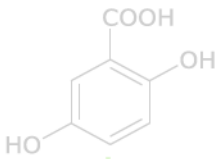


UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

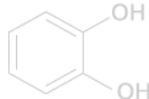
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

Departamento de Ciencias Biológicas

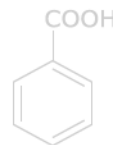
Gentisato



Catecol



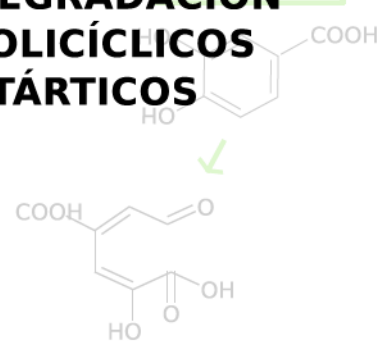
Benzoato



Trabajo de Tesis Doctoral

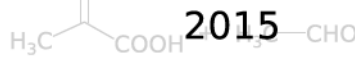
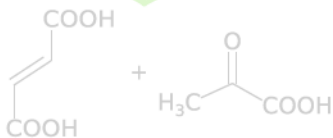
ANÁLISIS METAGENÓMICO DE LA BIODEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS EN SEDIMENTOS MARINOS SUBANTÁRTICOS

Ácido protocátélico



CLAUDIA L. LOVISO

2015



Ciclo de Krebs

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
Tesis de Doctorado
ANÁLISIS METAGENÓMICO DE LA BIODEGRADACIÓN DE
HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS EN SEDIMENTOS
MARINOS SUBANTÁRTICOS

Claudia L. Loviso

Dirección: Dra. Hebe M. Dionisi
Co-dirección: Dra. Mariana Lozada
Asesora: María Teresa Del Panno

La Plata, Argentina

2015

Dedicado a mi familia

Agradecimientos

En primer lugar quisiera agradecer al Estado Nacional por haberme otorgado, por medio del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), las becas doctorales que permitieron financiar mis estudios.

A las autoridades de Centro Nacional Patagónico (CENPAT-CONICET) por haberme brindado el lugar de trabajo para desarrollar la presente Tesis Doctoral.

A mis directoras, Hebe M. Dionisi y Mariana Lozada, por abrirme las puertas del Laboratorio de Microbiología ambiental y por sus consejos. Particularmente a Hebe, por la lectura y corrección del manuscrito.

A mi familia y especialmente a mis padres, por confiar en mí y por haberme dado la oportunidad de estudiar una carrera Universitaria, porque sin su apoyo esto no hubiera sido posible.

A Roy, mi compañero de caminos. Gracias mi vida por haber transitado esta etapa a mi lado, gracias por la paciencia, por tus palabras de aliento, por escucharme, por tu consejos.

Muchas gracias a tod@s los que hicieron que todos estos años hayan sido más llevaderos. Gracias a Lili, Agus, Maga, Mari, Sole, Ana, Poly, Marian, JuampyJime, Lau, Naty, Gastón, Gaby, Juli, Lucas, José, Nadia, Moni, Flor,... muchas gracias por su amistad, los mates compartidos y las juntadas dentro y fuera del CENPAT.

Gracias especialmente a Lili, Maga y Mari, mis compañeras de aventuras del laboratorio y oficina.

Gracias Agus y Mari por las charlitas en la pile para ponernos al día!, a pesar de las apuradas de Chiquita...

A Lau, Guille, Ro, Yani, Miris, gracias por las charlas y los momentos compartidos, por estar siempre a pesar de las distancias, las quiero amigas!.

Les agradezco enormemente a mis cuñados y a Leslie, por su compañía y aguante, por preguntarme cómo iba con la Tesis. Gracias Leslie por el préstamo de la computadora. Gracias Tami por los riquísimos licuados que acompañaron la última etapa de escritura.

A mis hermosas sobrinas, por regalarme las sonrisas que matizaron los momentos más difíciles.

Gracias a mis ex-compañeros del CINDEFI, por su cariño y recibirme siempre con los brazos abiertos cada vez que ando por aquellos pagos.

Por último, y no menos importante, quisiera agradecer a todas aquellas personas que colaboraron enormemente en el desarrollo de este trabajo. Gracias a Julio y Domingo, por las charlas en la garita y por haberme dejado entrar al CENPAT a horas inesperadas. A los integrantes del Laboratorio de Oceanografía y Contaminación de Aguas, por permitirme utilizar sus equipos e instalaciones de manera desinteresada. A Néstor, Nelda, Marina y Cynthia, porque siempre estuvieron dispuestos a dar una mano cuando fue necesario. A nuestros vecinos del laboratorio, Juan y Luis, porque hicieron que la etapa de trabajo de laboratorio fuera más divertida. Al Servicio Centralizado de Computación del CENPAT, especialmente a Fernando Jaguer, por su buena predisposición para solucionar cualquier problema con nuestras computadoras. A Zulma, por hacer que nuestras oficinas y laboratorios queden relucientes.

Índice general

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUCCIÓN | 13 |
| 1.1. Hidrocarburos en el ambiente marino | 13 |
| 1.1.1. Contaminación por hidrocarburos en la costa Patagónica | 14 |
| 1.1.2. Composición del petróleo crudo y sus productos derivados | 15 |
| 1.1.3. Efecto de los hidrocarburos en el ecosistema marino | 16 |
| 1.1.4. Intemperización los hidrocarburos introducidos en el mar | 17 |
| 1.2. La biodegradación de HAPs | 18 |
| 1.2.1. Por qué es importante la degradación de HAPs? | 18 |
| 1.2.2. Biodegradación de HAPs en condiciones aeróbicas | 19 |
| 1.2.3. Rutas metabólicas involucradas en la degradación de HAPs de bajo peso molecular | 20 |
| 1.2.3.1. Vía alta de degradación | 20 |
| 1.2.3.2. Vía baja de degradación | 21 |
| 1.2.4. Biodegradación de HAPs de alto peso molecular | 22 |
| 1.2.5. Enzimas RHOs | 24 |
| 1.2.5.1. Clasificación de las enzimas RHO | 25 |
| 1.2.6. Enzimas involucradas en la ruptura del anillo aromático | 26 |
| 1.2.6.1. Clasificación de enzimas EXDO | 27 |
| 1.2.7. Genes involucrados en el catabolismo de HAPs | 28 |
| 1.2.8. La biodegradación de hidrocarburos en el ambiente marino | 30 |
| 1.3. Estudio de comunidades microbianas: Métodos independientes del cultivo | 31 |
| 1.3.1. Bibliotecas de productos de amplificación | 32 |
| 1.3.2. PCR cuantitativa | 34 |
| 1.3.3. Metagenómica | 37 |
| 1.3.3.1. Bibliotecas metagenómicas | 37 |
| 1.3.3.2. Secuenciación al azar del metagenoma | 38 |
| 1.3.4. Tecnologías de secuenciación de segunda generación | 39 |
| 1.4. Bahía Ushuaia, el sitio de estudio | 42 |
| 1.4.1. Factores ambientales y el impacto de los hidrocarburos sobre Bahía Ushuaia . . | 43 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 1.4.2. | Poblaciones bacterianas de sedimentos intermareales de Bahía Ushuaia con capacidad de degradar HAPs | 44 |
| 1.5. | OBJETIVOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO | 45 |
| 2. | MATERIALES Y MÉTODOS | 48 |
| 2.1. | Composición de medios de cultivo y soluciones | 48 |
| 2.1.1. | Medios de cultivo | 48 |
| 2.1.2. | Soluciones | 48 |
| 2.2. | Cepas bacterianas utilizadas | 49 |
| 2.3. | Obtención de muestras de sedimentos intermareales | 49 |
| 2.4. | Extracciones de ADN | 50 |
| 2.4.1. | Extracción de ADN metagenómico | 50 |
| 2.4.1.1. | Extracción de ADN mediante kit comercial | 50 |
| 2.4.1.2. | Extracción manual de ADN metagenómico | 50 |
| 2.4.2. | Extracción de ADN plasmídico y fósídico | 51 |
| 2.4.2.1. | Extracción de plásmidos mediante el método de lisis alcalina | 51 |
| 2.4.2.2. | Extracción de plásmidos y fósídicos mediante un kit comercial | 51 |
| 2.4.3. | Cuantificación de ADN | 52 |
| 2.5. | Construcción de bibliotecas de productos de amplificación | 52 |
| 2.5.1. | Amplificación de genes de dioxigenasas | 52 |
| 2.5.2. | Clonado de productos de amplificación | 53 |
| 2.5.3. | Restricción de los fragmentos clonados | 54 |
| 2.6. | Cuantificación de genes correspondientes a la variante T de enzimas dioxigenasas | 54 |
| 2.6.1. | Diseño de cebadores para los ensayos de qPCR | 54 |
| 2.6.2. | Preparación del estándar para la cuantificación de la variante génica T | 55 |
| 2.6.3. | Optimización de los ensayos de qPCR | 56 |
| 2.6.3.1. | Optimización de la temperatura de hibridación | 56 |
| 2.6.3.2. | Optimización de la concentración de los cebadores | 56 |
| 2.6.3.3. | Concentración óptima de templado | 57 |
| 2.6.4. | Especificidad de los fragmentos de genes amplificados | 57 |
| 2.6.4.1. | Curvas de desnaturalización | 57 |
| 2.6.4.2. | Electroforesis en geles de agarosa | 57 |
| 2.6.5. | Estimación de la abundancia de genes correspondientes a la variante T | 57 |
| 2.7. | Construcción de la biblioteca metagenómica | 58 |
| 2.7.1. | Preparación del ADN metagenómico | 58 |

| | | |
|----------|--|----|
| 2.7.2. | Reacciones de ligación y empaquetado, infección de células EPI300-T1 [®] y titulación de los clones generados | 59 |
| 2.7.3. | Conservación de la biblioteca metagenómica | 59 |
| 2.8. | Identificación de los clones de interés a partir de la biblioteca metagenómica | 60 |
| 2.8.1. | Ensayos moleculares | 60 |
| 2.8.1.1. | Controles | 60 |
| 2.8.1.2. | Ensayos de PCR | 61 |
| 2.8.2. | Estrategia funcional | 61 |
| 2.8.2.1. | Actividad naftaleno dioxigenasa | 61 |
| 2.8.2.2. | Actividad extradiol dioxigenasa | 62 |
| 2.9. | Análisis de los fragmentos de ADN | 62 |
| 2.9.1. | Control de calidad de los fósmidos | 62 |
| 2.9.2. | Secuenciación de los fósmidos | 62 |
| 2.9.3. | Predicción de marcos abiertos de lectura y anotación funcional de las secuencias identificadas | 63 |
| 2.9.4. | Análisis filogenéticos | 63 |
| 2.9.5. | Estimación del origen de los fragmentos clonados | 64 |

3. CARACTERIZACIÓN DE GENES BIOMARCADORES RELACIONADOS CON LA DEGRADACIÓN DE HAPs EN SEDIMENTOS SUBANTÁRTICOS **66**

| | | |
|----------|---|----|
| 3.1. | Introducción | 66 |
| 3.2. | Resultados | 67 |
| 3.2.1. | Identificación de genes biomarcadores en sedimentos intermareales de Bahía Ushuaia | 67 |
| 3.2.1.1. | Biblioteca de productos de amplificación construida mediante el par de cebadores Ac114f/Ac596r | 68 |
| 3.2.1.2. | Amplificación de genes de enzimas RHO utilizando el par de cebadores Nah-for/Ac596r | 71 |
| 3.2.2. | Estimación de la abundancia de genes correspondientes a la variante T de enzimas dioxigenasas | 74 |
| 3.2.2.1. | Diseño de cebadores | 75 |
| 3.2.2.2. | Optimización del ensayo de qPCR | 75 |
| 3.2.2.3. | Estimación de la abundancia de genes correspondientes a la variante T en muestras de sedimento intermareal de Bahía Ushuaia | 80 |
| 3.3. | Discusión | 81 |

| | |
|---|------------|
| 4. CONSTRUCCIÓN Y ANÁLISIS DE UNA BIBLIOTECA METAGENÓMICA A PARTIR DE SEDIMENTOS INTERMAREALES DE BAHÍA USHUAIA | 88 |
| 4.1. Introducción | 88 |
| 4.2. Resultados | 89 |
| 4.2.1. Extracción de ADN metagenómico a partir de sedimentos | 89 |
| 4.2.2. Construcción de la biblioteca metagenómica | 90 |
| 4.2.3. Identificación de clones conteniendo genes de interés | 91 |
| 4.2.3.1. Estrategia molecular | 91 |
| 4.2.3.2. Estrategia funcional | 96 |
| 4.2.4. Purificación y secuenciación completa de los fósmidos identificados | 97 |
| 4.2.4.1. Rendimiento y calidad de de los fósmidos extraídos | 98 |
| 4.2.4.2. Secuenciación | 100 |
| 4.3. Discusión | 100 |
| 5. ANÁLISIS DE LOS FRAGMENTOS IDENTIFICADOS EN LA BIBLIOTECA METAGENÓMICA: ASIGNACIÓN TAXONÓMICA Y ANOTACIÓN FUNCIONAL | 106 |
| 5.1. Introducción | 106 |
| 5.2. Resultados | 107 |
| 5.2.1. Información general sobre los fragmentos clonados | 107 |
| 5.2.1.1. Predicción de genes y anotación funcional | 107 |
| 5.2.1.2. Características de las secuencias codificantes identificadas en los fragmentos clonados | 120 |
| 5.2.1.3. Asignación taxonómica de los fragmentos identificados | 121 |
| 5.2.2. Oxigenasas involucradas en las vías degradativas de hidrocarburos aromáticos . | 128 |
| 5.2.2.1. Oxigenasas hidroxilantes de compuestos aromáticos (RHO) | 128 |
| 5.2.2.2. Extradíol Dioxigenasas | 133 |
| 5.2.3. Reconstrucción de las rutas degradativas de HAPs a partir de la anotación funcional de los fragmentos clonados | 135 |
| 5.2.3.1. Secuencias involucradas en la vía alta de degradación de HAPs | 135 |
| 5.2.3.2. Secuencias involucradas en la vía baja de degradación de HAPs | 136 |
| 5.3. Discusión | 141 |
| 6. DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES | 152 |
| 6.1. Conclusiones | 159 |

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN

1.1. Hidrocarburos en el ambiente marino

Los hidrocarburos se encuentran entre los compuestos más abundantes del Planeta, pudiendo ser encontrados en los seres vivos como producto de las reacciones de biosíntesis, o en la geósfera, como producto de las transformaciones abióticas de materia orgánica en sistemas sedimentarios [Wilkes et al., 2010]. La explotación de hidrocarburos fósiles, fue iniciada con el objetivo de reemplazar fuentes de energía como la eólica, solar e hidráulica durante la revolución industrial. Esto provocó un gran desarrollo social y económico a partir del siglo XIX, tanto que su uso como combustible aumentó 800 veces entre los años 1750 y 2003 [Hall et al., 2003]. Sin embargo, la extracción de hidrocarburos no sólo fue clave para el progreso del Hombre, sino que además tuvo un impacto desfavorable en el medio ambiente.

El ambiente marino ha recibido especial atención como consecuencia del aumento de fugas y derrames durante la extracción, el transporte marítimo, refinado, almacenamiento y uso del petróleo [Adams et al., 2012]. De las toneladas de petróleo que ingresan cada año al medio ambiente marino, se calcula que aproximadamente un 50 % proviene de fuentes antropogénicas y el resto de filtraciones de origen natural [McKenna et al., 2014]. Estas filtraciones emanan naturalmente desde los estratos geológicos y difícilmente pueden ser controladas por el hombre, representando una base de contaminación a lo largo de la columna de agua. Sin embargo, dado que estas filtraciones datan de miles de años, han favorecido la adaptación del ecosistema a estas condiciones. Más aún, algunos organismos han desarrollado mecanismos para utilizar los hidrocarburos y otros compuestos liberados como fuente de carbono y energía [Farrington, 2014b]. En contraste, los derrames de grandes volúmenes de petróleo o hidrocarburos refinados en un tiempo relativamente corto afectan de mayor manera a aquellos sitios donde no es frecuente la exposición a estos compuestos, dado que carecen de organismos adaptados a estos compuestos y por lo tanto carecen de mecanismos naturales que favorezcan su degradación [Farrington, 2014a]. En consecuencia, la contaminación con hidrocarburos resultante de la actividad

humana debería ser minimizada para evitar graves consecuencias en el ecosistema marino.

1.1.1. Contaminación por hidrocarburos en la costa Patagónica

La costa Patagónica, ubicada entre los paralelos 40° y 54° de latitud sur, posee una extensión aproximada de 3000 km. La explotación de petróleo constituye una de las actividades económicas más importantes en esta región. Sin embargo, representa además la principal fuente de contaminación en el mar Patagónico, y por lo tanto un riesgo para otras actividades de interés económico como son la pesca y el turismo [Commendatore y Esteves, 2007]. La costa Patagónica posee zonas con infraestructura para la carga de petróleo crudo, el cual es transportado en buques tanque hacia las refinerías localizadas en la provincia de Buenos Aires [Commendatore y Esteves, 2007]. Una vez refinado, parte del producto obtenido retorna por vía marítima. Estas operaciones de carga, descarga y transporte de petróleo crudo y de productos refinados, también representan un riesgo de contaminación con hidrocarburos en esta zona ya que pueden producirse derrames accidentales o fallas durante maniobras operacionales [Nievas y Esteves, 2007]. A su vez, las corrientes marinas y el efecto de los vientos predominantes pueden favorecer la distribución de estos contaminantes hacia sectores costeros distantes con mayor sensibilidad ambiental [Commendatore et al., 2012].

Si bien los derrames accidentales de hidrocarburos han sido poco frecuentes en Argentina durante las últimas décadas, en dos ocasiones se produjeron importantes derrames de petróleo fuera de zonas portuarias que llegaron a afectar zonas costeras. El primero de ellos, producido en agosto de 1974, liberó al mar 53.500 toneladas de petróleo crudo a causa del accidente ocurrido en el Estrecho de Magallanes con el buque petrolero *Metula*, afectando unos 2.560 km² de superficie [Schwarz, 1978]. Casi veinte años después, se produjo un derrame de petróleo de volumen desconocido en la provincia de Chubut, provocando la muerte de 17.000 pingüinos de Magallanes a lo largo de 750 km de costa [Boersma, 1997]. Afortunadamente, desde hace varios años ha aumentado el reconocimiento sobre la importancia de la biodiversidad marina y la productividad del ambiente costero Patagónico. Es por ello que, a través de diferentes leyes nacionales, Argentina ha ratificado varios convenios internacionales tendientes a la protección del ambiente y a la eliminación y control de la contaminación del mar por hidrocarburos [Nievas y Esteves, 2007]. En 1998, Prefectura Naval Argentina definió nuevas rutas marítimas más alejadas de la costa para los buques tanque. Sin embargo, no siempre se aplican las reglamentaciones referidas al manejo de las terminales petroleras y a la actividad en los puertos. En dos oportunidades diferentes y por causa de fallas operativas, se encontraron zonas afectadas con petróleo en las costas de Caleta Córdova [Commendatore y Esteves, 2007, Commendatore et al., 2012, Lozada et al., 2008, Marcos et al., 2012]. Es por esto que resulta necesario desarrollar programas de monitoreo de la contaminación en áreas impactadas por actividades antropogénicas cercanas a centros

poblacionales y de alta sensibilidad ambiental, como así también desarrollar protocolos de respuesta a eventos de contaminación. Esto resulta de particular interés, dadas las tareas de exploración de petróleo que se están llevando a cabo en el Golfo San Jorge.

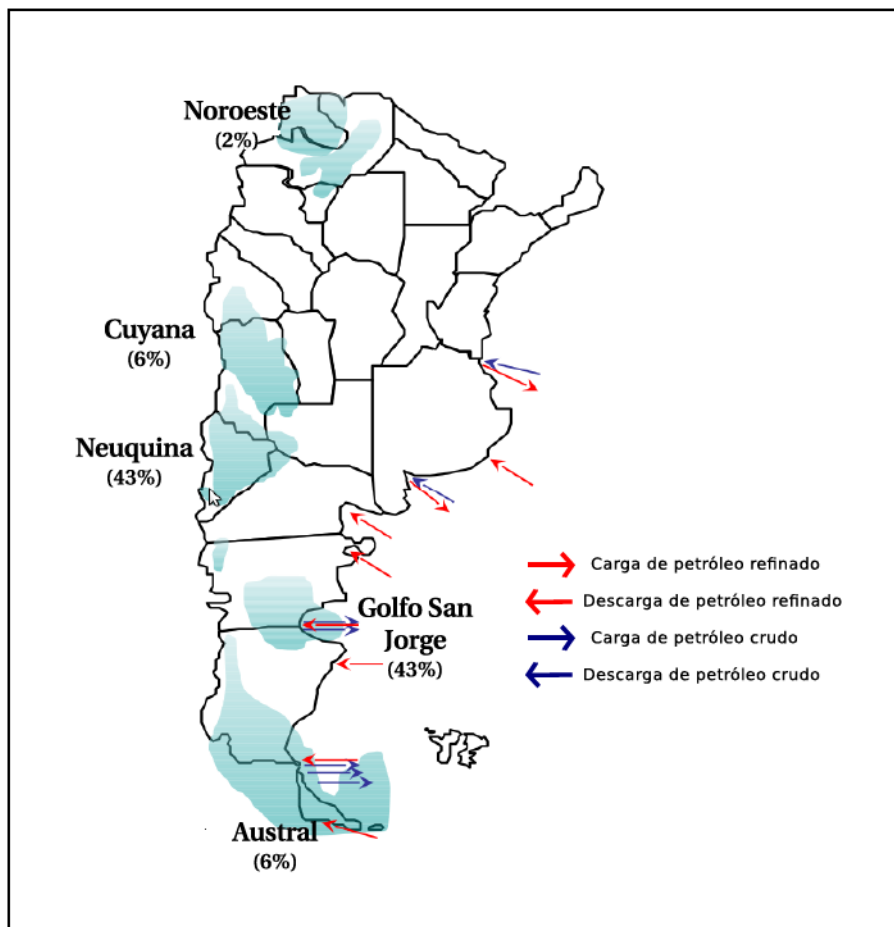


Figura 1.1: Sitios de carga y descarga de petróleo crudo y sus derivados refinados a lo largo de la costa Atlántica. Las zonas en celeste indican las cuencas petrolíferas productivas de Argentina. Los porcentajes corresponden a la cantidad de petróleo producido en cada cuenca. Mapa modificado en base a la información obtenida del Centro de Estudios de la Actividad Regulatoria Energética [CEARE, www.ceare.org].

1.1.2. Composición del petróleo crudo y sus productos derivados

El petróleo crudo es una mezcla extremadamente compleja de compuestos orgánicos, cuya composición varía de acuerdo a la formación geológica donde se originó [U.S. Department of Energy, 2008]. Avances recientes en espectrometría de masa de alta resolución han permitido la identificación de más de 17.000 compuestos químicos diferentes, por lo que el término *petroleómica* ha comenzado a utilizarse para referirse a la completa descripción química del petróleo [Marshall y Rodgers, 2004]. Los compuestos que lo conforman pueden ser clasificados en cuatro grupos definidos: (1) los hidrocarburos saturados (o alcanos), (2) los hidrocarburos aromáticos, (3) las resinas y (4) los asfaltenos [Harayama y Kishira, 1999]. Los hidrocarburos saturados representan entre un 15 y 60 % de la mezcla y pueden estar presentes en forma de cadenas lineales de más de cinco carbonos (parafinas), ramificadas o for-

mando estructuras cíclicas (naftenos). Los compuestos que siguen en abundancia (3 - 30 %) son los hidrocarburos aromáticos, los cuales están formados por uno o más anillos bencénicos, pudiendo poseer sustituyentes alquílicos. En cuanto a las resinas y los asfaltenos, éstos representan una fracción minoritaria del petróleo crudo. Dichos compuestos, a diferencia de los hidrocarburos saturados y aromáticos, son moléculas polares que además de contener átomos de carbono e hidrógeno en su estructura, poseen nitrógeno, oxígeno y/o azufre [Harayama y Kishira, 1999, U.S. Department of Energy, 2008].

El petróleo crudo es procesado en refinerías para obtener productos derivados del petróleo, como por ejemplo gasolina, diesel, FOI (mezcla de fuel oil pesado y diesel, utilizado como combustible para buques) o Bunker C (combustible pesado residual generado luego de la producción de gasolina y diesel). La tabla 1.1 muestra la proporción de los distintos compuestos presentes en estos productos [Fingas et al., 2011]

Tabla 1.1: Composición típica de algunos combustibles derivados del petróleo.

| Compuestos | % de producto | | | |
|------------|---------------|--------|------------------|-----------------------|
| | Gasolina | Diesel | FOI ¹ | Bunker C ² |
| Saturados | 50-60 | 65-95 | 25-35 | 20-30 |
| Aromáticos | 25-40 | 5-25 | 40-60 | 30-50 |
| Resinas | - | 0-2 | 10-15 | 10-20 |
| Asfaltenos | - | - | 5-10 | 5-20 |
| Oleifinas | 5-10 | 0-10 | - | - |

1: Fuel oil intermedio, mezcla de fuel oil pesado con un bajo porcentaje de gasoil.

2: Tipo de fuel oil muy viscoso utilizado como combustible en buques.

1.1.3. Efecto de los hidrocarburos en el ecosistema marino

Los efectos de los hidrocarburos en el ambiente marino dependen principalmente de la naturaleza de los mismos, del grado de contaminación y del tiempo de exposición. Las altas concentraciones de hidrocarburos generan efectos agudos sobre los organismos afectados. Ejemplo de ello son los grandes derrames de petróleo, los cuales pueden provocar una pérdida masiva en la riqueza de poliquetos, moluscos, crustáceos e insectos cuando estos compuestos arriban a zonas costeras [De la Huz et al., 2005]. Además, el petróleo es capaz de adherirse a las plumas de las aves y al pelaje de mamíferos marinos, pudiendo generar la muerte de estos organismos por hipotermia (como consecuencia de la disminución de su hidrofobicidad), o por ingestión accidental de dosis letales.

Por otro lado, la exposición a bajas concentraciones de hidrocarburos generan efectos crónicos que pueden evidenciarse luego de largos períodos de tiempo. Varios estudios han demostrado cambios en la fisiología y en el comportamiento de los organismos impactados [Farrington, 2014a], así como también retraso en el desarrollo, malformaciones y pérdida de la capacidad reproductiva de ciertos individuos [Carls et al., 1999, Heintz, 2007]. Más aún, organismos marinos, tales como almejas, mejillones y salmones, acumulan una fracción de los hidrocarburos del ambiente, dificultando así su eliminación [Levengood y Schaeffer, 2011, Liu et al., 2014, Sundt et al., 2011].

