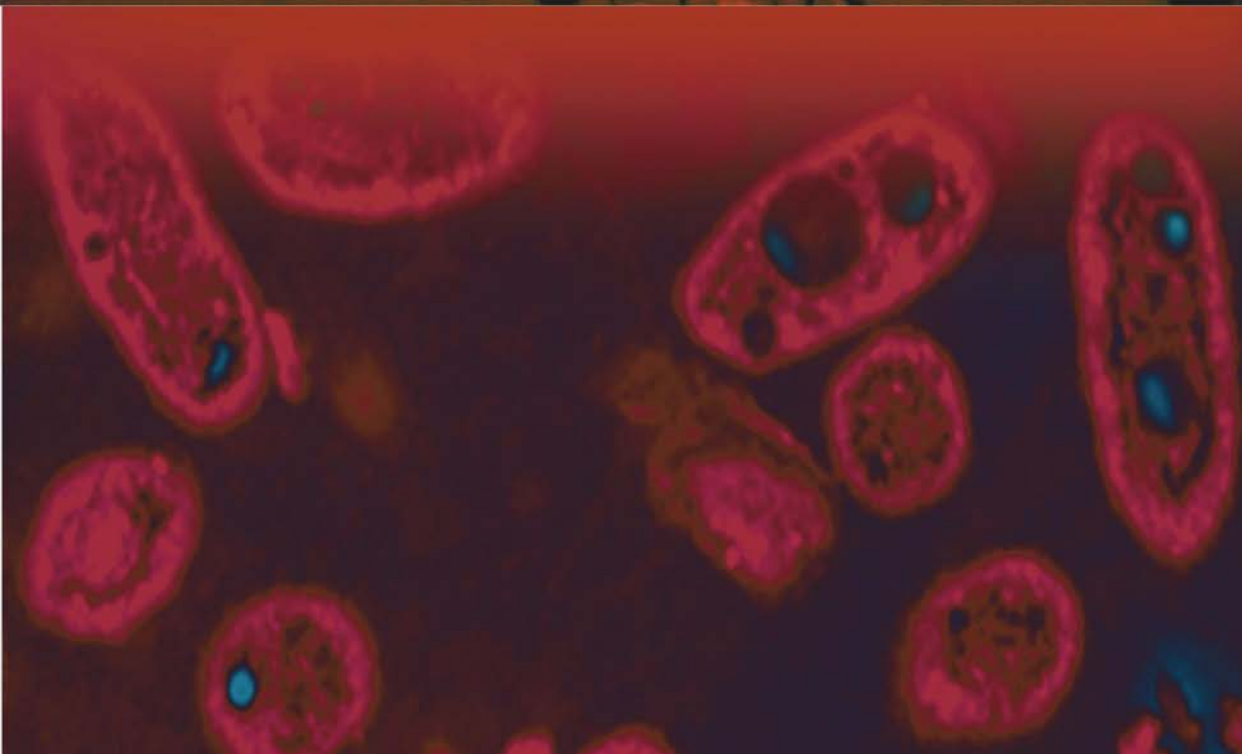
Un resultado importante es que, a pesar de las limitaciones observadas en la extracción de DNA y la amplificación por PCR en muestras ambientales (de Araújo y Schneider, 2008) y de las correspondientes a la electroforesis DGGE (como la co-migración de secuencias diferentes de DNA), hemos demostrado que el estudio de comunidades microbianas a través de los perfiles de DGGE resulta una herramienta válida para evaluar el efecto del inoculante sobre la dinámica bacteriana del suelo. Se ha demostrado que a pesar de que la alta abundancia del inoculante puede ser considerado como una posible causa de disturbio en los perfiles de DGGE (Gomes y col., 2005; Coppotelli y col., 2008), éste método nos ha permitido mostrar claras diferencias entre los perfiles de las comunidades bacterianas del suelo donde el inoculante se ha establecido bajo condiciones no competitivas (microcosmos F+22B bajo la condición NS) y aquellos en que la inoculación ha producido cambios selectivos en la estructura de la comunidad microbiana del suelo (microcosmos F+22B bajo la condición SR).

Los resultados de ésta parte del trabajo de tesis mostraron que las condiciones típicas de desecación de los suelos de la Patagonia semiárida (por debajo del 20% de WHC), limitan drásticamente el proceso de biodegradación de PAH, y que ni la bioestimulación ni la estrategia ABA utilizando una cepa degradadora de PAH seleccionada por su resistencia al estrés hídrico, superan las limitaciones del suelo de la Patagonia semiárida. Cuando el contenido de agua del suelo se incrementa (25% WHC) la estrategia ABA genera un efecto estimulador inicial en la biodegradación del fenantreno.



Estudio del proteoma de *Spingobium sp.*
22B bajo condiciones de desecación
ambiente

CAPÍTULO VI



VI. Estudio de las respuestas fisiológicas y moleculares de *Sphingobium sp. 22B* frente a diferentes estreses ambientales

Este capítulo del trabajo se enfoca principalmente en el estudio de los mecanismos que posee la cepa 22B para resistir las condiciones ambientales características de zonas semidesérticas como la Patagonia Central. La alta resistencia a la desecación, al déficit de carbono y nitrógeno, encontradas en la cepa patagónica 22B (Secciones IV.3.B.B, IV.3.C, IV.3.D) generó la inquietud de conocer los factores o propiedades que le permiten a éste microorganismo sobrevivir y mantenerse activo en regiones semiáridas y con suelos pobres en contenidos de nutrientes.

Debido a los resultados que se obtuvieron en los ensayos de resistencia al déficit de carbono y nitrógeno, junto con la búsqueda bibliográfica, se podría suponer que 22B es capaz de acumular compuestos de reserva tales como polihidroxibutirato (PHB) y glucógeno, y que en situaciones de estrés ambiental, esta capacidad podría darle ventajas para resistir en el ambiente.

Para poder comprobar las hipótesis planteadas se realizaron una serie de estudios fisiológicos, estructurales y moleculares en la cepa 22B, bajo diferentes condiciones de estrés.

Se analizó la respuesta de las células al cultivo en medios con un alto índice de Carbono/Nitrógeno con el fin de analizar la capacidad de la cepa 22B de acumular compuestos de reserva. En el año 1958, Macrae y Wilkinson reportaron que el contenido de PHB acumulado en *Bacillus megaterium* se incrementaba a índices crecientes de Carbono/Nitrógeno (Macrae y Wilkinson, 1958). Similares resultados se han reportado para otros microorganismos, los cuales sintetizan y acumulan PHB o glucógeno en presencia de un exceso de la fuente carbono y un déficit de la fuente de nitrógeno, mientras que el crecimiento y la replicación celular se ven disminuidos (Sudesh y col., 2000). La degradación del PHB o glucógeno acumulados le permitirían a las células mantener su metabolismo activo bajo condiciones desbalanceadas de crecimiento y la obtención de energía endógena para su adaptación y supervivencia bajo las condiciones fluctuantes del ambiente.

Además, se realizó el estudio del proteoma de 22B durante su incubación bajo condiciones de desecación, por ser este uno de los factores críticos en los ambientes semiáridos de la Patagonia, con el fin de identificar la expresión diferencial de proteínas relacionadas con la respuesta de las células a este estrés ambiental. Este estudio fue complementado con ensayos de recuentos de bacterias viables, microscopía electrónica y óptica y análisis del contenido de PHB y glucógeno.

VI.1 Análisis de la presencia de genes involucrados en la acumulación de sustancias de reserva en bacterias de la familia Sphingomonadaceae

En primer lugar se realizó un análisis bioinformático preliminar con una base de datos internacional (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), con el fin de detectar genes relacionados con la biosíntesis y acumulación de compuestos intracelulares de reserva como triacilglicéridos (TAG), ceras, glucógeno, polifosfatos y polihidroxialcanoatos (PHA) en diferentes proyectos genómicos de la familia de las *Sphingomonas* (*Sphingomonas wittichii*, *Sphingopyxis alaskensis* y *Sphingomonas* SKA58, *Sphingobium japonicum* UT26), géneros filogenéticamente relacionados con la cepa 22B.

No se encontraron genes relacionados con la acumulación de TAG y ceras (genes cera sintasa/diacilglicerol aciltransferasa, WS/DGAT) en ninguno de los genomas analizados, aunque sí genes putativos potencialmente involucrados en la biosíntesis y acumulación de polifosfatos, glucógeno y PHA. El análisis bioinformático preliminar fue útil para enfocar posteriormente los ensayos experimentales de acumulación de PHA y glucógeno, potenciales sustancias de reserva de carbono y energía endógena en las células de la cepa 22B.

VI.2 Estudio sobre la capacidad de la cepa 22B para acumular compuestos de reserva

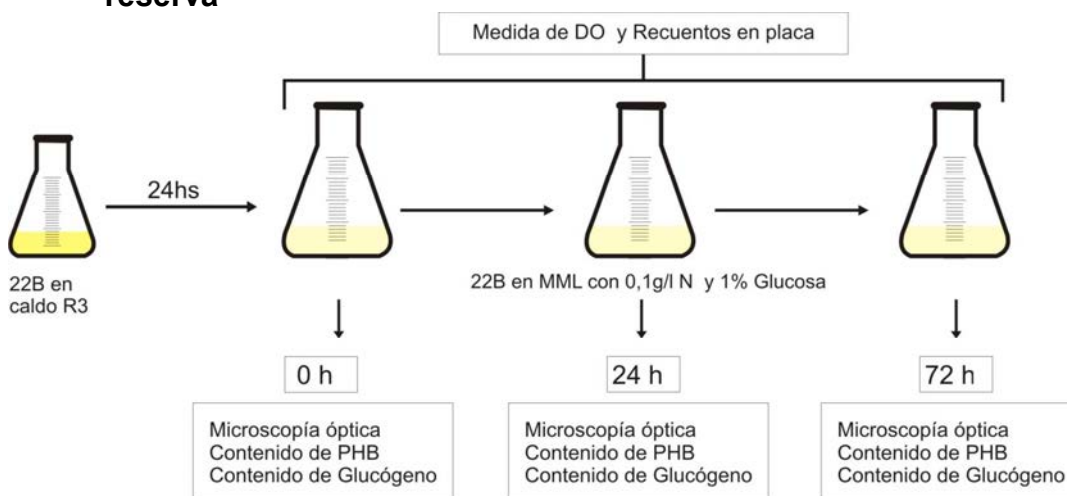


Figura VI.1: Esquema del ensayo de cultivo de la cepa 22B utilizando el medio MML con déficit de nitrógeno y 1% de Glucosa.

Se estudió la cinética de crecimiento de 22B en un medio con alto índice Carbono/Nitrógeno (100/1) mediante mediciones de DO a 600nm y recuentos en placa durante 72 h. La Figura VI.1 muestra el esquema de trabajo utilizado. Los resultados de la curva de crecimiento de 22B se muestran en la Figura VI.2.

Al analizar los resultados de la curva de crecimiento de 22B se observó un incremento relativamente constante en el log DO a 600nm durante casi todo el tiempo del ensayo (Figura VI.2 B). La curva del recuento de viables, a diferencia de la obtenida por medición de DO a 600nm, registró un aumento en el número de ufc hasta las primeras 24 h (fase exponencial), seguido de una meseta de la curva que indica el ingreso del cultivo a la fase estacionaria de crecimiento (Figura VI. 2 A). Estos resultados sugieren que el incremento en la DO a 600nm luego de las 24 h de cultivo no se debería al crecimiento del número de células, sino al aumento del volumen celular debido a la posible acumulación de algún compuesto de reserva.

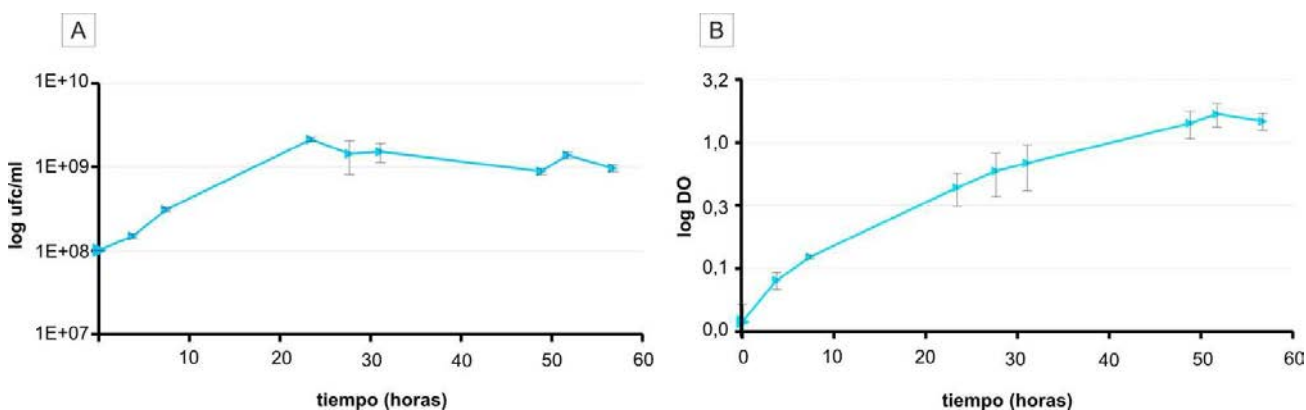


Figura VI.2: Cinética de crecimiento de 22B en MML con 0,1g/l de $(\text{SO}_4)_2\text{NH}_4$ y 1% de Glucosa durante 60 horas. A: Recuentos por ufc/ml. B: Medida de la DO a 600nm.

Con el objetivo de analizar la capacidad de 22B de acumular PHB y/o glucógeno en presencia de un exceso de la fuente de carbono y un déficit de la fuente de nitrógeno, se tomaron muestras de células a diferentes tiempos de incubación (0, 24 y 72 h) y se realizaron estudios morfológicos y analíticos. En primer lugar, se realizaron tinciones de las células con Sudan Black B para observar por microscopía óptica con el fin de detectar inclusiones intracelulares de características lipídicas.

Las imágenes obtenidas de la tinción con Sudán Black B mediante microscopía óptica se muestran en la Figura VI.3, donde se observaron células teñidas de rosa al inicio del experimento (safranina), mientras que a partir de las 24 h las células aparecieron teñidas de color violeta-negro indicando la presencia de gránulos hidrofóbicos (Burdon, 1946).

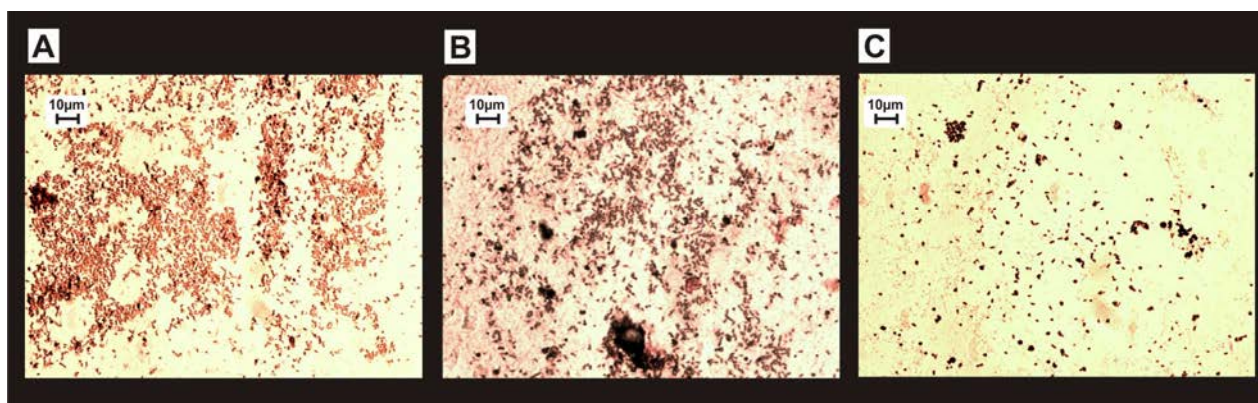


Figura VI. 3: Tinciones con Sudan Black B de la cepa 22B crecidas en MML con 1g/l de $(\text{SO}_4)_2\text{NH}_4$ y 1% de Glucosa al inicio del experimento (A), a las 24 h (B) y a los 72 h (C).

Posteriormente, se identificó la presencia de PHB en las células de 22B a través de análisis de cromatografía gaseosa utilizando estándares del compuesto. Este análisis demostró que *Sphingobium sp.* 22B fue capaz de acumular cantidades significativas de PHB durante su cultivo en condiciones de déficit de fuente de nitrógeno y en presencia de un exceso de fuente de carbono (Tabla VI.1). El contenido máximo de PHB en este ensayo se alcanzó al inicio de la fase estacionaria de crecimiento (44,9% de PHB por peso seco celular), lo cual se correlaciona con el incremento en la DO a 600nm observado en el cultivo celular (Tabla VI.1 y Figura VI.1). En etapas tardías del cultivo se observó una cierta movilización de los lípidos acumulados por las células previamente (Tabla VI.1).

Tabla VI. 1: Contenido de PHB en la cepa 22B a las 0, 24 y 72 horas creciendo en 0,1 g/l de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ y 1% de Glucosa.

Tiempo de incubación (h)	Contenido de PHB (% PSC)
0	1,7
24	44,9
72	26,1

Por otro lado, se analizó la capacidad de la cepa 22B de sintetizar glucógeno a partir de glucosa como única fuente de carbono. Los resultados obtenidos mediante el análisis en cromatografía en papel demostraron que *Sphingobium sp.* 22B fue capaz de producir glucógeno a partir de glucosa en las condiciones de cultivo utilizadas (Figura VI.4). Según la cromatografía semicuantitativa en papel realizada, la muestra tomada a las 24 h presentó el mayor contenido de glucógeno en las células (Figura VI.4). La cuantificación del contenido de

glucógeno de la muestra de 24 h mediante un método enzimático (Sección III.18) fue de $4,76 \pm 1,41$ %, PSC.

Los resultados demostraron que *Sphingobium sp.* 22B posee la capacidad de sintetizar al menos dos tipos de compuestos de reserva de carbono y energía endógena, como son el PHB y el glucógeno.



Figura VI.4: Cromatografía en papel del glucógeno extraído a partir de pellets liofilizados de la cepa 22B crecida en MML con 0,1g/l de $(SO_4)_2NH_4$ y 1% de glucosa a las 0, 24 y 72 h. S: estándar de glucógeno 1mg/ml.

VI.3 Estudio sobre la capacidad de la cepa 22B de movilizar el PHB y glucógeno acumulados

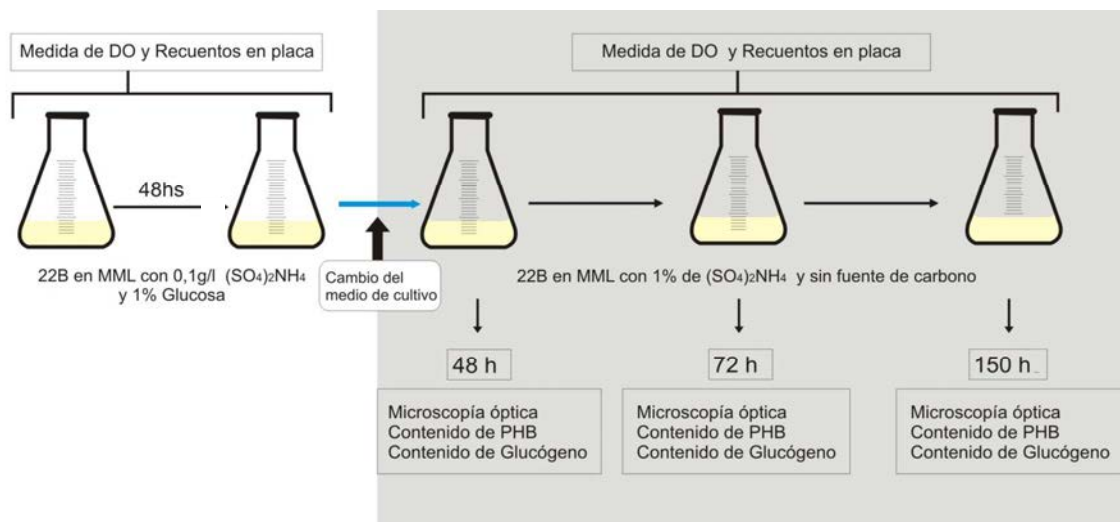


Figura VI.5: Esquema general del ensayo de movilización de sustancias de reserva de 22B en ausencia de la fuente de carbono.

Con el objetivo de determinar si *Sphingobium sp. 22B* era capaz de degradar PHB y/o glucógeno en condiciones de déficit de carbono, como frecuentemente ocurre en el ambiente, se realizó el ensayo mostrado en la Figura VI.5. Se incluyó en el mismo el pre-cultivo de 22B durante 48 h en condiciones de acumulación de compuestos de reserva. El comportamiento de la cepa durante el ensayo se determinó mediante la tinción específica de compuestos hidrofóbicos con el colorante Sudan Black B, recuentos de viables (ufc/ml), medidas de DO a 600nm y variación en el contenido de PHB y glucógeno a las 48, 72 y 150 h de iniciado el experimento (Figura VI.5).

Los resultados de la variación en el número de ufc/ml y en la DO a 600nm del cultivo a lo largo del ensayo se observan en la Figura VI.6.

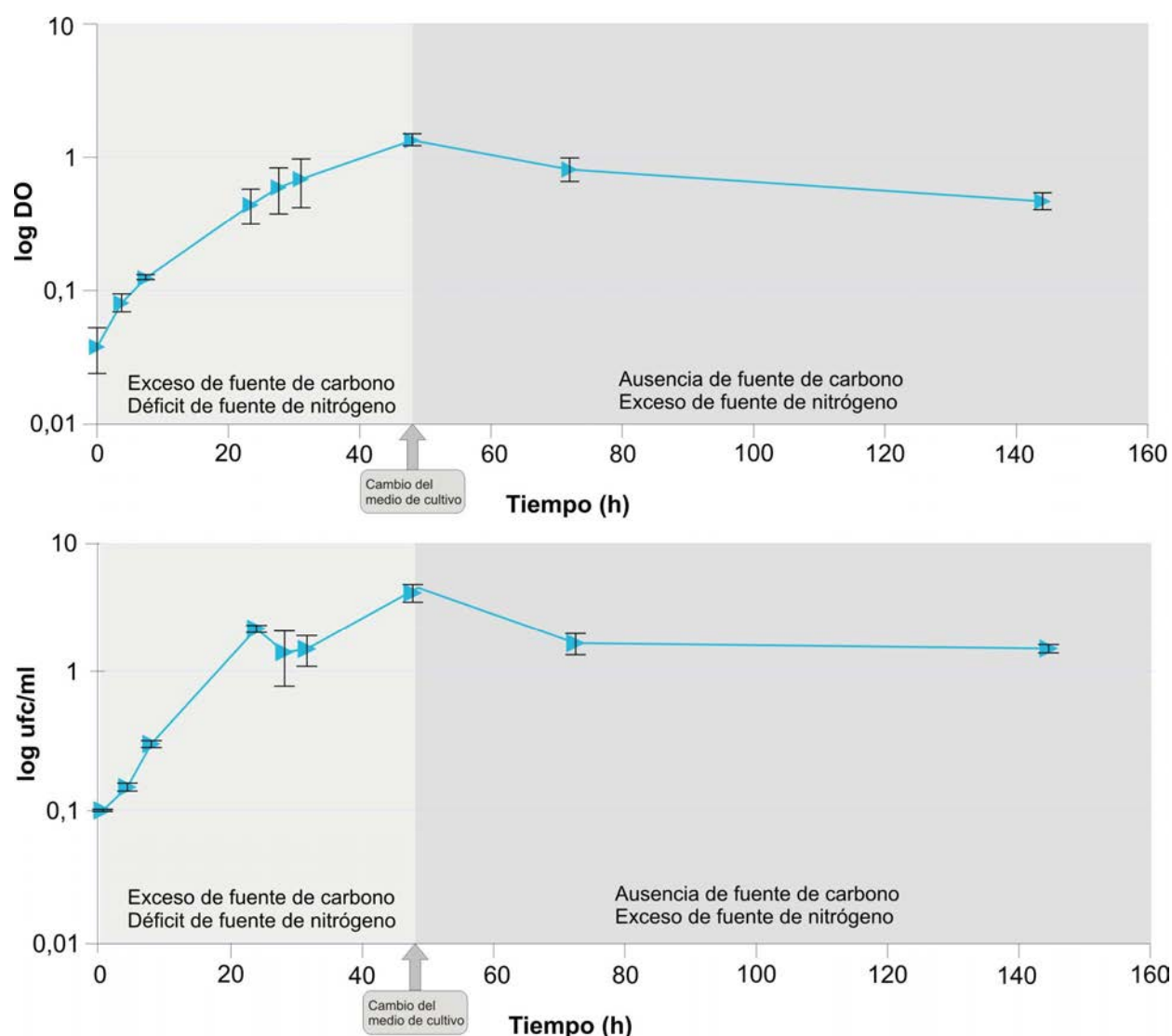


Figura VI.6: Cinética de crecimiento de 22B en MML 0,1g/l de nitrógeno y 1% de Glucosa hasta las 48 h (pre-cultivo) seguida de la resuspensión de 22B en MML con 1% de nitrógeno y ausencia de fuente de carbono por 150 h.

En general, el recuento de viables y la DO a 600nm se incrementaron durante el pre-cultivo de las células en medio mineral con un exceso de la fuente de carbono y déficit de la fuente de nitrógeno, mientras que ambos parámetros se mantuvieron o disminuyeron luego de la resuspensión de las células en ausencia de la fuente de carbono (Figura VI.6).

En la Figura VI.7 se muestran las tinciones con Sudan Black B realizadas a las 48, 72 y 150 h de iniciado el experimento. Las imágenes obtenidas muestran la disminución en el tamaño y cantidad de células teñidas de violeta a medida que aumenta el tiempo de incubación en ausencia de fuente de carbono.

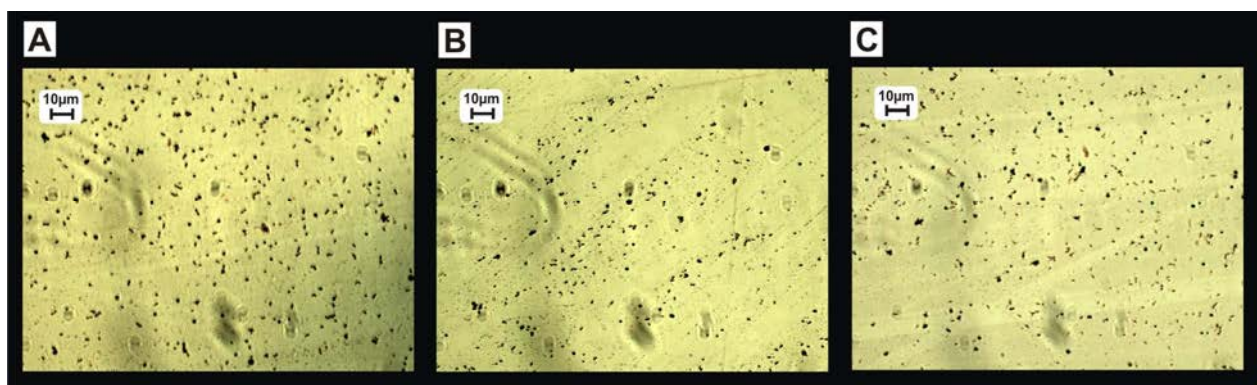


Figura VI.7: Imágenes de microscopio óptico de células teñidas con Sudan Black B durante su incubación en ausencia de la fuente de carbono. (A): 48 h, (B): 72 h y (C):150 h

La Figura VI.8 muestra el análisis semicuantitativo del contenido de glucógeno extraído mediante hidrólisis alcalina. Se observa una clara disminución del contenido de glucógeno comparando la muestra obtenida a las 150 h de incubación con la obtenida a las 48 h, lo cual sugiere una movilización del glucógeno celular durante la incubación del microorganismo en ausencia de la fuente de carbono. Por otro lado, también se observó la degradación de PHB en las células bajo estas condiciones, llegando casi al 90% de degradación luego de 150 h de cultivo (Tabla VI.2).

Los resultados expuestos demuestran la capacidad de la cepa 22B de movilizar el PHB y glucógeno durante el cultivo de las células en ausencia de la fuente de carbono, lo cual sugiere que estos compuestos podrían servir de fuente endógena de carbono y energía en ausencia de nutrientes externos.

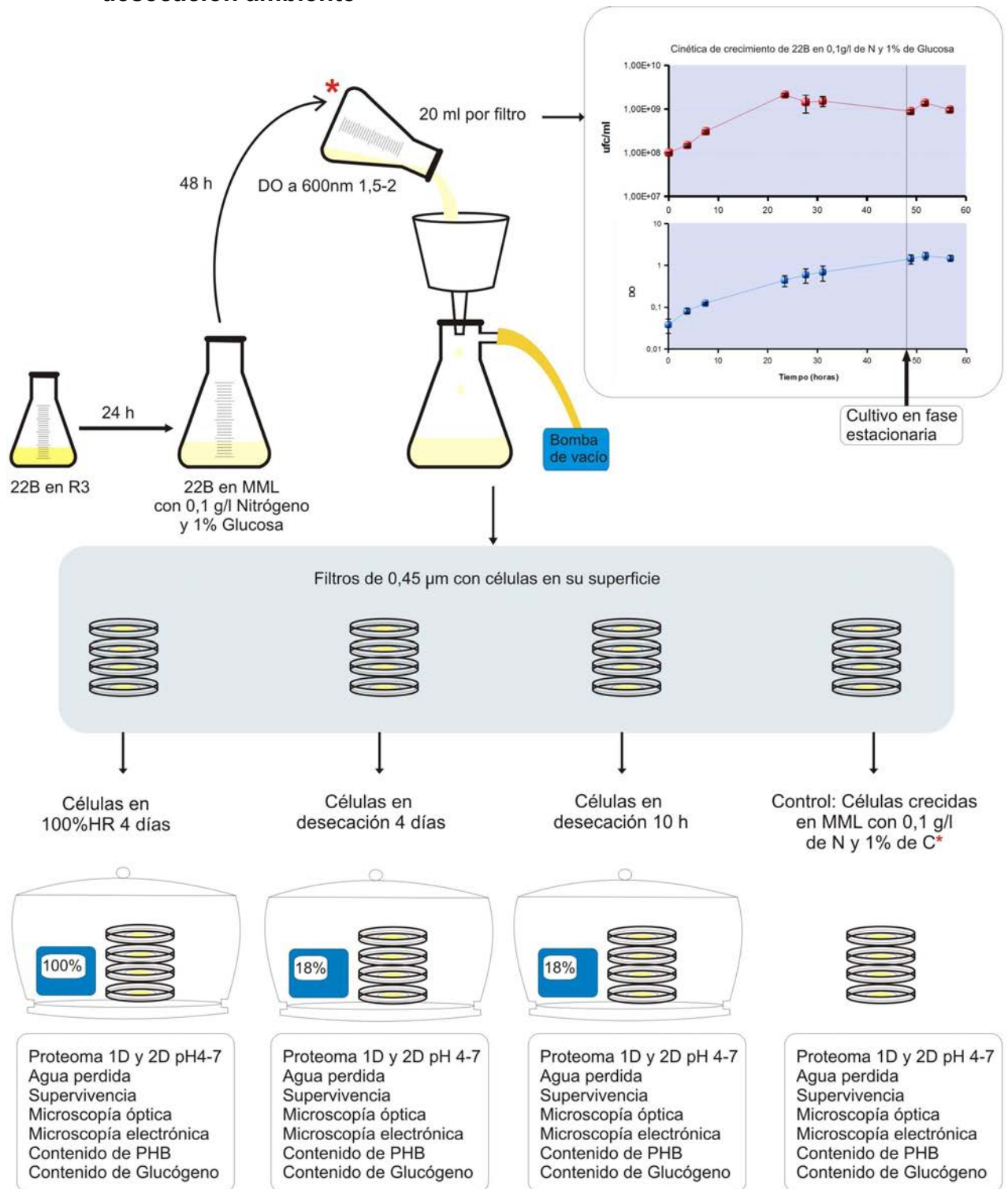
Tabla VI.2: Contenido de PHB en la cepa 22B a las 48, 72 y 150 h de exposición en un medio con ausencia total de la fuente de carbono.

Tiempo de incubación (h)	Contenido de PHB (% de PSC)
48	16,7
72	13,5
150	1,5



Figura VI.8: Cromatografía en papel del glucógeno extraído a partir de células incubadas en ausencia de la fuente de carbono. to: 48 h, t1: 72 h, t5: 150 h. S: estándar de glucógeno 1mg/ml.

VI.4 Respuestas fisiológicas y moleculares (Proteoma) de la cepa 22B a la desecación ambiente



* La condición Control corresponde a células crecidas en MML con 0,1g/l N y 1% Glucosa por 48 h, filtradas y resuspendidas inmediatamente en SF

Figura VI.9: Esquema general del ensayo de la respuesta de 22B a las condiciones de desecación.

Este ensayo tuvo como objetivo analizar de manera integral la respuesta de 22B frente a las condiciones de desecación, por ser este uno de los factores críticos en los suelos de la Patagonia semiárida. La cepa 22B se pre-cultivó en condiciones de acumulación de los compuestos de reserva y luego de 48 h las células se colocaron por filtración sobre un filtro de nitrato de celulosa (Figura VI.9). Los filtros con las células fueron sometidos a las siguientes condiciones de estrés:

- Condición desecación 10 h: Los filtros se incubaron en un desecador con 18% HR por 10 h.
- Condición desecación 4 días: Los filtros se incubaron en un desecador con 18% HR por 4 días.
- Condición húmeda: Los filtros se incubaron en un recipiente con 100% HR durante 4 días. Debido a que las células colocadas sobre los filtros durante 10 h y 4 días sufren estrés por falta de nutrientes, se incluyó en los ensayos la condición húmeda con el objetivo de diferenciar la respuesta propia del estrés hídrico con aquella relacionada al déficit de nutrientes.

Con el fin de determinar el porcentaje de agua eliminada por evaporación y el porcentaje de supervivencia de las células en cada condición, se realizaron ensayos gravimétricos y de recuentos en placa. Se tomaron muestras de las células sometidas a las condiciones de desecación por 4 días y condición húmeda para analizar sus cambios morfológicos mediante microscopio electrónico de transmisión y microscopía óptica luego de tinción con Sudan Black B. Se estudió además la variación en el contenido de PHB y de glucógeno intracelular para las mismas condiciones antes nombradas. Los resultados fueron comparados con los obtenidos a partir de células colocadas en filtros y resuspendidas inmediatamente sin someterlas a ninguna condición de estrés (Control).

La Tabla VI.3 muestra los porcentajes de agua eliminada por evaporación y supervivencia de 22B en las condiciones de desecación y en la condición húmeda (100% HR). Si bien la pérdida de agua fue significativa luego de 10 h y 4 días de incubación bajo desecación (94-96% con respecto al inicio del experimento), las células mostraron una gran capacidad de supervivencia bajo estas condiciones extremas (entre 80 a 96% con respecto al inicio del experimento). Este resultado estuvo en concordancia con los obtenidos en el ensayo de resistencia al estrés hídrico comentado en el capítulo IV de Resultados (Sección IV.3.B), donde 22B fue la cepa más resistente a la desecación ($82,2\% \pm 2,3$) de todos los microorganismos testeados. Se observó una pérdida de agua significativa ($58,8\% \pm 5,1$) en el ensayo de la condición húmeda, por lo que se consideró que los mecanismos de respuesta a la desecación en la cepa 22B podrían estar también activados bajo ésta condición.

Tabla VI.3: Porcentaje de agua perdida y porcentaje de supervivencia de 22B bajo las condiciones de desecación por 10 h y 4 días, y la condición húmeda (100% HR)

Condiciones	Porcentaje de agua perdida	Porcentaje de supervivencia
Desecación 10 h	96,0±1,6	96,8±1,8
Desecación 4 días	93,8±0,1	80,6±2,6
Húmeda	58,8±5,1	99,2±0,45

Se tomó como 100% aquel valor obtenido en el control.

La Figura VI.10 muestra las imágenes obtenidas a partir de los preparados teñidos con Sudan Black B observados al microscopio óptico. Se observó en todos los casos la presencia de compuestos hidrofóbicos, evidenciados por la coloración violeta de las células.

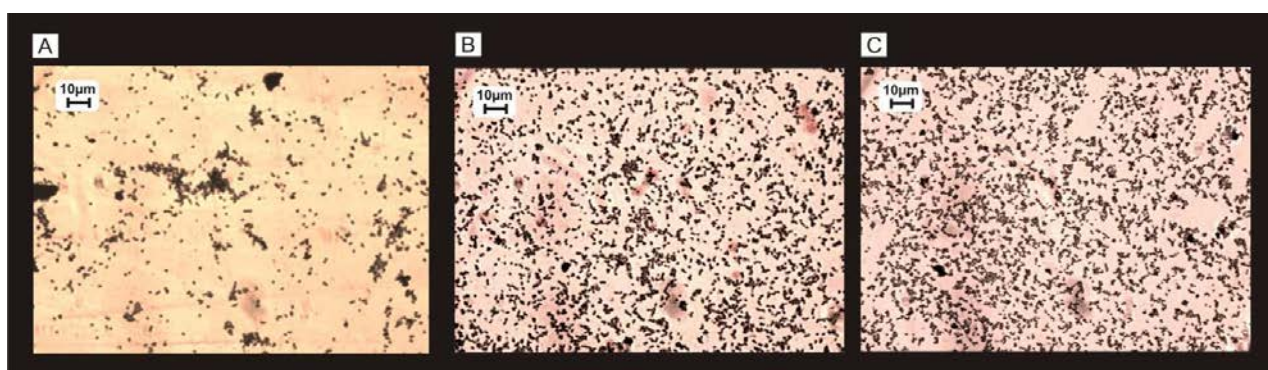


Figura VI.10: Imágenes obtenidas al microscopio óptico a partir de la tinción con Sudan Black B de la cepa 22B sometida a (B): Condición de Desecación por 4 días. (C): Condición Húmeda. (A): Control: células crecidas en MML con 0,1g/l de nitrógeno y 1% de glucosa por 48 h, filtradas y resuspendidas inmediatamente sin someterlas a ninguna condición de estrés.

Por otro lado, se analizaron las células mediante microscopía electrónica de transmisión (MET) (corte ultra-delgado) a fin de detectar cambios morfológicos generados por el tratamiento de desecación. En estos estudios se encontraron algunas evidencias de la presencia de un EPS como respuesta a los cambios de humedad en el ambiente por parte de las células de la cepa 22B. En la Figura VI.11 se observó la presencia de una mayor proporción de un material extracelular con diferente electrodensidad en las células sometidas a 4 días de desecación en comparación con el control. Algunos autores han reportado que los EPS poseen éstas características cuando son observados al MET (Clark y col., 2007). No se observó la presencia de éste material de diferente electrodensidad en las células de la condición húmeda. En la

Figura VI.12 de observación directa al MET se muestra la presencia de un material externo a las células principalmente bajo condiciones de desecación (flechas amarillas) y en menor medida en la condición húmeda (flechas verdes), a diferencia de las células crecidas en el ensayo control y en un medio rico como el caldo R3 (Figura VI.13).

Otro de los cambios morfológicos evidentes en las muestras fue la presencia diferencial de gránulos intracitoplasmáticos en la condición control y luego de 4 días bajo desecación, en comparación con las células de la condición húmeda. En los estudios microscópicos se observó además que las células de las condiciones desecación y control (Figura VI.11) contenían gránulos de mayor tamaño (posiblemente gránulos de PHB) que las células sometidas a la condición húmeda.

Con el fin de correlacionar lo observado con los análisis de microscopía óptica y electrónica, se realizaron análisis cuantitativos del contenido de PHB y glucógeno bajo las condiciones estudiadas. Los resultados obtenidos en la cuantificación de glucógeno intracelular y PHB para las condiciones de desecación por 4 días y condición húmeda se muestran en la Tabla VI.4.

Durante la incubación de la cepa 22B bajo la condición húmeda, las células degradaron aproximadamente un 50% del PHB y del glucógeno acumulados previamente (Tabla VI.4). Sin embargo, cuando las células se incubaron bajo condiciones de desecación durante 4 días, solo el glucógeno fue movilizado en proporciones significativas (aproximadamente 77% con respecto al contenido inicial), mientras que no se observaron variaciones en el contenido de PHB (Tabla VI.4).