1.1.4. Intemperización los hidrocarburos introducidos en el mar

Una vez que los hidrocarburos son introducidos en el ambiente marino, varios procesos físicos, químicos y biológicos actúan en diferentes escalas. Durante las primeras horas luego de un derrame, los principales procesos de intemperización son la **propagación**, la **evaporación**, la **dispersión**, la **emulsificación** y la **disolución** [International Tanker Owners Pollution Federation, 2014]. La **propagación** de hidrocarburos ocurre por la acción del viento, las olas y las corrientes marinas. La velocidad con la que se propagan estos compuestos depende principalmente de la temperatura y de la viscosidad de mezcla (que a su vez depende de su composición). Las altas temperaturas disminuyen la viscosidad de estos compuestos, y por lo tanto fluyen con mayor rapidez. El proceso de propagación favorece la **evaporación** de la fracción volátil presente en la mezcla, como por ejemplo los hidrocarburos monoaromáticos y los alcanos de bajo peso molecular. La evaporación de estos compuestos se ve incrementada a mayores temperaturas [International Tanker Owners Pollution Federation, 2014]. Por otra parte, turbulencias en la superficie del mar dan lugar a la formación de gotas de diferentes tamaños, generando la **dispersión** de hidrocarburos. Estas gotas de hidrocarburos poseen una alta relación superficie/volumen, permitiendo la acción de otros procesos naturales como la **sedimentación**, la **biodegradación** y, en menor proporción, la **disolución** de la fracción soluble de la mezcla de hidrocarburos [Liu et al., 2012]. Otro proceso que también es causado por turbulencias en el mar y en el que gotas de agua de mar son suspendidas en los hidrocarburos, es la **emulsificación** [Farrington, 2014a].

La **fotooxidación**, la **adsorción** y la **biodegradación** son procesos de intemperización que comienzan luego de unos días de producido un derrame. Estos procesos se extienden durante un largo período de tiempo, incluso años [International Tanker Owners Pollution Federation, 2014]. La acción del oxígeno y la luz solar (**fotooxidación**) puede generar la ruptura química de los compuestos derramados, haciéndolos más solubles. Asimismo, este proceso puede dar lugar a la formación de productos aún más persistentes por causa de la oxidación de los hidrocarburos que poseen alta viscosidad [International Tanker Owners Pollution Federation, 2014]. Por otro lado, aquellos hidrocarburos que

presentan baja polaridad pueden ser **adsorbidos** en diferentes partículas, de acuerdo al tamaño y la composición química de las mismas [Farrington, 2014a]. La sedimentación de estas partículas, si bien elimina parte de los hidrocarburos presentes en el ambiente pelágico, permite la acumulación de estos compuestos en los sedimentos subyacentes. Estos sedimentos constituyen un reservorio de hidrocarburos y, por lo tanto, una fuente secundaria de contaminación [Commendatore et al., 2012]. La **biodegradación**, por otra parte, es mediada por microorganismos que poseen la capacidad de utilizar determinados hidrocarburos como única fuente de carbono y energía. Existen microorganismos marinos que se encuentran especializados en la degradación de diferentes compuestos del petróleo, como por ejemplo los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) [Lyu et al., 2014, Yakimov et al., 2007]. La eficiencia de la biodegradación puede verse afectada por diversos factores, como por ejemplo la temperatura del ambiente, los niveles de nutrientes y el oxígeno disuelto [Kostka et al., 2014].

1.2. La biodegradación de HAPs

Si bien los HAPs introducidos en el medio ambiente marino son sometidos a diferentes procesos de intemperización, el principal proceso que permite remover estos compuestos del ambiente es la biodegradación. Entre los diferentes microorganismos capaces de degradar hidrocarburos se encuentran las levaduras, hongos, algas y bacterias, siendo éstas últimas los principales responsables de la biodegradación en el ambiente marino [Das y Chandran, 2011, Haritash y Kaushik, 2009]. La biodegradación de estos compuestos se produce mayormente en condiciones aeróbicas, sin embargo también puede ocurrir en condiciones aneróbicas, aunque más lentamente [McGenity et al., 2012, Shin et al., 2000]. En el presente trabajo de Tesis Doctoral se han estudiado procesos aeróbicos de biodegradación de HAPs, dado que los mismos predominan en los sedimentos intermareales superficiales con una granulometría dominada por arena y grava, como es el caso de los ambientes costeros de Bahía Ushuaia. No obstante, no es posible descartar que puedan ocurrir procesos anaeróbicos de biodegradación de HAPs en microambientes con baja tensión de oxígeno dentro de la matriz ambiental estudiada.

1.2.1. Por qué es importante la degradación de HAPs?

Los HAPs son compuestos formados por dos o más anillos bencénicos, los cuales se encuentran fusionados en diferentes configuraciones estructurales (Figura 1.2), pudiendo contener sustituyentes alquílicos. Estos compuestos se clasifican en HAPs de bajo peso molecular (de dos a tres anillos aromáticos) o de alto peso molecular (cuatro o más anillos). Los incrementos en el tamaño y en la angularidad de estas moléculas generalmente resultan en un aumento en su estabilidad, viscosidad e hidrofobicidad, propiedades fisicoquímicas que influyen sobre su persistencia en el medio ambiente

[Wilkes et al., 2010]. El aumento en la hidrofobicidad favorece la afinidad de los HAPs hacia entornos no polares, como los lípidos de un organismo o la materia orgánica que rodea una partícula de sedimento. Esto, sumado a la estabilidad de los HAPs a medida que aumenta su peso molecular, hace que dichos compuestos sean menos sensibles a la degradación [Wilkes et al., 2010]. De hecho, la vida media del fenantreno en suelos y sedimentos puede variar de 16 días a 4 meses, mientras que la vida media de benzo[*a*]pireno posee un rango de 7 a 47 meses [Shuttleworth y Cerniglia, 1995]. Por otro lado, algunos HAPs pueden ser perjudiciales para la salud humana, puesto que poseen efectos tóxicos, mutagénicos, teratogénicos y/o carcinogénicos [Zasadowski et al., 2001]. Debido a estas propiedades, la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) y la Agencia Europea de Medio Ambiente consideran a 16 HAPs como contaminantes prioritarios para su remediación [Renner, 1999].

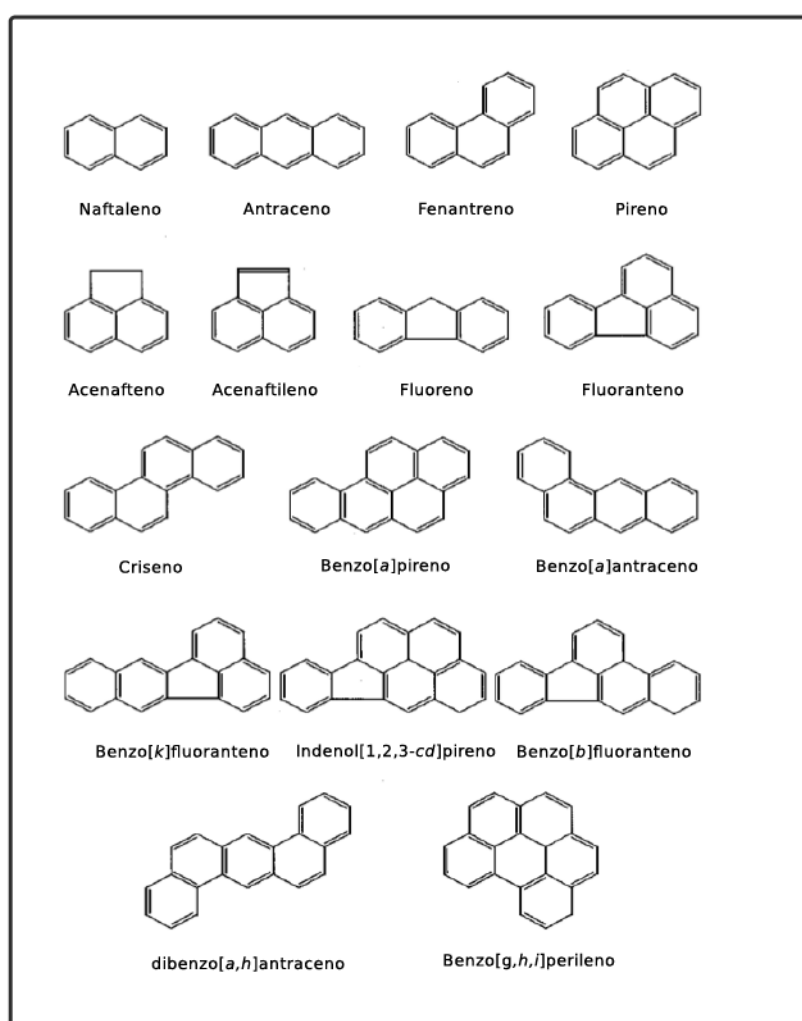


Figura 1.2: Estructura química de los 16 HAPs considerados prioritarios para su remediación (EPA). Figura adaptada de Habe y colaboradores [Habe et al., 2003].

1.2.2. Biodegradación de HAPs en condiciones aeróbicas

En respuesta a la complejidad natural que presentan los distintos HAPs, diversos microorganismos han desarrollado diferentes estrategias para degradar estos compuestos y utilizarlos como fuentes

de carbono y energía. Las rutas metabólicas involucradas en estos procesos generalmente presentan dos etapas clave: la activación del anillo bencénico termodinámicamente estable y su posterior ruptura [Pérez-Pantoja et al., 2010b]. Esto resulta en la formación de compuestos intermediarios (como catecol o ácido protocatéuico), los cuales luego son metabolizados hasta compuestos que pueden ingresar al ciclo de los ácidos tricarbóxicos. Las diferentes etapas de degradación y las enzimas que intervienen en cada reacción se detallan a continuación.

1.2.3. Rutas metabólicas involucradas en la degradación de HAPs de bajo peso molecular

La degradación bacteriana de hidrocarburos aromáticos de bajo peso molecular y sus derivados ha sido ampliamente estudiada y puede llevarse a cabo mediante diferentes rutas metabólicas [Mallick et al., 2011]. Las enzimas involucradas en las mismas pueden diferenciarse en enzimas de la vía alta de degradación y enzimas de la vía baja (Figura 1.3).

1.2.3.1. Vía alta de degradación

La vía alta de degradación de HAPs comprende la oxidación de estos compuestos y su posterior metabolismo para dar lugar a la formación de ácido salicílico y ácido ftálico (Figura 1.3). El primer paso de la ruta degradativa de HAPs es catalizado por enzimas oxigenasas, las cuales son capaces de incorporar uno o dos átomos de oxígeno a uno de los anillos aromáticos de la molécula (RHD1, MO, Figura 1.3). Estas oxigenasas iniciales pueden pertenecer a la superfamilia de las oxigenasas de anillos aromáticos que poseen sitio Rieske [Gibson y Parales, 2000], o a la superfamilia de las monooxigenasas dependientes de flavina [Mallick et al., 2011, van Berkel et al., 2006]. El segundo paso es mediado por enzimas dihidrodiol deshidrogenasas (D1), las cuales catalizan la deshidrogenación de los HAP-dihidrodiol formados previamente. Los dioles así generados (HAP-dioles, intermediarios catecólicos de la vía alta de degradación), luego pueden ser utilizados como sustratos de otra clase de oxigenasas involucradas en la diversificación de estas rutas catabólicas, las oxigenasas de ruptura del anillo aromático (EXDO1 e INDO1). Dependiendo del tipo de clivaje que realizan, estas oxigenasas pueden ser de dos tipos: extradiol dioxigenasas (EXDO), las cuales catalizan el metaclivaje de los anillos aromáticos; o intradiol dioxigenasas (INDO), las cuales producen la ruptura mediante ortoclivaje. A partir de los productos de reacción obtenidos, la acción consecutiva de enzimas hidratasas, aldolasas y deshidrogenasas permite la formación de intermediarios derivados del salicilato o de ftalato.

Durante el metabolismo de los derivados del ftalato, es posible que se produzca la descarboxilación e hidroxilación de los mismos mediante enzimas oxigenasas/hidroxilasas (DO1) para formar

intermediarios de tipo salicilato. A su vez, el anillo aromático de estos últimos intermediarios puede ser sometido a *meta* u *orto*-clivaje mediante enzimas EXDO2 e INDO2, respectivamente, generando otros derivados de salicilatos y ftalatos. Alternativamente, la hidroxilación/descarboxilación de los salicilatos mediante enzimas hidroxilasas, también pertenecientes a la superfamilia de oxigenasas con sitio Rieske (S1H, Figura 1.3), permite generar intermediarios catecólicos (HAP-dioles). Otra vía por la cual se forman HAP-dioles es mediante la descarboxilación de los intermediarios derivados del ftalato (DC1). Esta reacción da lugar a benzoatos, los cuales por acción de enzimas benzoato dioxigenasas (RHD2) y posterior descarboxilación generan HAP-dioles. Posteriormente, los HAP-dioles pueden ser metabolizados hasta otros compuestos del tipo salicilato, mediante enzimas similares a las mencionadas en el párrafo anterior, o ingresar a la vía baja de degradación [Mallick et al., 2011].

1.2.3.2. Vía baja de degradación

La vía baja de degradación de HAPs de bajo peso molecular se inicia con el metabolismo del ácido salicílico y del ácido ftálico generados en la vía alta para dar lugar finalmente a compuestos intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, como por ejemplo piruvato, fumarato y acetil-CoA [Habe et al., 2003]. El ácido ftálico puede ser degradado a través de dos vías diferentes. En una de ellas intervienen enzimas DC1 y RHD2 para generar catecol [Zeinali et al., 2008]. La otra vía consiste en la hidroxilación del ácido ftálico mediante enzimas dioxigenasas de anillos aromáticos (RHD3, Figura 1.3) y posterior descarboxilación a través de enzimas dihidroxiftalato descarboxilasas (DC2) para generar ácido protocatéquico. El producto de reacción obtenido por *orto*- o *meta*-clivaje del ácido protocatéquico mediante enzimas EXDO3 e INDO3, es posteriormente metabolizado para dar lugar a compuestos intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos.

El ácido salicílico puede ser degradado hasta piruvato y acetil-CoA o hasta piruvato y fumarato dependiendo de la vía degradativa utilizada. Por un lado, la actividad de enzimas salicilato 1-hidroxilasas (SH1) sobre el ácido salicílico permite la formación de catecol, cuyo anillo aromático puede ser clivado posteriormente por enzimas catecol 2,3-dioxigenasas (EXDO4) y catecol 1,2-dioxigenasas (INDO4, Figura 1.3). Los compuestos generados de esta manera son luego transformados hasta piruvato y acetil-CoA mediante diferentes reacciones. Por otro lado, a partir del ácido salicílico, las bacterias también pueden producir gentisato, reacción catalizada por enzimas salicilato 5-hidroxilasas (S5H). La acción de enzimas gentisato 1,2-dioxigenasas (EXDO5) permite la ruptura del anillo aromático del gentisato para formar productos de reacción que finalmente son metabolizados por actividad de enzimas isomerasas e hidrolasas, dando lugar a la formación de piruvato y fumarato [Habe et al., 2003, Mallick et al., 2011].

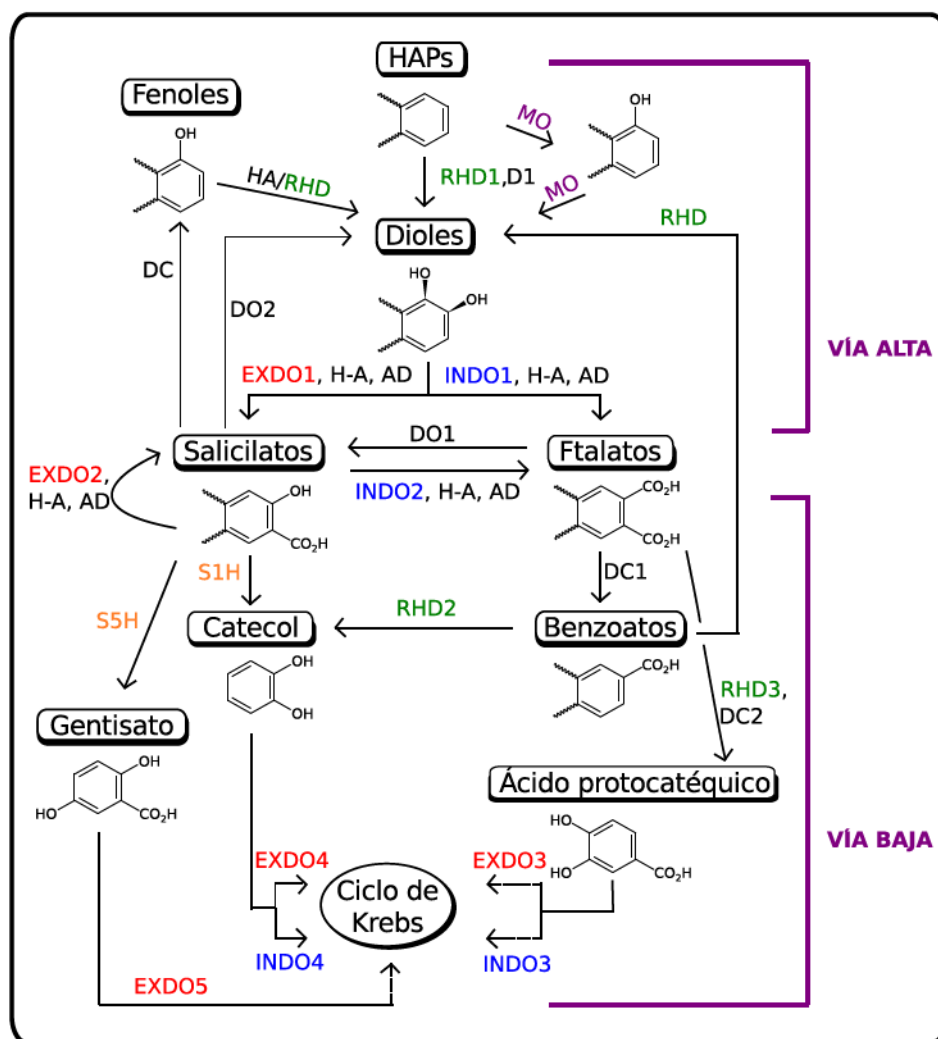


Figura 1.3: Esquema de las diversas rutas metabólicas bacterianas involucradas en la degradación de HAPs de bajo peso molecular en bacterias. En color se muestran las enzimas responsables de la diversificación de dichas rutas: verde, dioxigenasas de anillos aromáticos (RHD); en violeta, monooxigenasas (MO); rojo, extradiol dioxigenasas (EXDO); azul, intradiol dioxigenasas (INDO); naranja, salicilato hidroxilasas (S1H y S5H). Otras enzimas involucradas en la degradación, tales como deshidrogenasas (D), hidratasa-aldolasas (H-A), aldehído deshidrogenasas (AD), descarboxilasas (DO, DC) e hidroxilasas (HA) se muestran en negro. Figura modificada de Mallick y colaboradores [Mallick et al., 2011]

1.2.4. Biodegradación de HAPs de alto peso molecular

Durante los últimos diez años, las investigaciones realizadas en diferentes géneros bacterianos capaces de degradar pireno y fluoranteno han avanzado notoriamente. Entre ellos, *Mycobacterium vabaalenii* PYR-1 se ha convertido en el microorganismo modelo debido a los diversos estudios realizados sobre su capacidad degradativa [Kanaly y Harayama, 2010]. En *M. vabaalenii* PYR-1, la vía de degradación de pireno comienza con la monooxidación o dioxigenación de dicho compuesto. La ruta degradativa predominante ocurre vía oxigenación en los carbonos 4 y 5 del pireno, reacción que es catalizada por enzimas oxigenasas con sitio Rieske, produciendo el respectivo *cis*-dihidrodiol (*cis*-4,5-dihidroxy-4,5-dihidropireno). Las reacciones siguientes que permiten el metabolismo del *cis*-dihidrodiol

hasta intermediarios del salicilato son similares a las reacciones de la vía alta de degradación de HAPs de bajo peso molecular, dado que también son catalizadas por enzimas deshidrogenasas, enzimas dioxigenasas involucradas en la ruptura del anillo aromático, hidratasas, aldolasas y aldehído deshidrogenasas. Posteriormente, catalizado por enzimas intradiol dioxigenasas, se produce el clivaje del 1-hidroxi-2-naftoato generado en este último paso para dar lugar a *o*-ftalato (Figura 1.4), el cual es metabolizado por enzimas de la vía baja de degradación [Kim et al., 2007].

Hasta el momento, sólo el ácido ftálico ha sido identificado como intermediario en la vía baja de degradación de HAPs de alto peso molecular. A diferencia de la vía baja de la degradación de HAPs de bajo peso molecular, este compuesto parece ser sustrato de enzimas ftalato 3,4-dioxigenasas únicamente [Kanaly y Harayama, 2010, Kim et al., 2007, Kweon et al., 2007]. El producto de reacción obtenido, luego puede ser metabolizado por enzimas deshidrogenasas y descarboxilasas para generar ácido protocatéquico, el cual es degradado en la vía de ácido β cetoadípico. Finalmente, se generan succinil-CoA y acetil-CoA, los cuales pueden ingresar en el ciclo de los ácidos tricarbónicos (Figura 1.4).

Microorganismos de diversos géneros bacterianos tales como *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Cycloclasticus*, *Burkholderia*, *Bacillus* y *Strenotrophomonas* son capaces de degradar HAPs de alto peso molecular. Sin embargo, poco se conoce sobre las rutas degradativas que permiten la degradación completa de estos compuestos [Kanaly y Harayama, 2010]. Es posible que la degradación de pireno en microorganismos diferentes al género *Mycobacterium* sea llevada a cabo mediante otras vías degradativas [Wang et al., 2008]. Wang y colaboradores proponen que la degradación de pireno en *Cycloclasticus* sp. P1 comienza con la oxidación de este compuesto para dar pireno-4,5-dihidrodiol mediante una enzima oxigenasa con sitio Rieske, al igual que ocurre en *Mycobacterium*. No obstante, los autores estimaron que el dihidrodiol es luego transformado a ciclopenta(d, e, f)fenantrenona, a través de un mecanismo desconocido, para luego formar una lactona cuya ruptura de anillo da lugar a 4-fenantrenol. Este compuesto, entraría posteriormente en la ruta de degradación del fenantreno vía 3,4-dihidroxifenantreno. Los siguientes pasos de la vía degradativa involucrarían la ruptura de catecol mediante metaclivaje.

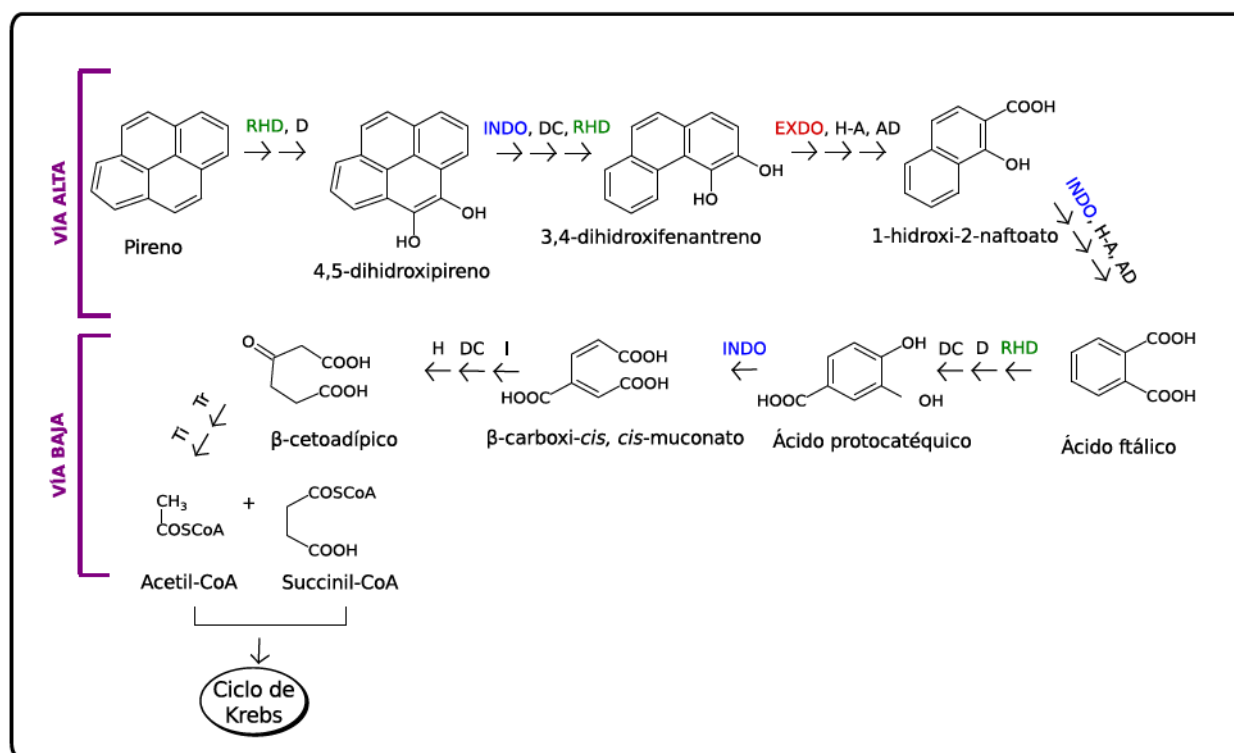


Figura 1.4: Degradación de pireno por *M. vanbaalenii* PYR-1. En color se muestran las enzimas responsables de la diversificación de dichas rutas: verde, dioxigenasas de anillos aromáticos (RHD); rojo, extradiol dioxigenasas (EXDO); azul, intradiol dioxigenasas (INDO). Otras enzimas involucradas en la degradación, tales como deshidrogenasas (D), hidratasa-aldolasas (H-A), aldehído deshidrogenasas (AD), descarboxilasas (DC) e hidroxilasas (HA), isomerasas (I), hidrolasa (H), Succinil-CoA transferasa (Tr) y -cetoadipil-CoA tiolasa (Ti) se muestran en negro. Figura modificada de Kim y colaboradores [Kim et al., 2007]

1.2.5. Enzimas RHOs

Las oxigenasas bacterianas que participan en las rutas degradativas de HAPs pertenecen a una gran familia de enzimas con capacidad de hidroxilar anillos aromáticos. Estas enzimas, que en conjunto se denominan enzimas hidroxilantes de compuestos aromáticos (o RHO, del inglés ring-hydroxylating oxygenases) poseen un rol importante en la mineralización de estos compuestos, debido a que dirigen las principales rutas degradativas [Chakraborty et al., 2012]. Las enzimas RHO son complejos multicomponentes constituidos por una oxigenasa terminal y un sistema transportador de electrones compuesto por una reductasa y una ferredoxina, aunque esta última puede no estar presente (Figura 1.5). Estas dos últimas proteínas transfieren electrones desde NAD(P)H hacia el dominio catalítico de la oxigenasa terminal. Las oxigenasas terminales son heteromultímeros formados por dos subunidades: una subunidad mayor (alfa) y una menor (beta), aunque ciertas dioxigenasas, como la enzima ftalato 4,5-dioxigenasa, contienen sólo subunidades alfa en forma homomultimérica. A su vez, la subunidad alfa posee dos dominios: un dominio Rieske ubicado en el extremo N-terminal de la proteína y un dominio catalítico C-terminal que contiene el sitio activo [Capyk y Eltis, 2012]. El dominio Rieske está formado por un centro redox [2Fe-2S] coordinado por dos cisteínas y dos histidinas. Asimismo, a

partir del centro 2Fe-2S, este dominio recibe electrones del sistema transportador de electrones para transferirlos luego al sitio activo [Haddock, 2010]. El dominio catalítico C-terminal, posee un sitio de unión al sustrato y un sitio conservado de unión a Fe^{+2} mononuclear, el cual se cree que es el sitio de activación del oxígeno [Chakraborty et al., 2012].