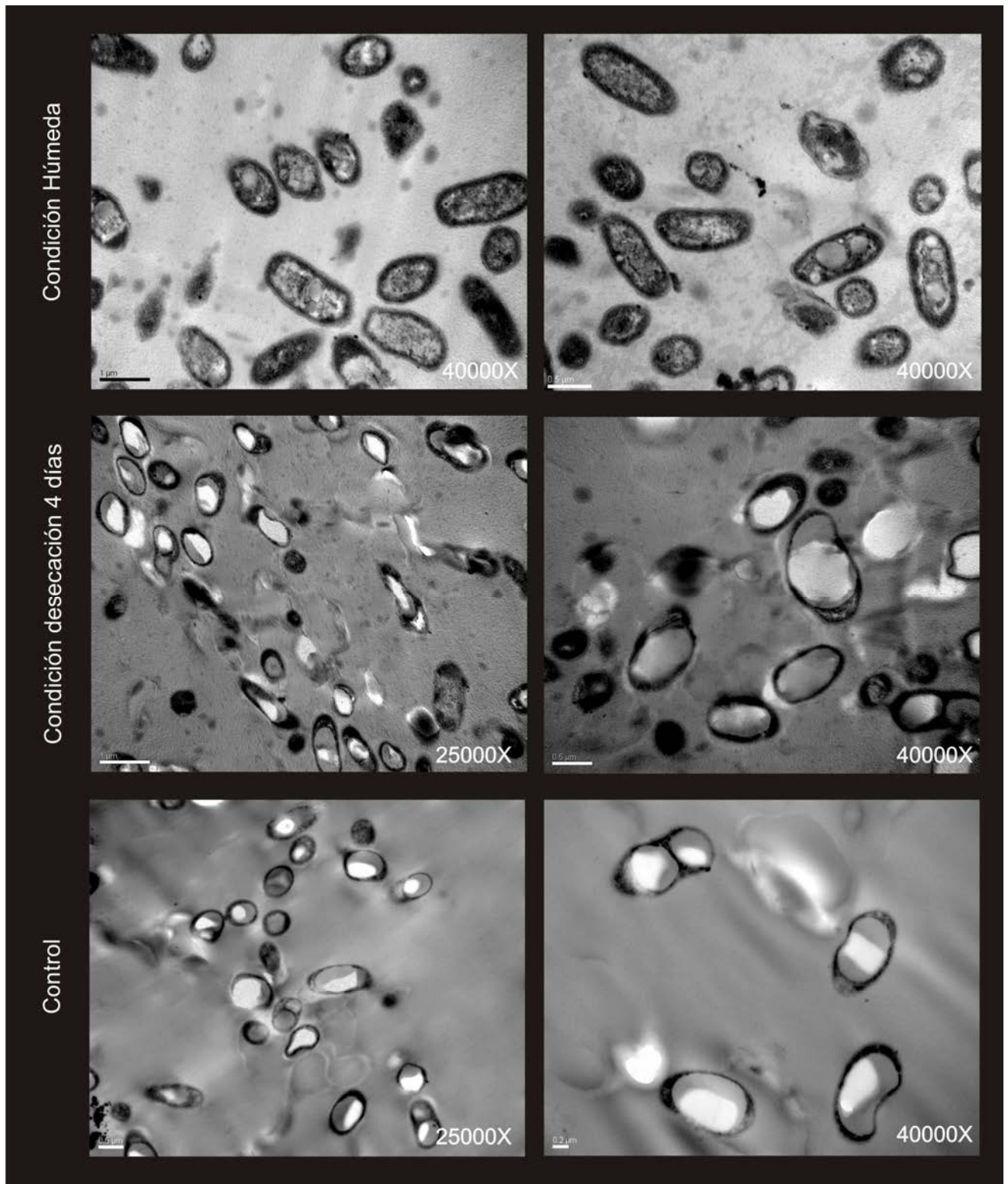


Figura VI.11: Imágenes de MET de cortes ultrafinos de la cepa 22B sometida a las condición húmeda y desecación durante 4 días. Control: células crecidas en MML con 0,1g/l de nitrógeno y 1% de glucosa por 48 h, filtradas y resuspendidas inmediatamente sin someterlas a ninguna condición de estrés.

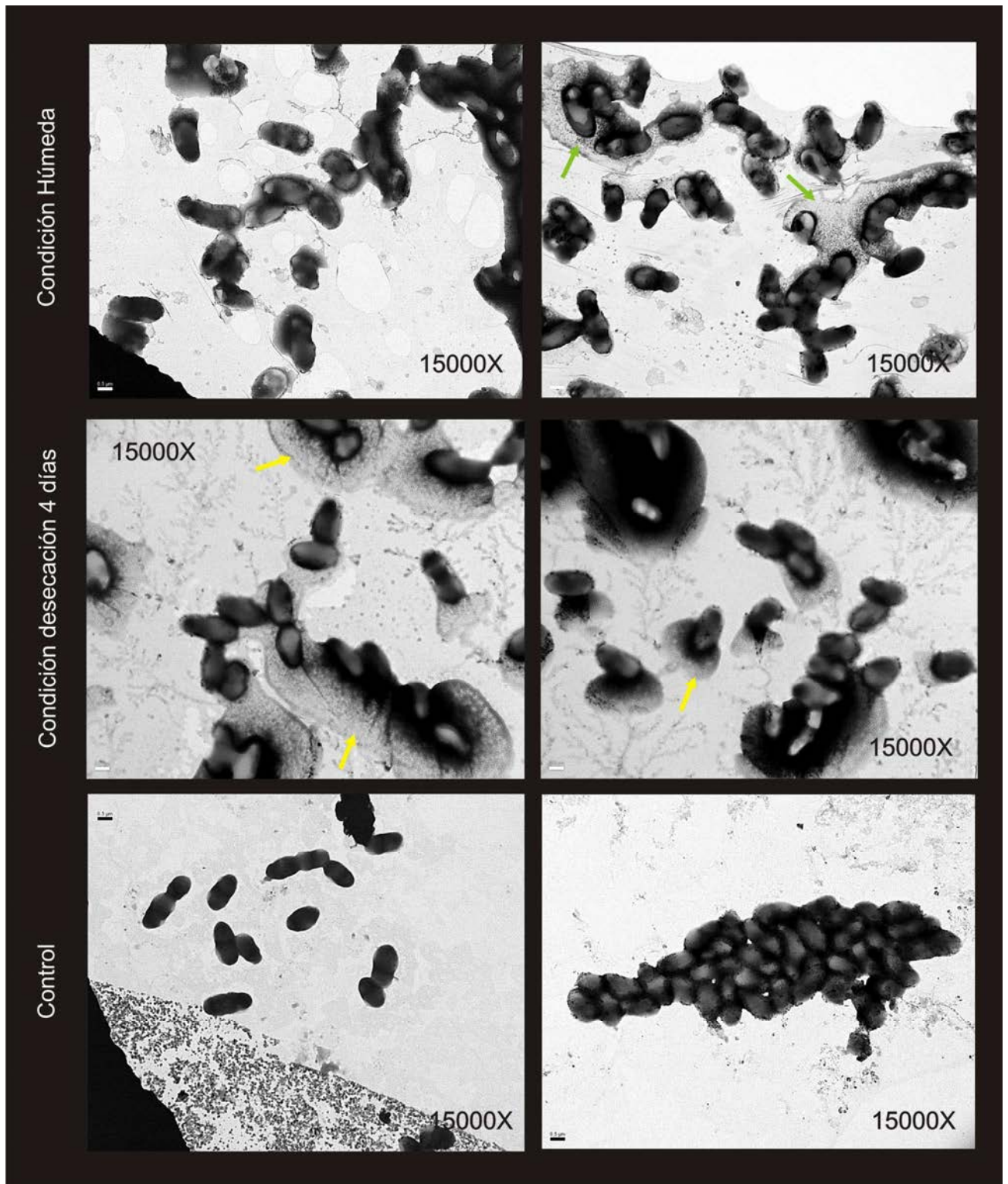


Figura VI.12: Imágenes de MET directas de la cepa 22B sometida a las condiciones húmeda y desecación durante 4 días. Control: células crecidas en MML con 0,1g/l de nitrógeno y 1% de glucosa por 48 h, filtradas y resuspendidas inmediatamente sin someterlas a ninguna condición de estrés. Flechas verdes y amarillas: indican la presencia de una sustancia externa a las células (probablemente EPS). Las células no fueron contrastadas con metal pesado debido a su alta electrodensidad.

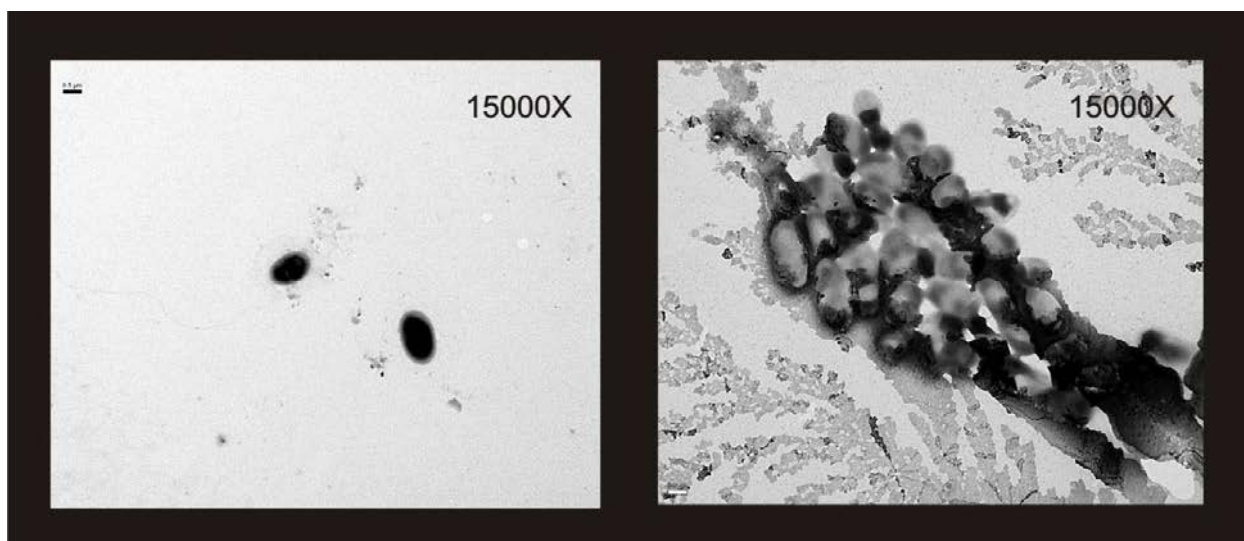


Figura VI.13: Imágenes de MET de la cepa 22B creciendo en caldo R3. Las células no fueron contrastadas con metal pesado debido a su alta electrodensidad.

Tabla VI.4: Contenido porcentual de glucógeno y PHB en 22B sometida a las condiciones de desecación por 4 días y húmeda

Condiciones	Porcentaje de PHB	Porcentaje de Glucógeno
Control (*)	44,9±6,4	4,31±1,26
Condición Húmeda	22,1±15,9	2,096±0,47
Condición Desecación 4 días	45,7±28,4	0,99±0,40

(*) Control: Muestra el contenido de PHB y de glucógeno al inicio del ensayo, previo al tratamiento de desecación y de la condición húmeda

El estudio sobre las respuestas de la cepa 22B a la desecación se complementó con un análisis del proteoma para evaluar la expresión diferencial de la fracción de proteínas solubles en las diferentes condiciones mencionadas (desecación por 10 h y 4 días, y condición húmeda). Se realizó la extracción de las proteínas solubles para todas las condiciones y los extractos proteicos obtenidos fueron analizados mediante electroforesis en geles SDS-PAGE y electroforesis bidimensionales (isoelectro-enfoque a pH 4-7). Los patrones de expresión de las proteínas en cada condición fueron comparados con el obtenido a partir de células que no fueron sometidas a ninguna condición de estrés (control). En la Figura VI.14 se muestra el perfil obtenido con SDS-PAGE para las condiciones de desecación 10 h y 4 días, húmeda y control. Sorprendentemente no se observaron diferencias notorias en el perfil de proteínas obtenidos para las cuatro condiciones investigadas.

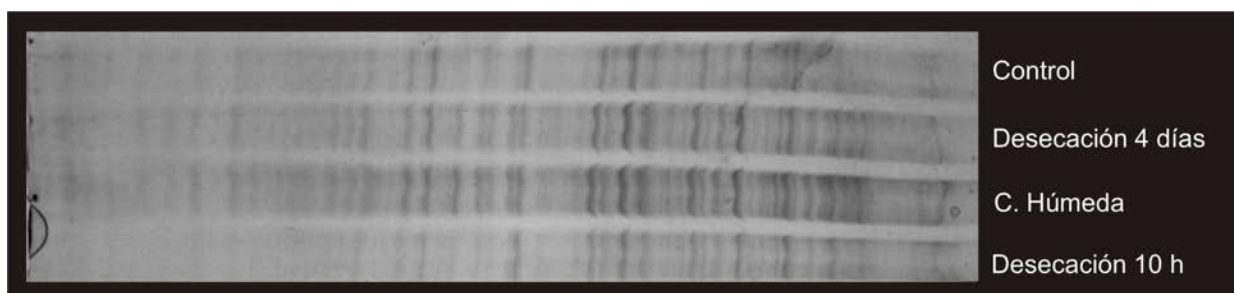


Figura VI.14: SDS-PAGE 12% Acril-bisacrilamida obtenido a partir de los extractos de proteínas solubles de la condición de desecación 10 h y 4 días, la condición húmeda y el control.

Los resultados de los geles bidimensionales obtenidos a partir de las proteínas solubles para cada condición se muestran en las Figura VI.15. Este análisis de la expresión de proteínas solubles en *Sphingobium sp. 22B* permitió evidenciar algunas diferencias entre las condiciones de incubación de las células utilizadas, aunque no se observó en general un gran número de cambios.

En el estudio se detectaron cuatro proteínas con expresiones diferenciadas al comparar las distintas condiciones: las proteínas identificadas con la letra A, B y D se sobreexpresaron en todas las condiciones ensayadas (desección por 10 h, 4 días y húmeda) comparadas con la muestra control. En el caso de las proteínas B y D, la mayor expresión se observó en la condición de desecación por 10 h (Figura VI.15). La proteína denominada C se encontró expresada principalmente en la muestra de desecación por 4 días.

Las proteínas A, B, C y D fueron extraídas del gel de desecación por 4 días y secuenciadas mediante espectrometría de masa. Se secuenciaron además las proteínas B y D correspondientes al gel de la muestra control con el fin de establecer que la identidad de los mismos coincidiera con las obtenidas a partir del gel de desecación por 4 días.

El análisis de espectrometría de masas reveló las identidades de las proteínas seleccionadas en las diferentes condiciones del ensayo. La proteína A sobreexpresada en todas las condiciones ensayadas al comparar con el gel control, correspondió a una proteína de peso molecular 40.391 Da y presentó una identidad del 30% con una acetil-CoA C-acetil transferasa (*AtoB*) del microorganismo *Sphingobium japonicum* UT26S. Esta enzima podría estar involucrada en el metabolismo del polihidroxitirato (PHB).

El spot B sobreexpresado en las condiciones de desecación y húmeda, aunque en mayor medida en la condición de desecación por 10 h, correspondió a una proteína de peso molecular 36.651 Da y pl 5,98, la cual presentó 41% de identidad con la proteína hipotética SJA_C1-23830 de *Sphingobium japonicum* UT26S. Realizando alineamientos de la secuencia de SJA_C1-23830 en bases de datos del NCBI se encontró que la misma posee un 60% de identidad con una proteína inducible sensora de la osmolaridad en una bacteria marina

(*Oceanicola granulosus* HTCC2516 NCBI Reference Sequence: ZP_01157004.1) (Cho y Giovannoni, 2004) y un 30% de identidad con una proteína rica en glicina de *Ramlibacter tataouinensis* TTB310 (NCBI Reference Sequence: YP_004618397.1), la cual estaría involucrada en la respuesta al estrés en este microorganismo (Heulin y col., 2003).

El análisis bioinformático de la proteína C sobreexpresada en el gel de desecación por 4 días, mostró identidad con una enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *Sphingobium japonicum* UT26S, de PM 35.768 Da y pI de 6,08, involucrada probablemente en el metabolismo de los carbohidratos. Esta enzima podría estar participando en la biosíntesis de un soluto compatible o una sustancia polimérica extracelular (EPS) en condiciones de desecación.

La proteína D, expresada mayoritariamente en la condición de desecación por 10 h, y en menor medida en los geles de desecación por 4 días y de condición húmeda, formaría parte de la familia de la "OOP-family proteins". Se postula que este tipo de proteínas forman canales en la membrana externa de las bacterias Gram negativo para el transporte de solutos de bajo peso molecular y su expresión se encontraría relacionada con la respuesta al estrés en ciertas bacterias (Wang 2002). En la Tabla VI.5 se resume las principales características de las proteínas analizadas.

Tabla VI.5: Características de las Proteínas A, B, C y D expresadas diferencialmente durante los ensayos de desecación e identificadas mediante espectrometría de masa.

Spot	Alinea con	Organismo	PM (Da)	Nombre	PI	P	I %
A	gi 294011684	<i>Sphingobium japonicum</i> UT26S	40.391	acetyl-CoA C-acetyltransferase	---	131	30
B	gi 294012369	<i>Sphingobium japonicum</i> UT26S	36.651	hypothetical protein SJA_C1-23830. DUF2171 superfamily	5,98	110	41
C	gi 294011296	<i>Sphingobium japonicum</i> UT26S	35.768	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	6,08	100	37
D	gi 294011226	<i>Sphingobium japonicum</i> UT26S	37.557	OOP-family protein	4,58	92	26

PI: punto isoeléctrico. PM: Masa Nominal. P: Puntaje. I%: Identidad porcentual

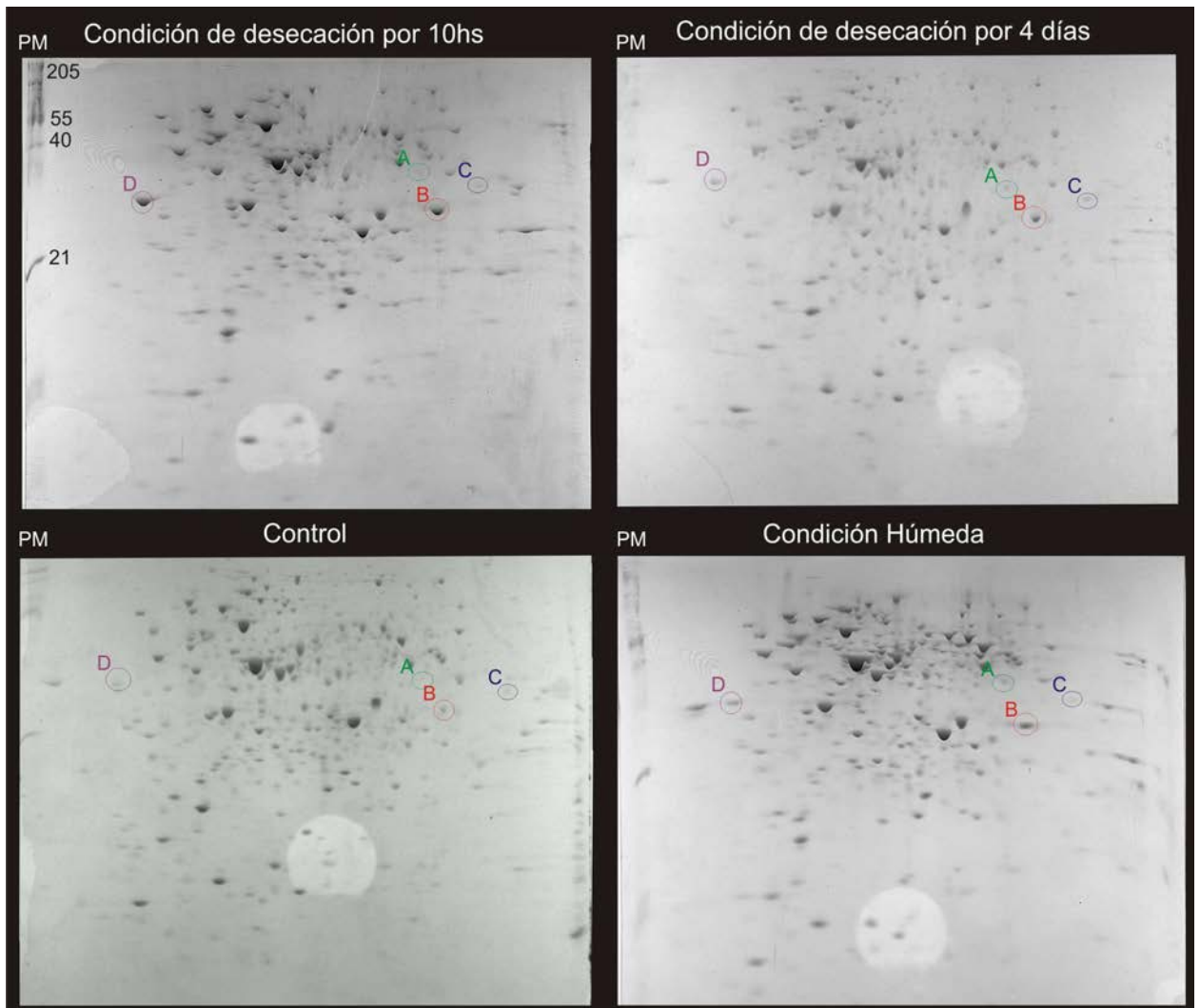


Figura VI.15: Geles bidimensionales de poliacrilamida al 12% (isoelectroenfoque en un gradiente pH 4-7 y SDS-PAGE) obtenidos a partir del extracto de proteínas soluble de células de 22B sometidas a las condiciones de desecación por 10 h y 4 días, y partir de la condición húmeda. Los geles de las condiciones fueron comparados con el obtenido a partir del extracto de proteínas solubles de la cepa 22B sin someterla a condición de estrés (Control). Los círculos de colores y las letras indican las proteínas que fueron extraídas de los geles y analizadas por espectrometría de masas. PM: patrón de peso molecular.

VI.5 Discusión

La cepa autóctona *Sphingobium* sp. 22B es un microorganismo Gram negativo, móvil y no esporulado, que fue aislado de una muestra de suelo de la Patagonia semiárida. En los ensayos experimentales realizados en el Capítulo V se demostró que esta cepa fue capaz de persistir largos períodos de tiempo en el suelo luego de su inoculación durante los procesos de bioaumentación. Adicionalmente, en ensayos experimentales de los Capítulos IV y VI demostró poseer una gran tolerancia a la desecación, el cual es uno de los principales factores ambientales de la región patagónica donde fue aislada. Todo lo expuesto, sugiere que la cepa 22B posee mecanismos celulares que le permiten sobrevivir y mantener su actividad bajo las condiciones ambientales fluctuantes típicas de la Patagonia semiárida. La capacidad de adaptarse exitosamente a las condiciones del ambiente que se quiere biorremediar es uno de los requerimientos que debe cumplir una cepa bacteriana que se utilice como inóculo de biodegradación, además de su habilidad para degradar los hidrocarburos contaminantes. Uno de los objetivos del presente trabajo fue investigar la presencia de algunos mecanismos o procesos que permitan explicar, al menos en parte, la tolerancia de la cepa 22B a los principales factores ambientales de la Patagonia semiárida. En este contexto, uno de los aspectos investigados fue la respuesta de las células a la presencia de un déficit de la fuente de nitrógeno y un exceso de la fuente de carbono. Una situación similar se podría generar luego de un derrame de hidrocarburos sobre los suelos pobres en nitrógeno de la región patagónica. Los ensayos realizados demostraron que la cepa *Sphingobium* sp. 22B fue capaz de mantenerse activa bajo estas condiciones (Figura IV.12, IV.13), y de acumular compuestos de reserva, tales como los polihidroxiacetato (PHA) y glucógeno (Tabla VI.1, Figura VI.4). La síntesis y acumulación de polihidroxiácidos (PHA) en condiciones desbalanceadas de nutrientes es una propiedad ampliamente distribuida en procariontes, habiéndose reportado en numerosos géneros de bacterias Gram negativo como *Azotobacter* (Page y col., 1993), *Comamonas* (Lee y col., 2004), *Pseudomonas* (Bertrand y col., 1990), *Ralstonia* (Nurbas y col., 2004), *Vibrio* (Chien y col., 2007), y *Sphingopyxis* (Godoy y col., 2003), entre otros. En un trabajo previo se reportó la capacidad de acumular PHA en porcentajes que variaron entre un 2,9 a 70,2% (p/p) en bacterias relacionadas con el género *Sphingomonas*, como *Sphingopyxis chilensis* sp. S37T, *Sphingomonas adhaesiva*, *Sphingopyxis macrogoltabida* y *Sphingomonas alaskensis*, durante el cultivo de las células en medio mineral MML conteniendo 0,05% de (p/v) de NH_4Cl y 0,1 M (1,8%) de glucosa (Godoy y col., 2003).

Por otro lado, este sería el primer trabajo donde se demuestra la producción de glucógeno en una bacteria del género *Sphingobium*, ya que según nuestro conocimiento no existen reportes previos sobre la producción de glucógeno en bacterias relacionadas con el género

Sphingomonas. En estudios anteriores se había sugerido que este tipo de microorganismos podrían tener la capacidad de producir glucógeno. En estos trabajos, se observó que ciertos tratamientos de aguas residuales no habían sido exitosos en la remoción biológica de fósforo (EBPR) debido a la proliferación no deseada de organismos acumuladores de glucógeno (GAOs) (Crocetti y col., 2002; Burow y col., 2007). En este contexto, Beer y colaboradores (2004) reportaron que los miembros del género *Sphingomonas* estaban presentes en gran número dentro de comunidades de las α -*Proteobacteria* con escasa capacidad de eliminación de fósforo y que la biomasa de microorganismos GAOs obtenida tenía un alto contenido de glucógeno (17%, p/p).

En el presente trabajo se demostró que la cepa autóctona 22B fue capaz de movilizar el PHB y el glucógeno acumulados cuando las células fueron cultivadas en medios con déficit de la fuente de carbono (Tabla VI.2; Figura VI.8). Estos compuestos son probablemente utilizados como una fuente de energía endógena durante períodos de escasez de carbono externo, pero también como una fuente de carbono interno para la producción de precursores metabólicos necesarios para la adaptación al ambiente. Esta propiedad podría representar una ventaja selectiva para el microorganismo en el ambiente, ya que le permitiría independizarse por períodos de tiempo variables del medio externo cuando las condiciones no son propicias para su desarrollo y mantener su actividad metabólica bajo condiciones nutricionales fluctuantes. En este sentido, Liang y col. (2011) reportaron que la cepa *Sphingobium scionense* sp. WP01T, aislada de suelo contaminado con petróleo, fue capaz de sintetizar PHB a partir de bifenilo y naftaleno bajo condiciones limitantes de nitrógeno y sugirieron que en un proceso de bioaumentación el precultivo del inóculo en condiciones de acumulación de PHA podría incrementar la sobrevivencia y eficiencia en la degradación del petróleo durante el proceso. Otros autores también han relacionado la acumulación de PHA en diferentes microorganismos como *Pseudomonas* (Ayub y col., 2004), *Spirillum* (Matin, 1979), *Bacillus* y *Alcaligenes* (López y col., 1995) con la capacidad de sobrevivir y tolerar condiciones ambientales desfavorables. Ayub y col. (2004) han estudiado la tolerancia a estreses ambientales en el microorganismo *Pseudomonas sp.* 14-3, el cual fue aislado de la Antártida y posee la capacidad de acumular PHB a partir de octanoato. Se analizó la tolerancia al estrés en células de *Pseudomonas sp.* 14-3 con y sin acumulación de PHB, encontrando mayor resistencia en las cepas que presentaban en su interior el compuesto de reserva. Tribelli y col., (2011) también reportaron que la acumulación de PHB en *Pseudomonas extremaustralis* incrementó la motilidad y la supervivencia de las células planctónicas en los biofilms producidos bajo condiciones de bajas temperaturas. Por lo expuesto, se sugiere que la capacidad de acumular y movilizar PHB y glucógeno por parte de la cepa patagónica 22B, podría ser uno de los factores que le permite a las células sobrevivir y persistir en un ambiente extremo como el de la Patagonia semiárida.

La desecación es uno de los factores críticos que determinan la viabilidad y la actividad microbiana en los ambientes de suelo de la Patagonia semiárida. La fluctuación en el contenido de agua del suelo puede limitar la actividad y persistencia de un inóculo bacteriano durante un proceso de bioaumentación de suelos contaminados. Se ha demostrado que *Sphingobium sp. 22B* es capaz de persistir largos períodos de tiempo bajo condiciones sub-óptimas luego de su inoculación en microcosmos de suelo patagónico, por lo que se decidió realizar un ensayo experimental con el fin de analizar las respuestas moleculares de las células a nivel del proteoma frente a condiciones de escasez de agua. Es sabido que los microorganismos poseen diferentes estrategias que les permiten sobrevivir a las variaciones del contenido de agua en el ambiente. Algunas de las estrategias reportadas son la producción de solutos compatibles (Welsh, 2000; Alvarez y col., 2004), la modificación en la composición de los ácidos grasos de membrana (Halverson y Firestone, 2000), la síntesis de exopolisacáridos (EPS) (Roberson y Firestone, 1992; Ophir y Gutnick, 1993; Alvarez y col., 2004), la formación de esporas (Setlow, 1995) y la presencia de múltiples copias del genoma (Billi y col., 2000, Mattimore y Battista, 1996), entre otros. Los estudios que llevaron a conocer los mecanismos de resistencia a la desecación han sido realizados en su mayoría con los géneros bacterianos *Rhodococcus* (Alvarez y col., 2004; Le Blanc y col., 2008), *Cyanobacteria* (Welsh 2000; Shirkey y col., 2000; Billi y Potts; 2002) y *Pseudomonas* (Roberson y Firestone, 1992). A pesar de que existen reportes de la fisiología y la respuesta a factores ambientales en bacterias del género *Sphingomonas* (Fegatella y Cavichioli, 2000; Eguchi y col., 1996; Johnson y col., 2011), poco se sabe de las estrategias adaptativas que presentan estos microorganismos para responder a cambios fluctuantes en la disponibilidad de agua.

En el presente trabajo se realizó un experimento típico de desecación, colocando las células provenientes de un pre-cultivo en condiciones que favorecen la acumulación de compuestos de reserva, sobre un soporte sólido inerte (filtro de nitrato de celulosa) y mediante exposición de las mismas a atmósferas con diferente humedad relativa (HR altas y bajas). Se investigó las respuestas de las células frente a la pérdida de humedad de los respectivos sistemas experimentales utilizados. A nivel fisiológico, se observó una respuesta diferencial entre el sistema de desecación y el de la condición húmeda, con respecto a la utilización de los compuestos de reserva producidos durante el pre-cultivo de las células. En el ensayo de la condición húmeda, se observó una movilización parcial del PHB y del glucógeno por parte de las células, mientras que bajo la condición de desecación solo se detectó la degradación del glucógeno pero no del PHB acumulado previamente. Estos resultados se correlacionaron bien con la observación de las células por microscopía electrónica de transmisión, donde las mismas bajo desecación presentaron abundantes inclusiones intracelulares de PHB al igual que las células del ensayo control y a diferencia de las células de la condición húmeda donde

se observó la disminución en el contenido de inclusiones celulares. Otro de los cambios observados a nivel morfológico fue la aparición de un EPS asociado a las células en los sistemas experimentales sometidos a pérdida de agua. Es un hecho conocido que la síntesis de EPS está vinculada con la capacidad que poseen algunos microorganismos de resistir factores ambientales. Estas estructuras extracelulares de alta complejidad presentan propiedades que permiten mantener la homeostasis bacteriana: pueden generar un ambiente húmedo alrededor de la célula debido a la capacidad de absorber una gran cantidad de agua (Roberson y Firestone, 1992; Ophir y Gutnick, 1994), pueden actuar evitando la pérdida de agua intracelular protegiendo al microorganismo en contra de cambios externos en el potencial acuoso (Roberson y Firestone, 1992; Ophir y Gutnick, 1994; Garmiri y col., 2008), permiten que el microorganismo posea tiempo adicional para adaptar su fisiología a la desecación (Roberson y Firestone, 1992), y su presencia promueve la formación de biofilms y consecuentemente el aumento de la resistencia a factores ambientales (Wai y col., 1998; Tribelli y col., 2011). Recientemente Johnson y col., 2011 han estudiado el transcriptoma de *Sphingomonas wittichii* RW1 sometida a estrés osmótico (solutos permeables) y a la disminución en la disponibilidad de agua (solutos no permeables), encontrando en ambos casos la sobreexpresión de genes vinculados con la síntesis, exportación y ensamblaje de exopolisacáridos (EPS) y con la síntesis del soluto compatible trehalosa.

La movilización del glucógeno y/o del PHB por la cepa 22B, sumado a la producción del EPS sugiere que las células mantienen cierta actividad metabólica durante su incubación en condiciones de déficit de agua. Similares resultados se reportaron con la bacteria *Rhodococcus opacus* PD630, que fue capaz de movilizar los triglicéridos intracelulares durante la desecación y de producir un EPS (Alvarez y col., 2004). En el caso de la cepa 22B, es probable que la degradación del glucógeno esté relacionada con el aporte de azúcares para la producción del EPS y que el PHB sea utilizado preferentemente para la generación de energía endógena. Ashtaputre y Shah (1995) demostraron que el EPS producido por una cepa de *Sphingomonas* estaba compuesto mayoritariamente por derivados de azúcares, conteniendo un 70% de glucosa, 11% de ácido glucurónico, 7% de ácido galacturónico y 12% de acetato. El aporte de intermediarios metabólicos para la síntesis del EPS podría resultar más directo y económico desde el punto de vista energético, si proviene del glucógeno que si lo hace del PHB. De todos modos, este aspecto debería ser aclarado experimentalmente en futuros estudios. Alternativamente, la degradación del glucógeno por la cepa 22B bajo condiciones de desecación podría estar relacionada con la producción de trehalosa. En un análisis bioinformático realizado en este trabajo, se identificaron genes relacionados con la síntesis de trehalosa a partir de glucógeno (genes *treYZ*) en *Sphingomonas sp.* S17 (TreY: malto-oligosiltrehalosa sintasa ,GI:332014668 y TreZ: malto-oligosiltrehalosa trehalohidrolasa,

GI:332014839). La vía TreY-Z fue reportada por Wolf y col. (2003) como la vía de preferencia utilizada por el microorganismo *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 sometido a estrés osmótico, sugiriendo que ésta vía de síntesis sería la más razonable para ser utilizada en una situación de estrés debido a que el glucógeno, como otras maltodextrinas, representan sustratos accesibles que no requieren de mecanismos de captación. La trehalosa (disacárido no reductor) es el soluto compatible mejor caracterizado y más ampliamente distribuido en bacterias (Carpenter y col., 1993; Prestrelski, 1993; Alvarez, 2004; Kurz y col., 2010; Zhang y col., 2012). La propiedad que hace que la trehalosa pueda actuar como soluto compatible en un proceso de desecación, es la capacidad que posee de formar puentes de hidrogeno con las macromoléculas, las proteínas y las cabezas polares de los fosfolípidos en las membranas bacterianas (Gaber y col., 1986; Crowe, 1987). Sin embargo, la síntesis de trehalosa a partir de glucógeno como soluto compatible por la cepa 22B bajo desecación deberá ser investigada en el futuro.

Por otro lado, es probable que la movilización de PHB en *Sphingobium sp.* 22B tenga dependencia con la actividad metabólica de las células. Es posible que la actividad metabólica de las células de la cepa 22B, al igual que ocurre con otras bacterias (Alvarez y col., 2004), sea baja durante la desecación, lo que determina que el PHB sea movilizado en forma muy lenta bajo estas condiciones (Tabla VI.4). La incubación de las células en la condición húmeda (100% de HR) (Tabla VI.4) podría determinar una mayor actividad metabólica, generando una condición similar a las observadas en el experimento de déficit de la fuente de carbono, donde las células movilizan activamente el PHB (Tabla VI.2). Esta situación podría explicar la mayor movilización del PHB bajo la condición húmeda y la mayor supervivencia de las células bajo esta condición en comparación con el sistema de desecación (18% de HR) (Tabla VI.3).

Cuando se realizó el análisis del proteoma de las células sometidas a las diferentes condiciones de humedad, no fue posible observar grandes diferencias en el perfil de expresión de las proteínas solubles (Figura VI.15).

Se observó una mayor expresión en dos proteínas que participarían en la adaptación del metabolismo de la cepa 22B al déficit de agua. Una de las proteínas (Proteína A) mostró 30% de similitud con una enzima acetil-CoA-C-acetil transferasa (*AtoB*) del microorganismo *Sphingobium japonicum* UT26S, la cual cataliza la conversión reversible de acetyl-CoA a acetoacetyl-CoA. Esta enzima podría estar involucrada en el metabolismo del PHB en la cepa 22B, el que podría aportar energía endógena mediante su lenta degradación bajo condiciones de desecación, o durante la salida de las células del estrés de desecación. Alternativamente esta enzima podría participar de la síntesis de algún componente del EPS en las células.

La otra proteína expresada durante el déficit de agua en la cepa 22B fue la proteína C (Figura VI.15) que mostró 37% de similitud con la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de

Sphingobium japonicum UT26S. Esta enzima cataliza la conversión reversible de gliceraldehído-3-fosfato a 1,3-bifosfoglicerato y es sabido que está involucrada en el metabolismo de los carbohidratos de muchos microorganismos (Gunsalus, Horecker y Wood, 1958). En un estudio realizado por Oliveira y col., (2012) en cepas de *Rhizobium tropici* productoras de EPS, se encontró la expresión de esta enzima en el tiempo de mayor producción del EPS. Por otro lado, Lu y col., (2009) demostraron que la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa es requerida en la producción de EPS y para la patogenicidad de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Estos resultados junto con los observados en las imágenes del MET (Figura VI.12), sugieren que la sobre-expresión de esta enzima podría estar vinculada con la producción del EPS en la cepa 22B en condiciones de desecación.

Uno de los requisitos que deben cumplir las células bacterianas para sobrevivir bajo condiciones de desecación es la de poseer mecanismos de control de su estado osmótico. La sobre-expresión de las proteínas B y D bajo estrés hídrico en comparación con la muestra control, formarían parte de las respuestas del microorganismo frente al estrés osmótico generado por la pérdida de agua del sistema. La proteína D, sobreexpresada mayoritariamente en la condición de desecación por 10 h, y en menor medida en los geles de desecación por 4 días y condición húmeda (Figura VI.15), mostró 26% de similitud con la familia de porinas-OOP ubicadas en la membrana externa de bacterias Gram negativo. Esta familia incluye las proteínas denominadas OmpA a OmpF (Saier, 2000), distribuidas en un gran número de géneros bacterianos (Beher, 1980), siendo OmpA la proteína mejor estudiada. En *E.coli* K-12 fue la proteína más numerosa (Chai and Foulds, 1977), con alrededor de 100.000 copias por célula (Smith y col., 2007). Su estructura tridimensional ha sido estudiada, encontrando que forma un β -barril altamente conservado (Arora y col., 2000) y 4 loops cortos que sobresalen de la célula (Smith et al., 2007). Por el interior del β -barril pueden pasar pequeñas moléculas hacia el espacio periplásmico (Arora y col., 2002), sin embargo la función básica de ésta proteína en *E. coli* es de mantener la membrana externa y el peptidoglicano juntos (Wang y col., 2002). En *E.coli* OmpA actúa como receptor de los fagos K3, Ox2 y M1 (25 de Wang, 2002), promueve la formación de biofilm sobre superficies de poliestireno (González Barrios y col., 2006) y se produce en gran cantidad durante la formación de biofilm en cepas de origen clínico y de laboratorio (Orme y col., 2006). La expresión de OmpA se encuentra relacionada con la respuesta al estrés en ciertas bacterias (Wang y col., 2002). Johnson y col. (2011) observaron la expresión diferencial de genes putativos a tiempos cortos de estrés por NaCl en *Sphingomonas wittichii* RW1, vinculados con la biosíntesis y funcionamiento de la membrana externa, entre los que se encuentran los que codifican para la proteína OmpA. En *Mycobacterium tuberculosis* también se ha relacionado ésta proteína con la respuesta al estrés, debido a que Niederwies y col., (2003) encontraron al menos dos porinas OmpATb, las cuales

serían esenciales para la adaptación de *M. tuberculosis* a pH bajos generados en los fagosomas de los macrófagos.

Por todo lo expuesto, podríamos sugerir que la sobreexpresión de la proteína OmpA en la cepa 22B en etapas tempranas del estrés por desecación podría estar relacionada con la formación del EPS y/o con el pasaje de solutos de bajo peso molecular a través de la membrana externa con el fin de regular la osmolaridad celular durante el proceso de desecación.