La evolución de las enzimas RHO ha expandido ampliamente su rango de sustratos, entre los cuales se encuentran bifenilos policlorados, HAPs, benzoatos y ftalatos. A continuación se describen los diferentes sistemas utilizados para la clasificación de estas enzimas. Los sistemas más recientes intentan reflejar las relaciones que existen entre las mismas, teniendo en cuenta su estructura, secuencia, función y evolución [Chakraborty et al., 2012].

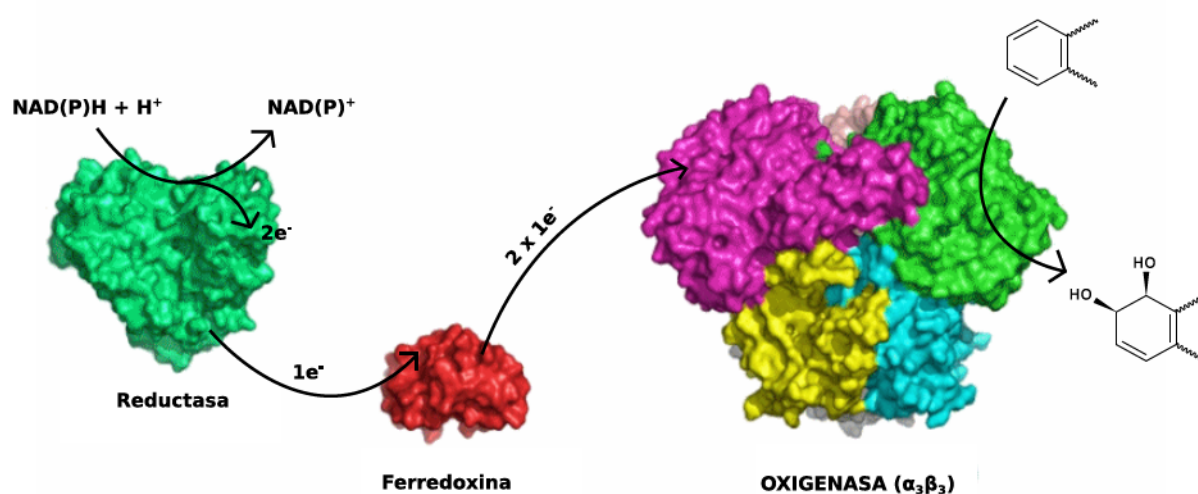


Figura 1.5: Sistema enzimático multicomponente de enzimas RHO.

1.2.5.1. Clasificación de las enzimas RHO

En el año 1991, Batie y colaboradores fueron los primeros en proponer una clasificación de esta familia de oxigenasas [Batie et al., 1991]. En ella, las enzimas se agrupaban de acuerdo a las propiedades de las proteínas transportadoras de electrones [Jiang y Parales, 1996]. Posteriormente, Werlen y colaboradores identificaron cuatro familias de oxigenasas (naftaleno, tolueno/benceno, bifenil y benzoato/toluato dioxigenasas). Las mismas se definieron en base a la especificidad de sustrato, a la organización génica de sus componentes y a la similitud de secuencias de aminoácidos de las subunidades alfa de las oxigenasas [Werlen et al., 1996].

La identificación y la caracterización de enzimas RHO que no pertenecían a ningún grupo según las clasificaciones previas hizo necesario el desarrollo de nuevos sistemas de clasificación. Por ejemplo, en la clasificación propuesta por Nam y colaboradores [Nam et al., 2001], dichas enzimas se agrupaban en cuatro grupos (I a IV) con un criterio similar al propuesto por Werlen y colaboradores pero esta-

bleciendo grupos de enzimas más inclusivos que reflejaban mejor las relaciones filogenéticas [Werlen et al., 1996]. Por otro lado, en la clasificación propuesta por Kweon y colaboradores [Kweon et al., 2008] se consideró cada componente de estas oxigenasas (oxigenasa terminal y proteínas transportadoras de electrones), teniendo en cuenta clasificaciones anteriores [Batie et al., 1991, Nam et al., 2001]. La misma permitió identificar cinco tipos de dioxigenasas diferentes, y su principal ventaja es que posibilita la clasificación de oxigenasas aún sin contar con la información completa de los distintos componentes de las mismas.

La clasificación más reciente, la cual fue utilizada para el análisis de las secuencias de oxigenasas identificadas en este trabajo, es aquella propuesta por Chakraborty y colaboradores. En este sistema de clasificación, se proponen cuatro clases diferentes de oxigenasas (A a D) en base a aspectos evolutivos y funcionales relacionados con la configuración estructural del sustrato y sus sitios de oxigenación. Por otra parte, las RHOs, se clasifican en diferentes tipos de enzimas, de acuerdo a la combinación de los componentes de la cadena transportadora de electrones asociada a la oxigenasa. De esta manera, se amplía la clasificación previa de Kweon y colaboradores. Por otro lado, el descubrimiento de enzimas RHO pertenecientes a microorganismos no cultivables podría dar lugar a la identificación de otros tipos de enzimas aún no descritos, dado que en la clasificación propuesta por Chakraborty y colaboradores sólo se emplearon secuencias de enzimas oxigenasas de bacterias aisladas [Chakraborty et al., 2012].

1.2.6. Enzimas involucradas en la ruptura del anillo aromático

Como se vió en la sección 1.2.3, las rutas involucradas en la degradación de HAPs descritas hasta el momento generalmente convergen en la formación de intermediarios centrales derivados del catecol. Las enzimas intradiol y extradiol dioxigenasas catalizan la ruptura del anillo aromático de estos intermediarios y, al igual que las enzimas RHO, cumplen un rol clave en el metabolismo de HAPs. Estas enzimas evitan la acumulación de compuestos catecólicos, los cuales poseen un efecto letal en bacterias [Pérez-Pantoja et al., 2003]. A diferencia de las enzimas intradiol dioxigenasas (INDO), las enzimas extradiol dioxigenasas (EXDO) son más versátiles y permiten degradar una amplia variedad de sustratos. El análisis de las secuencias y de la estructura de las enzimas INDO indican que las mismas pertenecen a un único linaje evolutivo. En contraste, las enzimas EXDO han evolucionado de manera tal que es posible clasificarlas en diferentes familias o tipos [Pérez-Pantoja et al., 2010b, Vaillancourt et al., 2006].

1.2.6.1. Clasificación de enzimas EXDO

La clasificación de EXDO definida por Eltis y colaboradores se basó tanto en análisis filogenéticos como estructurales, lo cual permitió distinguir dos tipos principales de enzimas: tipo I y tipo II [Eltis y Bolin, 1996]. Las EXDO de tipo I constituyen una superfamilia muy diversa, con secuencias altamente divergentes entre las cuales se definieron diferentes familias (I.1 a I.5) y subfamilias. Por ejemplo, en la familia I.1 se incluyeron enzimas de dominio único, mientras que las familias I.2 y I.3 se encontraron enzimas con dos dominios y con preferencia por sustratos monocíclicos (I.2) y bicíclicos (I.3). Las familias restantes, sólo tenían un representante, por lo que se consideraron provisionarias. Por otro lado, aquellas secuencias que no pudieron ser alineadas con las secuencias de aminoácidos de las enzimas EXDO de tipo I se denominaron EXDO tipo II. Entre ellas se encontraban las enzimas protocatéquico 4,5 dioxigenasa y catecol 2,3 dioxigenasa I de *Alcaligenes eutrophus* JMP222 [Eltis y Bolin, 1996].

En la actualidad, se reconocen tres familias de enzimas EXDO, de tipo I, II y III [Pérez-Pantoja et al., 2010b, Vaillancourt et al., 2006], si bien no existe una clasificación formal que incluya a la totalidad de las enzimas EXDO descubiertas hasta el momento (H. Pieper, comunicación personal). Estas enzimas poseen en común un sitio activo que presenta dos histidinas y un glutamato, así como también al hierro como ligando. Las enzimas EXDO I pertenecen a la superfamilia de proteínas quelantes de oxígenos vecinales [Gerlt y Babbitt, 2001] e incluyen a las EXDO de tipo I definidas por Eltis y colaboradores [Eltis y Bolin, 1996]. Las enzimas de este tipo que poseen un único dominio presentan una conformación homodimérica, mientras que las enzimas que presentan dos dominios, forman homomultímeros. Uno de sus sitios conservados se encuentra la región comprendida entre los aminoácidos 239 a 260 correspondientes a la proteína BphC de *Pseudomonas cepacia* LB400: [GNTIV]_{x(1)}-H-x(5,7)-[LIVMF]-Y_{x(2)}-[DENTA]-P-x-[GP]_{x(3,4)}E, característica de esta superfamilia, donde x(n) indica el número de residuos de aminoácidos de cualquier tipo y entre corchetes los aminoácidos encontrados en una posición definida [Eltis y Bolin, 1996, Pérez-Pantoja et al., 2010b, Vaillancourt et al., 2006]. Por otro lado, el análisis filogenético de dichas enzimas mostró que las mismas se agrupan de acuerdo a la especificidad de sustrato [Pérez-Pantoja et al., 2010b]. Ejemplo de las EXDO I son las enzimas catecol 2,3 dioxigenasas, aunque algunas de ellas pueden pertenecer también a la familia EXDO II [Pérez-Pantoja et al., 2010b, Vaillancourt et al., 2006].

Las enzimas EXDO II, forman parte de la superfamilia Lig B, la cual incluye enzimas con una o dos subunidades [Pérez-Pantoja et al., 2010b, Sugimoto et al., 1999, Vaillancourt et al., 2006]. Entre ellas también se encuentran las enzimas protocatéquico 4,5-dioxigenasas. Finalmente, las EXDO III pertenecen a la superfamilia de las cupinas [Dunwell et al., 2004], e incluyen enzimas tales como gentisato 1,2-dioxigenasa, homogentisato 1,2-dioxigenasa y 3-hidroxiantranilato 3,4-dioxigenasa, involucradas en la degradación de salicilato, fenilalanina y triptofano respectivamente. Las proteínas de

esta superfamilia poseen sólo una subunidad en forma de tetrámeros o hexámeros [Vaillancourt et al., 2006].

1.2.7. Genes involucrados en el catabolismo de HAPs

Los genes codificantes para las enzimas mencionadas en las secciones 1.2.3 y 1.2.4 han sido identificados en un amplio rango de bacterias gram negativas y en algunas bacterias gram positivas. En bacterias del género *Pseudomonas*, estos genes han sido muy estudiados y se encuentran distribuidos en dos operones (Figura 1.6). En uno de ellos se localizan los genes que codifican para las enzimas de la vía alta involucradas en la degradación de naftaleno, fenantreno o antraceno hasta ácido salicílico. En cambio, el otro operón posee genes codificantes para las enzimas de la vía baja, las cuales permiten metabolizar el ácido salicílico hasta intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Generalmente, en distintas cepas pertenecientes al género *Pseudomonas* que presentan la capacidad de degradar HAPs, estos genes se encuentran organizados de manera similar y comparten un 90 % de identidad a nivel de nucleótidos [Peng et al., 2008]. Debido a esto se los denomina frecuentemente genes "arquetípicos" de *Pseudomonas* [Habe et al., 2003]. El primer gen presente en el operón de la vía baja de degradación es aquel codificante para una ferredoxina reductasa (*nahAa*). Al mismo le siguen en orden los genes *nahAb* (codificante para una ferredoxina), *nahAc* (subunidad alfa del componente catalítico de la dioxigenasa inicial, RHD1 de la figura 1.3), *nahAd* (subunidad beta del componente catalítico de la dioxigenasa inicial), *nahB* (dihidrodiol deshidrogenasa, D en la figura 1.3), *nahF* (salicilaldehído deshidrogenasa, AD), *nahC* (dihidroxi-HAP-dioxigenasa, EXDO1), *nahQ* (gen desconocido), *nahE* (hidratasa-aldolasa, H-A en la figura 1.3) y *nahD* (carboxilato isomerasa) [Habe et al., 2003]. Por otro lado, la vía baja de degradación consiste en once genes con la siguiente organización: *nahGTHINLOMKJY*. Estos genes codifican para las enzimas salicilato hidroxilasa, ferredoxina, catecol 2,3 dioxigenasa, hidroximucónico semialdehído deshidrogenasa, hidroximucónico semialdehído hidrolasa, 2-oxo-pent-4-enoato hidratasa, acetaldehído deshidrogenasa, 4-hidroxi-2-oxovalerato aldolasa, 4-oxalocrotonato descarboxilasa y 4-oxalocrotonato tauomerasa, respectivamente [Grimm y Harwood, 1999, Peng et al., 2008]. Particularmente, el gen *nahY* codifica para una proteína de membrana involucrada en la quimiotaxis durante la degradación naftaleno [Grimm y Harwood, 1999].

Si bien cepas pertenecientes a otros géneros bacterianos poseen fenotipos similares respecto de la degradación de HAPs, la organización de sus genes puede ser muy diferente a la de los genes *nah* de *Pseudomonas*. Estas cepas pertenecen a los géneros *Sphingomonas*, *Cycloclasticus*, *Mycobacterium*, *Burkholderia* y *Comamonas*, entre otros. Particularmente, en varias cepas pertenecientes al orden Sphingomonadales, estos genes se encuentran altamente conservados y distribuidos a lo largo del genoma en operones diferentes [Pinyakong et al., 2003]. Ejemplo de ello son los genes contenidos en el

plásmido pNL1 de *Novosphingobium aromaticivorans* DSM 12444 [Romine y Stillwell, 1999], en el cual los genes codificantes para seis enzimas dioxigenasas (*bphA1*[a-f] y *bphA2*[a-f]) se encuentran dispersos a lo largo de sus 184 kb (Figura 1.6). Lo mismo ocurre con los genes codificantes para el resto de las enzimas involucradas en la vía alta de la degradación de HAPs (*bphB-F* y *nahD-F*). Sin embargo, en el plásmido pNL1, la totalidad de los genes involucrados en la ruta baja de degradación por metaclivaje, se encuentran agrupados en un único operón (*xylFEGJQKIHT*). Estos genes, junto con los genes de la vía alta, otorgan la capacidad de degradar naftaleno, fenantreno, antraceno y bifenilos hasta compuestos intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbóxicos [Habe et al., 2003, Pinyakong et al., 2003]. Los genes *phn* pertenecientes a la cepa *Cycloclasticus* sp. A5, también presentan una organización similar a la encontrada en *Novosphingobium aromaticivorans* DSM 12444 y otras bacterias pertenecientes al orden Sphingomonas [Yakimov et al., 2007]. Dichos genes fueron identificados en un fragmento genómico de 10,5 kb y se encuentran en diferentes unidades transcripcionales. En una de ellas, los genes *phnA1*, *phnA2* y *phnC* codifican para las dos subunidades correspondientes de la dioxigenasa inicial y para una enzima extradiol dioxigenasa, respectivamente. Mientras que, separados por 2,8 kb, se identificaron los genes *phnA3*, *phnA4* y *phnD* codificantes para una ferredoxina, una ferredoxin reductasa y una hidroxicromeno-2-carboxilato isomerasa, respectivamente [Kasai y Shindo, 2003].

Hasta el momento, los genes involucrados en el catabolismo de HAPs de alto peso molecular (específicamente pireno) se estudiaron en detalle sólo en *M. vanbaalenii* PYR-1 [Kim et al., 2008, 2007]. Los 27 genes codificantes para la totalidad de las enzimas degradadoras de pireno se encuentran distribuidos en cuatro regiones del genoma de esta bacteria. Una de ellas, a excepción de los genes codificantes para las enzimas dihidrodiol deshidrogenasas, descarboxilasas y carboxibenzaldehído deshidrogenasa, posee los genes necesarios para metabolizar pireno hasta ácido ftálico. El resto de los genes que permiten la degradación completa de dicho compuesto se encuentran dispersos en las otras tres regiones.

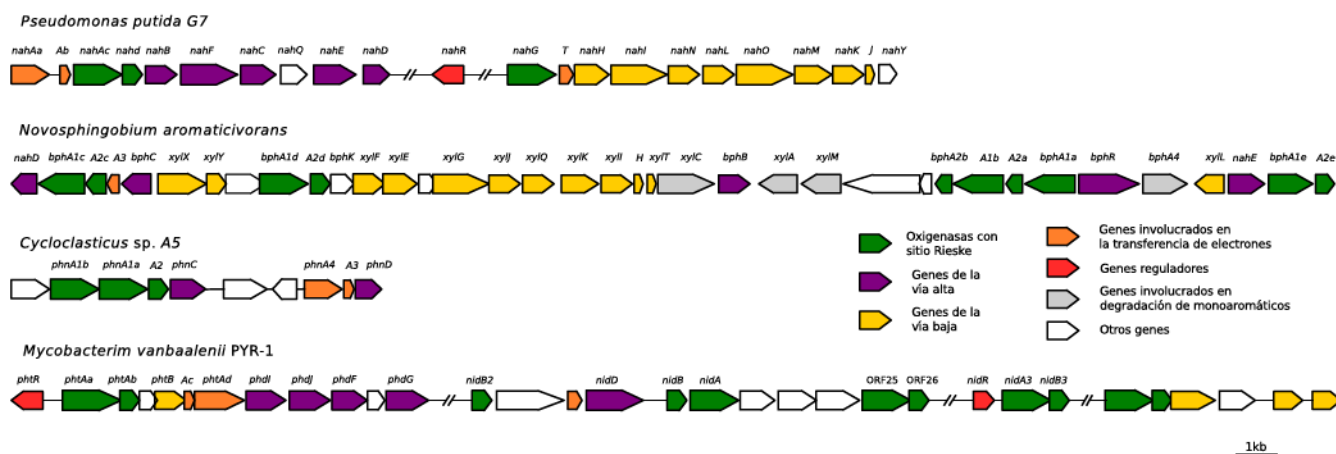


Figura 1.6: Organización de los genes involucrados en la degradación HAPs. Se muestran las regiones genómicas de diferentes cepas bacterianas capaces de degradar estos compuestos. Las flechas representan los genes y el sentido de su transcripción. Arriba de las flechas y en *itálica* se indica el nombre de los genes correspondientes. Las líneas paralelas indican que los genes se encuentran alejados, [Kim et al., 2007, Peng et al., 2008, Pinyakong et al., 2003, Yakimov et al., 2007]

1.2.8. La biodegradación de hidrocarburos en el ambiente marino

Diversos géneros bacterianos aislados a partir del medio ambiente marino poseen la capacidad de degradar hidrocarburos. Entre ellos se encuentra un grupo de bacterias altamente especializadas en la utilización de estos compuestos, denominado *bacterias marinas hidrocarbonoclasticas obligadas* [McGenity et al., 2012, Yakimov et al., 2007]. Bacterias aisladas de sedimentos marinos como por ejemplo *Cycloclasticus* sp. P1 y *Novosphingobium pentaromaticivorans* US6-1 poseen la capacidad de utilizar HAPs como única fuente de carbono y energía [Lai et al., 2012, Luo et al., 2012]. En cambio, *Alcanivorax borkumensis*, *Thalassolituus oleivorans*, *Oleiphilus messinensis*, *Oleispira antarctica* y algunas especies del género *Marinobacter* únicamente emplean alcanos como fuente de carbono y energía [Cappello et al., 2010, Duran, 2010, Yakimov et al., 2010, 1998]. A pesar de que no es sencillo mantener la actividad metabólica de estos microorganismos durante largo tiempo en cultivos puros, algunos estudios demostraron que poseen mecanismos de adaptación específicos. Tanto en *Cycloclasticus* como en *Alcanivorax* se encontraron diferentes sistemas de transporte para la captura de nutrientes y oligoelementos, componentes que en el ambiente marino se encuentran en baja proporción [Yakimov et al., 2007]. Además, poseen múltiples copias de genes codificantes para enzimas oxigenasas involucradas en el primer paso de la degradación de hidrocarburos poliaromáticos y alifáticos, respectivamente. Esta característica podría estar relacionada con su capacidad de degradar un amplio rango de sustratos [McGenity et al., 2012, Yakimov et al., 2007].

Si bien las bacterias hidrocarbonoclasticas obligadas normalmente se encuentran en bajas abundancias en el ambiente marino, algunos géneros bacterianos específicos aumentan en abundancia ante

la presencia de hidrocarburos, como es el caso de *Alcanivorax* [Kostka et al., 2011, Vila et al., 2010] y *Cycloclasticus* [Niepceon et al., 2010, Teira et al., 2007]. Sin embargo, la respuesta microbiana no es uniforme, sino que depende de varios factores tales como la composición de hidrocarburos, las condiciones ambientales, la temperatura y la concentración de nutrientes. Más aún, en ambientes fríos se vió que la bacteria psicrófila *O. antarctica* es dominante en la comunidad degradadora en lugar de *Alcanivorax* [Coulon et al., 2007]. Algo similar ocurre con el género *Thalassolituus* en ambientes templados [McKew et al., 2007]. Por otro lado, las bacterias generalistas también pueden tener un rol importante durante la biodegradación de hidrocarburos. Estas últimas no sólo poseen la capacidad de utilizar hidrocarburos, sino también otras fuentes de carbono y energía. Entre las mismas se encuentran algunas cepas bacterianas pertenecientes a los géneros *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Roseobacter*, *Marinobacter*, *Neptunomonas*, *Spingomonas* y *Mycobacterium*. Si bien otros microorganismos presentes en el ambiente marino no participan directamente de la degradación de hidrocarburos, pueden favorecer dicho proceso proporcionando el oxígeno necesario (*Cyanobacterias*) o incrementando la biodisponibilidad de estos compuestos mediante la producción de biosurfactantes [Berthe-Corti et al., 2010, Maneerat y Phetrong, 2007].

1.3. Estudio de comunidades microbianas: Métodos independientes del cultivo

La observación de discrepancias entre el número de microorganismos determinado mediante el recuento en placa y por microscopía fue indicador de que los microorganismos cultivables no representan la totalidad de la diversidad microbiana [Staley y Konopka, 1985]. Particularmente, la diferencia en ambientes acuáticos puede ser entre cuatro y seis órdenes de magnitud, mientras que en suelo sólo es posible recuperar entre un 0,1 a 1 % de los microorganismos de la comunidad en un medio de cultivo estándar [Torsvik y Øvreås, 2002]. Esto se debe, en parte, a que las condiciones de cultivo difieren de las características de su entorno natural. Sin embargo, en la actualidad no se considera que existan microorganismos incultivables, sino aún no cultivables. Avances en las estrategias de cultivo han permitido recuperar una mayor proporción de la diversidad microbiana natural. Tal es el caso de cepas pertenecientes al género *Pelagibacter*, el cual representa más de un tercio de las células procariotas presentes en los ambientes pelágicos superficiales de los océanos [Handelsman, 2004]. Inicialmente, este género había sido identificado a partir del estudio del gen que codifica para el ARN ribosomal 16S (ARNr 16S). Sin embargo, no fue hasta el año 2004 que se lograron obtener cultivos puros de diferentes miembros de este género [Cho y Giovannoni, 2004].

Durante los últimos treinta años, el desarrollo de herramientas moleculares independientes del

cultivo de microorganismos ha permitido incrementar nuestro conocimiento sobre la diversidad microbiana presente en nuestro Planeta. Dentro de estas herramientas pueden distinguirse dos tipos de estrategias, la amplificación y análisis de un gen o familia de genes (los cuales son llamados genes biomarcadores), y el estudio de la totalidad de los genes presentes en una comunidad microbiana, estrategia denominada metagenómica [Edwards et al., 2006, Muangchinda et al., 2014, Pilloni et al., 2012, Suenaga et al., 2009]. Ambas estrategias permiten estimar la función, el potencial metabólico y la diversidad de los microorganismos a partir del ADN purificado de una muestra ambiental. Sin embargo, se diferencian con respecto a la información que pueden aportar: las primeras sólo proveen información de aquellos genes que pueden ser amplificados, mientras que las segundas son más abarcativas [Riesenfeld et al., 2004]. En los estudios basados en la amplificación de fragmentos de genes puede distinguirse el análisis de genes biomarcadores filogenéticos y funcionales. Los marcadores filogenéticos son empleados frecuentemente para estudiar la estructura y diversidad de los microorganismos presentes en una muestra ambiental, dado que permiten obtener información sobre su identidad. Ejemplo de ello son los genes codificantes para ARNr 16S, siendo el marcador filogenético más utilizado [Abed, 2009]. Los genes marcadores funcionales corresponden a genes codificantes para proteínas, y por lo tanto aportan información sobre las capacidades metabólicas y funcionales de la comunidad microbiana. Asimismo, pueden ser utilizados para estudiar la presencia o diversidad de enzimas claves para los procesos metabólicos de interés, estimar su abundancia o evaluar su expresión [Junca et al., 2010, Kazy et al., 2010]. A continuación se describen algunas de las técnicas independientes del cultivo utilizadas en la presente tesis doctoral por su potencial, aunque es importante destacar que las mismas no reemplazan los métodos microbiológicos clásicos. Sino todo lo contrario, ambas estrategias se complementan entre sí [Abed, 2009].