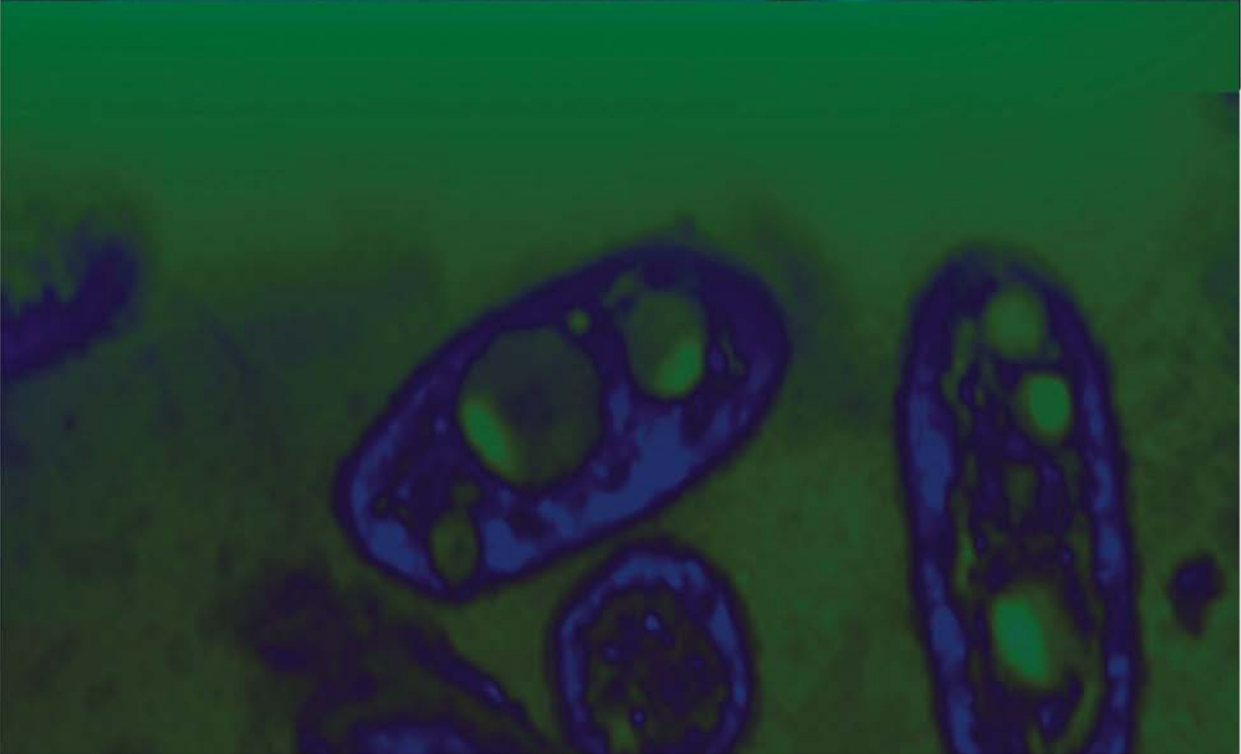
Por otro lado, la proteína B presentó un 41% de similitud con una proteína hipotética SJA_C1-23830 de *Sphingobium japonicum* UT26S. Realizando alineamientos de la secuencia de SJA_C1-23830 en bases de datos del NCBI se encontró que esta proteína hipotética posee un 60% de identidad con una probable proteína inducible sensora de la osmolaridad, de función desconocida, de la bacteria marina *Oceanicola granulosus* HTCC2516 (NCBI Reference Sequence: ZP_01157004.1) (Cho y Giovannoni, 2004) y un 30% de similitud con una proteína rica en glicina del microorganismo aislado del desierto de Túnez *Ramlibacter tataouinensis* TTB310 (NCBI Reference Sequence: YP_004618397.1). *Oceanicola granulosus* HTCC2516 es un bacilo corto no móvil, Gram negativo, perteneciente al grupo *Roseobacter* dentro de α -Proteobacterias. Si bien no se conoce con exactitud la función de ésta proteína en *Oceanicola Granulosus*, en *E. coli* la proteína sensora de la osmolaridad EnvZ es una kinasa que se autofosforila y subsecuentemente fosforila a la proteína reguladora OmpR. Luego, OmpR fosforilada (OmpR-P) regula la expresión de genes de la familia de las porinas OOP (OmpF y OmpC) (Leonardo y Forst, 1996). *Ramlibacter tataouinensis* TTB310 ha sido recientemente caracterizado debido a su inusual mecanismo de resistencia a la desecación, en el cual conviven dos morfologías bacterianas, expresando fenotípicamente una o la otra dependiendo de las condiciones ambientales (De Luca y col., 2011). La morfología resistente a la desecación (esférica) es no móvil, está embebida en una matriz extracelular (EPS), presenta gránulos intracelulares de PHA (Heulin y col., 2003), contiene trehalosa como soluto compatible y carece de la ruta de síntesis de glucógeno (De Luca y col., 2011). Proteínas con motivos ricos en glicina, similares a la que presentó afinidad con la proteína B de *Sphingobium sp. 22B*, poseen una considerable afinidad por ARN (GRP2) y han sido descritas en muchas plantas (Gómez y col., 1988; Moriguchi y col., 1999). Algunos autores las han vinculado con la respuesta a estreses ambientales (Sachetto-Martins y col., 2000; Kim, 2007). Si bien Sugita y col. (1993) han reportado por primera vez la existencia de éste tipo de proteínas en la cianobacteria *Synechococcus* 6301, no se han encontrado reportes que detallen la función de éste tipo de proteínas. Por lo expuesto se sugiere que la sobreexpresión de la proteína B podría formar parte de un mecanismo específico pero aún desconocido de respuesta a la desecación (estrés hídrico) en *Sphingobium sp. 22B*.

A modo de resumen y analizando los resultados de esta sección en su conjunto, podríamos sugerir que la cepa autóctona *Sphingobium sp. 22B* posee una serie de mecanismos de resistencia y adaptación a los principales factores ambientales del suelo de la Patagonia semiárida, como son la escasez de nutrientes (fuentes de nitrógeno y carbono) y la desecación. Entre estos mecanismos se encuentran la capacidad de las células de producir dos tipos diferentes de compuestos de reserva, como son el PHB y el glucógeno. El PHB sería la fuente de energía y carbono endógena de elección en la cepa 22B; considerando que se produce en una proporción 10 veces mayor que el glucógeno, cuando las células son cultivadas en condiciones limitantes de nitrógeno. De esta manera, el PHB sería consumido preferentemente en una condición de déficit de la fuente de carbono. Por otro lado, el glucógeno podría servir como “amortiguador metabólico” durante períodos de exceso de carbohidratos en el metabolismo central, más que como reserva de carbono y energía, y como reserva de azúcares para la síntesis de derivados de carbohidratos útiles bajo condiciones de estrés, como la trehalosa o los componentes mayoritarios del EPS. La cepa 22B demostró mantener la viabilidad de las células y cierta actividad metabólica bajo diferentes grados de desecación, a través de la movilización de PHB y glucógeno, de la producción de un EPS y de la expresión de proteínas que participarían de la respuesta celular frente a los diferentes estreses que componen la desecación, tales como el estrés nutricional, el estrés osmótico y el estrés hídrico. Dentro de este último estrés, *Sphingobium sp. 22B* podría poseer mecanismos específicamente involucrados en la respuesta de las células a la falta de agua (como la proteína B), de manera similar a otras bacterias consideradas especialistas para sobrevivir en ambientes desérticos. Si bien, este trabajo constituye el inicio del estudio sobre los mecanismos de adaptación de la cepa 22B a las condiciones ambientales de la Patagonia, los resultados sugieren que esta bacteria posee una fisiología robusta para ser considerada un buen candidato para tareas de biorremediación de ambientes contaminados en la región patagónica.



Conclusiones

CAPÍTULO VII



VII. Conclusiones

El aislamiento y selección exclusivamente de cepas pertenecientes al género *Sphingomonas*, a partir de muestras de suelo patagónicas crónicamente contaminadas con PAH, a pesar de haber aplicado diferentes estrategias de aislamiento, evidencian que éste género bacteriano posee ventajas fisiológicas y metabólicas para sobrevivir y degradar el contaminante en suelos de la Patagonia semiárida; demostrando que los microorganismos del género *Sphingomonas* no puede ser estrictamente clasificado como microorganismo oportunista, y de importancia ecológica solo en situaciones de contaminación aguda.

La selección del inoculante es un factor crítico que determinaría las posibilidades de éxito del bioaumentación. La cepa de *Sphingomonas* aislada utilizando cultivos de enriquecimiento tradicionales resultó sensible a los factores ambientales típicos de la Patagonia semiárida. Los procedimientos de enriquecimiento no tienen influencia sobre características esenciales para que los inoculantes sean competitivos y efectivos en el ambiente blanco.

El aislamiento de microorganismos degradadores, filogenéticamente relacionados y con distintas capacidades fisiológicas demuestra la redundancia de microorganismos degradadores de PAH en los suelos crónicamente contaminados de la Patagonia semiárida, lo que resulta potencialmente útil para seleccionar inoculantes autóctonos adaptados a algún o algunas de las condiciones ambientales que limitan la biodegradación de los PAH en suelos.

Las cepas degradadoras 1A, 22A y 22B, resistentes a algún/os de los factores ambientales propios de la región presentaron características potenciales para ser utilizados en ensayos de bioaumentación en suelos crónicamente contaminados de la Patagonia

La caracterización fisiológicas realizada en el Capítulo IV nos permitió comprobar que la cepa *Sphingobium sp.* 22B es particularmente resistente a las condiciones de desecación. De nuestro conocimiento no existen reportes que hayan demostrado la presencia de mecanismos de resistencia a la desecación en cepas de *Sphingomonas*.

Los ensayos de biodegradación realizados en el Capítulo V permitieron demostrar que las condiciones áridas de los suelos patagónicos es el principal factor que limita la biodegradación de fenantreno; permitiéndonos establecer que es condición necesaria mantener los valores de humedad por arriba del 20% WHC para que los procesos de biodegradación ocurran.

Los ensayos de inoculación con la cepa autóctona *Sphingobium sp.* 22B demostraron que la misma resultó efectiva únicamente cuando se corrigió parcialmente el stress hídrico, acelerando la degradación inicial del fenantreno. Cabe destacar que aunque el efecto estimulador sobre la degradación de fenantreno producido por la inoculación de la cepa es de corto plazo y pensando en tratamiento *in situ*, la estrategia ABA permitiría acortar los tiempos de tratamiento lo que se traducirían en un ahorro en la utilización de agua, un recurso preciado y costoso.

Se ha encontrado evidencias de que la cepa degradadora autóctona *Sphingobium sp.* 22B es capaz de establecerse y permanecer en suelos naturalmente semiáridos (sin el agregado de agua) y contaminados con PAH, a pesar de la ausencia de eliminación del contaminante.

Se ha demostrado que el estudio de comunidades microbianas a través de los perfiles de DGGE resulta una herramienta válida para evaluar el efecto del inoculante sobre la dinámica bacteriana del suelo. Este método nos ha permitido mostrar claras diferencias entre los perfiles de las comunidades bacterianas del suelo donde el inoculante se ha establecido bajo condiciones no competitivas, y aquellos en que la inoculación ha producido cambios selectivos en la estructura de la comunidad microbiana del suelo..

Sphingobium sp. 22B es capaz de acumular compuestos intracelulares de reserva como PHB y glucógeno en situaciones de exceso de la fuente de carbono. La capacidad de producir, acumular y utilizar PHB y glucógeno como fuente de carbono y energía endógena en situaciones de privación de nutrientes podría darle ventajas selectivas para sobrevivir en ambientes extremos y fluctuantes como los de la Patagonia Central. Este trabajo de tesis doctoral resulta el primer reporte donde se demuestra la producción de glucógeno en una bacteria del género *Sphingobium*.

La cepa 22B sería capaz de mantener la viabilidad y cierta actividad metabólica bajo diferentes grados de desecación, debido a la movilización de PHB y glucógeno, a la producción de un EPS y a la expresión de proteínas que participarían de la respuesta celular frente a los diferentes estreses que componen la desecación, tales como el estrés nutricional, el estrés osmótico y el estrés hídrico. Por otro lado encontramos evidencias de que los compuestos de reserva acumulados tendrían diferentes funciones metabólicas. El PHB sería la fuente de energía y carbono endógena de elección en la cepa 22B, mientras que el glucógeno podría servir como “amortiguador metabólico” y como reserva de azúcares para la síntesis de

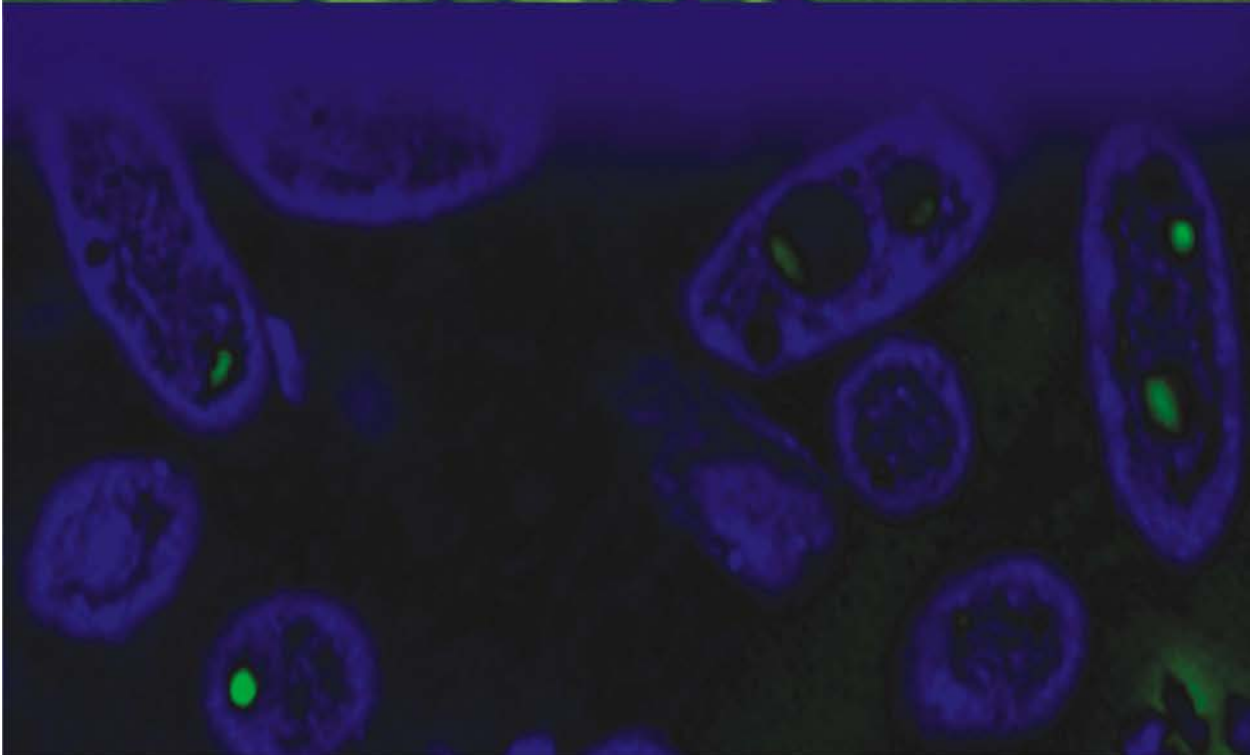
derivados de carbohidratos útiles bajo condiciones de estrés, como la trehalosa o los componentes mayoritarios del EPS.

Sphingobium sp. 22B posee una fisiología robusta para ser considerada un buen candidato en procesos de biorremediación de ambientes contaminados en la región patagónica.



Bibliografía

CAPÍTULO VIII



- Abbondanzi, F., Bruzzi, L., Campisi, T., Frezzati, A., Guerra, R., Iancodini, A. 2006. Biotreatability of polycyclic aromatic hydrocarbons in brackish sediments: preliminary studies of an integrated monitoring. *International Biodeterioration & Biodegradation* 57, pp. 214-221.
- Agarwal, T., Khillare, P. S., Shridhar, V., & Ray, S. 2009. Pattern, sources and toxic potential of PAHs in the agricultural soils of Delhi, India. *Journal of hazardous materials*, 163(2-3), 1033-9.
- Alvarez, H. M., Silva, R. a, Cesari, A. C., Zamit, A. L., Peressutti, S. R., Reichelt, R., Keller, U., et al. 2004. Physiological and morphological responses of the soil bacterium *Rhodococcus opacus* strain PD630 to water stress. *FEMS Microbiology Ecology*, 50(2), pp. 75-86.
- Amato P, Parazols M, Sancelme M, Laj P, Mailhot G, Delort A-M. 2007. Microorganisms isolated from the water phase of tropospheric clouds at the Puy de Dôme: major groups and growth abilities at low temperatures. *FEMS Microbiology Ecology* 59, pp. 242-254
- An, H., Xu, M., Dai, J., Wang, Y., Cai, F., Qi, H., Peng, F., Fang, C. 2011. *Sphingomonas xinjiangensis* sp. nov., isolated from desert sand. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 61(Pt 8), 1865-9. doi:10.1099/ijs.0.021147-0
- Anokhina, T. O., Kochetkov, V. V, Zelenkova, N. F., Balakshina, V. V, & Boronin, A. M. (n.d.). [Biodegradation of phenanthrene by *Pseudomonas* bacteria bearing rhizospheric plasmids in model plant-microbial associations]. *Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiya*, 40(6), pp. 654-658.
- Arora, A., Rinehart, D., Szabo, G., and Tamm, L. K. 2000. Refolded outer membrane protein A of *Escherichia coli* forms ion channels with two conductance states in planar lipid bilayers. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 1594-1600.
- Aso, Y., Miyamoto, Y., Harada, K. M., Momma, K., Kawai, S., Hashimoto, W., Mikami, B., Murata, K. 2006. Engineered membrane superchannel improves bioremediation potential of dioxin-degrading bacteria. *Nature biotechnology*, 24(2), pp. 188-189.
- Ashtaputre, A., & Shah, A. 1995. Studies on a Viscous, Gel-Forming Exopolysaccharide from *Sphingomonas paucimobilis* GS1. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(3), pp. 1159-1162.
- Atagana, H. I. 2004. Biodegradation of phenol, o-cresol, m-cresol and p-cresol by indigenous soil fungi in soil contaminated with creosote. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 20(8), pp. 851-858.
- Atlas, R.M., 1981. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiological reviews*, 45(1), pp.180-209.
- Atlas R. M. & Bartha R. 1987. *Microbial Ecology: Fundamentals and Applications*, 2nd edition. Benjamin/Cummings, Menlo Park, Calif.
- ASTM D-2216. Standard Test Method for Laboratory Determination of Water (Moisture) Content of Soil and Rock by Mass. United, T. H. E., & Of, S. (n.d.). By Authority Of, 552(4).
- Ayub, N. D., Pettinari, M. J., Ruiz, J. A., & López, N. I. 2004. A polyhydroxybutyrate-producing *Pseudomonas* sp. isolated from Antarctic environments with high stress resistance. *Current Microbiology*, 49(3), 170-4.
- Baboshin, M., Akimov, V., Baskunov, B., Born, T.L., Khan, S.U., Golovlela, L. 2008. Conversion of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Sphingomonas* sp. VKM B-2434. *Biodegradation* 19:567-576.

- Balkwill, D. L., Drake, G. R., Reeves, R. H., Fredrickson, J. K., White, D. C., Ringelberg, D. B., Chandler, D. P., Romine, M. F., Kennedy, DW, Spadoni CW. 1997. Taxonomic study of aromatic-degrading bacteria from deep-terrestrial-subsurface sediments and description of *Sphingomonas aromaticivorans* sp. nov., *Sphingomonas subterranea* sp. nov., and *Sphingomonas stygia* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 47:191–201
- Baraniecki, C. a, Aislabie, J. & Foght, J.M., 2002. Characterization of *Sphingomonas* sp. Ant 17, an aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from Antarctic soil. *Microbial Ecology*, 43(1), pp. 44–54.
- Barriuso, J; Solano, BR; Santamaria, C; Daza, A; Manero, FJG. 2008. Effect of inoculation with putative plant growth-promoting rhizobacteria isolated from *Pinus* spp. on *Pinus pinea* growth, mycorrhization and rhizosphere microbial communities. *Journal of Applied Microbiology*. 105(5), pp. 1298-1309.
- Bartha R. & Pramer, D. 1965. Features of a flask and method for measuring the persistence and biological effects of pesticide. *Soil Science*. 100, pp. 68–70.
- Basta, T., Keck, A., Klein, J. & Stolz, A. 2004. Detection and Characterization of Conjugative Degradative Plasmids in Xenobiotic-Degrading *Sphingomonas* Strains. *Journal of bacteriology*, 186(12), pp. 3862–3872.
- Basta, T., Buerger, S. & Stolz, A. 2005. Structural and replicative diversity of large plasmids from sphingomonads that degrade polycyclic aromatic compounds and xenobiotics. *Microbiology (Reading, England)*, 151(Pt 6), pp.2025–37.
- Bastiaens, L., Springael, D., Wattiau, P., Verachtert, H., & Harms, H. 2000. Isolation of Adherent Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) degrading Bacteria Using PAH-Sorbing Carriers. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(5), pp. 1834–1843.
- Beer, M., Kong, Y.H. & Seviour, R.J. 2004. Are some putative glycogen accumulating organisms (GAO) in anaerobic□: aerobic activated sludge systems members of the alpha-Proteobacteria? *Microbiology (Reading, England)*, 150(Pt 7), pp. 2267–2275.
- Behr, M.G., Schnaitman, C. a & Pugsley, a P. 1980. Major heat-modifiable outer membrane protein in gram-negative bacteria: comparison with the ompA protein of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 143(2), pp. 906–913.
- Beijerinck, M.W.1901. Anhaufungsversuche mit ureumbak- terium ureumspaltung durch urease und durch katabolis- mus. *Zentralbl Bakyeriol Parasitenkd Infektionskr Hyg Abt II* 7, pp. 33–61.
- Belloso, C. O., & A, B. A. S. 2003. In situ bioremediation of hydrocarbon-contaminated soil by autochthonous microorganisms: a full-scale project. *Proceedings of the Seventh International In Situ and On-Site Bioremediation Symposium*, Battelle P.
- Bento, F. M, De Oliveira Camargo, F. a, Okeke, B. C., & Frankenberger, W. T. 2005a. Diversity of biosurfactant producing microorganisms isolated from soils contaminated with diesel oil. *Microbiological Research*, 160(3), pp. 249–255.
- Bento, F. M., Camargo, F. A. O., Okeke, B. C., & Frankenberger, W. T. 2005b. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Bioresource technology*, 96(9), pp. 1049–1055.