1.3.1. Bibliotecas de productos de amplificación

La construcción de este tipo de bibliotecas comienza con la extracción de ADN a partir de una muestra ambiental y posterior amplificación de fragmentos de genes biomarcadores (filogenéticos o funcionales) presentes en la comunidad bacteriana mediante reacciones de PCR (Figura 1.7). Debido a que estos genes son amplificados a partir del ADN de diversos microorganismos se trata de reacciones multitemplado, las cuales posibilitan la obtención de amplicones correspondientes a diferentes variantes de un mismo gen. Para poder estudiarlos individualmente, cada producto de amplificación se liga a un vector de clonado, que luego es introducido en una célula hospedadora. Luego, cada amplicón se analiza individualmente, por ejemplo por medio de su secuenciación y comparación de las secuencias obtenidas con las bases de datos. Las bibliotecas de amplificación son utilizadas frecuentemente para estudiar la diversidad de los genes de interés presentes en una comunidad microbiana [Lozada et al., 2008, Marcos et al., 2009]. Además, la obtención de secuencias individuales posibilita el diseño de

sondas o cebadores para la posterior detección de genes específicos [Abed, 2009, van Elsas y Boersma, 2011].

Se ha reportado que esta metodología puede sufrir una serie de desvíos y artefactos [Sipos et al., 2010]. Durante la etapa de amplificación, estos problemas metodológicos pueden provocar cambios en las abundancias relativas de las distintas variantes del gen biomarcador con respecto a la comunidad estudiada. Por ejemplo, es posible que aquellos templados con mayor contenido GC se desnaturalicen menos eficientemente, disminuyendo así su abundancia relativa original [Reysenbach y Giver, 1992]. Por otra parte, los amplicones generados a partir de los genes más abundantes poseen mayor probabilidad de rehibridarse entre sí, quedando inhabilitados para hibridar en la reacción de PCR, lo cual también modifica la abundancia relativa original de los genes blanco [Suzuki et al., 1996]. Lo mismo ocurre cuando se forman estructuras secundarias en los amplicones [Kanagawa, 2003]. Por otro lado, en la etapa de clonado, pueden generarse desvíos cuando algunos amplicones son ligados con mayor preferencia que otros. Además, una vez clonados, determinados insertos podrían ser letales para la cepa transformada [Palatinszky et al., 2011]. Los desvíos y artefactos que pueden afectar a esta metodología limitan la información que puede obtenerse a partir de las bibliotecas de productos de amplificación. Otra limitación de esta metodología está relacionada con la baja cobertura de análisis que ofrece cuando la diversidad de variantes del gen biomarcador es muy alta, como por ejemplo en el estudio de la estructura de las comunidades microbianas complejas. Debido a ello, ha sido reemplazada por métodos más modernos como es la secuenciación en gran escala de los fragmentos amplificados, lo cual evita el paso de clonado y permite el estudio de decenas de miles de fragmentos amplificados a partir de una muestra. Sin embargo, aún es muy utilizada para el estudio de genes biomarcadores funcionales, los cuales son habitualmente menos diversos. Asimismo, es importante tener en cuenta que los resultados obtenidos pueden ser afectados por los desvíos anteriormente mencionados.

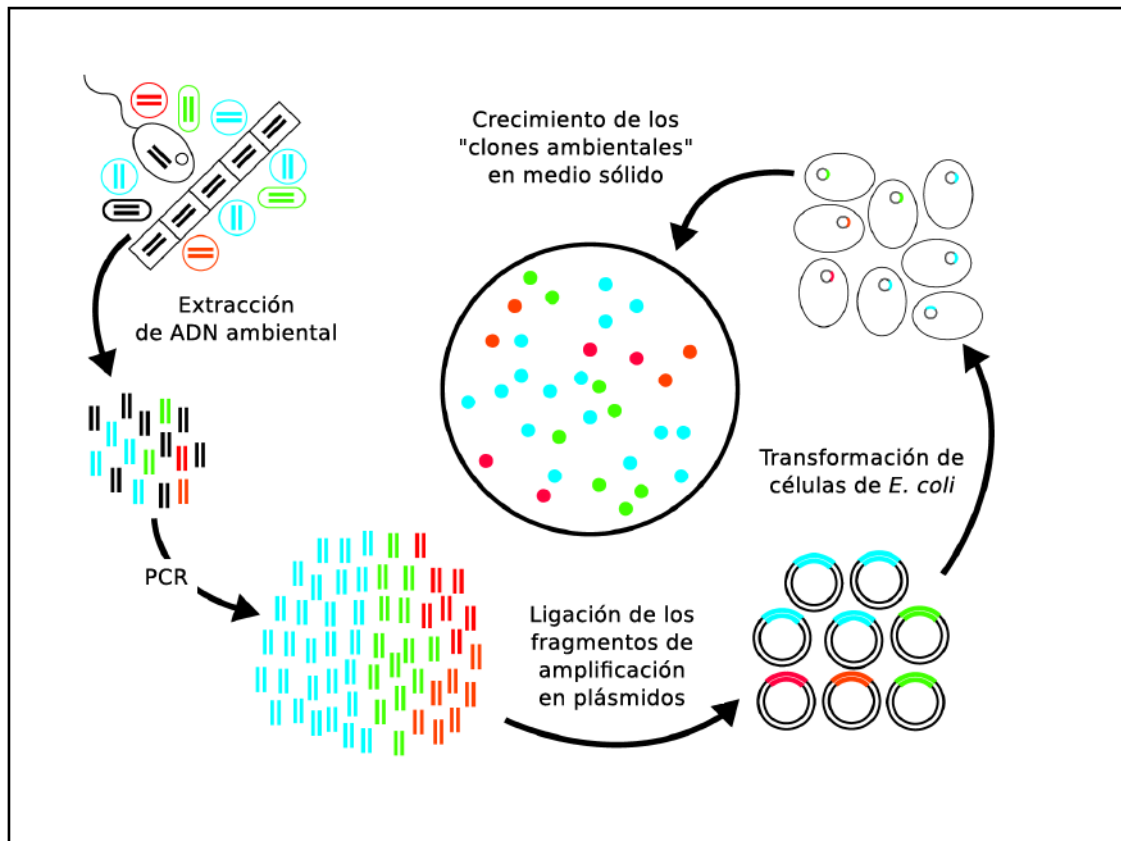


Figura 1.7: Construcción de bibliotecas de productos de amplificación a partir de ADN ambiental. Modificado a partir de Crump y colaboradores [Crump et al., 2005].

1.3.2. PCR cuantitativa

La PCR cuantitativa (qPCR) es una metodología basada en la amplificación de genes, en la cual cada ciclo de amplificación es monitoreado en tiempo real utilizando tecnologías de detección por fluorescencia [Valasek et al., 2005]. Las señales de fluorescencia pueden provenir de colorantes capaces de unirse a la doble hebra de ADN o de sondas fluorescentes con secuencias específicas. [Valasek et al., 2005, Wilhelm et al., 2003]. Durante la amplificación, los datos de fluorescencia son graficados en función del número de ciclo, dando lugar a una curva típica de amplificación como la observada en la figura 1.8. Este proceso presenta cuatro fases: la fluorescencia de base, la fase exponencial, la amplificación lineal y la fase de meseta o *plateau*. En la etapa exponencial, la cantidad de amplicón del gen de interés es proporcional a su concentración inicial, por lo que esta información es utilizada para cuantificar el número de genes presentes en la muestra. Para ello, se fija arbitrariamente un umbral de fluorescencia significativamente mayor a la fluorescencia de base que permita comparar las muestras. Luego, se determinan los valores de Ct para cada muestra, los cuales representan la cantidad de ciclos de amplificación que fueron necesarios para superar dicho umbral. Los valores de Ct se encuentran relacionados con la cantidad inicial de templado (a mayor concentración, se necesitarán menos ciclos para alcanzar el Ct) y por lo tanto pueden ser utilizados para la cuantificación de los genes de interés

a partir de curvas de calibración generadas con un gen estándar [Bustin, 2004, Smith y Osborn, 2009].

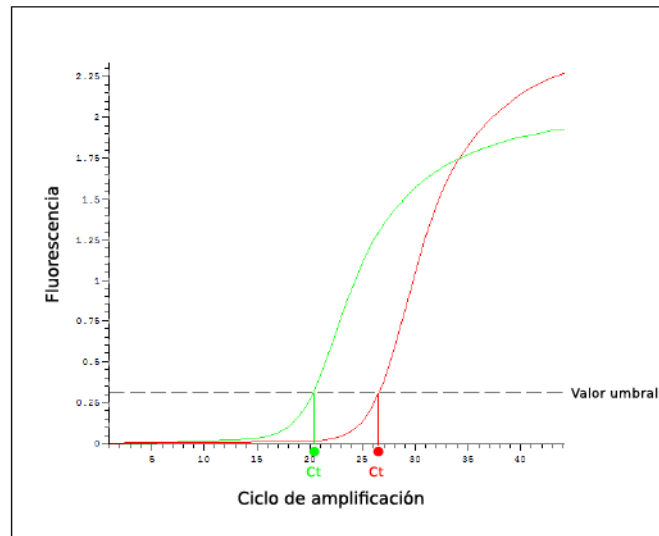


Figura 1.8: Curva de fluorescencia en función de los ciclos de amplificación observada en dos reacciones de qPCR conteniendo distintas concentraciones de templado.

Entre los colorantes más utilizados se encuentra SYBR Green I. Este colorante se intercala entre los pares de bases adyacentes del ADN doble cadena emitiendo una señal de fluorescencia, por lo que al aumentar la cantidad de fragmentos de ADN doble cadena a lo largo de los ciclos de amplificación también se incrementa esta señal. Dado que dicho colorante es capaz de unirse a cualquier hebra de ADN doble cadena, todo producto inespecífico producido durante la amplificación, así como también la formación de dímeros de cebadores sobreestimarán la abundancia de los genes blanco [Smith y Osborn, 2009, Wilhelm et al., 2003]. Este método de detección de fluorescencia permite la construcción de curvas de desnaturalización para analizar la especificidad de los productos de reacción. Luego de finalizada la reacción de amplificación se generan aumentos graduales de temperatura, dando lugar a la disociación del ADN doble cadena y por lo tanto de las moléculas de colorante. Esto resulta en una disminución de la fluorescencia, la cual puede ser representada en función de la temperatura para generar las curvas de desnaturalización correspondientes (Figura 1.9b). La temperatura en la que se observa una caída pronunciada de la señal de fluorescencia se denomina temperatura de desnaturalización (T_m). Dado que la T_m depende del tamaño y composición de los fragmentos de ADN, permite identificar tanto la presencia de productos inespecíficos como de dímeros de cebadores [Smith y Osborn, 2009, Wilhelm et al., 2003]. Asimismo, es frecuente representar la derivada negativa de la fluorescencia ($-dI/dT$) respecto de la temperatura (Figura 1.9a), a fin de detectar más fácilmente estos productos.

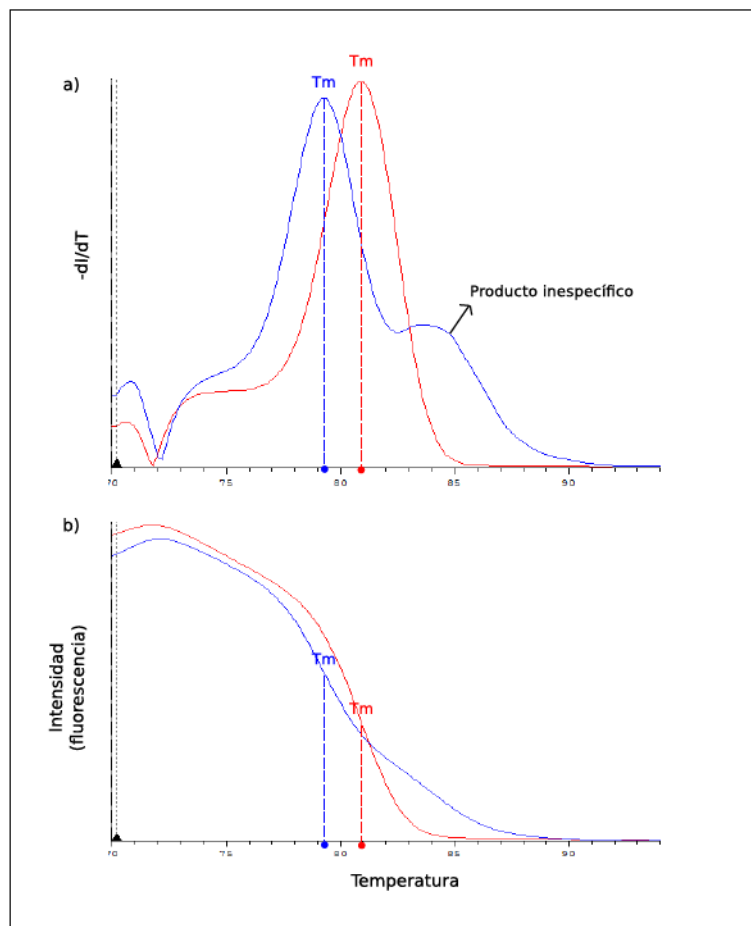


Figura 1.9: Curvas de melting. a) $-dI/dT$ en función de la fluorescencia. b) Intensidad de la fluorescencia en función de la temperatura.

La PCR cuantitativa se ha convertido en una metodología ampliamente utilizada en investigación y en diagnóstico tanto médico como ambiental [Cébron et al., 2008, Fierer y Jackson, 2005, Mestdagh et al., 2008, Wilhelm et al., 2003]. Una de sus principales ventajas es que posibilita la estimación de la abundancia del gen de interés en un amplio rango dinámico (más de ocho órdenes de magnitud). Esto, sumado a su gran sensibilidad, permite la detección de menos de cinco copias de la secuencia blanco por reacción. Finalmente, la qPCR no requiere manipulaciones posteriores y por lo tanto se minimizan las posibilidades de contaminación en el laboratorio con productos de amplificación [Valasek et al., 2005, Wilhelm et al., 2003]. Sin embargo, esta técnica también posee ciertas limitaciones [Valasek et al., 2005]. La principal de ellas, al igual que en las reacciones de PCR tradicional, es su susceptibilidad a la inhibición por determinados compuestos que pueden estar presentes en la muestra, como por ejemplo inhibidores fenólicos [Wilson, 1997]. Además, al igual que la PCR, depende fuertemente de la información disponible en las bases de datos para el diseño de los cebadores.

1.3.3. Metagenómica

El conjunto de herramientas y el campo de estudio destinados a la caracterización y análisis de la totalidad de los genomas microbianos presentes en una muestra ambiental se denomina "Metagenómica" [Riesenfeld et al., 2004]. Si bien las estrategias metagenómicas presentan desvíos y limitaciones, este abordaje permite acceder al potencial genético contenido en una comunidad microbiana de forma mucho más completa [Ferrer et al., 2009, Simon y Daniel, 2009]. La alta diversidad que presentan los microorganismos en las comunidades microbianas representa el mayor desafío de este nuevo campo de estudio. Sin embargo, esta diversidad presenta también un gran valor, y la metagenómica representa una disciplina clave para acceder a dicho potencial. La metagenómica está contribuyendo a incrementar nuestro conocimiento sobre el rol que presentan los microorganismos para el funcionamiento de los ecosistemas de nuestro planeta, a conocer las distintas especializaciones que han adquirido a lo largo de su evolución, y a revelar sus posibles utilidades biotecnológicas [Brown y Tiedje, 2011]. Por medio de dos estrategias diferentes, estas herramientas permiten analizar el ADN de la comunidad sin utilizar un paso previo de amplificación. Ambas se describen brevemente a continuación.

1.3.3.1. Bibliotecas metagenómicas

De forma similar a las bibliotecas genómicas, la construcción de una biblioteca metagenómica consiste en el clonado de ADN metagenómico en vectores adecuados, y la posterior transformación de la célula hospedadora. De acuerdo al vector utilizado, es posible generar dos tipos de bibliotecas metagenómicas, aquellas que contienen insertos menores a 10 kb, los cuales son clonados en vectores plasmídicos, y las que poseen insertos de hasta 40 kb o mayores (clonados en cósmidos, fósidos o BACs). La construcción de uno u otro tipo de biblioteca dependerá del tamaño de los fragmentos obtenidos durante la extracción de ADN metagenómico, de la estrategia de búsqueda seleccionada para identificar los clones de interés, del hospedador y del número clones requerido para que la biblioteca sea representativa del metagenoma, entre otros factores [Daniel, 2005]. Generalmente, las bibliotecas metagenómicas en plásmidos son empleadas para la identificación de nuevas biomoléculas codificadas por un sólo gen u operón pequeño. Sin embargo, para poder identificar rutas metabólicas codificadas por varios genes, o fragmentos de ADN destinados a la caracterización genómica de microorganismos no cultivables, es conveniente la construcción de una biblioteca en cósmidos, fósidos o BACs [Simon y Daniel, 2011]. Aunque la construcción de una biblioteca metagenómica es conceptualmente simple, se requiere de un gran número de clones a fin de lograr una adecuada cobertura del análisis de la comunidad en estudio.

La identificación de los clones conteniendo genes de interés involucra estrategias de búsqueda basadas en las secuencias de nucleótidos de los genes en estudio o en la determinación una actividad

enzimática [Simon y Daniel, 2011]. Los análisis basados en secuencias nucleotídicas incluyen el uso de técnicas moleculares como PCR o hibridación. Debido a que estas técnicas utilizan cebadores o sondas diseñados a partir de regiones conservadas de genes conocidos, su aplicación queda limitada a la identificación de nuevos miembros de familias de genes previamente caracterizadas. Por otro lado, dichas estrategias no permiten asegurar la detección de genes completos y/o funcionales [Daniel, 2005, Simon y Daniel, 2009]. Aún así se han identificado varios genes codificantes para enzimas novedosas, tales como deshidrogenasas, isomerasas y oxidasas [Neufeld et al., 2008, Parachin y Gorwa-Grauslund, 2011]. Estas metodologías también pueden ser utilizadas en la detección de genes biomarcadores filogenéticos. Por otra parte, la búsqueda de clones basada en la detección de una actividad enzimática de interés no depende del conocimiento previo de las secuencias de los genes que las codifican. En consecuencia, los ensayos funcionales representan la única estrategia con potencial para el descubrimiento de productos génicos novedosos [Ferrer et al., 2005, Heath et al., 2009, Steele et al., 2009]. Ejemplo de ello es la esterasa O.16 identificada y caracterizada por Ferrer y colaboradores, la cual posee una complejidad estructural y funcional mayor que el resto de las esterases reportadas hasta ese momento [Ferrer et al., 2005]. Otra de las ventajas que posee esta estrategia funcional es que posibilita la identificación de genes completos y funcionales. Sin embargo, la detección de los clones de interés puede verse condicionada, dado que la funcionalidad del gen clonado depende de la capacidad que posee el hospedador de expresar genes heterólogos [Riesenfeld et al., 2004, Simon y Daniel, 2011]. Debido a que las estrategias moleculares y funcionales son complementarias, el uso de ambos tipos de análisis permite obtener mayor información sobre los genes en estudio.

La construcción y el análisis de bibliotecas metagenómicas es considerada una tarea laboriosa, dado que a menudo es necesario analizar decenas de miles de clones para poder estudiar el potencial metabólico de una comunidad. A pesar de ello, las bibliotecas metagenómicas representan un reservorio importante de información genética. A partir de ellas es posible llevar a cabo numerosos estudios, como por ejemplo analizar el contexto genómico de los genes identificados, evaluar la presencia de eventos de transferencia horizontal de genes y realizar ensayos posteriores de expresión heteróloga y caracterización bioquímica [Ferrer et al., 2009].

1.3.3.2. Secuenciación al azar del metagenoma

Esta estrategia metagenómica consiste en la secuenciación directa del ADN purificado a partir de una comunidad microbiana mediante plataformas de secuenciación en gran escala [Shendure y Ji, 2008]. Dado que estas plataformas generan un gran número de secuencias, la cobertura de análisis es significativamente mayor respecto de las metodologías descritas anteriormente [Di Bella et al., 2013]. Esto posibilita realizar estudios sobre la diversidad y potencial metabólico de una comunidad

microbiana de una manera global y con una mayor resolución [Krause et al., 2008]. Esta metodología es aplicada frecuentemente para estudiar las diferencias existentes entre muestras ambientales a partir del análisis comparativo de sus metagenomas [Dinsdale et al., 2008]. Otra ventaja de esta estrategia es que no requiere del clonado previo de los fragmentos de ADN, reduciendo así los tiempos de análisis. Sin embargo, las secuencias obtenidas por estas tecnologías de secuenciación pueden presentar entre 25 y 1000 pares de bases de longitud, dificultando el estudio de genes completos, sus funciones y sus regiones lindantes. Programas especialmente diseñados para ensamblar este tipo de secuencias permiten generar fragmentos de ADN de mayor longitud (Tabla 1.2). No obstante, en aquellos casos donde las secuencias provienen de ADN de comunidades que poseen una alta diversidad, el ensamblado de las mismas generalmente se ve limitado [Di Bella et al., 2013]. Otro desafío que presenta esta estrategia, es que requiere de gran capacidad computacional para el análisis y procesamiento de la información generada.

1.3.4. Tecnologías de secuenciación de segunda generación

Se denomina así a las plataformas de secuenciación que producen, mediante la síntesis de ADN, secuencias de una longitud entre 25 y 1000 pb en forma masiva y paralela [Shendure y Ji, 2008]. El desarrollo de esta tecnología ha reducido los costos de la generación de secuencias e incrementado su rendimiento en varios órdenes de magnitud respecto de la secuenciación tradicional desarrollada por Sanger [Sanger y Coulson, 1975]. Por sus características, la secuenciación de alto rendimiento no sólo es utilizada en el estudio de metagenomas, sino también en la secuenciación de productos de amplificación, fósmidos, genomas de microorganismos aislados y metatranscriptómica, entre otras aplicaciones [Bohorquez et al., 2012, Lai et al., 2012, Suenaga et al., 2009]. Si bien en el mercado existen diferentes plataformas que difieren en su bioquímica y en cómo se disponen los distintos fragmentos de ADN a secuenciar, todas ellas realizan la secuenciación en etapas conceptualmente similares. Dichas etapas consisten en la fragmentación al azar del ADN, la ligación de adaptadores comunes, separación de los fragmentos obtenidos, generación de amplicones a partir de dichos fragmentos y finalmente la secuenciación compartimentalizada de cada grupo de amplicones mediante ciclos alternados de incorporación de nucleótidos y adquisición de datos (éstos últimos basados en las señales generadas durante cada incorporación [Margulies et al., 2005, Shendure et al., 2005, Turcatti et al., 2008]).

Entre las plataformas de secuenciación más utilizadas durante los últimos años, se encuentran Illumina [www.illumina.com] y Roche 454 [www.454.com], cada una con sus ventajas y limitaciones. La plataforma 454 Roche (GS FLX Titanium) puede generar secuencias de hasta 1000 pb en poco tiempo y con un rendimiento de 700 Mb por corrida. De las plataformas existentes, es la que brinda mayor tamaño de secuencias. Por lo tanto, resulta de utilidad en el análisis de regiones palindrómicas

o repetitivas y en los casos en que se requiere reconstruir fragmentos de ADN metagenómico (las secuencias largas son más fáciles de ensamblar que secuencias cortas). Sin embargo posee las desventajas de presentar un alto costo y generar baja cantidad de secuencias, cuando es comparada con plataformas de secuenciación más modernas. Además puede introducir errores en regiones homopoliméricas [Di Bella et al., 2013, Kunin et al., 2010]. La plataforma Illumina, por otro lado, permite producir hasta 1000 Gb de información por corrida a un menor costo y con una mayor precisión que la plataforma 454 Roche. Su principal limitación es que genera secuencias más cortas (hasta 150 pb) y requiere de mayor tiempo de corrida [Di Bella et al., 2013]. Una de las aplicaciones en las que estas tecnologías poseen un mayor impacto es en el estudio de los metagenomas [Wooley et al., 2010]. Algunos de los programas y sistemas integrales utilizados en el análisis de las secuencias obtenidas (ensamblado, predicción de genes, anotación funcional, asignación taxonómica, análisis comparativos, etc.) se muestran en la tabla 1.2. Estos análisis generalmente son aplicados tanto a los datos obtenidos a partir de bibliotecas metagenómicas como a partir de la secuenciación al azar de metagenomas.

Tabla 1.2: Algunos programas computacionales utilizados para el análisis de secuencias generadas a partir de las tecnologías de secuenciación de alto rendimiento.

| ANÁLISIS | PROGRAMAS | CARACTERÍSTICAS GENERALES | REFERENCIAS |
|------------------------------|---|--|---|
| Asignación taxonómica | TETRA, PhyloPythia | Permite el análisis de las propiedades intrínsecas de las secuencias para determinar su posible origen taxonómico. Presentan inconvenientes en la asignación de secuencias cortas. | [Teeling et al., 2004, Mc. Hardy et al., 2006] |
| Ensamblado | MEGAN, MetaCluster, CARMA MetaVelvet, Newler, WGS | Asignan fragmentos a un grupo taxonómico en base a su similitud con secuencias conocida (propiedades extrínsecas). Identifican regiones de superposición entre diferentes fragmentos de ADN para generar secuencias de mayor longitud y facilitar la detección de genes completos. Se necesita mucho tiempo computacional y se ve dificultado por bajas coberturas de análisis. | [Huson et al., 2007, Krause et al., 2008, Wang et al., 2012] [Margulies et al., 2005, Myers et al., 2000, Namiki et al., 2012] |
| Predicción génica | Glimmer, Orphelia, FgeneB, MetaGeneAnnotator | Detectan marcos abiertos de lectura a partir de parámetros estadísticos basados en propiedades intrínsecas y extrínsecas de las secuencias. | [www.softberry.com, Noguchi et al., 2008, Hoff et al., 2009] |
| Anotación funcional | ISGA, RAST | Son sistemas automáticos de predicción y anotación funcional de los genes identificados. Los resultados obtenidos generalmente se corroboran manualmente. | [www.isga.cgb.indiana www.rast.nmpdr.org] |

1.4. Bahía Ushuaia, el sitio de estudio

Bahía Ushuaia se ubica en la costa sur de la Isla Grande de Tierra del Fuego, dentro del Canal de Beagle, el cual conecta los Océanos Pacífico y Atlántico en el extremo sur de Sudamérica (Figura 1.10). En sus orillas se encuentra Ushuaia, la ciudad más austral del mundo. La economía local depende principalmente del turismo, el comercio, la pesca y el desarrollo industrial, actividades que involucran un intenso tráfico de buques en esta bahía. El suministro de combustibles en la Isla Grande de Tierra del Fuego se realiza exclusivamente por medio de buques tanque, siendo descargado en la planta de combustibles Orión (localizada en la ciudad de Ushuaia), a partir de un pequeño muelle ubicado junto a la misma (Figura 1.10). Este muelle en general opera con hidrocarburos persistentes (derivados pesados, gas-oil, fuel-oil, etc.) y no persistentes (nafta). Algunos buques que arriban a la ciudad también pueden efectuar cargas de combustible en dicho muelle [www.nuestromar.org]. Si bien Bahía Ushuaia no es una zona de explotación de hidrocarburos, como sí ocurre al norte de la isla, las actividades portuarias junto con el crecimiento poblacional, han favorecido el ingreso de hidrocarburos en la bahía [Commendatore et al., 2012, Esteves et al., 2006]. Un trabajo reciente ha identificado tres zonas en la bahía con distintos niveles de contaminación por hidrocarburos: este, sudoeste y centro [Commendatore et al., 2012]. En la zona central, sedimentos intermareales y submareales presentaron una alta concentración de hidrocarburos de origen petrogénico y pirogénico [Commendatore et al., 2012, Marcos et al., 2012], probablemente como consecuencia de derrames ocasionados en la cercanía de los muelles presentes en esta zona [Commendatore et al., 2012, Esteves et al., 2006]. Por otra parte, en sedimentos intermareales cercanos a Planta Orión, objeto de estudio de este trabajo, se detectaron signos de degradación de hidrocarburos alifáticos propios de sedimentos crónicamente contaminados [Commendatore et al., 2012]. Asimismo, y como consecuencia de la circulación de agua en sentido antihorario predominante dentro de la bahía, los hidrocarburos de esta zona podrían ser transportados hacia zonas menos afectadas, como es el caso del área ubicada al sudoeste de la bahía [Commendatore et al., 2012].

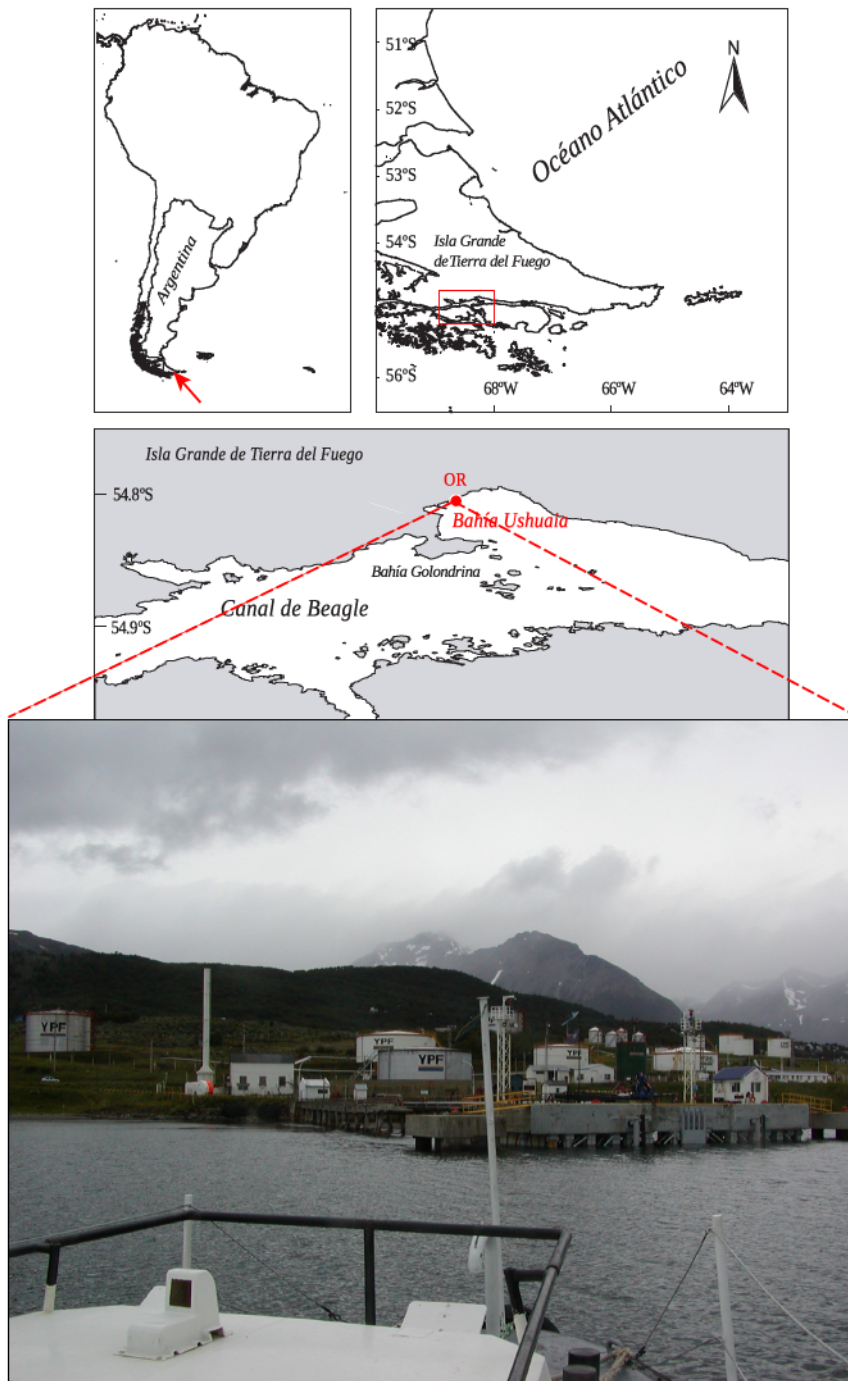


Figura 1.10: Ubicación del sitio de muestreo. La foto muestra una vista del muelle y de los tanques de almacenamiento de combustible de la Planta Orión.

1.4.1. Factores ambientales y el impacto de los hidrocarburos sobre Bahía Ushuaia

La persistencia y el impacto de los hidrocarburos en Bahía Ushuaia se ven favorecidas por las condiciones ambientales existentes en esta región subantártica. En primer lugar, el clima oceánico subpolar, con una temperatura superficial del agua que varía desde un promedio de 4,5°C en julio y 9,7°C en enero [Dionisi et al., 2011], disminuye la solubilidad de los hidrocarburos respecto de otras regiones más cálidas, y por ende su biodisponibilidad. Además, a pesar de que existen microorganismos

mos adaptados a ambientes fríos capaces de degradar hidrocarburos, como por ejemplo *O. antarctica* [Berthe-Corti et al., 2010, Pini et al., 2007], las bajas temperaturas limitan la velocidad de biodegradación, al afectar la actividad microbiana [Coulon et al., 2007]. En segundo lugar, y a diferencia de la costa Atlántica de la provincia de Tierra del Fuego, Bahía Ushuaia se encuentra en una región protegida de fuertes vientos, con lo cual no hay olas que faciliten la oxigenación y por ende los procesos de biodegradación aeróbica de los hidrocarburos. Es por esto que los hidrocarburos que arriban a esta zona tienden a acumularse [Esteves et al., 2006]. Finalmente, cada primavera en el sur de Argentina se registran altos niveles de radiación ultravioleta-B (UV-B, 280-315 nm) como consecuencia de la disminución de la capa de ozono ubicada sobre la Antártida [Diaz et al., 2006, Frederick et al., 1994]. La radiación UV-B, en ciertas condiciones, puede incrementar el efecto tóxico de los HAPs, fenómeno denominado toxicidad fotoinducida [Arfsten et al., 1996, McDonald y Chapman, 2002]. Si bien la relevancia ecológica de la toxicidad fotoinducida aún se desconoce [McDonald y Chapman, 2002], diversos organismos presentes en los ambientes costeros antárticos y subantárticos de Argentina podrían verse afectados. Sargian y colaboradores realizaron ensayos experimentales a fin de observar el efecto de la radiación UV y de la fracción soluble del petróleo crudo en microplancton de agua de mar de Bahía Ushuaia [Sargian et al., 2007]. Estos estudios evidenciaron la susceptibilidad del microplancton frente a estos factores, y un efecto sinérgico entre la luz UV y las bajas concentraciones de hidrocarburos solubles [Sargian et al., 2007].

1.4.2. Poblaciones bacterianas de sedimentos intermareales de Bahía Ushuaia con capacidad de degradar HAPs

Desde el año 2004 hasta la fecha, estudios realizados en el Laboratorio de Microbiología Ambiental del Centro Nacional Patagónico (CENPAT-CONICET) han permitido identificar diferentes poblaciones bacterianas capaces de degradar HAPs en sedimentos intermareales de Bahía Ushuaia. Estos estudios se basaron en la amplificación de genes biomarcadores funcionales, específicamente de aquellos que codifican para el componente catalítico correspondiente a la subunidad mayor de la dioxigenasa inicial de la ruta degradativa de HAPs. A partir del clonado de los amplicones generados y posterior análisis de sus secuencias, se identificaron 22 variantes de genes de enzimas dioxigenasas [Dionisi et al., 2011, Lozada et al., 2008, Marcos et al., 2009]. Tres de las 22 variantes identificadas presentaron altos porcentajes de similitud con secuencias de dioxigenasas previamente caracterizadas. Dos de ellas se encontraron muy relacionadas con los genes de *nahAc* identificadas en cepas del género *Pseudomonas* (98 % de identidad a nivel de aminoácidos) y con los genes de la variante *phnAc*, inicialmente identificada en el microorganismo degradador de fenantreno *Alcaligenes faecalis* AFK2, y luego en otras betaproteobacterias (94,5 - 99,3 %). La tercera variante identificada presentó altos porcentajes de identidad con el gen *phnAc*, característicos de bacterias marinas hidrocarbonoclasticas obligadas

del género *Cycloclasticus* [Lozada et al., 2008]. Si bien se han llevado a cabo pocos estudios similares en otros ambientes marinos del mundo, resultó sorprendente que de la totalidad de las variantes génicas encontradas, 19 presentarían secuencias con porcentajes de identidad bajos a intermedios (33-70 % a nivel de aminoácidos) respecto de otras dioxigenasas previamente descritas. Estudios posteriores han evaluado la abundancia relativa de las variantes identificadas frecuentemente en sedimentos intermareales de tres ambientes de la costa Patagónica, incluyendo Bahía Ushuaia [Marcos et al., 2012]. Estos análisis mostraron que en sedimentos cercanos al muelle de la Planta Orión en una serie temporal de seis años, la abundancia de las variantes B, C y D en la mayoría de los casos fue superior respecto de la abundancia de genes arquetípicos de dioxigenasas. Particularmente, la abundancia de los genes de la variante *nahAc* fue muy baja en todas las muestras analizadas, a pesar de que numerosas cepas degradadoras de HAPs pertenecientes a este género han sido aisladas a partir del medio ambiente marino [Lalucat et al., 2006]. Estos resultados sugieren que las poblaciones microbianas que contienen genes de las variantes B, C y D son miembros estables dentro de la comunidad y que podrían tener un rol clave en la biodegradación de HAPs [Marcos et al., 2012]. Respecto de las variantes novedosas restantes (F a S), se observó que la mayoría se relacionaba con genes identificados en bacterias Gram-positivas del género *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Nocardioides*, *Terrabacter* y *Bacillus* [Marcos et al., 2009].

1.5. OBJETIVOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO

La caracterización de los microorganismos que presentan la capacidad para degradar HAPs resulta de interés para el desarrollo económico sustentable de zonas costeras afectadas por la contaminación con hidrocarburos. Estudios realizados en la región costera Patagónica, particularmente en Bahía Ushuaia, sugieren la existencia de múltiples poblaciones microbianas que presentan la capacidad de degradar estos compuestos. Sin embargo, las metodologías empleadas en estos estudios fueron incapaces de revelar los mecanismos degradativos que utilizan dichas poblaciones. Asimismo, por causa de las limitaciones metodológicas, probablemente se haya subestimado la diversidad de microorganismos degradadores de HAPs autóctonos de estos ambientes. Es por esto que el **objetivo general** de este trabajo fue:

Incrementar nuestro conocimiento sobre la diversidad y relevancia ecológica de los microorganismos con capacidad para degradar HAPs autóctonos de ambientes costeros subantárticos crónicamente contaminados, como así también revelar los mecanismos que utilizan para degradar estos compuestos.

Para ello, se plantearon los siguientes **objetivos específicos**:

- I. Identificar y estimar la abundancia de microorganismos que presentan la capacidad para biode-

gradar HAPs en sedimentos intermareales crónicamente contaminados de Bahía Ushuaia, mediante análisis cualitativos y cuantitativos de genes biomarcadores funcionales.

- II. Analizar la diversidad de los genes codificantes para las enzimas claves involucradas en la degradación de HAPs.
- III. Estudiar a nivel genómico las rutas degradativas utilizadas por los microorganismos presentes en estos sedimentos, así como también otros mecanismos desarrollados para su adaptación a este ambiente.

En la presente Tesis Doctoral se formuló la siguiente **hipótesis** de trabajo:

La comunidad microbiana de los sedimentos subantárticos crónicamente contaminados con hidrocarburos contiene una gran diversidad de genes aún no descritos relacionados con las rutas degradativas de HAPs.

Capítulo 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Composición de medios de cultivo y soluciones

2.1.1. Medios de cultivo

LB (Luria-Bertani): Para un litro de medio LB se disolvieron 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl en 950 ml de agua destilada. Se ajustó a pH 7,0 con NaOH y se agregó la cantidad necesaria de agua destilada para obtener un litro de medio de cultivo. Para el caso de medio LB sólido, se agregaron 15 g de agar por litro. Se esterilizó mediante autoclavado.

LB/Km: A un litro de medio LB esterilizado se agregó kanamicina hasta una concentración de 50 mg/l.

LB/Cm: A un litro de LB esterilizado se agregó cloranfenicol hasta una concentración de 12,5 $\mu\text{g/ml}$.

S.O.C: 2% (p/v) de triptona, 0,5% (p/v) de extracto de levadura, 10 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 10 mM de MgCl_2 , 10 mM MgSO_4 , 20 mM de glucosa.

2.1.2. Soluciones

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

Solución de lisis II: Se preparó en el momento de ser utilizada, diluyendo 0,2 N de NaOH y 1% (p/v) de SDS en agua destilada estéril.

Solución de lisis III: 60 ml de acetato de potasio 5 M se mezclaron con 11,5 ml de ácido acético glacial, llevando a un volumen final de 100 ml con agua destilada. La solución se almacenó a

4°C.

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

Tris-HCl 1M (pH 8): 12,1 gr de 2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol (Tris) se disolvieron en 80 ml de agua destilada ajustando el pH al valor deseado con HCl concentrado. Se llevó a un volúmen total de 100 ml.

TNE 10X: 100 mM de Tris, 10 mM de EDTA y 2 M de NaCl. El pH fue ajustado a 7,4 con HCl concentrado.

TBE 5X: 445 mM de Tris, 445 mM de ácido bórico y 10 mM EDTA en agua destilada. Se almacenó a temperatura ambiente.

TAE 50X: 2M de Tris, 1M de ácido acético glacial, 100 mM de EDTA.

Buffer PDB: 10 mM de Tris-HCl (pH 8,3), 100 mM de NaCl y 10 mM de MgCl₂.

Solución stock de EDTA 0,5 M (pH 8): Se agregaron 187,1 g de Na₂EDTA.2H₂O a 800 ml de agua destilada. Se mezcló mediante agitación magnética y se ajustó el pH con NaOH 10 mM. Se agregó la cantidad suficiente de agua destilada hasta obtener un litro de solución y se esterilizó mediante autoclave. Se almacenó a temperatura ambiente.

2.2. Cepas bacterianas utilizadas

Genotipos:

DH5 α : F⁻80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*)U169 *recA1 endA1 hsdR17*(r_k⁻, m_k⁺) *phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 tonA*.

EPI300-T1[®]: F⁻ *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) (Str^R) 80*dlacZ* Δ M15 Δ *lacX74 recA1 endA1 araD139 Δ (*ara, leu*)7697 *galU galK* λ - *rpsL nupG trfA tonA dhfr*.*

2.3. Obtención de muestras de sedimentos intermareales

Se obtuvieron muestras superficiales (0 - 3 cm) de sedimentos intermareales con tubos de acrílico de 4,4 cm de diámetro interno y 25 cm de largo, a fin de mantener la estratificación del sedimento. Cada muestra se obtuvo durante la marea baja a partir de 7 a 10 puntos elegidos al azar a lo largo de la línea de marea y separados por 1 m de distancia, aproximadamente. Los sedimentos se colocaron

en frascos de vidrio estériles y se mantuvieron a 4°C durante su traslado al laboratorio, donde fueron homogeneizados para obtener una muestra compuesta. Dicha muestra se alicuotó y almacenó a -80°C hasta el momento de realizar los análisis moleculares [Lozada et al., 2008].

Los nombres de las muestras se identificaron con dos letras, las cuales simbolizan el nombre abreviado del sitio, y los dos últimos dígitos del año de muestreo.

2.4. Extracciones de ADN

2.4.1. Extracción de ADN metagenómico

2.4.1.1. Extracción de ADN mediante kit comercial

Las extracciones de ADN metagenómico se realizaron por duplicado a partir de 0,7 a 1 g de sedimento húmedo utilizando el kit de extracción FastDNA para suelos (FastDNA SPIN kit for soil, MP Biomedicals, Solon, Estados Unidos). Se siguieron las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones: la homogeneización de las muestras se realizó tres veces durante 50 segundos a velocidad máxima utilizando un mini beadbeater Biospec (Bartlesville, Estados Unidos) con intervalos de 1 minuto en hielo entre pulsos de homogenización, y el ADN se eluyó en 150 μ l de Tris-HCl 10 mM pH 8. Las dos extracciones se combinaron y se almacenaron a -80°C hasta su análisis.

2.4.1.2. Extracción manual de ADN metagenómico

El protocolo manual para la extracción de ADN utilizado en la construcción de la biblioteca metagenómica se basó en aquel desarrollado por Zhou y colaboradores [Zhou et al., 1996]: 5 g de muestra fueron mezcladas con 13,5 ml de buffer de extracción [100 mM Tris-HCl (pH 8); 100 mM Na₂EDTA (pH 8); 100 mM de buffer fosfato de sodio (pH 8); 1,5 M NaCl; 1% (p/v) CTAB] y se adicionaron 50 μ l de proteinasa K (20 mg/ml). La mezcla se incubó a 225 rpm por 30 min a 37°C. Luego de la incubación, se agregaron 1,5 ml de SDS al 20% (p/v) y se incubó a 65°C durante 2 h en agitación suave (50 rpm), mezclando suavemente por inversión cada 15 o 20 min. La solución obtenida se centrifugó a 6000 x g (Sorvall RC5C, rotor SA-600) durante 10 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo de centrifuga, y se realizaron otras dos extracciones a partir del pellet obtenido adicionando 4,5 ml del buffer de extracción y 500 μ l de SDS 20% (p/v), agitando con vortex durante 10 s. Se incubó la mezcla a 65°C durante 10 min y se centrifugó durante 10 min a 6000 x g a temperatura ambiente. Se combinaron los tres sobrenadantes obtenidos y se mezclaron con un mismo volumen de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1). Se recuperó la fase acuosa por centrifugación (5 min a 10.000 x g), se colocó en tubos corex y se precipitó con 0,6 vol de isopropanol a temperatura

ambiente durante 12 hs. Se centrifugó a 16.000 x g durante 20 min a temperatura ambiente y se lavó el pellet de ADN con 5 ml de etanol al 70 % (v/v). Posteriormente, se centrifugó durante 10 min a 16000 x g y el precipitado fue resuspendido en 100 μ l de 10 mM Tris-HCl (pH 8) preparado con agua de calidad biología molecular (Gibco, Invitrogen). El ADN se almacenó a -80°C hasta su posterior análisis.

2.4.2. Extracción de ADN plasmídico y fosmídico

2.4.2.1. Extracción de plásmidos mediante el método de lisis alcalina

Previo a la extracción de ADN plasmídico utilizando el método descrito por Sambrook y Russell [Sambrook y Russell, 2001], se inoculó una colonia aislada de *Escherichia coli* DH5 α conteniendo el plásmido de interés, en 3 ml de medio LB/Km y se incubó a 37°C durante 12-16 hs en agitación vigorosa (250 rpm). Luego de la incubación, el cultivo obtenido se centrifugó a máxima velocidad por 30 seg mediante microcentrífuga, se resuspendió el precipitado celular en 500 μ l de STE a 4°C y se centrifugó nuevamente. El precipitado obtenido se resuspendió en 100 μ l de solución de lisis alcalina I a 4°C y se mezcló vigorosamente con agitador. Posteriormente, se adicionaron 200 μ l de solución de lisis II, se mezcló por inversión cinco veces y se incubó en hielo por 1 min. A continuación, se agregaron 150 μ l de solución de lisis III a 4°C, se mezcló por inversión cinco veces y se incubó en hielo durante 5 min. El lisado celular fue centrifugado a 14.000 x g durante 5 min, y el sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo. Se adicionaron dos volúmenes de etanol absoluto en cada muestra, se mezcló vigorosamente y se dejó precipitando a -20°C durante 3 h. Luego, se centrifugó a 14,000 x g durante 5 min, y se lavó el precipitado con etanol 70 % (v/v). Una vez evaporado el etanol, el ADN fue disuelto en 50 μ l de Tris-HCl 10 mM (pH 8) y se almacenó a -20°C.

2.4.2.2. Extracción de plásmidos y fósidos mediante un kit comercial

Tanto para la extracción de plásmidos como para la extracción de fósidos se utilizó el kit QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA, Estados Unidos). Para la purificación de plásmidos, previamente se inoculó una colonia aislada de *E. coli* DH5 α conteniendo el plásmido de interés, en 3 ml de medio LB/Km, incubando a 37°C durante 12-16 hs en agitación vigorosa (250 rpm). Luego de la incubación, el cultivo se centrifugó a máxima velocidad por 30 seg. A partir del precipitado obtenido se realizó la extracción del plásmido siguiendo las instrucciones del fabricante del kit.

A diferencia de la purificación de plásmidos, la extracción y purificación de fósidos se realizó a partir de 10 ml de cultivos en medio líquido LB/Cm y 1 X de solución autoinductora (Epicentre

Biotechnologies, Madison, WI, Estados Unidos) teniendo en cuenta las siguientes recomendaciones del fabricante del kit: se duplicaron los volúmenes de las soluciones P1, P2 y N3 y se realizó un paso de lavado con buffer PB. Además, el ADN fue eluido utilizando el buffer EB a 70°C.

2.4.3. Cuantificación de ADN

El ADN de plásmidos, fósidos y metagenómico fue cuantificado por fluorometría utilizando un fluorómetro QuantiFluorTM-ST Handheld (Promega Corporation, Madison WI, Estados Unidos) en el canal de detección de fluorescencia A (canal UV 365nm_{ex} y 440-470nm_{em}), y el colorante Hoechst 33258 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, Estados Unidos), siguiendo el protocolo sugerido en el manual del equipo. La calibración del fluorómetro se realizó con un estándar de ADN de timo de ternero (Calf Thymus, Amersham Biosciences). Se utilizaron cubetas de metacrilato en todas las mediciones.

2.5. Construcción de bibliotecas de productos de amplificación

2.5.1. Amplificación de genes de dioxigenasas

Las reacciones de amplificación fueron realizadas en un volumen final de 25 μ l conteniendo 1X de buffer de la enzima Taq polimerasa, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, cebadores en las concentraciones indicadas en la tabla 2.1, 1U de Taq polimerasa T-PLUS (Inbio-Highway, Tandil, Argentina) y entre 1 y 10 ng de ADN/reacción. Dichas reacciones se llevaron a cabo en un termociclador PTC-100 (MJ Research, Waltham, MA, Estados Unidos), utilizando el siguiente programa de amplificación: 5 min a 94°C, 40 ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg a la temperatura de hibridación de los cebadores indicados en la tabla 2.1 y 30 seg a 72°C y un ciclo final de extensión de 15 min a 72°C. En cada ensayo se incluyó un control negativo conteniendo agua destilada autoclavada en lugar del templado. Para el control positivo, se utilizaron plásmidos conteniendo insertos obtenidos a partir de la amplificación de genes de dioxigenasas. La presencia de fragmentos de amplificación se verificó mediante corridas electroforéticas a 70V en geles de agarosa al 1,5% (p/v) utilizando buffer TBE 0,5 X. Los geles fueron teñidos con 0,5 μ g/ml de bromuro de etidio en buffer TBE 0,5 X durante 30 minutos y desteñidos con agua destilada durante 20 min. El ADN fue visualizado utilizando un documentador de geles Bio-Vision (Vilber Lourmat, Francia).

Tabla 2.1: Cebadores utilizados

| CEBADOR | SECUENCIA ¹ | T ² | CONC ³ | REFERENCIAS |
|-----------|----------------------------|----------------|-------------------|-------------------------|
| Ac114f | 5' CTGGCwwTTyCTCACyCAT 3' | 43 | 0,5 | [Wilson et al., 1999] |
| Ac596r | 5' CrGGTGyCTTCCAGTTG 3' | 43 | 0,5 | [Wilson et al., 1999] |
| Nahfor | 5' TGCmvmTAyCAyGGyTGG 3' | 56 | 2 | [Zhou et al., 2006] |
| ARHD-D-F | 5' AACCCCTCACCTGCTCCTAC 3' | 59 | 0,6 | [Marcos et al., 2012] |
| ARHD-D-R | 5' TAAAGTAGGCGCTyTGCTCC 3' | 59 | 0,6 | [McGenity et al., 2012] |
| ARHD-T-F | 5' TGGTACCTTCGACGCAAGC 3' | 56 | 0,9 | Este trabajo |
| ARHD-T-R | 5'GGCACATCCAGAAATGAGTCC 3' | 56 | 0,6 | Este trabajo |
| 16S-1055f | 5' ATGGCTGTCGTCAGCT 3' | 50 | 0,5 | [Lane, 1991] |
| 16S-1392r | 5' ACGGGCGGTGTGTAC 3' | 50 | 0,5 | [Ferris et al., 1996] |

1: Letras en minúscula corresponden al código IUPAC para bases degeneradas.