- Beruto, M., Beruto, D., Debergh, P. 1999. Influence of agar on in vitro cultures: Physiochemical properties of agar and agar gelled media. *In vitro cellular & Developmental Biology – Plant*. 35(1), pp. 86-93
- Billi, D., & Potts, M. 2002. Life and death of dried prokaryotes. *Research*, 153, pp. 7–12.
- Bogardt, A.H. & Hemmingsen, B.B., 1992. Enumeration of phenanthrene-degrading bacteria by an overlayer technique and its use in evaluation of petroleum-contaminated sites. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(8), pp. 2579–2582.
- Bouchez, T., Patureau, D., Dabert, P., Juretschko, S., Doré, J., Delgenès, P., Moletta, R., Wagner, M., 2000. Ecological study of a bioaugmentation failure. *Environmental Microbiology* 2, pp. 79–190.
- Braddock, J.F., Lindstrom, J.E. & Brown, E.J., 1995. Distribution of hydrocarbon-degrading microorganisms in sediments from Prince William Sound, Alaska, following the Exxon Valdez oil spill. *Marine Pollution Bulletin*, 30(2), pp.125–132.
- Braddock, J. F., M. L. Ruth, P. H. Catterall, J. L. Walworth, and K. A. McCarthynd. 1997. Enhancement and inhibition of microbial activity in hydrocarbon-contaminated arctic soils: implications for nutrient-amended bioremediation. *Environmental Science & Technology*. 31, pp. 2078–2084.
- Brandl, H., Gross, R. A., Lenz, R. W. & Fuller, R. C. 1988. *Pseudomonas oleovorans* as a source of poly(b-hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyester. *Applied and Environmental Microbiology*, 54, pp. 1977–1982.
- Bray, R. H. y Kurtz, L. T. 1945. Determination of total, organic and available forms of phosphorus in soil. *Soil Science*. 59, pp. 39-45.
- Bremmer, J.M. 1960. Determination of nitrogen in soil by Kjeldahl method. *J. Agric. Sci.* 55, pp. 11-33.
- Browning, D.F. & Busby, S.J., 2004. The regulation of bacterial transcription initiation. *Nature reviews. Microbiology*, 2(1), pp. 57–65.
- Burdon, K. L. 1946. Fatty Material in Bacteria and Fungi Revealed by Staining Dried, Fixed Slide Preparations. *Journal of Bacteriology*, 52(6), pp. 665–678.
- Burow, L. C., Kong, Y., Nielsen, J. L., Blackall, L. L., & Nielsen, P. H. 2007. Abundance and ecophysiology of *Defluviicoccus* spp., glycogen-accumulating organisms in full-scale wastewater treatment processes. *Microbiology (Reading, England)*, 153(Pt 1), pp. 178–185.
- Bünz, P. V & Cook, A.M., 1993. Dibenzofuran 4,4a-dioxygenase from *Sphingomonas* sp. strain RW1: angular dioxygenation by a three-component enzyme system. *Journal of Bacteriology*, 175(20), pp. 6467–6475.
- Cabrera A. L. 1976. Regiones fitogeográficas argentinas. *Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería*. Tomo II Fs.1 Ed. ACME. Bs As. Argentina. pp. 1-85
- Carpenter, J. F. 1993. Stabilization of proteins during freezing and dehydration: application of lessons from nature. *Cryobiology*, 30, pp.220-221.
- Cavicchioli, R., Ostrowski, M., Fegatella, F., Goodchild, a, & Guixa-Boixereu, N. 2003. Life under nutrient limitation in oligotrophic marine environments: an eco/physiological perspective of *Sphingopyxis alaskensis* (formerly *Sphingomonas alaskensis*). *Microbial ecology*, 45(3), pp. 203–17.
- Cerniglia, C.E., 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation*, 3(2-3), pp. 351–368.

- Chai, T.-J., and Foulds, J. 1977. Purification of protein A, an outer membrane component missing in *Escherichia coli* K-12 ompA mutants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 493, pp. 210–215.
- Charity RM, Foukas AF .2005. Osteomyelitis and secondary septic arthritis caused by *Sphingomonas paucimobilis*. *Infection* 33, pp. 93–95
- Chen, Q., Liu, Z., Peng, Q., Huang, K., He, J., Zhang, L., Li, W., Chen, Y. 2010. Diversity of halophilic and halotolerant bacteria isolated from non-saline soil collected from Xiaoxi National Natural Reserve, Hunan Province. *Wei sheng wu xue bao = Acta microbiologica Sinica*, 50(11), pp. 1452–1459.
- Chien, C.-C., Chen, C.-C., Choi, M.-H., Kung, S.-S., & Wei, Y.-H. (2007). Production of poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) by *Vibrio spp.* isolated from marine environment. *Journal of Biotechnology*, 132(3), pp. 259–63.
- Cho, Jae-Chang & Kim, S.-J., 2001. Detection of Mega Plasmid from Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Degrading. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology.*, 3(4), pp.503–506.
- Cho, Jang-Cheon & Giovannoni, S.J., 2004. *Oceanicola granulosus gen. nov., sp. nov.* and *Oceanicola batsensis sp. nov.*, poly-beta-hydroxybutyrate-producing marine bacteria in the order “Rhodobacterales”. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 54(Pt 4), pp.1129–36.
- Chowdhury, N., Marschner, P. & Burns, R.G. 2011. Soil microbial activity and community composition: Impact of changes in matric and osmotic potential. *Soil Biology and Biochemistry*, 43(6), pp.1229–1236.
- Chung, E. J., Jo, E. J., Yoon, H. S., Song, G. C., Jeon, C. O., & Chung, Y. R. 2011. *Sphingomonas oryzae sp. nov.* and *Sphingomonas jinjuensis sp. nov.* isolated from rhizosphere soil of rice (*Oryza sativa* L.). *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 61(Pt 10), pp. 2389–2394.
- Clark, M. E., Edelman, R. E., Duley, M. L., Wall, J. D., & Fields, M. W. (2007). Biofilm formation in *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough is dependent upon protein filaments. *Environmental microbiology*, 9(11), 2844–54.
- Cleveland, C.C. & Liptzin, D., 2007. C:N:P stoichiometry in soil: is there a “Redfield ratio” for the microbial biomass? *Biogeochemistry*, 85(3), pp. 235–252.
- Colombo, M., Cavalca, L., Bernasconi, S., & Andreoni, V. 2011. Bioremediation of polyaromatic hydrocarbon contaminated soils by native microflora and bioaugmentation with *Sphingobium chlorophenolicum* strain C3R: A feasibility study in solid- and slurry-phase microcosms. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65(1), pp. 191–197.
- Colquhoun, D. R., Hartmann, E. M., & Halden, R. U. 2012. Proteomic profiling of the dioxin-degrading bacterium *Sphingomonas wittichii* RW1. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2012, 408690. pp. 1-9.
- Commendatore, M. G., Nievas, M. L., Amin, O., & Esteves, J. L. 2012. Sources and distribution of aliphatic and polyaromatic hydrocarbons in coastal sediments from the Ushuaia Bay (Tierra del Fuego, Patagonia, Argentina). *Marine environmental research*, 74, pp. 20–31.
- Coppotelli, B. M., Ibarrolaza, A., Del Panno, M. T., Morelli, I. S. 2008. Effects of the inoculant strain *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA on soil bacterial community biodegradation in phenanthrene-contaminated soil. *Microbial Ecology* 55:173-183

- Coppotelli, B. M., Ibarrolaza, A., Dias, R. L., Del Panno, M. T., Berthe-Corti, L., & Morelli, I. S. 2010. Study of the degradation activity and the strategies to promote the bioavailability of phenanthrene by *Sphingomonas paucimobilis* strain 20006FA. *Microbial ecology*, 59(2), 266–76.
- Crocetti, G. R., Banfield, J. F., Bond, P. L., & Blackall, L. L. 2002. Glycogen-accumulating organisms in laboratory-scale and full-scale wastewater treatment processes. *Microbiology* (Reading, England), 148, 3353–3364.
- Crowe, J. H., Crowe, L. M., Carpenter, J. F., & Aurell Wistrom, C. 1987. Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. *The Biochemical journal*, 242(1), 1–10.
- Cunliffe, M. & Kertesz, M.A., 2006. Effect of *Sphingobium yanoikuyae* B1 inoculation on bacterial community dynamics and polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in aged and freshly PAH-contaminated soils. *Environmental pollution* (Barking, Essex): 1987), 144(1), pp.228–37.
- D'Annibale, A., Rosetto, F., Leonardi, V., Federici, F., & Petruccioli, M. 2006. Role of autochthonous filamentous fungi in bioremediation of a soil historically contaminated with aromatic hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(1), 28–36.
- Del Panno, M. T., Coppotelli, B. M. Morelli, I. S., Berthe-Corti, L. 2005. Inoculation of soil microcosms with *Sphingomonas paucimobilis*. Impact of the inoculation protocol on phenanthrene degradation and soil community. 13th International Biodeterioration and Biodegradation Symposium (IBBS-13). 4-9 September. Madrid. Spain. Pp-275.
- Deziel, E., Paquette, G., Villemur, R., Lepine, F., Bisailon, J., & Le, O. I. S. 1996. Biosurfactant production by a soil *Pseudomonas* strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbons. These include: Biosurfactant Production by a Soil *Pseudomonas* Strain Growing on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(6), 1908–1912.
- De Araújo, J. C., & Schneider, R. P. 2008. DGGE with genomic DNA: suitable for detection of numerically important organisms but not for identification of the most abundant organisms. *Water research*, 42(20), pp. 5002–5010.
- De Luca, G., Barakat, M., Ortet, P., Fochesato, S., Jourlin-Castelli, C., Ansaldi, M., Py, B., Py, B., Fichant, G., Coutinho, P.M., Voulhoux, R., Bastien, O., Maréchal, E., Henrissat, B., Quentin, Y., Noirot, P., Filloux, A., Méjean, V., DuBow, M.S., Barras, F., Barbe, V., Weissenbach, J., Mihalcescu, I., Verméglio, A., Achouak, W., Heulin, T. 2011. The cyst-dividing bacterium *Ramlibacter tataouinensis* TTB310 genome reveals a well-stocked toolbox for adaptation to a desert environment. *PloS one*, 6(9), 23784. pp. 1-9
- Denner, E. B., Paukner, S., Kämpfer, P., Moore, E. R., Abraham, W. R., Busse, H. J., Wanner, G., Lubitz, W. 2001. *Sphingomonas pituitosa* sp. nov., an exopolysaccharide-producing bacterium that secretes an unusual type of sphingan. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 51(Pt 3), pp. 827–41.
- De Rore, H., Demolder, K., De Wilde, K., Top, E., Houwen, F., Verstraete, W. (1994). Transfer of the catabolic plasmid RP4::Tn4371 to indigenous soil bacteria and its effect on respiration and biphenyl breakdown. *FEMS Microbiology Ecology* 15, pp. 71-81.
- Dibble, J.T. & Bartha, R., 1979. Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, 37(4), pp. 729–739.

- Dogra, C., Raina, V., Pal, R., Suar, M., Lal, S., Gartemann, K., Holliger, C., Meer, J. 2004. Organization of *lin* Genes and IS6100 among Different Strains of Evidence for Horizontal Gene Transfer. *Journal of bacteriology*, 186(8), pp. 2225–2235.
- Eguchi, M., Nishikawa, T., Macdonald, K., Cavicchioli, R., Gottschal, J. C., & Kjelleberg, S. 1996. Responses to Stress and Nutrient Availability by the Marine Ultramicrobacterium Responses to Stress and Nutrient Availability by the Marine Ultramicrobacterium *Sphingomonas sp. strain* RB2256. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(4), pp. 1287–1294.
- El Fantroussi, S. & Agathos, S.N., 2005. Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? *Current opinion in microbiology*, 8(3), pp. 268–275.
- EPA (1986) Method 418.1 mod. Petroleum Hydrocarbons, Total Recoverable Spectrophotometric Infrared. Environmental Protection Agency. Washington DC, EEUU. 8 pp.
- FAO, 2008. FAO. Principales Órdenes, Subórdenes y Grandes Grupos de Suelos Presentes en las Regiones Secas de la República Argentina (Soil Taxonomy, 1979).
- Fassbender, H. W., & Bornemisza, E. 1987. Química de Suelos con énfasis en Suelos de América Latina, p. 420. IICA.
- Fegatella, F. & Cavicchioli, R., 2000. Physiological responses to starvation in the marine oligotrophic ultramicrobacterium *Sphingomonas sp. strain* RB2256. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(5), pp. 2037–2044.
- Fernández-Luqueño, F., Valenzuela-Encinas, C., Marsch, R., Martínez-Suárez, C., Vázquez-Núñez, E., Dendooven, L. 2011. Microbial communities to mitigate contamination of PAHs in soil—possibilities and challenges: a review. *Environmental science and pollution research international*, 18(1), pp.12–30.
- Fida, T. T., Breugelmans, P., Lavigne, R., Coronado, E., Johnson, D. R., Van der Meer, J. R., Mayer, A. P., Heipieper, H.J., Hofkens, J., Springael, D. 2012. Exposure to solute stress affects genome-wide expression but not the PAH-degrading activity of *Sphingomonas sp.* LH128 in biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(23), pp. 8311–8320.
- Foght, J. 2008. Anaerobic Biodegradation of Aromatic Hydrocarbons: Pathways and Prospects. *J. Mol. [Journal of](#) Microbiology [and](#) Biotechnology*, 15, pp. 93–120.
- Fredrickson, J. K., Balkwill, D.L., Drake, G.R., Romine, M.F., Ringelberg, D.B., White, D.C. 1995. Aromatic-degrading *Sphingomonas* isolates from the deep surface. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, pp. 1917–1922
- Freeman, D.J. & Cattell, F.C.R., 1990. Woodburning as a source of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Science & Technology*, 24(10), pp.1581–1585.
- Friedrich, M., R.J. Grosser, E.A. Kern, W.P. Inskeep, and D.M. Ward. 2000. Effect of model sorptive phases on phenanthrene biodegradation: Molecular analysis of enrichments and isolates suggests selection based on bioavailability. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, pp. 2703–2710.
- Fromin, N., Hamelin, J., Tarnawski, S., Roesti, D., Jourdain-Miserez, K., Forestier, N., Teyssier-Cuvelle, S., Gillet, F., Aragno, M., Rossi, P. 2002. Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGGE) fingerprinting patterns. *Environmental Microbiology*, 4, pp. 634–643.

- Gaber, B. P., I. Chandrasekhar, and N. Pattabiraman. 1986. The interaction of trehalose with the phospholipid bilayer: a molecular modeling study, pp. 231-241. In A. C. Leopold (ed.), *Membranes, metabolism and dry organisms*, 1st ed. Cornell University Press, Ithaca.
- García-junco, M., Gomez-Iahoz, C., Niqui-Arroyo, J.-L., & Ortega-Calvo, J.-J. 2003. Biosurfactant and Partitioning of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from Nonaqueous-Phase Liquids. *Environmental Science & Technology*, 37(13), pp. 2988–2996.
- Gentry, T., Rensing, C. & Pepper, I., 2004. New Approaches for Bioaugmentation as a Remediation Technology. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 34(5), pp. 447–494.
- Gibson, D. T. and Subramanian, V., 1984. Microbial Degradation of Aromatic Hydrocarbons. *Microbial Degradation of Organics Compounds*, pp. 181–252.
- Godoy, F., 2003. *Sphingopyxis chilensis sp. nov.*, a chlorophenol-degrading bacterium that accumulates polyhydroxyalkanoate, and transfer of *Sphingomonas alaskensis* to *Sphingopyxis alaskensis comb. nov.* *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(2), pp. 473–477.
- Gomes, N., Kosheleva, I., Abraham, W., Smalla, K. 2005. Effects of the inoculant strain *Pseudomonas putida* KT2442 (pNF142) and naphthalene contamination on the soil bacterial community. *FEMS Microbiology Ecology* 54, pp. 21-33.
- Gómez, J., Sánchez-Martínez, D., Stiefel, V., Rigau, J., Puigdomenech, P. and Pages, M. 1988. A gene induced by the plant hormone abscisic acid in response to water stress encodes a glycine-rich protein. *Nature*, 344, pp. 262–264
- Gomila M, Gascó J, Busquets A, Gil J, Barnabeu R, Buades JM, Lalucat J. 2005. Identification of culturable bacteria present in haemodialysis water and fluid. *FEMS Microbiology Ecology*, 52, pp. 101–114
- González Barrios, A.F., Zuo, R., Ren, D., and Wood, T.K. 2006. Hha, YbaJ, and OmpA regulate *Escherichia coli* K12 biofilm formation and conjugation plasmids abolish motility. *Biotechnology and Bioengineering* 93, pp. 188–200.
- Grosser, R. J., Warshawsky, D., & Vestal, J. R. 1991. Indigenous and enhanced mineralization of pyrene, benzo[a]pyrene, and carbazole in soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(12), pp. 3462–3469.
- Gunsalus, I.C., Horecker, B.L. & Wood, W.A., 1958. Pathways of carbohydrate metabolism in microorganisms, pp. 79-128.
- Guo, C., Ke, L., Dang, Z., & Tam, N. F. 2011. Temporal changes in *Sphingomonas* and *Mycobacterium* populations in mangrove sediments contaminated with different concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Marine pollution bulletin*, 62(1), pp. 133–139.
- Habe, H & Omori, T. 2003. Genetics of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in diverse aerobic bacteria. *Biosci Biotechnol Biochem*, 67, pp. 225–243.
- Halden, R.U., Colquhoun, D.R. & Wisniewski, E.S., 2005. Identification and Phenotypic Characterization of *Sphingomonas wittichii* strain RW1 by Peptide Mass Fingerprinting Using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(5), pp. 2442–2451.

- Halverson, L.J. & Firestone, M K, 2000. Differential effects of permeating and nonpermeating solutes on the fatty acid composition of *Pseudomonas putida*. *Applied and environmental microbiology*, 66(6), pp. 2414–2421.
- Hamann, C., Hegemann, J. & Hildebrandt, A. 1999. Detection of polycyclic aromatic hydrocarbon degradation genes in different soil bacteria by polymerase chain reaction and DNA hybridization. *FEMS Microbiology Letters*, 173(1), pp. 255–263.
- Hamdi, H., Benzarti, S., Manusadžianas, L., Aoyama, I., & Jedidi, N. 2007. Bioaugmentation and biostimulation effects on PAH dissipation and soil ecotoxicity under controlled conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(8), pp. 1926–1935.
- Harayama, S., Kok, M., Neidle, E.L. 1992. Functional and evolutionary relationships among diverse oxygenases. *Annual review of microbiology*, 46 pp. 561-601.
- Haritash, A.K. & Kaushik, C.P., 2009. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Journal of hazardous materials*, 169(1-3), pp.1–15.
- Haro, P. A., Perez, J. D., & Alvarez, A. F. 2007. Biostimulation Treatments of Hydrocarbon-Contaminated Soil in Semiarid Patagonia, Argentina. *Society of Petroleum Engineers*.
- Hashidoko Y, Kitagawa E, Iwahashi H, Purnomo E, Hasegawa T, Tahara S. 2007. Design of sphingomonad-detecting probes for a DNA array, and its application to investigate the behaviour, distribution, and source of rhizospheric *Sphingomonas* and other *sphingomonads* inhabiting an acid sulfate soil paddock in Kalimantan, Indonesia. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 71, pp. 345–351.
- Hashimoto, W., Momma, K., Maruyama, Y., Yamasaki, M., Mikami, B., & Murata, K. 2005. Structure and function of bacterial super-biosystem responsible for import and depolymerization of macromolecules. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 69(4), pp. 673–92.
- Head I.M. 1998) Bioremediation: towards a credible technology. *Microbiology* 144, pp. 599–608.
- Helmann, J.D. & Chamberlin, M.J., 1988. Structure and function of bacterial sigma factors. *Annual review of biochemistry*, 57, pp. 839–72.
- Hengge-aronis, R., Klein, W., Lange, R., Rimmele, M., & Boos, W. 1991. Trehalose Synthesis Genes Are Controlled by the Putative Sigma Factor Encoded by *rpoS* and Are Involved in Stationary-Phase Thermotolerance in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 173(24), pp. 7918–7924.
- Heulin, T., 2003. *Ramlibacter tataouinensis* gen. nov., sp. nov., and *Ramlibacter henchirensis* sp. nov., cyst-producing bacteria isolated from subdesert soil in Tunisia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(2), pp. 589–594.
- Holman, H. Y., & Tsang, Y. W. 1995. Influence of soil moisture on biodegradation of petroleum hydrocarbons. In R. E. Hinchey, R. N. Miller, & P. C. Johnson (Eds.), *In situ aeration: air sparging, bioventing, and related remediation processes*. pp. 323–332. Columbus: Battelle
- Hong, H., Chang, Y., Nam, I., & Schmidt, S. 2002. *Sphingomonas wittichii* RW1 Biotransformation of 2, 7-Dichloro- and *Sphingomonas wittichii* RW1. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(5), pp. 2584–2588.
- Hosokawa, R., Nagai, M., Morikawa, M., Okuyama, H. 2009. Autochthonous bioaugmentation and its possible application to oil spills. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(9), pp.1519–1528.