2: Temperatura de hibridación en grados centígrados.

3: Concentración de los cebadores (μM)

2.5.2. Clonado de productos de amplificación

Para el clonado de los productos amplificados, se utilizaron entre 2 y 4 reacciones de amplificación, las cuales fueron combinadas con el fin de incrementar la representatividad de este análisis y disminuir los desvíos asociados a esta metodología [Sipos et al., 2010]. Los fragmentos amplificados, en primer lugar, fueron separados mediante una corrida electroforética en geles de agarosa al 1,5% (p/v) y la banda del tamaño esperado fue escindida y purificada utilizando el kit Wizard SV gel and PCR clean-up system (Promega, Madison, WI, Estados Unidos). Inmediatamente previo al clonado, los productos de amplificación purificados fueron incubados durante 30 min a 72°C en buffer 1 X de la enzima Taq polimerasa, 0,2 mM de dNTPs, 1,5 mM MgCl₂ y 1,5 U de enzima T-PLUS. Posteriormente, los fragmentos fueron ligados al vector pCR 4.0-TOPO[®] de acuerdo a las instrucciones del fabricante del kit TA cloning kit for sequencing (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos). El plásmido resultante fue utilizado para transformar células *E. coli* DH5 α competentes químicamente [Sambrook y Russell, 2001]. Para ello, se utilizaron 200 μl de células DH5 α a las cuales se agregaron 3 μl de reacción de clonado, se mezcló suavemente y se incubó en hielo entre 40 y 60 min. Luego, se realizó un shock térmico incubando a 42°C durante 90 segundos, transfiriendo inmediatamente a hielo durante 1 o 2 minutos. Finalmente, se agregaron 800 μl de medio S.O.C., se incubó durante 90 min a 37°C en agitación suave (50 rpm) y se centrifugó durante 3 min a 10.000 rpm. Posteriormente, se eli-

minaron aproximadamente 600 μl del sobrenadante y se resuspendieron las células en el medio S.O.C. restante. Las células transformadas fueron sembradas en medio sólido LB/Km, incubando durante 12 hs a 37°C. Como control positivo, la transformación de las células se realizó a partir del agregado de un plásmido de concentración conocida que contenía un producto de amplificación como inserto. En los controles negativos, se reemplazó la mezcla de ligación por el agua provista por el fabricante del kit.

2.5.3. Restricción de los fragmentos clonados

A partir de amplicones provenientes de los insertos clonados, se realizaron reacciones de restricción utilizando 20 μl de productos de amplificación, a los cuales se adicionaron 0,5 μl de enzima HaeIII (Promega, Madison, WI, Estados Unidos) según las instrucciones del proveedor. La mezcla de reacción se incubó a 37°C durante 12 hs. Posteriormente, los fragmentos de restricción obtenidos se analizaron en geles de agarosa al 2,5 % (p/v) durante 3 hs a 90V.

2.6. Cuantificación de genes correspondientes a la variante T de enzimas dioxigenasas

2.6.1. Diseño de cebadores para los ensayos de qPCR

Las secuencias nucleotídicas de los fragmentos de ADN clonados correspondientes a la variante T de dioxigenasas fueron alineadas con el programa ClustalX [Chenna et al., 2003] utilizando los parámetros por defecto. A partir de este alineamiento, se obtuvo la secuencia consenso utilizando el programa GeneFischer2 [<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/genefisher2/references.html>], la cual fue analizada con el programa Primer3 [www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/] para diseñar el par de cebadores utilizados en la cuantificación de genes correspondientes a la variante T. El par de cebadores fue seleccionado entre las opciones provistas por el programa Primer3, de acuerdo a las consideraciones de Bustin y colaboradores [Bustin, 2004]:

1. Deben tener una longitud de entre 15 y 25 pb para maximizar la especificidad, y un porcentaje de GC entre 50 % y 60 %, o asemejarse al porcentaje del fragmento amplificado, lo que asegura una mayor estabilidad de hibridación.
2. La temperatura de desnaturalización de los mismos debe estar en el rango de los 50-65°C y no debe diferir en más de 2°C.

3. Los cebadores no deben formar dímeros entre sí o estructuras secundarias, ya que pueden competir con la hibridación entre el cebador y el ADN blanco.
4. Tener uno o más residuos de G o C en el extremo 3'. Esto aumenta la eficiencia de unión de los cebadores al ADN blanco, sin embargo se deben evitar repeticiones de más de tres o cuatro residuos de GC en los últimos 5 nucleótidos de este extremo.
5. Los productos de amplificación generados no deben superar una longitud de 150 pb, ya que cuanto más corto es el amplicón, mejor es la eficiencia de amplificación.

Tanto la probabilidad de formación de dímeros de cebadores como la probabilidad de generar estructuras secundarias se calculó a través del sitio de internet Oligonucleotide Properties calculator (www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html). La especificidad de los cebadores elegidos, fue evaluada mediante la comparación de sus secuencias con la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) utilizando la herramienta blastn.

2.6.2. Preparación del estándar para la cuantificación de la variante génica T

Se seleccionó el clon Nahfor596R-OR14 para ser utilizado como estándar en el ensayo de qPCR diseñado. Dicho clon contiene un fragmento del gen correspondiente a la variante T clonado a partir de sedimentos del sitio de muestreo Planta Orión. Para ello, se purificó el plásmido utilizando el kit QIAprep Spin Miniprep, y se linealizó mediante la enzima de restricción NotI (Promega, Madison, WI, Estados Unidos), la cual digiere al vector pCR 4.0-TOPO[®] en un sólo sitio. Para verificar que dicha enzima no posea un sitio de corte en el inserto, se analizó la secuencia del mismo con el programa NEBcutter V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2>). Los plásmidos linealizados se purificaron con el kit Wizard SV gel and PCR clean-up system (Promega, Madison, WI, Estados Unidos), con el fin de eliminar la enzima de restricción y el buffer utilizados durante la digestión. La concentración del estándar se determinó por fluorimetría tal como se indicó en la sección 2.4.3. Dicha concentración además fue confirmada por electroforesis en gel de agarosa 0,8% (p/v) utilizando el marcador de peso molecular High DNA Mass[™]Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos). El número de copias/ μ l de estándar fue calculado teniendo en cuenta el tamaño molecular del mismo (4.253 pb) y asumiendo un peso molecular de 660 Da por cada par de bases, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Núm. de copias}/\mu\text{l} = \frac{\text{Concentración de ADN del estándar (g}/\mu\text{l}) \times 6,022,10^{23}}{\text{Tamaño molecular (pb) x 660 Da}}$$

Se realizó una dilución del estándar hasta obtener una concentración de 10^9 copias de estándar/ μ l. A partir de esta solución se llevaron a cabo diluciones seriadas cubriendo un rango de 10^7 copias por

reacción hasta 5 copias, con el objetivo de realizar las curvas de calibración utilizadas para estimar la abundancia de los genes blanco del ensayo de forma relativa al estándar.

2.6.3. Optimización de los ensayos de qPCR

Las amplificaciones realizadas tanto para la optimización de las reacciones de qPCR como para la estimación de la abundancia de genes de la variante T se llevaron a cabo en un termociclador Chromo4 (BioRad, Hercules, CA, Estados Unidos) en un volumen final de reacción de 20 μ l. El programa de amplificación consistió en un paso inicial de desnaturalización de 5 min a 95°C y 45 ciclos de: 30 seg a 95°C, 30 seg a la temperatura de hibridación de los cebadores y 30 seg a 72°C, realizando una lectura de fluorescencia en cada ciclo. Se utilizó la mezcla de reacción comercial *PerfeCTa*[®] Green Supermix (Quanta BioSciences, Inc., Gaithersburg, MD, Estados Unidos).

2.6.3.1. Optimización de la temperatura de hibridación

Para determinar la temperatura óptima de hibridación de los cebadores, se realizó una reacción de qPCR en la cual se programó un gradiente de temperatura que varió entre 50 y 60°C en el paso de hibridación de los cebadores. Para ello se utilizó una mezcla de reacción conteniendo 1X de mezcla comercial *PerfeCTa*, 600 nM de cada cebador (ARHD-T-f/ARHD-T-r), 1 μ l de agua de calidad biología molecular (Gibco, Invitrogen) y 5 μ l de templado por tubo de reacción en dos concentraciones diferentes de ADN metagenómico de la muestra OR07 (2,5 y 5 ng de ADN/tubo de reacción). Se evaluó además, la amplificación del estándar en una única concentración (10^6 copias por tubo de reacción) para cada temperatura testada. Con respecto al control negativo de la reacción de amplificación, se reemplazó el templado por agua de calidad biología molecular (Gibco). En este caso, sólo se evaluó su amplificación en la condición de menor temperatura de hibridación.

2.6.3.2. Optimización de la concentración de los cebadores

La concentración óptima de los cebadores para la cuantificación de genes correspondientes a la variante T se determinó a partir de las distintas combinaciones posibles de concentraciones de cada uno de los cebadores (600 nM y 900 nM) utilizando 2,5 ng de ADN de OR07 como templado. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo con el programa mencionado en la sección 2.6.3 utilizando en cada ciclo de amplificación una temperatura de hibridación de 50°C. En el control positivo de reacción se utilizaron 10^6 copias de estándar como templado. Para el control negativo, se utilizó agua de calidad biología molecular en lugar del templado. En ambos controles sólo se evaluaron dos combinaciones de cebadores (600 nM ARDH-T-f/600 nM de ARHD-T-r y 900 nM ARHD-T-f/900 nM ARHD-T-r).

2.6.3.3. Concentración óptima de templado

La concentración de templado fue optimizada utilizando tres concentraciones de ADN metagenómico de cada muestra (2,5, 5 y 7,5 ng), las condiciones descritas en la sección 2.6.3 y una temperatura de hibridación de los cebadores de 56°C. A fin de evaluar el posible efecto inhibitorio del templado sobre las reacciones de amplificación, se compararon los valores de abundancia relativa de los genes blanco por microgramo de ADN para las tres concentraciones de templado evaluadas. Para la estimación de la abundancia de los genes blanco en las muestras ambientales se seleccionó la concentración de templado que presentó la menor inhibición.

2.6.4. Especificidad de los fragmentos de genes amplificados

Con el fin de verificar la especificidad de los productos de reacción generados durante la cuantificación del gen blanco, se analizaron las curvas de desnaturalización y se realizaron corridas electroforéticas en geles de agarosa.

2.6.4.1. Curvas de desnaturalización

La temperatura de desnaturalización (T_m) para cada muestra se analizó en un gráfico en el que se representó $\frac{-dI}{dT}$ (donde dI es la derivada primera de la intensidad de la fluorescencia y dT es el cambio de la temperatura) en función de la temperatura. Se compararon las T_m obtenidas a partir de las reacciones de qPCR de los estándares con las T_m observadas en las muestras ambientales.

2.6.4.2. Electroforesis en geles de agarosa

Los productos de amplificación de las muestras ambientales y de los estándares se sembraron en geles de agarosa al 2,5 % (p/v) en buffer TBE 0,5X para realizar una corrida electroforética a 70V. Los amplicones se visualizaron luego de la electroforesis mediante la tinción del gel con solución 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de bromuro de etidio. El tamaño molecular de los productos de qPCR de las muestras se comparó con el tamaño observado en los estándares.

2.6.5. Estimación de la abundancia de genes correspondientes a la variante T

En la amplificación de genes de la variante T de dioxigenasas se utilizaron las concentraciones óptimas de templado y cebadores establecidas durante la puesta a punto del ensayo. Las reacciones de qPCR se realizaron en el termociclador Chromo4 con un programa de amplificación que consistió en

un paso inicial de desnaturalización de 5 min a 95°C, seguido por 45 ciclos de 30 seg a 95°C, 30 seg a 56°C, 30 seg a 72°C y un paso de detección de fluorescencia. Luego de finalizado el programa de amplificación, se realizaron curvas de desnaturalización cubriendo un rango de temperaturas de 70 a 95°C con lecturas realizadas a intervalos de 0,2°C. La amplificación y cuantificación de cada muestra ambiental fue realizada por cuadruplicado. Junto con dichas muestras, también se amplificó el estándar en un rango de 10⁸ a 5 copias iniciales por reacción. Además, se incluyó un blanco de reacción. Los registros de fluorescencia obtenidos fueron representados como el logaritmo de la fluorescencia en función del ciclo de amplificación. Se determinó de manera manual la línea de base o *threshold*, y se calculó el número de copias por reacción del gen a partir de la curva de calibración. Luego, a partir de las copias del gen blanco/tubo de reacción se calcularon las copias del gen blanco/ μ g de ADN. Las réplicas de cada muestra fueron utilizadas para el calcular la media y el desvío estándar en cada determinación.

Además de las réplicas, y con el objetivo de evaluar el efecto inhibitorio del templado sobre las reacciones de amplificación, se realizó una reacción de qPCR adicional por cada muestra utilizando como templado 2,5 ng de ADN y 10⁶ copias de estándar por tubo. En base al número de copias iniciales del estándar presente en dicha reacción, se calculó el porcentaje de inhibición observado en presencia de la muestra ambiental, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhib} = 100 - \frac{\text{Copias del gen/tubo de reacción}}{10^6 \text{ copias de estándar/tubo}} \times 100$$

Tanto la eficiencia de las reacciones de amplificación como el límite de detección y la linealidad del ensayo se determinó a partir de las curvas de calibración, como se indica en la sección 3.2.3.

2.7. Construcción de la biblioteca metagenómica

La construcción de la biblioteca metagenómica se realizó utilizando el kit CopyControlTMHTP Fosmid Library Production Kit (Epicentre Biotechnologies, Madison, WI, Estados Unidos). Previo al clonado del ADN, se llevaron a cabo los controles de ligación y de eficiencia de empaquetado, tal como lo sugiere el fabricante del kit para verificar que las células, extracto de empaquetado y reactivos se encuentren en buenas condiciones.

2.7.1. Preparación del ADN metagenómico

El ADN metagenómico extraído utilizando el método manual (sección 2.4.1) fue reparado siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante, a fin de generar insertos de extremos romos fosforilados

en el extremo 5'. Luego de una corrida electroforética en gel de agarosa de bajo punto de fusión (Genbio-tech) al 0,85 % (p/v) en buffer TAE 1X durante 19 horas a 43 V, los fragmentos reparados del tamaño adecuado (aproximadamente 40 kb) fueron extraídos del gel. Para ello, el sector correspondiente a la banda de interés no fue teñido ni expuesto a la radiación UV. La posición de los fragmentos del tamaño deseado fue estimada en base a la tinción de otra sección del mismo gel conteniendo parte de la muestra, el marcador de peso molecular y el fósido control de 42 kb. El ADN seleccionado fue purificado a partir del fragmento del gel mediante una reacción enzimática con gelasa (GELaseTMEpicentre Biotechnologies, Madison, WI, Estados Unidos), recuperando el ADN por precipitación de acuerdo a las instrucciones del fabricante del kit de construcción de la biblioteca metagenómica con la siguiente modificación: el ADN fue precipitado durante 8 hs a -20°C, en lugar de 10 min a temperatura ambiente. La concentración del ADN recuperado fue determinada por fluorometría, y el tamaño de los fragmentos purificados se corroboró mediante electroforesis.

2.7.2. Reacciones de ligación y empaquetado, infección de células EPI300-T1[®] y titulación de los clones generados

El ADN reparado y purificado fue ligado al vector de clonado pCC2FOSTM. Los fósidos generados fueron incubados con el extracto de empaquetado del fago lambda de acuerdo a las instrucciones del fabricante del kit, con la siguiente modificación: al finalizar la segunda incubación con el extracto de empaquetado, se agregaron 100 μ l de buffer PDB y 5 μ l de cloroformo [Taupp et al., 2009]. Se mezclaron 125 μ l de los fagos empaquetados y 5 ml de células EPI300-T1[®] incubando a 37°C durante 1 hora. Seguidamente, se realizó la titulación de los clones obtenidos en medio sólido LB/Cm, sembrando 50 y 10 μ l (por duplicado) de células infectadas e incubando a 37°C hasta observar formación de colonias. El resto de las células se centrifugó durante 10 min a 3.500 x g, se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 1 ml de medio LB conteniendo 20 % (v/v) de glicerol. Alícuotas de 100 μ l de células resuspendidas se colocaron en tubos crioviales de 2 ml y se almacenaron a -80°C hasta generar la biblioteca amplificada (sección siguiente).

2.7.3. Conservación de la biblioteca metagenómica

En base al título de la biblioteca metagenómica, se plaquearon volúmenes de células infectadas en medio LB/Cm de forma tal de obtener aproximadamente 100 clones por placa. Las colonias crecidas en cada placa fueron resuspendidas en 1 ml de medio LB + 20 % (v/v) de glicerol. Cada resuspensión, representando grupos de 100 clones replicados, se colocó en tubos de 2 ml para ser almacenados a -80°C. Esta manera de almacenar la biblioteca metagenómica permite evitar pérdidas de los clones obtenidos.

2.8. Identificación de los clones de interés a partir de la biblioteca metagenómica

2.8.1. Ensayos moleculares

2.8.1.1. Controles

Dado que se decidió realizar amplificaciones a partir de suspensiones celulares de los clones de la biblioteca metagenómica, como control positivo se evaluó la amplificación a partir de células de *E. coli* DH5 α conteniendo el plásmido pCR 4.0-TOPO[®] con el inserto AcOR06-6, el cual corresponde a un fragmento de un gen de dioxigenasa. Para ello, se prepararon cultivos líquidos de este clon en medio LB/Km. Luego de la incubación durante 12 h a 37°C, se realizó la titulación de la suspensión celular obtenida. Teniendo en cuenta que el número de copias del plásmido pCR 4.0-TOPO[®] puede variar entre 500 y 700 copias por célula, se realizaron las diluciones correspondientes hasta obtener una suspensión celular conteniendo aproximadamente 10⁴ plásmidos/ μ l. Dichas diluciones se llevaron a cabo con células generadas en el control de ligación del kit CopyControl[™] HTP Fosmid Library Production a fin de evaluar posibles inhibiciones al utilizar suspensiones celulares en las reacciones de PCR en lugar de ADN purificado. Este control sería equivalente a un clon de la biblioteca metagenómica conteniendo el gen de interés en una mezcla de 100 clones amplificados. 5 μ l de células control lavadas con agua destilada estéril (conteniendo aprox. 10⁵ copias de plásmidos) se utilizaron como templado en una mezcla de reacción de 25 μ l compuesta por 1X de buffer de enzima polimerasa, 1,5mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 2 μ M y 0,5 μ M de cebadores Nah-for y Ac596r, respectivamente (o 0,6 μ M de cada cebador ARHD-D-f/ARHD-D-r) y 1 U de ADN polimerasa T-PLUS. El programa de amplificación consistió en un paso inicial de 15 min a 95°C, seguido de 44 ciclos de 30 seg a 95°C, 30 seg a 59°C y 30 seg a 72°C, en el caso de utilizar cebadores ARHD-D-F/ARHD-D-R; o 40 ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg a 54°C y 30 seg a 72°C (para los cebadores Nah-for/Ac596R). En ambos casos se agregó un paso final de incubación a 72°C durante 15 min.

De igual manera, se evaluaron mezclas de reacción conteniendo 5 μ l de células lavadas representando 10⁴, 10³, 10² y 10 copias de plásmidos por tubo de amplificación a fin de determinar el límite de detección de la técnica. Los productos de amplificación obtenidos con los cebadores Nah-for/Ac596r se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1,5% (p/v) y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio. Aquellos amplicones generados a partir de los cebadores ARHD-D-F/ARHD-D-R se analizaron de forma similar, pero utilizando geles de agarosa al 2,5%.

2.8.1.2. Ensayos de PCR

Se tomaron 50 μl de cada grupo de 100 clones amplificados (sección 2.7.3), se centrifugaron durante 10 min a velocidad máxima en microcentrífuga y el precipitado celular obtenido fue resuspendido en 25 μl de agua destilada estéril. 5 μl de cada suspensión celular fue utilizado en las reacciones de amplificación que incluyeron el set de cebadores correspondiente. Las mezclas de reacción, así como los programas de amplificación, fueron los descritos en la sección anterior. A partir de cada grupo de clones en los que se observó la amplificación de fragmentos del tamaño esperado, se generaron subgrupos de 30 clones por placa en medio sólido LB/Cm, los cuales fueron resuspendidos en 1 ml de solución fisiológica al 0,85 % (p/v) estéril. Las suspensiones celulares de estos subgrupos fueron analizadas de igual manera que las suspensiones obtenidas a partir de los grupos de 100 clones amplificados. Dado que previamente a la resuspensión de los clones pertenecientes a cada subgrupo se realizaron réplicas de los mismos, pudieron ser analizados de forma individual (mediante PCR a partir de una colonia), luego de identificar productos de amplificación del tamaño esperado en el subgrupo correspondiente. Los clones individuales que dieron lugar a amplicones del tamaño deseado fueron aislados y almacenados a -80°C en medio LB/Cm conteniendo glicerol al 20 % (v/v).

2.8.2. Estrategia funcional

A partir de las suspensiones celulares de cada uno de los grupos de clones amplificados (sección 2.7.3) se realizaron diluciones en solución fisiológica estéril de manera tal de obtener aproximadamente 300 clones por placa de petri conteniendo medio LB/Cm sólido suplementado con arabinosa al 0,01 % (p/v). Se cultivaron seis placas por cada grupo de clones, tres para ser utilizadas en la detección de actividad naftaleno dioxigenasa y el resto para el análisis de actividad extradiol dioxigenasa (EXDO):

2.8.2.1. Actividad naftaleno dioxigenasa

Los clones de la biblioteca metagenómica fueron incubados 24 hs en medio sólido a 37°C y, luego de la incubación se agregaron cristales de indol en la tapa de las placas. Las placas fueron incubadas durante 15 días a temperatura ambiente al resguardo de la luz. Para aislar los clones con actividad dioxigenasa, se realizaron diluciones de los grupos de clones a los que pertenecían y se plaquearon 100 μl de la dil. 10^{-5} en medio LB/Cm sólido, incubando a 37°C durante 24 hs (placas madre). Los clones crecidos fueron replicados en medio LB/Cm sólido suplementado con arabinosa y se agregaron cristales de indol luego de la incubación a 37°C durante 24 hs, incubando nuevamente al resguardo de la luz durante 15 días a temperatura ambiente. Se analizaron tantos clones como fuera necesario hasta encontrar el clon de interés. Aquellos que mostraron actividad enzimática fueron identificados

en las placas madres y aislados a partir de ellas para luego ser cultivados en 3 ml de medio LB/Cm a 37°C durante 12 hs. (ON) con agitación (250 rpm). Una alícuota de dichos cultivos se almacenó en glicerol al 20 % (v/v) a -80°C para análisis posteriores.

2.8.2.2. Actividad extradiol dioxigenasa

Los clones de la biblioteca metagenómica fueron sembrados en sólido (LB/Cm con arabinosa) e incubadas durante 36 hs a 37°C. Luego de la incubación, las colonias fueron rociadas bajo campana de extracción con solución de catecol al 1 % (p/v) esterilizada por filtración mediante filtros con tamaño de poro de 0,2 μm , dejando actuar durante unos minutos. Los clones que mostraron coloración amarilla fueron aislados directamente en medio sólido LB/Cm y posteriormente cultivados en medio LB/Cm líquido para su almacenamiento, tal como se describió en las secciones anteriores.

2.9. Análisis de los fragmentos de ADN

2.9.1. Control de calidad de los fósmidos

Para la digestión de los fósmidos, se utilizó 1 μg de ADN fosmídico al cual se adicionaron 0,5 μl de enzima EcoRI o NotI (Promega, Madison, WI, Estados Unidos), de acuerdo a las instrucciones del proveedor. En ambos ensayos se incubó a 37°C durante 4 horas, y los fragmentos de restricción obtenidos se analizaron por medio de su electroforesis en geles de agarosa al 0,7 % (p/v) en buffer TBE 0,5 X durante 14 hs a 44 V.

Para estimar la cantidad de ADN cromosomal de *E. coli* presente en el extracto fosmídico, se realizaron reacciones de qPCR teniendo como blanco a genes ARNr 16S bacterianos, utilizando los cebadores 16S-1055f y 16S-1392r indicados en la tabla 2.1. El programa de amplificación consistió en la incubación a 95°C durante 5 min y 44 ciclos de: 30 seg a una temperatura de 95°C, 30 seg a 50°C y 30 seg a 72°C, realizando una lectura de fluorescencia en cada ciclo. Se utilizó la mezcla de reacción comercial *PerfeCTa*[®] Green Supermix (Quanta BioSciences, Inc., Gaithersburg, MD, Estados Unidos).

2.9.2. Secuenciación de los fósmidos

Los fósmidos seleccionados fueron secuenciados de forma individual mediante la plataforma de secuenciación 454-Roche en el Instituto de Agrobiotecnología Rosario (INDEAR, Rosario, Argentina). Las lecturas generadas fueron ensambladas utilizando diferentes programas: WGS v7.0 y Newler v2.6.

Se seleccionó el mejor ensamblado en base a la comparación estadística de los resultados obtenidos con cada uno de estos programas. A partir del ADN ensamblado se eliminó manualmente la secuencia del vector.

2.9.3. Predicción de marcos abiertos de lectura y anotación funcional de las secuencias identificadas

Los fragmentos ensamblados fueron analizados con dos sistemas integrales de predicción y anotación automática: ISGA (Integrative Services for Genomic Analysis, <http://isga.cgb.indiana.edu>) y RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology, <http://rast.nmpdr.org>). El programa FgeneB [<http://linux1.softberry.com/>] fue utilizado posteriormente para corroborar las predicciones de los marcos abiertos de lectura realizadas por los sistemas automáticos de predicción. La longitud de cada uno de los genes identificados se comparó con sus genes ortólogos utilizando la herramienta tblastx del NCBI [www.ncbi.nlm.nih.gov/]. En los casos en que se observó superposición de marcos abiertos de lectura de más de 60 nucleótidos y gran diferencia en la longitud de los genes predichos respecto de los genes ortólogos, se realizó una corrección manual de los mismos teniendo en cuenta los criterios mencionados por Palleja y colaboradores [Pallejà et al., 2008] para evitar errores de anotación. Las secuencias de aminoácidos correspondientes a los genes identificados se compararon con la base de datos de GenBank utilizando la herramienta blastp. Para verificar la presencia de sitios conservados y estimar la función de las secuencias detectadas, las secuencias deducidas de aminoácidos se compararon con las bases de datos del sistema para análisis y clasificación de secuencias de proteínas, InterPro [www.ebi.ac.uk/interpro/], y con la base de datos KEEG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes database, [www.genome.jp/kegg]).

2.9.4. Análisis filogenéticos

El alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las enzimas oxigenasas identificadas se realizó mediante el programa ClustalW, utilizando la matriz BLOSUM y aplicando valores predefinidos en los parámetros restantes. En estos alineamientos también se incluyeron secuencias de referencia pertenecientes a la subunidad alfa de enzimas RHO, o pertenecientes a enzimas extradiol dioxigenasas, según el análisis correspondiente. En el caso del alineamiento de las secuencias deducidas de aminoácidos identificadas a partir de la biblioteca de productos de amplificación, se incluyeron las secuencias correspondientes a la subunidad alfa de enzimas RHO de compuestos aromáticos con mayores porcentajes de identidad obtenidas de la base de datos del GenBank. En cuanto al alineamiento de las secuencias de enzimas RHO identificadas en la biblioteca metagenómica, se incluyeron secuencias de referencia que habían sido previamente clasificadas [Chakraborty et al., 2012]. Para el alineamiento de

las secuencias de enzimas extradiol dioxigenasas (EXDO) se seleccionaron secuencias representativas de cada subfamilia de enzimas EXDO [Vilchez-Vargas et al., 2013]. En el caso de las secuencias que presentaron más del 99 % de identidad, sólo se seleccionó una secuencia para los análisis filogenéticos. La construcción de los árboles filogenéticos se realizó con el programa MEGA 5.2 [Tamura et al., 2011] utilizando el método *Neighbour Joining* (NJ) en base a 1.000 repeticiones.

2.9.5. Estimación del origen de los fragmentos clonados

La asignación taxonómica de cada una de las secuencias codificantes fue realizada utilizando el programa MEGAN (MEtaGenome ANalyzer, [Huson et al., 2007]) utilizando los siguientes parámetros: *min-score=100*, *min-support=3*, *top-percent=10*, *win-score=0*, *min-complexity=0.44*. Este programa permite, mediante una búsqueda por similitud, asignar el origen filogenético de un fragmento de ADN en base al algoritmo LCA (del inglés Lowest Common Ancestor). Adicionalmente, se comparó la secuencia completa de los insertos fosmídicos utilizando la base de datos de genomas bacterianos de GenBank [www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank] y la herramienta *blastn* para encontrar secuencias de nucleótidos similares en genomas caracterizados.

Capítulo 3

CARACTERIZACIÓN DE GENES BIOMARCADORES RELACIONADOS CON LA DEGRADACIÓN DE HAPs EN SEDIMENTOS SUBANTÁRTICOS

3.1. Introducción

La identificación de genes involucrados en la degradación de hidrocarburos aromáticos en una biblioteca metagenómica dependerá en gran medida de la presencia y abundancia de microorganismos conteniendo dichos genes en la muestra utilizada para su construcción. Es decir, del potencial degradativo de la comunidad microbiana. Es por esto que, en la elección de la muestra, no sólo es importante tener en cuenta el tipo de ambiente a analizar, sino también que la muestra seleccionada a partir de este ambiente se encuentre enriquecida con los genes de interés.

El potencial de una comunidad microbiana para degradar HAPs, utilizando métodos independientes del cultivo, es estimado frecuentemente a partir del análisis de los genes codificantes para la subunidad alfa de enzimas RHO que participan del primer paso de la ruta degradativa de HAPs [Cébron et al., 2008, Lozada et al., 2008, Marcos et al., 2009]. Los métodos basados en la amplificación de fragmentos de dichos genes han sido empleados en varios estudios a fin detectar y cuantificar estos genes en muestras provenientes de ambientes marinos [Dionisi et al., 2011, Gallego et al., 2014, Marcos et al., 2012, Wongwongsee et al., 2013]. No obstante, debido a la gran diversidad de genes codificantes para dichas enzimas [Chakraborty et al., 2012] los resultados obtenidos mediante estos ensayos dependen principalmente de los cebadores seleccionados de acuerdo al objetivo de estudio [Iwai et al., 2011, Lozada et al., 2008, Marcos et al., 2009]. Cebadores muy específicos en general permiten la amplificación de fragmentos de genes pertenecientes a una variante particular de este gen [Cébron et al., 2008, Iwai et al., 2011]. Ejemplo de ello es el par de cebadores Cyc372F/Cyc854R diseñado por Lozada y colaboradores [Lozada et al., 2008], a partir de los cuales sólo se generaron amplicones con alto porcentaje de identidad (98,6-100% a nivel de aminoácidos) respecto de los genes *phnA1*, correspondientes a la subunidad α de enzimas RHO identificadas en cepas pertenecientes al género

Cycloclasticus. Por otro lado, la utilización de cebadores de amplia cobertura, es decir aquellos capaces de amplificar diferentes alelos del gen blanco, generalmente posibilitan la identificación de una mayor diversidad de genes de interés [Iwai et al., 2011, Lozada et al., 2008, Marcos et al., 2009].

El empleo de cebadores de amplia cobertura (Ac114f/Ac596r, [Wilson et al., 1999]) en el análisis de poblaciones degradadoras presentes en sedimentos intermareales de Bahía Ushuaia (cerca de la planta de almacenamiento de combustibles Planta Orión), permitió detectar, además de genes *nahAc* arquetípicos de *Pseudomonas*, cinco variantes novedosas de genes de dioxigenasas (denominadas A a E, [Lozada et al., 2008]). Demostrando que los genes relacionados con aquellos utilizados en el diseño de estos cebadores (genes *nahAc*), sólo representan una parte de la diversidad de genes de dioxigenasas presentes en este ambiente. Por otro lado, se observó que la proporción de genes novedosos detectados en muestras obtenidas entre los años 2004 a 2006 no era uniforme, sino que incrementaba [Lozada et al., 2008]. Estos resultados permitieron hipotetizar que dicha tendencia podría continuar si se extendía la serie temporal. En el presente capítulo se analizaron muestras de sedimentos del mismo sitio obtenidas en años posteriores, a fin de testear dicha hipótesis. Para ello, se utilizó la misma metodología empleada en el trabajo de Lozada y colaboradores, la cual consistió en la amplificación y clonado de fragmentos de los genes de interés utilizando los mismos cebadores (Ac114f/Ac596r). Además, se evaluó la presencia de otras variantes de genes RHO modificando uno de los cebadores utilizados para la construcción de las bibliotecas de amplificación. Asimismo, se diseñó un ensayo de qPCR con el objetivo de confirmar la abundancia relativa en sedimentos intermareales de uno de los genes identificados.

La información obtenida resulta de gran importancia para realizar una estimación sobre las variantes de enzimas RHO presentes en sedimentos intermareales de Bahía Ushuaia (Planta Orión), y para seleccionar la muestra más adecuada para la construcción de la biblioteca metagenómica. Más aún, permitirá seleccionar los cebadores que serán utilizados para identificar, mediante ensayos moleculares basados en reacciones de amplificación, genes de interés en dicha biblioteca metagenómica.

3.2. Resultados

3.2.1. Identificación de genes biomarcadores en sedimentos intermareales de Bahía Ushuaia

Con el objetivo de evaluar el potencial para degradar HAPs que posee la comunidad microbiana presente en sedimentos de Bahía Ushuaia, se amplificaron fragmentos de genes codificantes para la subunidad alfa del componente catalítico de enzimas RHO. Para ello se utilizó ADN metagenómico y

diferentes pares de cebadores de amplia cobertura, uno de ellos (Ac114f/Ac596r) había sido previamente utilizado en la detección de genes de dioxigenasas a partir de muestras de sedimentos intermareales de dicho sitio. Se analizaron muestras de sedimentos obtenidas entre los años 2006 y 2008, tomadas en cercanías de la planta de combustibles Orión (OR06, OR07 y OR08). Los amplicones generados se utilizaron para la construcción de bibliotecas de productos de amplificación. El análisis de las mismas se describe a continuación.

3.2.1.1. Biblioteca de productos de amplificación construida mediante el par de cebadores Ac114f/Ac596r

El ADN metagenómico extraído a partir de la muestra OR07 fue utilizado para la construcción de una biblioteca de productos de amplificación. Se obtuvieron un total de setenta y seis clones, los cuales fueron analizados por medio del polimorfismo de la longitud de sus fragmentos de restricción (RFLP), detectándose tres variantes génicas diferentes. Los patrones de restricción de las mismas coincidieron con los patrones obtenidos a partir de las variantes de dioxigenasas B, C y *nahAc* de *P. putida* (Figura 3.1a) previamente identificadas en sedimentos intermareales cercanos a Planta Orión [Lozada et al., 2008]. Clones representativos de cada patrón de restricción fueron elegidos para la secuenciación de su inserto a fin de confirmar su identidad. El análisis de las secuencias utilizando el algoritmo blastx y la base de datos de GenBank (colección de nucleótidos no redundantes) permitió confirmar que dichos clones contenían fragmentos de genes codificantes para la subunidad alfa de enzimas RHO. Más aún, la secuencias deducidas de aminoácidos alinearon de manera significativa (Figura 3.2 y Tabla 3.1) con secuencias correspondientes a las variantes B, C y *nahAc* descritas anteriormente, mostrando un alto porcentaje de identidad (99-100% a nivel de aminoácidos). En la figura 3.1b se muestran las abundancias relativas de las tres variantes génicas identificadas en la muestra OR07, siendo la variante *nahAc* de *P. putida* la que se encontró en mayor proporción.

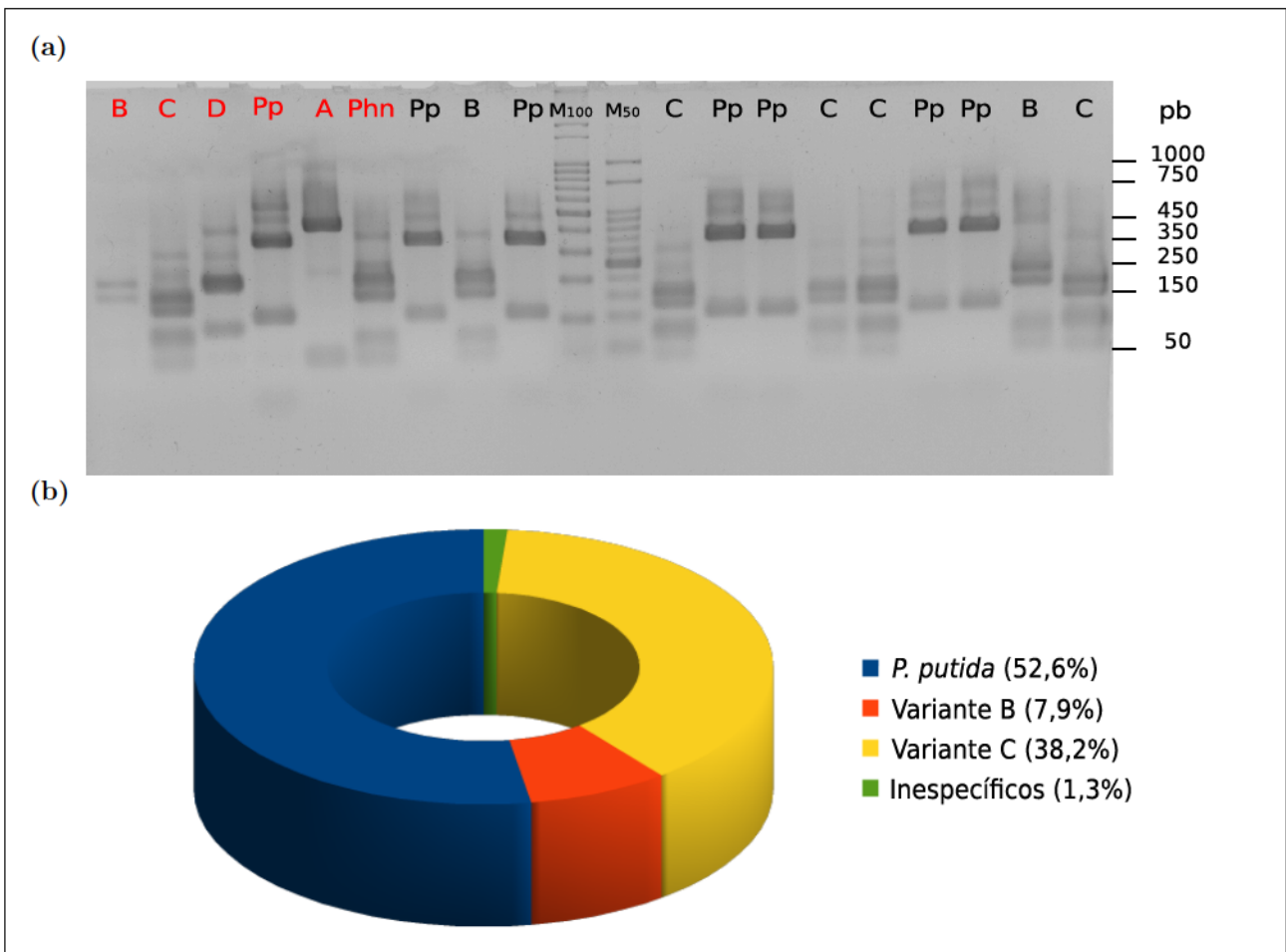


Figura 3.1: Variantes de genes de enzimas RHO identificadas en la muestra OR07 mediante el clonado de productos de amplificación obtenidos con los cebadores Ac114f/Ac596r. a): ejemplo de una de las corridas electroforéticas en gel de agarosa al 2,5 % de patrones de RFLP. En rojo, patrones tipo de las variantes A a D, *nahAc* (Pp) y *phnAc* (Phn); en negro, variantes identificadas en OR07. b): porcentaje de clones de las diferentes variantes en base al total de clones obtenidos.

Tabla 3.1: Variantes de enzimas RHO identificadas en las bibliotecas de productos de amplificación

| Variante | Longitud de secuencia (pb) | Homólogo más cercano ¹ | % cob ² | % id ³ | N° acceso |
|--------------|----------------------------|--|--------------------|-------------------|---------------|
| C | 449 | Dioxigenasa de anillos aromáticos (microorg. no cultivado) | 99 | 99 | CAP60615 |
| | | Naftaleno 1,2-dioxigenasa (<i>Nevskia ramosa</i>) | 98 | 60 | WP_022978279 |
| B | 443 | Dioxigenasa de anillos aromáticos (microorg. no cultivado) | 99 | 100 | CAP60614 |
| | | Subunidad α de HAP dioxigenasa (<i>Cycloclasticus</i> sp. P1) | 99 | 61 | ABF56510 |
| <i>nahAc</i> | 446 | Dioxigenasa de anillos aromáticos (microorg. no cultivado) | 99 | 99 | CAP60646 |
| | | Naftaleno-1,2-dioxigenasa (<i>Pseudomonas fluorescens</i>) | 99 | 99 | ABS29618 |
| E | 257 | Dioxigenasa de anillos aromáticos (microorg. no cultivado) | 98 | 85 | CAP60623 |
| | | Naftaleno 1,2-dioxigenasa (<i>Polycyclovorans algicola</i> TG408) | 98 | 84 | WP_029889175 |
| T | 260 | Dioxigenasa de anillos aromáticos (microorg. no cultivado de suelo, Chambery, Francia) | 98 | 59 | CCG9776 |
| | | Dioxigenasa de anillos aromáticos (<i>Cycloclasticus</i> sp. P1) | 96 | 67 | YP_0068837517 |
| U | 245 | Prot. con dominio 2Fe-2S (<i>Frankia</i> sp. BMG5.12) | 96 | 61 | WP_01863789 |

1: Si la secuencia con puntaje máximo pertenece a un microorganismo no cultivado, también se indica la proteína homóloga correspondiente al microorganismo cultivable más cercano.
2: Porcentaje de cobertura.
3: Porcentaje de identidad.

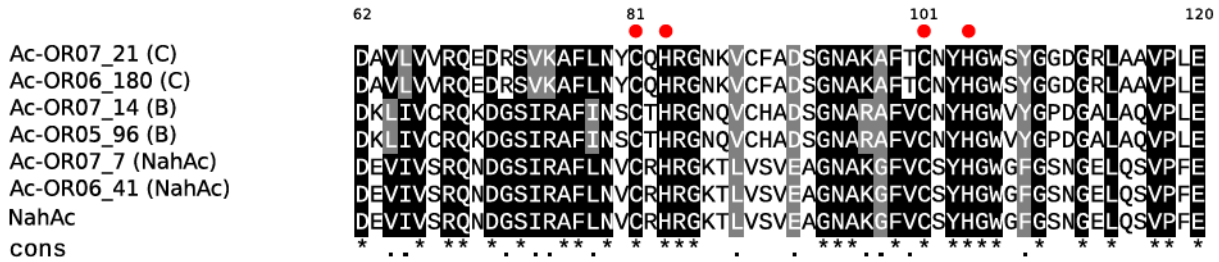


Figura 3.2: Alineamiento de secuencias de aminoácidos deducidas a partir de las secuencias obtenidas. Se muestra una región de las secuencias representativas de cada variante identificada en la muestra OR07: AcOR07-21 (C), AcOR07-14 (B) y AcOR07-7 (NahAc), seguida de una secuencia representativa de la misma variante previamente detectada en Planta Orión: AcOR06-180 (C), AcOR05-96 (B) y AcOR06-41 (NahAc). La numeración en la parte superior indica la posición de los residuos de aminoácidos respecto de la secuencia NahAc de *P. putida* NCIB9816-4. La secuencia consenso (cons) está representada por asteriscos, los cuales muestran las posiciones conservadas; y por puntos, indicando sitios similares. Los círculos rojos sobre las secuencias indican los residuos conservados de cisteína e histidina del centro de coordinación Rieske perteneciente a la subunidad alfa de enzimas RHO

3.2.1.2. Amplificación de genes de enzimas RHO utilizando el par de cebadores Nah-for/Ac596r

Debido a que el par de cebadores Ac114f/Ac596r genera alta proporción de productos de amplificación relacionados con genes codificantes para la subunidad alfa de dioxigenasas de *Pseudomonas* y a que en la muestra OR07 se identificaron variantes génicas de enzimas RHO ya descritas, se decidió evaluar la especificidad y cobertura de otros cebadores de amplia cobertura: DP1 Rieske/Ac596r, Nah-for/Ac596r y Ac596rc/NAPH-2R. El par Nah-for/Ac596r fue el único que produjo amplicones del tamaño esperado (aproximadamente 300 pb), observándose además una menor proporción de amplificación inespecífica.

Optimización de las condiciones de amplificación utilizando los cebadores Nah-for/Ac596r.

Para determinar temperatura óptima de hibridación de los cebadores Nah-for/Ac596r, se realizaron reacciones de PCR utilizando un gradiente de temperatura de 40°C a 58°C. También se evaluaron diferentes cantidades de templado (1 y 10 ng de ADN de OR07/reacción), con el objetivo de observar posibles inhibiciones de la reacción de PCR producidas por el ADN metagenómico. Como puede verse en la figura 3.3, se obtuvieron productos de amplificación del tamaño esperado en todas las temperaturas evaluadas, usando tanto 1 ng como 10 ng de ADN. En la mayoría de las reacciones también se observó amplificación inespecífica de fragmentos de ADN de diferente peso molecular, la cual disminuyó con temperaturas de apareamiento más elevadas. Si bien a 54°C (utilizando 10 ng de ADN como templado) y a 58°C (1 y 10 ng de ADN) se observó una menor cantidad de productos inespecíficos, se decidió utilizar 54°C como temperatura de hibridación. Temperaturas elevadas no sólo impiden la generación de productos inespecíficos sino también de productos específicos cuando la hibridación de

los cebadores ocurre con algunas bases no apareadas. Por lo tanto, es posible que a 54°C se obtenga una mayor diversidad de los amplicones de interés. Como control positivo de estas reacciones se utilizó un plásmido conteniendo un inserto correspondiente a la variante D de dioxigenasas, variante previamente identificada en sedimentos intermareales cercanos a Planta Orión.

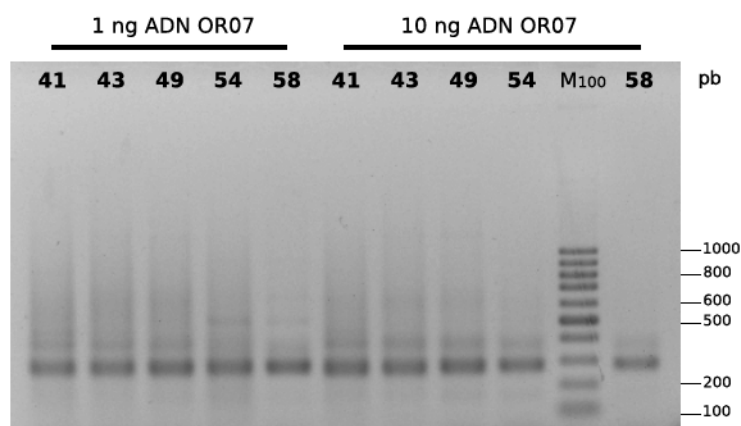


Figura 3.3: Corrida electroforética en gel de agarosa (1,5%) de productos de amplificación generados con los cebadores Nahfor/Ac596r y ADN de proveniente de la muestra OR07. Se evaluaron diferentes temperaturas de hibridación en las reacciones de amplificación (41, 43, 49, 54 y 58°C) en las reacciones de amplificación, utilizando dos concentraciones de templado inicial (1 y 10 ng de ADN). M₁₀₀, marcador de peso molecular.

Construcción y análisis de bibliotecas de productos de amplificación. Una vez determinada la temperatura de hibridación de los cebadores Nah-for/Ac596r, se realizaron reacciones de PCR a partir de ADN metagenómico. Se evaluó ADN proveniente de sedimentos intermareales cercanos a Planta Orión (muestras OR06, OR07 y OR08), así como también de sedimentos correspondientes a un sitio cercano, ubicado entre el muelle comercial y el muelle perteneciente a la Planta de combustibles Orión (muestra EM06, [Lozada et al., 2008]). Todas las muestras generaron amplicones del tamaño esperado. Con el fin de simplificar el análisis, se construyó una biblioteca a partir de una mezcla de dichos productos de amplificación, obteniendo un total de 95 clones. Nueve clones fueron elegidos al azar, y luego de confirmar la presencia del fragmento de interés, se secuenciaron los insertos clonados. Ocho de los nueve insertos pudieron ser secuenciados. Además, se construyó otra biblioteca de productos de amplificación utilizando los cebadores Nah-for/Ac596r y templado proveniente de un sistema experimental en el que a la muestra OR08 se había adicionado petróleo crudo (muestra OR08-O, [Guibert et al., 2012]). Se obtuvieron un total de dieciocho clones, de los cuales ocho fueron analizados a partir de la secuenciación de los insertos clonados.

El análisis de las secuencias obtenidas permitió identificar dos nuevas variantes de genes codificantes para la subunidad alfa de enzimas RHO, las cuales se denominaron variante T y U, siguiendo la nomenclatura utilizada en trabajos anteriores. En total se identificaron nueve secuencias de la variante T, las cuales presentaron una longitud de 260 pb y un 99% a 100% de identidad entre sí a nivel de

aminoácidos. De la variante U sólo fue posible identificar una secuencia de 245 pb de longitud, la cual mostró un 16 % de identidad a nivel de aminoácidos respecto de la variante T (Figura 3.4). A su vez, tanto la variante T como la variante U presentaron, respectivamente, un 45 a 56 % y un 13 a 18 % de identidad a nivel de aminoácidos en relación a las variantes encontradas previamente en sedimentos intermareales de Bahía Ushuaia. Por otro lado, también fue posible detectar, entre las secuencias analizadas, seis secuencias idénticas de 257 pb relacionadas con la variante E descrita por Lozada y colaboradores [Lozada et al., 2008], las cuales compartieron un 85 % de identidad a nivel de aminoácidos.

Con el objetivo de evaluar la relación de las variantes T y U, con las variantes encontradas previamente en este sitio y con secuencias de enzimas RHO identificadas en otros estudios, se realizó un análisis filogenético de las mismas. En la Figura 3.4 puede observarse que la variante T se encuentra relacionada con una enzima RHO identificada en la bacteria *Cycloclasticus* sp. P1 (bacteria marina capaz de utilizar pireno como única fuente de carbono y energía) y con dioxigenasas pertenecientes a la variante D, con las cuales comparte un 67 % y un 56 % de identidad a nivel de aminoácidos, respectivamente (Tabla 3.1). Por otra parte, la variante U forma un clado muy divergente respecto de enzimas RHO previamente identificadas y se encuentra moderadamente relacionada (51 a 61 % de identidad a nivel de aminoácidos) con proteínas que poseen un sitio Rieske y que pertenecen a las cepas *Frankia* sp. BMG5.12, *Sphingobium* sp. AP49 y *Mycobacterium rhodesiae* NBB3 (Figura 3.4, Tabla 3.1).