- Hughes, J.B., Beckles, D.M. Chandra, S.D. and Ward, C.H. 1997. Utilization of Bioremediation Processes for the Treatment of PAH-Contaminated Sediments. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 18, pp. 152–160.
- Huo, Y.-Y., Xu, X.-W., Liu, S.-P., Cui, H.-L., Li, X., & Wu, M. 2011. *Sphingomonas rubra* sp. nov., isolated from bioreactor wastewater. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 61(Pt 5), pp. 1028–1032.
- Huong, N. L., Itoh, K., Miyamoto, M., Suyama, K., & Yamamoto, H. 2007. Chlorophenol Hydroxylase Activity Encoded by TfdB from 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D)-Degrading *Bradyrhizobium* sp. strain RD5-C2. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 71(7), pp. 1691–1696.
- Ibarrolaza, A., Coppotelli, B. M., Del Panno, M. T., Donati, E. R., & Morelli, I. S. 2011. Application of the knowledge-based approach to strain selection for a bioaugmentation process of phenanthrene- and Cr(VI)-contaminated soil. *Journal of Applied Microbiology*, 111 (1), pp. 26-35
- In der Wiesche, C., Martens, R., Zadrazil, F., 2003. The Effect of Interaction Between White-rot Fungi and Indigenous Microorganisms on Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soil. *Water, Air and Soil Pollution: Focus*, 3(3), pp. 73–79.
- Johnsen, A. R., Karlson, U. 2004. Evaluation of bacterial strategies to promote the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Applied Microbiology and Biotechnology* 63, pp. 452–459
- Johnson, D. R., Coronado, E., Moreno-Forero, S. K., Heipieper, H. J., & Van der Meer, J. R. 2011. Transcriptome and membrane fatty acid analyses reveal different strategies for responding to permeating and non-permeating solutes in the bacterium *Sphingomonas wittichii*. *BMC microbiology*, 11, pp. 250.
- Jones, K. C., Stratford, J. A., Waterhouse, K. S., Furlong, E. T., Giger, W., Hites, R. A., Schaffner, C., Johnston, A. E. 1989. Increases in the polynuclear aromatic hydrocarbon content of an agricultural soil over the last century. *Environmental Science & Technology*, 23(1), pp. 95–101.
- Kanally, R.A. & Harayama, S., 2000. Biodegradation of High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Bacteria. *MINIREVIEW Biodegradation of High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Bacteria*. *Journal of bacteriology*, 182(8), pp. 2059–2067.
- Kaneko A, Miyadai H, Danbara H, Kawahara K. 2000. Construction of mutants of *Sphingomonas paucimobilis* defective in terminal mannose in the glycosphingolipid. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 64, pp. 1298–1301
- Kawahara K, Kuraishi H, Zähringer U. 1999. Chemical structure and function of glycosphingolipids of *Sphingomonas* spp and their distribution among members of the α -4 subclass of Proteobacteria. *J Industrial Microbiology and Biotechnology*, 23, pp. 408–413
- Kelley, I. & Cerniglia, C.E., 1995. Degradation of a mixture of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by a *Mycobacterium* strain PYR-1. *Soil and Sediment Contamination*, 4(1), pp. 77–91.
- Kelley ST, Theisen U, Angenent LT, Amand AS, Pace NR. 2004. Molecular analysis of shower curtain biofilm microbes. *Applied Environmental Microbiology* 70, pp. 4187–4192.

- Khan, A. A., R.-F. Wang, W.-W. Cao, W. Franklin, and C. E. Cerniglia. 1996. Reclassification of a polycyclic aromatic hydrocarbon-metabolizing bacterium, *Beijerinckia* sp. strain B1, as *Sphingomonas yanoikuyae* by fatty acid analysis, protein pattern analysis, DNA-DNA hybridization, and 16S ribosomal DNA sequencing. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46, pp. 466–469.
- Kilic A, Senses Z, Kurekci E, Aydogan H, Sener K, Kismet E, Basustaoglu AC. 2007. Nosocomial outbreak of *Sphingomonas paucimobilis* bacteremia in a hemato/oncology unit. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. 60, pp. 394–396
- Kim, J. Y., Park, S. J., Jang, B., Jung, C.-H., Ahn, S. J., Goh, C.-H., Cho, K., Han, O., Kang, H. 2007. Functional characterization of a glycine-rich RNA-binding protein 2 in *Arabidopsis thaliana* under abiotic stress conditions. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, 50(3), pp. 439–451.
- Kim, Y.-H., Freeman, J. P., Moody, J. D., Engesser, K.-H., & Cerniglia, C. E. 2005. Effects of pH on the degradation of phenanthrene and pyrene by *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *Applied microbiology and biotechnology*, 67(2), pp. 275–285.
- Kiyohara, H., & Nagao, K. 1978. The Catabolism of phenanthrene and naphthalene by Bacteria. *Journal of General Microbiology*, 105, 69–75.
- Kjelleberg, G. and S. & M Eguchi, T Nishikawa, K Macdonald, R Cavicchioli, J.C., 1996. Responses to Stress and Nutrient Availability by the Marine Ultramicrobacterium Responses to Stress and Nutrient Availability by the Marine Ultramicrobacterium *Sphingomonas* sp. strain RB2256. *Applied and environmental microbiology*, 62(4), pp. 1287–1294.
- Koskinen, R., Ali-Vehmas, T., Kämpfer, P., Laurikkala, M., Tsitko, I., Kostyal, E., Atroshi, F., Salkinoja-Salonen, M. 2000. Characterization of *Sphingomonas* isolates from Finnish and Swedish drinking water distribution systems. *Journal of applied microbiology*, 89(4), pp. 687–96.
- Krauss, M., Wilcke, W., Martius, C., Bandeira, A. G., Garcia, M. V. B., & Amelung, W. 2005. Atmospheric versus biological sources of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in a tropical rain forest environment. *Environmental pollution (Barking, Essex: 1987)*, 135(1), pp. 143–54.
- Krivobok S, Kuony S, Meyer C, Louwagie M, Willison J C, Jouanneau Y, 2003. Identification of pyrene-induced proteins in *Mycobacterium* sp. strain 6PY1: evidence for two ring-hydroxylating dioxygenases. *Journal of bacteriology*, 185(13), pp.3828–41.
- Kurz, M., Burch, A.Y., Seip, B., Lindow, S.E., & Gross, H. 2010. Genome-driven investigation of compatible solute biosynthesis pathways of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and their contribution to water stress tolerance. *Applied and environmental microbiology*, 76(16), pp. 5452–5462.
- Laflamme, R.E. & Hites, R.A., 1978. The global distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in recent sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 42(3), pp. 289–303.
- Lanfranconi, M.P., Alvarez, Hector M. & Studdert, C., A. 2003. A strain isolated from gas oil-contaminated soil displays chemotaxis towards gas oil and hexadecane. *Environmental Microbiology*, 5(10), pp. 1002–1008.
- Launen, L. a., Buggs, V. H., Eastep, M. E., Enriquez, R. C., Leonard, J. W., Blaylock, M. J., Huang, J.-W., Häggblom, M.M. 2002. Bioremediation of Polyaromatic Hydrocarbon-Contaminated Sediments in Aerated Bioslurry Reactors. *Bioremediation Journal*, 6(2), pp. 125–141.

- Lauro, F. M., McDougald, D., Thomas, T., Williams, T. J., Egan, S., Rice, S., DeMaere, M. Z., Ting, L., Ertan, H., Johnson, J., Ferriera, S., Lapidus, A., Anderson, I., Kyripides, N., Munk, C., Detter, C., Han, C.S., Brown, M.V., Robb, F.T., Kjelleberg, S., Cavicchioli, R. 2009. The genomic basis of trophic strategy in marine bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(37), pp. 15527–15533.
- Leahy, J.G. & Colwell, R.R., 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological reviews*, 54(3), pp. 305–315.
- Lee, W.-H., Azizan, M. N. M., & Sudesh, K. 2004. Effects of culture conditions on the composition of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) synthesized by *Comamonas acidovorans*. *Polymer Degradation and Stability*, 84(1), pp. 129–134.
- Leonardo, M.R. & Forst, S., 1996. Re-examination of the role of the periplasmic domain of EnvZ in sensing of osmolarity signals in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 22(3), pp.405–413.
- Lester, E.D., Satomi, M. & Ponce, A., 2007. Microflora of extreme arid Atacama Desert soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(2), pp. 704–708.
- LeBlanc, J. C., Gonçalves, E. R., & Mohn, W. W. 2008. Global response to desiccation stress in the soil actinomycete *Rhodococcus jostii* RHA1. *Applied and environmental microbiology*, 74(9), pp. 2627–2636.
- Leonardo, M. R., & Forst, S. 1996. Re-examination of the role of the periplasmic domain of EnvZ in sensing of osmolarity signals in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 22(3), pp. 405–413.
- Leys, N. M. E. J., Ryngaert, A., Bastiaens, L., Verstraete, W., Top, E. M., & Springael, D. 2004. Occurrence and Phylogenetic Diversity of Sphingomonas Strains in Soils Contaminated with Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Occurrence and Phylogenetic Diversity of Sphingomonas Strains in Soils Contaminated with Polycyclic Aromatic Hydrocarbons *Applied and environmental microbiology*, 70(4), pp. 1944–1955.
- Leys, N.M., A. Ryngaert, L. Bastiaens, P. Wattiau, E.M. Top, W. Verstraete, and D. Springael. 2005. Occurrence and community composition of fast-growing *Mycobacterium* in soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiology Ecology*, 51, pp. 375–388.
- Liang, Q. & Lloyd-Jones, G., 2011. Formation of Poly-β-hydroxybutyrate from Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by *Sphingobium scionense* sp. WP01. 2011 International Conference on Computer Distributed Control and Intelligent Environmental Monitoring, pp. 2448–2451.
- Lin, S.-Y. Lin, S.-Y., Shen, F.-T., Lai, W.-A., Zhu, Z.-L., Chen, W.-M., Chou, J.-H., Lin, Z.-Y., Young, C-C. 2012. *Sphingomonas formosensis* sp. nov., a polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from agricultural soil. *International Journal of [International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology](#)*, pp. 62:1581–1586.
- Liu, Y.J., Zhang, A.N. & Wang, X.C., 2009. Biodegradation of phenol by using free and immobilized cells of *Acinetobacter* sp. XA05 and *Sphingomonas* sp. FG03. *Biochemical Engineering Journal*, 44(2-3), pp.187–192.
- López, N. I., Floccari, M. E., Steinbüchel, A., Mndez, B. S., & Garcia, A. F. 1995. Effect of poly (3-hydroxybutyrate) (PHB) content on the starvation-survival of bacteria in natural waters. *FEMS Microbiology Ecology*, 16, pp. 95–101.

- Lu, G.-T., Xie, J.-R., Chen, L., Hu, J.-R., An, S.-Q., Su, H.-Z., Feng, J.-X., He, Y.-Q., Jiang, B.-L., Tang, D.-J., Tang, J.-L. 2009. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* is required for extracellular polysaccharide production and full virulence. *Microbiology (Reading, England)*, 155(Pt 5), pp. 1602–12.
- Ma, L., Zhang, J., Han, L., Li, W., Xu, L., Hu, F., & Li, H. 2012. The effects of aging time on the fraction distribution and bioavailability of PAH. *Chemosphere*, 86(10), pp. 1072–8.
- MacKay, D. 1997. *Illustrated Handbook of Physical-Chemical Properties and Environmental Fate for Organic Chemicals: Pesticide Chemicals*.
- Mackay, D., Callcott, D. 1998. *Partitioning and physical chemical properties of PAHs: the Handbook of Environmental chemistry. Vol3*. Editor A:H Neilson Springer-Verlag. Berlin Heidelberg.
- Macrae RM, Wilkinson JR. 1958. Poly- β -hydroxybutyrate metabolism in washed suspensions of *Bacillus cereus* and *Bacillus megaterium*. *Journal of general microbiology*, 19, PP. 210-222.
- Margesin, R. & Schinner, F., 2001. Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56(5-6), pp.650–663.
- Margesin, Rosa, Zhang, D.-C. & Busse, H.-J., 2012. *Sphingomonas alpina* sp. nov., a psychrophilic bacterium isolated from alpine soil. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 62(Pt 7), pp.1558–63.
- Mashreghi M, Prosser JI. 2006. Survival and activity of lux- marked phenanthrene-degrading *Pseudomonas stutzeri* P16 under different conditions. *Iranian Journal of Science and Technology Trans A*;30:71–80.
- Marin, J. A., Hernández, T., & Garcia, C. 2005. Bioremediation of oil refinery sludge by landfarming in semiarid conditions: influence on soil microbial activity. *Environmental research*, 98(2), pp. 185–95.
- Martín-Cabello, G., Moreno-Ruiz, E., Morales, V., Floriano, B., & Santero, E. 2011. Involvement of poly(3-hydroxybutyrate) synthesis in catabolite repression of tetralin biodegradation genes in *Sphingomonas macrogolita* strain TFA. *Environmental Microbiology Reports*, 3(5), pp. 627–631.
- Martínez M. D. 2010. Elucidación de la ruta de degradación de fenantreno por la cepa *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA: Incursión en estrategias metabólicas y proteómicas. Ph.D. Tesis, Universidad Nacional de la Plata, La Plata, Argentina.
- Mattimore, V., Battista, J.R. 1996. Radioresistance of *Deinococcus radiodurans*: functions necessary to survive ionizing radiation are also necessary to survive prolonged desiccation. *Journal Bacteriology*, 178, pp. 633-637.
- Matin, A, Veldhuis, C., Stegeman, V., & Veenhuis, M. 1979. Selective advantage of a *Spirillum* sp. in a carbon-limited environment. Accumulation of poly- β -hydroxybutyric acid and its role in starvation. *Journal of general microbiology*, 112(2), pp. 349–55.
- Meredith, W., Kelland, S.J., Jones, D.M., 2000. Influence of biodegradation on crude oil acidity and carboxylic acid composition. *Organic Geochemistry* . 31, pp. 1059–1073.
- Michener, S.R.R. & C.D., 1958. *A Statistical Method for Evaluating Systematic Relationships*. , p.Univ. Kansas Sci. Bull. 38, pp. 1409–1438.

- Morelli I.S., Saparrat M.C.N., Del Panno M.T., Coppotelli B.M. and Arrambari A. Bioremediation of PAHs contaminated soil by fungi. Fungi as Bioremediators. Ebrahim Mohammadi Goltapeh, Younes Rezaee Danesh & Ajit Varma (Editors). Series: Soil Biology. Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York. 2013.
- Moriguchi, K., Sugita, M. & Sugiura, M. 1997. Structure and subcellular localization of a small RNA-binding protein from tobacco. *Plant Journal*. 6, pp. 825–834.
- Morita, R.Y., 1990. The starvation-survival state of microorganisms in nature and its relationship to the bioavailable energy. *Experientia*, 46(8), pp. 813–817.
- Mrozik, A. & Piotrowska-Seget, Z. 2010. Bioaugmentation as a strategy for cleaning up of soils contaminated with aromatic compounds. *Microbiological research*, 165(5), pp. 363–75.
- Mueller, J. G., P. J. Chapman, B. O. Blattmann, & P. H. Pritchard. 1990. Isolation and characterization of a fluoranthene-utilizing strain of *Pseudomonas paucimobilis*. *Applied and Environmental Microbiology* 56, pp. 1079–1086.
- Muyzer, G., Brinkhoff, T., Nübel, U., Santegoeds, C., Schäfer, H., Wawer, C., Kowalchuk, G. A., De Bruijn, F. J., Head, I. M., Akkermans, A. D. L., Van Elsas, J. D. 2004. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), *Microbial ecology*, (Ed.2), pp. 743–769.
- Nagata, Y., Kamakura, M., Endo, R., Miyazaki, R., Ohtsubo, Y., Tsuda, M. 2006. Distribution of γ -hexachlorocyclohexane-degrading genes on three replicons in *Sphingobium japonicum* UT26. *FEMS Microbiology Letters* 256, pp. 112–118
- Nagata, Y., Ohtsubo, Y., Endo, R., Ichikawa, N., Ankai, A., Oguchi, A., Fukui, S., Fujita, N., Tsuda, M. 2010. Complete genome sequence of the representative γ -hexachlorocyclohexane-degrading bacterium *Sphingobium japonicum* UT26. *Journal of bacteriology*, 192(21), pp. 5852–5853.
- Nam, I., Hong, H., Kim, Y., Kim, B., Murugesan, K., & Å, Y. C. 2005. Biological removal of polychlorinated dibenzo-p-dioxins from incinerator fly ash by *Sphingomonas wittichii* RW1, 39, pp. 4651–4660.
- Niederweis, M., 2003. Mycobacterial porins new channel proteins in unique outer membranes. *Molecular Microbiology*, 49(5), pp.1167–1177.
- Nörtemann, B., Baumgarten, J., Rast, H. G., & Knackmuss, H. J. 1986. Bacterial communities degrading amino- and hydroxynaphthalene-2-sulfonates. *Applied and environmental microbiology*, 52(5), pp. 1195–202.
- Novikova N, De Boever P, Poddubko S, Deshevaya E, Polikarpov N, Rakova N, Coninx I, Mergeay M. 2006. Survey of environmental biocontamination on board of the International Space Station. *Research in Microbiology* 157, pp. 5–12
- Nurbas, M., & Kutsal, T. 2004. Production of PHB and P (HB-co-HV) Biopolymers by Using *Alcaligenes Eutrophus*. *Iranian Polymer Journal*, 3(1), pp. 45–51.
- Okere, U & Semple, K. T., 2012. Biodegradation of PAHs in “Pristine” Soils from Different Climatic Regions. *Journal of Bioremediation and Biodegradation*, 01(S1).
- Oliveira, J., Figueiredo, M., Silva, M., Malta, M., Vendruscolo, C., & Almeida, H. 2012. Production of extracellular biopolymers and identification of intracellular proteins and *Rhizobium tropici*. *Current microbiology*, 65(6), pp. 686–91.
- Ophir, T. & Gutnick, D.L., 1994. A role for exopolysaccharides in the protection of microorganisms from desiccation. *Applied and environmental microbiology*, 60(2), pp.740–5.

- Orme, R., Ian Douglas, C.W., Rimmer, S., and Webb, M. 2006. Proteomic analysis of *Escherichia coli* biofilms reveals the overexpression of the outer membrane protein OmpA. *Proteomics* 6, pp. 4269–4277.
- Otte MP, Gagnon J, Comeau Y, Matte N, Greer CW, Samson R. 1994. Activation of an indigenous microbial consortium for bioaugmentation of pentachlorophenol/creosote contaminated soils. *Applied Microbiology and Biotechnology* 40:926–932.
- Page WJ, Knosp O. 1989. Hyperproduction of poly-β-hydroxybutyrate during exponential growth of *Azotobacter vinelandii* UWD. *Applied and environmental microbiology*, 55, pp. 1334-1339.
- Paruelo N.R., Beltrán A., Jobbágy E., Sala O.E & Golluscio R.A. 1998. The climate of Patagonia: general patterns and controls on biotic processes. *Ecología Austral*, 8, pp. 85-101.
- Peressutti, S.R., 2000. Dinámica de las poblaciones bacterianas degradadoras de hidrocarburos en un ecosistema de suelo patagónico. Ph.D. Tesis, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Comodoro Rivadavia, Argentina.
- Peters, C.A., Knightes, C.D. & Brown, D.G. 1999. Long-Term Composition Dynamics of PAH-Containing NAPLs and Implications for Risk Assessment. *Environmental Science & Technology*, 33(609), pp.4499–4507.
- Pieper DH. 2005. Aerobic degradation of polychlorinated biphenyls. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67, pp. 170–191
- Pinyakong, O., H. Habe, N. Supaka, P. Pinpanichkarn, K. Juntongjin, T. Yoshida, K. Furihata, H. Nojiri, H. Yamane, and T. Omori. 2000. Identification of novel metabolites in the degradation of phenanthrene by *Sphingomonas sp. strain* P2. *FEMS Microbiology Letters*. 191, pp. 115–121.
- Pinyakong, O., Habe, H., & Omori, T. 2003. The unique aromatic genes in *shpingomonads* degrading polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Journal of General and Applied Microbiology.*, 49, pp. 1–19.
- Potin, O., Raÿn, C., & Veignie, E. 2004. Bioremediation of an aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contaminated soil by filamentous fungi isolated from the soil, *International biodeterioration & biodegradation*, 54, 45–52.
- Potts, M. & Webb, S.J., 1994. Desiccation Tolerance of Prokaryotes. *Microbiological Reviews*, 58(4), pp. 755–805.
- Prado, M., & Robledo, M. 2010. La actividad hidrocarburífera en la Cuenca del Golfo San Jorge: El papel del empresariado regional *Revista de estudios regionales y mercado de trabajo en la Cuenca del Golfo del empresariado regional Mariano Prado. Revista de estudios regionales y mercado de trabajo*, 6, pp. 117–193.
- Prakash, O. & Lal, R., 2006. Description of *Sphingobium fuliginis sp. nov.*, a phenanthrene-degrading bacterium from a fly ash dumping site, and reclassification of *Sphingomonas cloacae* as *Sphingobium cloacae comb. nov.* *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 56(Pt 9), pp. 2147–52.
- Prasadarao, N. V., Wass, C. A., and Kim, K. S. 1996. Endothelial cell GlcNAc1–4GlcNAc epitopes for outer membrane protein A enhance traversal of *Escherichia coli* across the blood-brain barrier. *Infection and Immunity* . 64, pp. 154–160.
- Prestrelski, S. J. 1993. The structure of proteins in lyophilized formulations using fourier transform infrared spectroscopy. *Cryobiology* 30, pp. 222-223.

- Prieto, L.H. Bertiller, M. B., Carrera, A.L., Olivera, N.L. 2011. Soil enzyme and microbial activities in a grazing ecosystem of Patagonian Monte, Argentina. *Geoderma*, 162(3-4), pp.281–287.
- Qu, Y., Zhou, J., Wang, J., Song, Z., Xing, L., & Fu, X. 2006. Bioaugmentation of bromoamine acid degradation with *Sphingomonas xenophaga* QYY and DNA fingerprint analysis of augmented systems. *Biodegradation*, 17(1), pp. 83–91.
- Rahman, K.S.M.J., Thahira-Rahman, P., Lakshmanaperumalsamy, I.M.B. 2002. Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium. *Bioresource technology*, 85, pp. 257–261.
- Rahman, K.S.M., Rahman, T.J., Kourkoutas, Y., Petsas, I., Marchant, R., Banat, I.M. 2003. Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. *Bioresource Technology*, 90, pp. 159–168.
- Ramos, J. L., Gallegos, M. T., Marqués, S., Ramos-González, M. I., Espinosa-Urgel, M., & Segura, a. (2001). Responses of Gram-negative bacteria to certain environmental stressors. *Current opinion in microbiology*, 4(2), pp. 166–171.
- Ramsay, B. A., Ramsay, J. A., & Chavarie, C. 1990. Biosynthesis of Poly- β -Hydroxyalkanoates from Pentoses by *Pseudomonas pseudoflava*. *Applied and environmental microbiology*, 56(10), 3133–3138.
- Reasoner, D.J. & Geldreich, E.E., 1985. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Applied and environmental microbiology*, 49(1), pp.1–7.
- Reddy, G. S. N., & Garcia-Pichel, F. 2007. *Sphingomonas mucosissima* sp. nov. and *Sphingomonas desiccabilis* sp. nov., from biological soil crusts in the Colorado Plateau, USA. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 57(Pt 5), pp. 1028–1034.
- Rhykerd, R. L., R. W. Weaver, and K. J. McInnes. 1995. Influence of salinity on bioremediation of oil in soil. *Environmental Pollution*, 90, pp. 127–130.
- Roberson, E. B., & Firestone, M. K. 1992. Relationship between Desiccation and Exopolysaccharide Production in a Soil *Pseudomonas* sp. *Applied and environmental microbiology*, 58(4), pp. 1284–1291.
- Röling, W. F. M., Milner, M. G., Jones, D. M., Lee, K., Daniel, F., Swannell, R. J. P., & Head, I. M. 2002. Robust hydrocarbon degradation and dynamics of bacterial communities during nutrient-enhanced oil spill bioremediation. *Applied and environmental microbiology*, 68(11), pp. 5537–5548.
- Romine, M. F., Stillwell, L. C., Wong, K. K., Thurston, S. J., Sisk, E. C., Sensen, C., Gaasterland, T., Fredrickson, J. K., Saffer, J. D. 1999. Complete sequence of a 184-kilobase catabolic plasmid from *Sphingomonas aromaticivorans* F199. *Journal of bacteriology*, 181(5), pp. 1585–1602.
- Ronen Z, Vasiluk L, Abeliovih A, Nejidat A. 2000. Activity and survival of tribromophenol-degrading bacteria in a contaminated desert soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 3, pp. 1643–1650.
- Rore, H. De et al., 1994. Transfer of the catabolic plasmid RP4::Tn4371 to indigenous soil bacteria and its effect on respiration and biphenyl breakdown. *FEMS Microbiology Ecology*, (15), pp.71–81.
- Roy, M., Khara, P. & Dutta, T.K., 2012. meta-Cleavage of hydroxynaphthoic acids in the degradation of phenanthrene by *Sphingobium* sp. strain PNB. *Microbiology (Reading, England)*, 158(Pt 3), pp.685–95.
- Sachetto-Martins, G., Franco, L.O. and de Oliveira, D.E. 2000. Plant glycine-rich proteins: a family or just proteins with a common motif? *Biochimica et Biophysica Acta*, 1492, pp. 1–14.

- Saier, M.H., Jr. and Tseng, T.-T. 1999. Evolutionary origins of transmembrane transport systems. In Transport of molecules across microbial membranes (Society for General Microbiology Symposium) (eds. J.K. Broome-Smith, S. Baumberg, C.J. Stirling, and F.B. Ward), pp. 252–274. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Samanta, S.K., Singh, O. V & Jain, R.K., 2002. Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. Trends in biotechnology, 20(6), pp. 243–248.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning, a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, NY, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Scullion, J., 2006. Remediating polluted soils. Die Naturwissenschaften, 93(2), pp. 51–65.
- Senoo, K. & Wada, H., 1989. Soil Science and Plant Nutrition Isolation and identification of an aerobic γ -HCH-decomposing bacterium from soil. Soil Science and Plant Nutrition, 35(1), pp. 79–87.
- Setia, R., Marschner, P., Baldock, J., Chittleborough, D., Smith, P., & Smith, J. 2011. Salinity effects on carbon mineralization in soils of varying texture. Soil Biology and Biochemistry, 43(9), pp. 1908–1916.
- Setlow, P., 1995. Mechanisms for the prevention of damage to DNA in spores of *Bacillus* species. Annual review of microbiology, 49, pp. 29–54.
- Shi, T., Fredrickson, J.K. & Balkwill, D.L., 2001. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Sphingomonas* strains isolated from the terrestrial subsurface. Journal of industrial microbiology & biotechnology, 26(5), pp. 283–9.
- Shirkey, B., Kovarcik, D. P., Wright, D. J., Wilmoth, G., Prickett, T. F., Helm, R. F., Gregory, E. M., Potts, M. 2000. Active Fe-containing superoxide dismutase and abundant sodF mRNA in *Nostoc commune* (*Cyanobacteria*) after years of desiccation. Journal of bacteriology, 182(1), pp. 189–97.
- Silva R.A. 2008. Relación entre el metabolismo de lípidos y la adaptación a la presencia de contaminantes y a condiciones ambientales en bacterias autóctonas. Ph.D. Tesis, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Comodoro Rivadavia, Argentina.
- Smith, S.G.J., Mahon, V., Lambert, M.A., & Fagan, R.P. 2007. A molecular Swiss army knife: OmpA structure, function and expression. FEMS Microbiology Letters 273: 1–11
- SM 4500 H+B (Dto. Nac.831/93), Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation.
- Soclo, H., Garrigues, P. & Ewald, M., 2000. Origin of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Coastal Marine Sediments: Case Studies in Cotonou (Benin) and Aquitaine (France) Areas. Marine Pollution Bulletin, 40(5), pp.396–387.
- Sokal, R. R. & Michener, C. D. 1958. A statistical method for evaluating systematic relationships. Univ. Kansas Sci. Bull. 38, pp. 1409-1438.
- Stark, J.M., Firestone, M.K., 1995. Mechanisms for soil moisture effects on the activity of nitrifying bacteria. Applied and Environmental Microbiology 61, pp. 218-221.
- Stolz, A., 2009. Molecular characteristics of xenobiotic-degrading sphingomonads. Applied microbiology and biotechnology, 81(5), pp. 793–811.
- Sudesh, K., Abe, H. & Doi, Y., 2000. Synthesis , structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. Progress in Polymer Science, 25, pp.1503–1555.

- Sugita, M. & Sugiura, M. 1994. The existence of eukaryotic ribonucleoprotein consensus sequence-type RNA-binding proteins in a prokaryote, *Synechococcus* 6301. *Nucleic acids research*, 22(1), pp.25–31.
- Sun, J.-Q., Huang, X., Chen, Q.-L., Liang, B., Qiu, J.-G., Ali, S. W., & Li, S.-P. 2008. Isolation and characterization of three *Sphingobium* sp. strains capable of degrading isoproturon and cloning of the catechol 1,2-dioxygenase gene from these strains. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(2), 259–268.
- Swannell, R., Lee, K & McDonagh, M., 1996. Field evaluations of marine oil spill bioremediation. *Microbiol. Rev.*, 60(2), pp.342–365.
- Takeuchi, M., Hamana, K & Hiraishi, a, 2001. Proposal of the genus *Sphingomonas sensu stricto* and three new genera, *Sphingobium*, *Novosphingobium* and *Sphingopyxis*, on the basis of phylogenetic and chemotaxonomic analyses. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 51(Pt 4), pp.1405–17.
- Takeuchi, M., Nanba, K., Iwamoto, H., Nirei, H., Kusuda, T., Kazaoka, O., Owaki, M. 2005, Fuyura, K. In situ bioremediation of a cis-dichloroethylene-contaminated aquifer utilizing methane-rich groundwater from an uncontaminated aquifer. *Water research*, 39(11), pp. 2438–2444.
- Talà, A., Lenucci, M., Gaballo, A., Durante, M., Tredici, S. M., Debowles, D. A., Pizzolante, G., Marcuccio, C., Carata, E., Piro, G., Carpita, N.C., Mita, G., Alifano, P. 2013. *Sphingomonas cynarae* sp. nov., a proteobacterium that produces an unusual type of sphingane. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63(Pt 1), pp. 72–79.
- Teng, Y., Luo, Y., Sun, M., Liu, Z., Li, Z., Christie, P. 2010. Effect of bioaugmentation by *Paracoccus* sp. strain HPD-2 on the soil microbial community and removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from an aged contaminated soil. *Bioresource technology*, 101(10), pp. 3437–3443.
- Thalman, A. 1968. Zur Methodik der bestimmung der dehydrogenaseaktivität im boden mittels triphenyltetrazoliumchlorid (TTC). *Landwirtsch Forsch* 21, pp. 249–258.
- Thomassin-Lacroix, E. J., Yu, Z., Eriksson, M., Reimer, K. J., & Mohn, W. W. 2001. DNA-based and culture-based characterization of a hydrocarbon-degrading consortium enriched from Arctic soil. *Canadian journal of microbiology*, 47(12), pp. 1107–1115.
- Thompson, I. P., Van der Gast, C. J., Ciric, L., & Singer, A. C. 2005. Bioaugmentation for bioremediation: the challenge of strain selection. *Environmental microbiology*, 7(7), pp. 909–915.
- Toyama, T., Momotani, N., Ogata, Y., Miyamori, Y., Inoue, D., Sei, K., Mori, K., Kikuchi, S., Ike, M. 2010. Isolation and characterization of 4-tert-butylphenol-utilizing *Sphingobium fuliginis* strains from *Phragmites australis* rhizosphere sediment. *Applied and environmental microbiology*, 76(20), pp. 6733–6740.
- Treves, D. S., Xia, B., Zhou, J., & Tiedje, J. M. 2003. A two-species test of the hypothesis that spatial isolation influences microbial diversity in soil. *Microbial ecology*, 45(1), pp. 20–28.
- Trzesicka-Mlynarz, D. & Ward, O.P., 1995. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by a mixed culture and its component pure cultures, obtained from PAH-contaminated soil. *Canadian journal of microbiology*, 41(6), pp. 470–476.
- Tribelli, P. M., & López, N. I. 2011. Poly(3-hydroxybutyrate) influences biofilm formation and motility in the novel Antarctic species *Pseudomonas extremaustralis* under cold conditions. *Extremophiles: life under extreme conditions*, 15(5), pp. 541–547.

- Tribelli, P. M., Di Martino, C., López, N. I., & Raiger lustman, L. J. 2012. Biofilm lifestyle enhances diesel bioremediation and biosurfactant production in the Antarctic polyhydroxyalkanoate producer *Pseudomonas extremaustralis*. *Biodegradation*, 23(5), pp. 645–51.
- Tribelli, P. M., Raiger lustman, L. J., Catone, M. V, Di Martino, C., Revale, S., Méndez, B. S., & López, N. I. 2012. Genome sequence of the polyhydroxybutyrate producer *Pseudomonas extremaustralis*, a highly stress-resistant Antarctic bacterium. *Journal of bacteriology*, 194(9), pp. 2381–2382.
- Tyagi, M., Da Fonseca, M.M.R. & De Carvalho, C.C.C.R. 2011. Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. *Biodegradation*, 22(2), pp. 231–41.
- Uchida, H., Hamana, K., Miyazaki, M., Yoshida, T., & Nogi, Y. 2012. *Parasphingopyxis lamellibrachiae* gen. nov., sp. nov., isolated from a marine annelid worm. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 62(Pt 9), pp. 2224–2228.
- Ueno, A., Ito, Y., Yumoto, I., & Okuyama, H. 2007. Isolation and characterization of bacteria from soil contaminated with diesel oil and the possible use of these in autochthonous bioaugmentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(12), pp. 1739–1745.
- Uytbroek M, Ortega-Calvo J-J, Breugelmans P, Springael D. 2006. Comparison of mineralization of solid-sorbed phenanthrene by polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading *Mycobacterium spp.* and *Sphingomonas spp.* *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72, pp. 829–836
- Uytbroek, M., Spoden, A., Ortega-Calvo, J.-J., Wouters, K., Wattiau, P., Bastiaens, L., & Springael, D. 2007. Differential responses of eubacterial, *Mycobacterium*, and *Sphingomonas* communities in polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-contaminated soil to artificially induced changes in PAH profile. *Journal of environmental quality*, 36(5), pp. 1403–1411.
- Uz, I., Duan, Y.P. & Ogram, a, 2000. Characterization of the naphthalene-degrading bacterium, *Rhodococcus opacus* M213. *FEMS microbiology letters*, 185(2), pp. 231–238.
- Vacca, D.J., Bleam, W.F. & Hickey, W.J., 2005. Isolation of Soil Bacteria Adapted To Degrade Humic Acid-Sorbed Phenanthrene. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(7), pp. 3797–3805.
- Vancanneyt, M., Schut, F., Snauwaert, C., Goris, J., Swings, J., & Gottschal, J. C. 2001. *Sphingomonas alaskensis sp. nov.*, a dominant bacterium from a marine oligotrophic environment. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 51(Pt 1), pp. 73–79.
- Vecchioli, G.I., Del Panno, M.T. & Paineira, M.T., 1990. Use of selected autochthonous soil bacteria to enhanced degradation of hydrocarbons in soil. *Environmental Pollution*, 67(3), pp. 249–258.
- Van Herwijnen, R., Joffe, B., Ryngaert, A., Hausner, M., Springael, D., Govers, H. A. J., Wuertz, S., Parsons, J R. 2006. Effect of bioaugmentation and supplementary carbon sources on degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by soil-derived culture. *FEMS Microbiology Ecology*, 55, pp. 122–135.
- Van Veen, J. a, Van Overbeek, L.S. & Van Elsas, J D, 1997. Fate and activity of microorganisms introduced into soil. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 61(2), pp.121–35.
- Vanbroekhoven, K., A. Ryngaert, L. Bastiaens, P. Wattiau, M. Vancanneyt, J. Swings, R. De Mot & Springael, D. 2004. Streptomycin as a selective agent to facilitate recovery and isolation of introduced and indigenous *Sphingomonas* from environmental samples. *Environmental Microbiology*, 6, pp. 1123–1136.

- Vílchez R, Pozo C, Gómez MA, Rodelas B, González-López J. 2007. Dominance of *Sphingomonads* in a copper-exposed biofilm community for groundwater treatment. *Microbiology*, 153, pp. 325–337
- Viñas, M., Sabaté, J., Espuny, M. J., Anna, M., & Vin, M. 2005. Bacterial Community Dynamics and Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation during Bioremediation of Heavily Creosote-Contaminated Soil Bacterial Community Dynamics and Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation during Bioremediation of Heavily Creosote. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005, 71(11), pp. 7008–7018.
- Vogel, T.M., 1996. Bioaugmentation as a soil bioremediation approach. *Current opinion in biotechnology*, 7(3), pp. 311–316.
- Vogel, T.M., and Walter, M.V. 2001. Bioaugmentation. In *Manual of Environmental Microbiology*. Hurst, C.J., Crawford, R.L., Knudsen, G.R., McInerney, M.J., and Stetzenbach, L.D. (eds). Washington, DC, USA: American Society for Microbiology Press, pp. 952–995.
- Wada, H., Senoo, K., and Tajai, Y. 1989. Rapid degradation of γ -HCH in the upland soil after multiple application *Soil Science Plant Nutrition*, 35, 71-77
- Walkley, A & Black, I.A. 1934. An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Science*, 37, pp, 29-38.
- Wai, S. N., Mizunoe, Y., Takade, A., & Wai, S. U. N. N. 1998. *Vibrio cholerae* O1 Strain TSI-4 Produces the Exopolysaccharide Materials That Determine Colony Morphology, Stress Resistance, and Biofilm Formation *Vibrio cholerae* O1 Strain TSI-4 Produces the Exopolysaccharide Materials That Determine Colony Morphology. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(10), pp. 3648–3655.
- Wang, Y. 2002. The function of OmpA in *Escherichia coli*. *Biochemical and biophysical research communications*, 292(2), pp. 396–401.
- Weber, J. W., & Corseuil, H. X. 1994. Inoculation of contaminated subsurface soils with enriched indigenous microbes to enhance bioremediation rates. *Water Research*, 28(6), pp. 1407–1414.
- Welsh, D.T., 2000. Ecological significance of compatible solute accumulation by micro-organisms: from single cells to global climate. *FEMS Microbiology Reviews*, 24, pp. 263–290.
- Wichern, J., Wichern, F., Joergensen, R.G., 2006. Impact of salinity on soil microbial communities and the decomposition of maize in acidic soils. *Geoderma*, 137, pp. 100-108.
- Wilcke, W., Amelung, W., Krauss, M., Martius, C., Bandeira, A., & Garcia, M. 2003. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) patterns in climatically different ecological zones of Brazil. *Organic Geochemistry*, 34(10), pp. 1405–1417.
- Wild, S.R. & Jones, K C, 1995. Polynuclear aromatic hydrocarbons in the United Kingdom environment: a preliminary source inventory and budget. *Environmental pollution (Barking, Essex: 1987)*, 88(1), pp. 91–108.
- Wittich, R. M., Wilkes, H., Sinnwell, V., Francke, W., & Fortnagel, P. 1992. Metabolism of dibenzo-p-dioxin by *Sphingomonas sp.* strain RW1. *Applied and environmental microbiology*, 58(3), pp. 1005–10.

- Wittmann, C., Zeng, A.-P. & Deckwer, W.D. 1998. Physiological characterization and cultivation strategies of the pentachlorophenol-degrading bacteria *Sphingomonas chlorophenolica* RA2 and *Mycobacterium chlorophenolicum* PCP-1. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 21(6), pp. 315.
- Wolf, A., Krämer, R. & Morbach, S., 2003. Three pathways for trehalose metabolism in *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 and their significance in response to osmotic stress. *Molecular Microbiology*, 49(4), pp.1119–1134.
- Wrenn, B.A. & Venosa, A.D., 1996. Selective enumeration of aromatic and aliphatic hydrocarbon degrading bacteria by a most-probable-number procedure. *Canadian journal of microbiology*, 42(3), pp. 252–258.
- Xia, Y., Min, H., Rao, G., Lv, Z., Liu, J., Ye, Y., & Duan, X. 2005. Isolation and characterization of phenanthrene-degrading *Sphingomonas paucimobilis* strain ZX4. *Biodegradation*, 16(5), 393–402.
- Yabuuchi, E., Yano, I., Oyaizu, H., Hashimoto, Y., Ezaki, T., & Yamamoto, H. 1990. Proposals of *Sphingomonas paucimobilis* gen. nov. and comb. nov., *Sphingomonas parapaucimobilis* sp. nov., *Sphingomonas yanoikuyae* sp. nov., *Sphingomonas adhaesiva* sp. nov., *Sphingomonas capsulata* comb. nov., and two genospecies of the genus *Sphingomonas*. *Microbiology and immunology*, 34(2), pp. 99–119.
- Youngblood, W.W. & Blumer, M., 1975. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the environment: homologous series in soils and recent marine sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 39(9), pp.1314–1303.
- Zhang, Q., & Yan, T. 2012. Correlation of intracellular trehalose concentration with desiccation resistance of soil *Escherichia coli* populations. *Applied and environmental microbiology*, 78(20), pp. 7407–13.