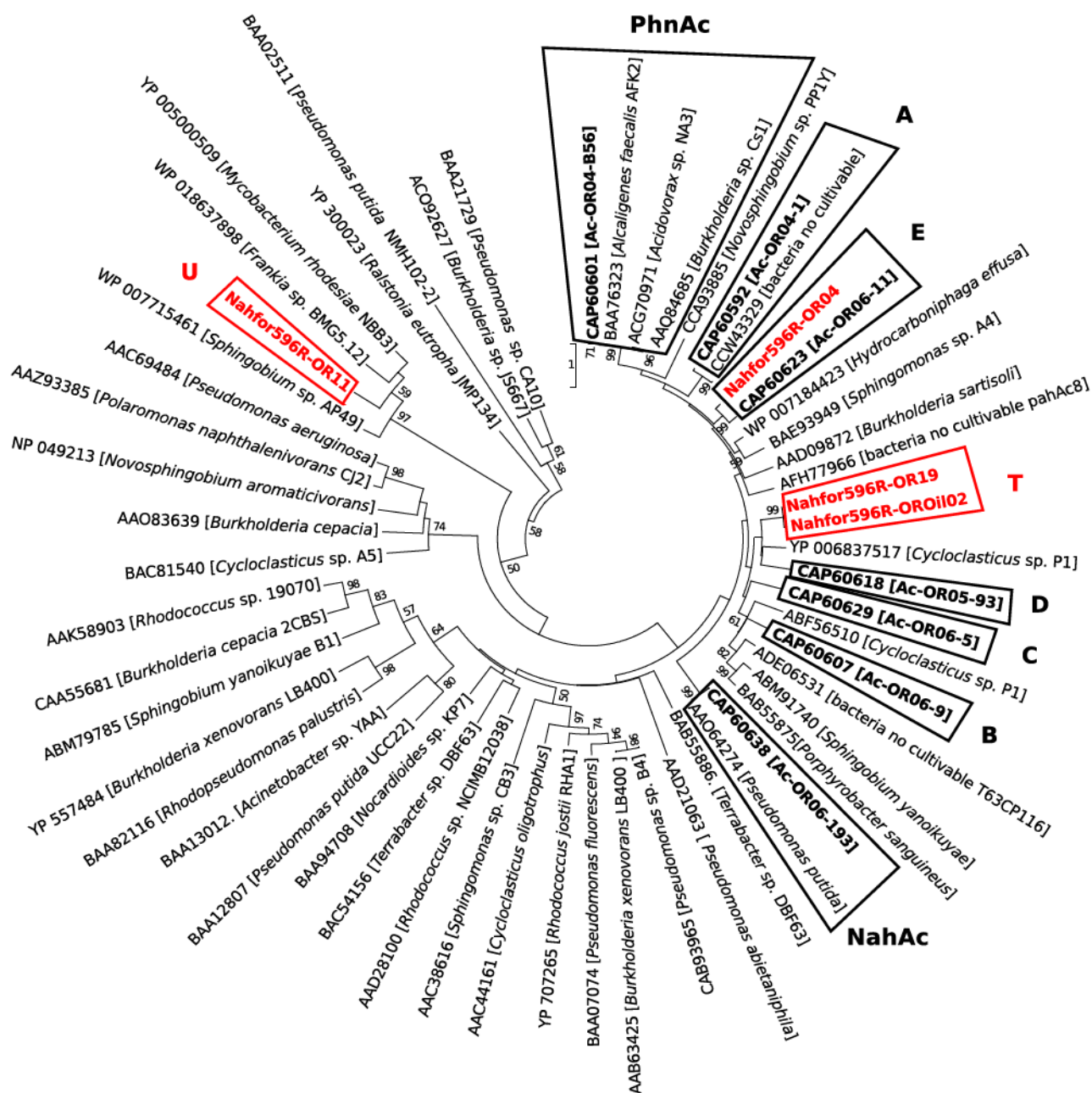


Figura 3.4: Análisis filogenético de las secuencias de aminoácidos deducidas a partir de las variante génicas detectadas con los cebadores Nah-for/Ac596r (en rojo). Las secuencias correspondientes a la subunidad α de enzimas oxigenasas identificadas previamente en sedimentos intermareales cercanos a Planta Orión se indican en negrita [Lozada et al., 2008]. Secuencias de referencia obtenidas de cultivos puros y de bacterias no cultivadas se muestran entre corchetes y precedidas por su número de acceso obtenido del GenBank. La construcción del árbol filogenético se realizó utilizando el método de neighbor-joining. Sólo se muestran los valores de bootstrap mayores al 50 % (1000 réplicas). La escala representa los cambios de aminoácidos inferidos por posición.

3.2.2. Estimación de la abundancia de genes correspondientes a la variante T de enzimas dioxigenasas

Con el fin de estimar la abundancia de la variante T en sedimentos intermareales del sitio OR, se diseñó y optimizó un ensayo de PCR cuantitativa (qPCR) en base a la información obtenida en las bibliotecas de productos de amplificación.

3.2.2.1. Diseño de cebadores

Cebadores específicos para la amplificación de genes pertenecientes a la variante T fueron diseñados a partir de un alineamiento de secuencias de nucleótidos pertenecientes a dicha variante (Figura 3.5). En el alineamiento no sólo se incluyeron las secuencias identificadas en sedimentos de Bahía Ushuaia, sino también otras secuencias pertenecientes a esta misma variante pero que fueron amplificadas a partir de muestras de sedimentos de Caleta Córdova (golfo San Jorge, Chubut, Argentina). La secuencia consenso obtenida a partir de este alineamiento se utilizó luego para el diseño de los cebadores correspondientes, teniendo en cuenta las consideraciones específicas para ensayos de qPCR sugeridas por Bustin y colaboradores [Bustin, 2004].

Los cebadores diseñados, denominados ARHD-T-F y ARHD-T-R, permiten la amplificación de fragmentos de ADN de 84 pb (Tabla 2.1). El análisis *in silico* de estos cebadores evidenció una baja probabilidad de formación dímeros de cebadores y estructuras secundarias. Con el objetivo de evaluar las posibles secuencias blanco de los cebadores ARHD-T-F y ARHD-T-R, los respectivos oligonucleótidos se compararon con la base de datos de GenBank. Los resultados obtenidos no permitieron detectar coincidencias significativas con secuencias que pudieran interferir en la cuantificación de estos genes, indicando la especificidad de los cebadores diseñados. No obstante, la determinación de la especificidad de dichos cebadores a través de análisis *in silico* puede ser diferente a la analizada mediante los productos de reacción obtenidos de la amplificación de genes presentes en una muestra ambiental. Esto se debe a que las muestras ambientales contienen ADN de organismos cuyas secuencias se desconocen. Por lo que generalmente la especificidad de los amplicones generados a partir de este tipo de muestras debe ser evaluada en cada caso en particular.



Figura 3.5: Alineamiento de secuencias de nucleótidos pertenecientes a la variante T. Los asteriscos indican los sitios conservados en la secuencia consenso. Sólo se muestra un fragmento de las secuencias amplificadas con los cebadores Nah_for/Ac596r (121 a 218 pb). En amarillo se indican las regiones de hibridación de los cebadores diseñados para la cuantificación de genes correspondientes a la variante T.

3.2.2.2. Optimización del ensayo de qPCR

A continuación se describen los ensayos realizados con el objetivo de optimizar las condiciones de reacción que serán utilizadas en los ensayos de cuantificación de la variante génica T.

Temperatura de hibridación. Se realizaron reacciones de qPCR con temperaturas de hibridación entre 50 y 60°C. Tal como se observa en la figura 3.6, no se detectaron diferencias en los valores de Ct al utilizar diferentes temperaturas de hibridación. El estándar utilizado tampoco presentó diferencias en los valores de Ct con las temperaturas evaluadas.

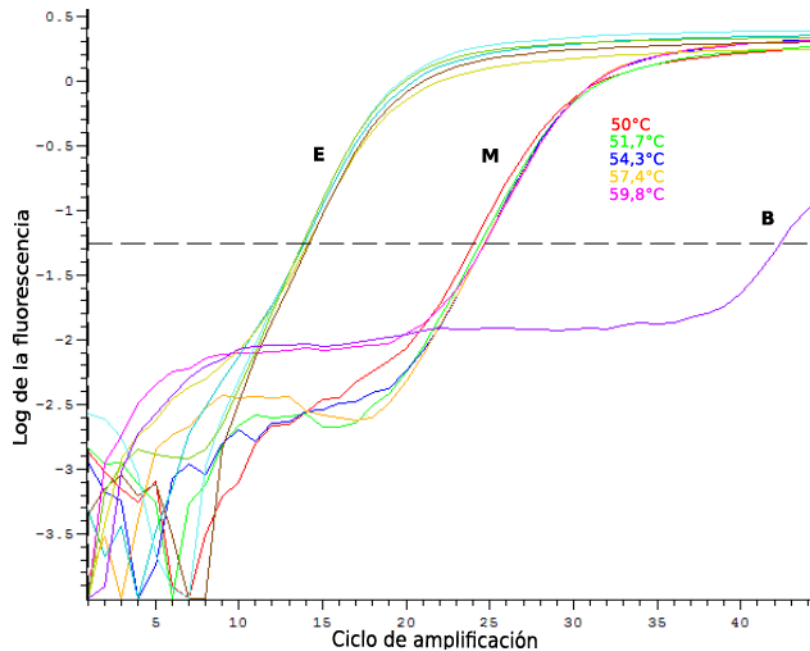


Figura 3.6: Optimización de la temperatura de hibridación. Se realizaron reacciones de amplificación utilizando un gradiente de temperaturas desde 50 a 59,8°C. E: curvas de fluorescencia obtenidas a partir de la amplificación del estándar a diferentes temperaturas de hibridación. M: curvas de amplificación obtenidas a partir de 2,5 ng de ADN de la muestra OR07 utilizando diferentes temperaturas de hibridación (los diferentes colores representan las curvas obtenidas con cada temperatura ensayada). B: blanco de reacción, sólo se muestra la curva obtenida al utilizar 50°C como temperatura de hibridación.

Con el objetivo de observar la posible formación de dímeros de cebadores u otros ensamblados oligoméricos, y evaluar la especificidad de los fragmentos amplificados al utilizar diferentes temperaturas de hibridación, se realizaron curvas de desnaturalización luego de finalizar el programa de amplificación (Figura 3.7a). No se evidenció la presencia de productos inespecíficos en ninguna de las temperaturas evaluadas. La ausencia de productos inespecíficos fue verificada mediante una corrida electroforética de los productos de amplificación en un gel de agarosa al 2,5 % (Figura 3.7b), en el que se observaron productos de amplificación del tamaño esperado en todas las temperaturas evaluadas.

En un principio, la temperatura de hibridación seleccionada fue la que presentó un menor valor de Ct (50°C). No obstante, a esta temperatura se observaron amplicones inespecíficos en otras muestras de sedimento, principalmente en OR08. En esta muestra se observó que a 56°C se generaron menos productos de amplificación inespecífica, hecho evidenciado por la presencia de picos más definidos (Figura 3.8). Por lo que en los ensayos de estimación de la abundancia de la variante génica

T, dicha temperatura fue utilizada como temperatura de hibridación de los cebadores ARHD-T-F y ARHD-T-R.

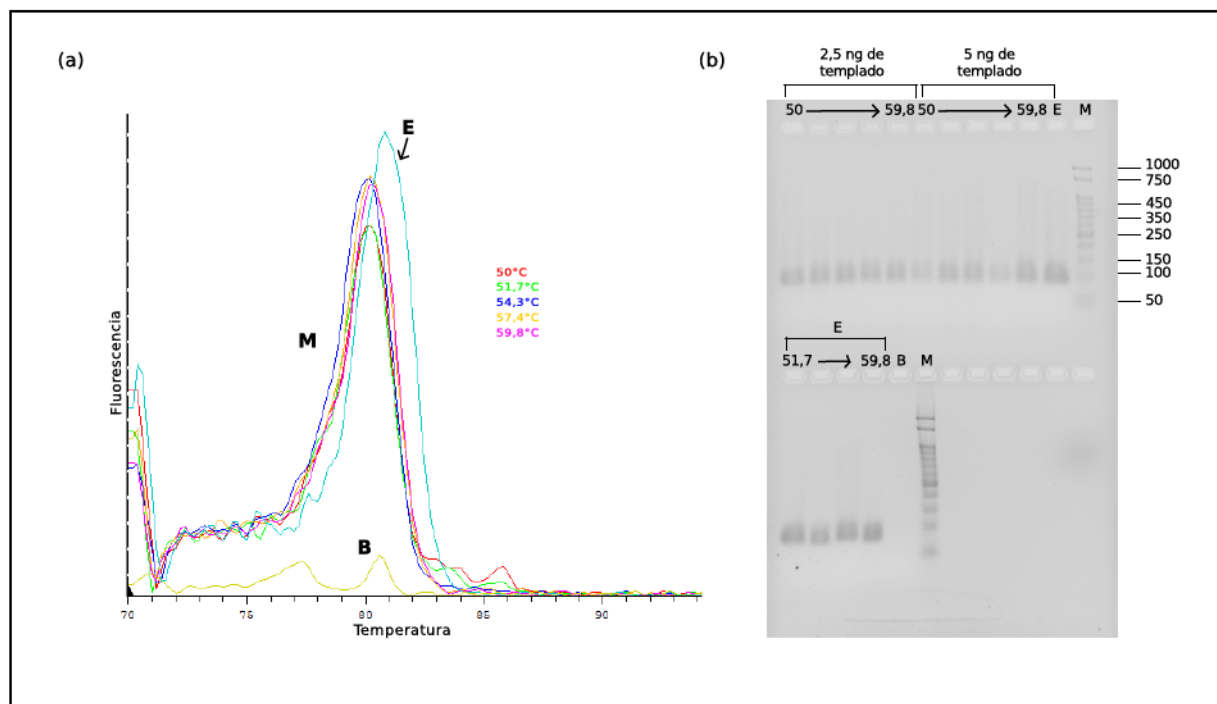


Figura 3.7: Especificidad de los fragmentos amplificados a partir de la muestra OR07. (a): curvas de desnaturalización representadas por la fluorescencia ($-dI/dT$) en función de la temperatura: la desnaturalización de los productos de reacción generados con 2,5 ng de ADN de la muestra OR07 (M) a diferentes temperaturas de hibridación se muestran en rojo, verde, azul, amarillo y magenta; la desnaturalización del producto de amplificación obtenido a partir del estándar (E) se muestra en celeste; el blanco de reacción (B) se representa mediante la curva amarilla. (b): corrida electroforética en gel de agarosa al 2,5% (p/v) de los productos de reacción obtenidos con 2,5 y 5 ng de templado a diferentes temperaturas de hibridación (las flechas representan los aumentos progresivos de temperatura: 50, 51,7, 54,3, 57,4 y 59,8°C). E, amplicones generados a partir del estándar; M, marcador de peso molecular de 50 pb (Productos Bio-Lógicos, Universidad Nacional de Quilmes, Argentina); B, blanco de reacción.

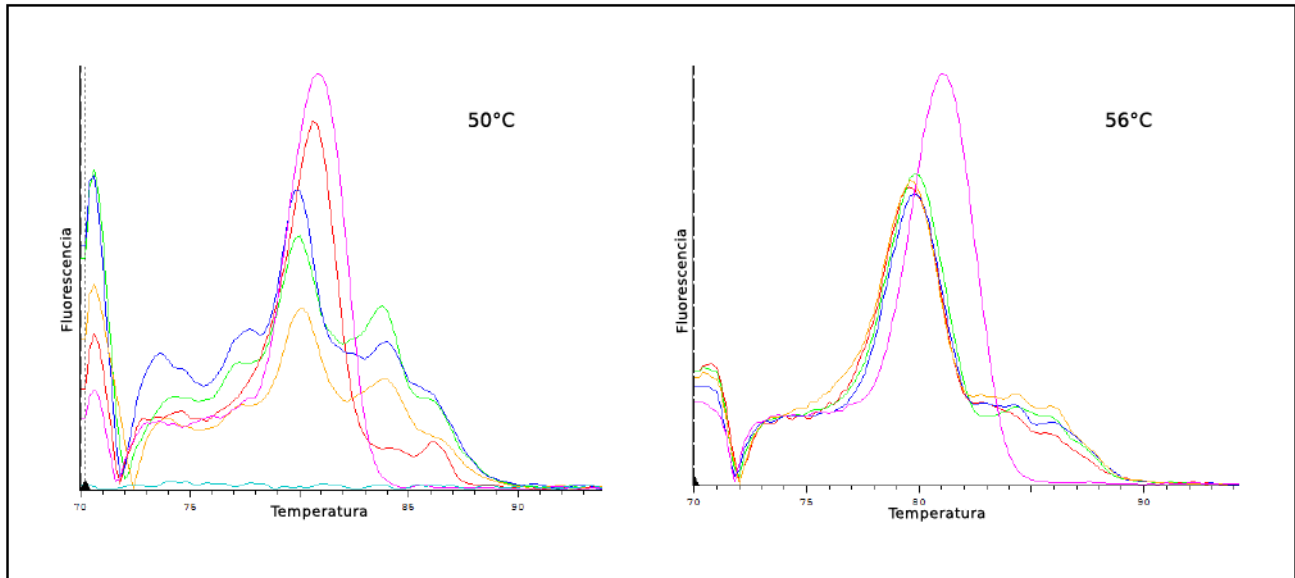


Figura 3.8: Especificidad de los fragmentos amplificados a partir de la muestra OR08. En ambas figuras se muestra la desnaturalización de los productos de reacción obtenidos a partir de 2,5 ng de ADN de OR08. Las curvas de color rojo, azul, verde y amarillo son réplicas de dicha reacción. La desnaturalización del producto obtenido a partir del estándar se muestra en la curva color magenta. En la figura de la derecha, los productos inespecíficos se ven disminuidos.

Concentración de cebadores. Se evaluaron dos concentraciones diferentes de cada cebador (600 y 900 nM) en todas las combinaciones posibles, utilizando como templado 2,5 ng de ADN de OR07 por tubo de reacción. Como puede verse en la figura 3.9, la combinación de cebadores que presentó menor valor de Ct correspondió a 900 nM del cebador directo y 600 nM del cebador inverso y fue elegida para realizar la estimación de la abundancia de la variante génica T. A pesar de que en los controles del blanco de reacción se observó amplificación, se obtuvieron valores de Ct mucho mayores respecto de la muestra ambiental. La diferencia entre dichos valores fue de aproximadamente 16 ciclos, con lo cual se considera que los blancos de reacción no contribuyen a la señal de fluorescencia obtenida a partir de la amplificación de los genes presentes en muestras ambientales [Smith et al., 2006].

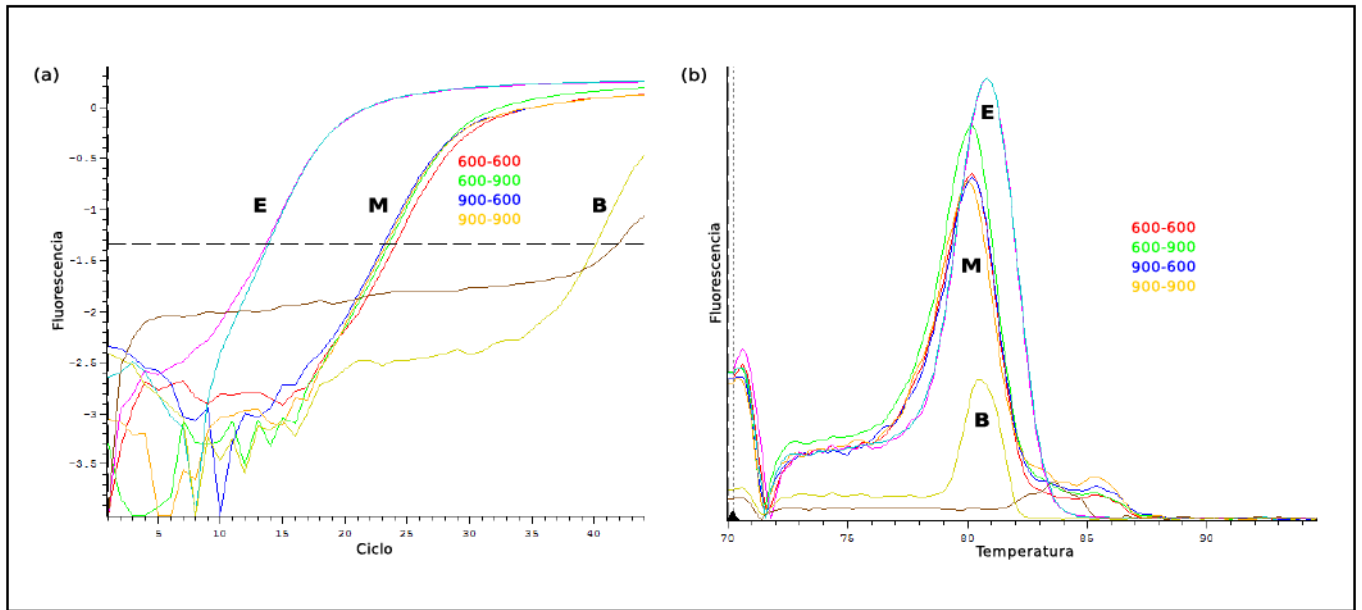


Figura 3.9: Optimización de la concentración de cebadores. Al lado de las curvas y en colores se indican las combinaciones de cebadores (concentración de cebador directo-concentración de cebador inverso), los cuales se corresponden con las curvas del mismo color (M). Las curvas correspondientes al estándar (E) se muestran en magenta y celeste. Blancos de reacción (B), en amarillo y marrón. (a): curvas de amplificación. (b): curvas de desnaturalización de los productos de reacción correspondientes.

Curva estándar: sensibilidad y eficiencia de las reacciones de qPCR. A fin de determinar el rango adecuado de concentraciones del estándar para realizar la cuantificación de la variante génica T, se utilizaron diferentes concentraciones de estándar plasmídico. Las mismas variaron desde 5 copias hasta 10^7 copias/reacción. En la figura 3.10 se muestra la relación lineal ($r^2 = 0.994$) entre el logaritmo del número de copias del estándar y el valor de Ct, la cual se mantuvo a lo largo de siete órdenes de magnitud.

A partir de esta curva de calibración y teniendo en cuenta la ecuación:

$$\% \text{ de eficiencia} = (10^{-1/m} - 1) \times 100$$

en donde m es la pendiente de la curva, la eficiencia de amplificación estimada de estos ensayos fue del 98 %.

Concentración de templado y evaluación de la inhibición en las reacciones de amplificación. Con el fin de encontrar la concentración óptima de templado y detectar posibles inhibiciones en la reacciones de amplificación, se realizó un ensayo de qPCR utilizando como templado 2,5, 5 y 7,5 ng de ADN proveniente de sedimentos intermareales obtenidos en diferentes años (OR05, OR06, OR07 y OR08). La inhibición en la amplificación del gen de interés puede observarse mediante cambios en los valores de concentración relativa (copias/ μg de ADN), dado que en ausencia de inhibición dicho valor debería mantenerse constante independientemente de la concentración de templado utilizada.

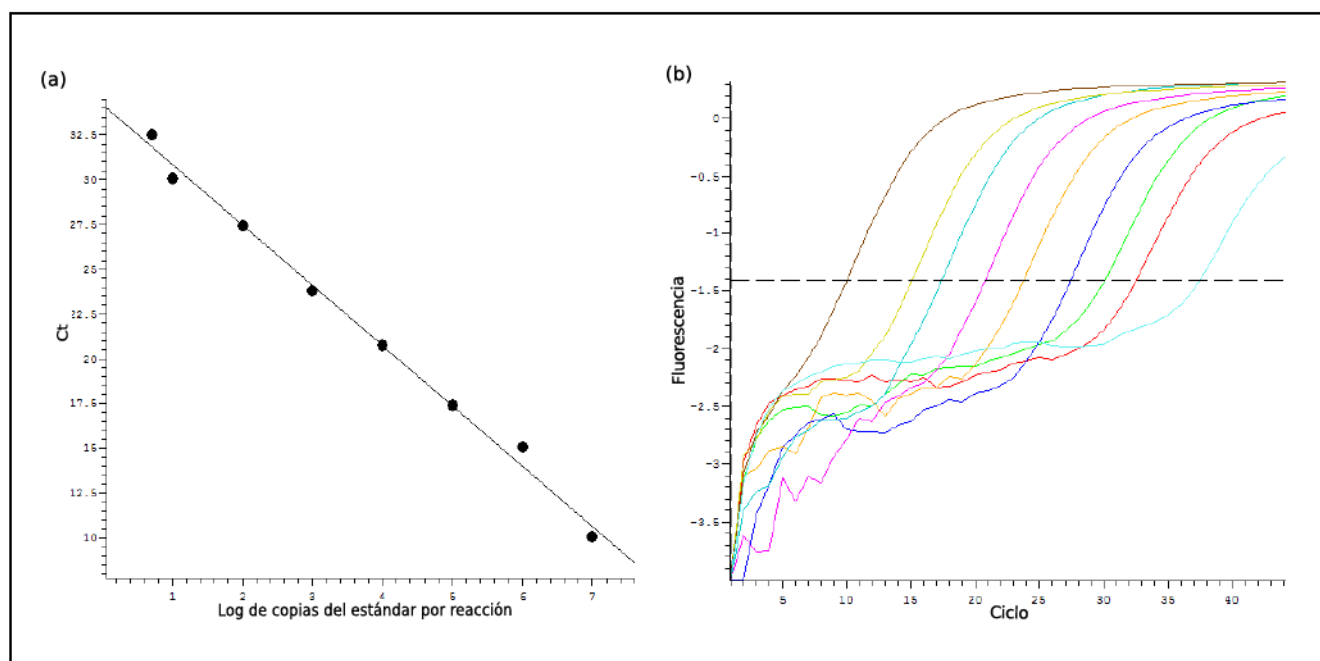


Figura 3.10: Curva estándar. (a): valores de Ct en función del logaritmo de las copias iniciales del estándar por tubo de reacción. (b): curvas de fluorescencia obtenidas a partir de la amplificación de diferentes concentraciones del estándar. A medida que disminuye la concentración del estándar de 10^7 a 5 copias por reacción, aumentan los valores de Ct. La curva celeste corresponde al blanco de reacción.

Las copias de la variante génica T/ μg de ADN se mantuvo constante en las muestras de sedimento OR05 y OR08, mientras que en las muestras OR06 y OR07 se evidenció una probable inhibición en las reacciones de PCR.

Para determinar el grado de inhibición, se cuantificó el estándar de la reacción en presencia de la muestra ambiental. El porcentaje de inhibición fue prácticamente nulo al utilizar 2,5 ng de ADN metagenómico por reacción de qPCR. Es por esto que en las reacciones de cuantificación posteriores se utilizó esta concentración de templado.

3.2.2.3. Estimación de la abundancia de genes correspondientes a la variante T en muestras de sedimento intermareal de Bahía Ushuaia

La estimación de la abundancia de copias de genes de la variante T en las muestras de sedimento crónicamente contaminado de Bahía Ushuaia se realizó por comparación de los resultados de amplificación (valores de Ct) con la curva estándar correspondiente. En muestras obtenidas durante los años 2005 a 2008, la cantidad de copias de este gen por μg de ADN varió menos de un orden de magnitud entre muestras: $3,0 \times 10^4$ ($\pm 2,7 \times 10^3$) a $1,16 \times 10^5$ ($\pm 6,8 \times 10^3$) (Figura 3.11). A excepción de la muestra OR07, la cual es significativamente diferente ($p < 0,05$), dicha variante parece mantenerse relativamente constante a lo largo de los años evaluados. Por otro lado, y con el fin de comparar la abundancia de las poblaciones conteniendo dicho gen biomarcador entre las muestras de la serie temporal, se calculó la

relación entre la abundancia de la variante génica T y la abundancia de genes ARNr 16S (éstas últimas, previamente cuantificadas por Marcos y colaboradores, [Marcos et al., 2012]). Las abundancias relativas variaron desde 0,027 % a 0,22 %, siendo OR07 la muestra que aparentemente contiene mayor abundancia de poblaciones bacterianas que poseen genes correspondientes a la variante génica T.

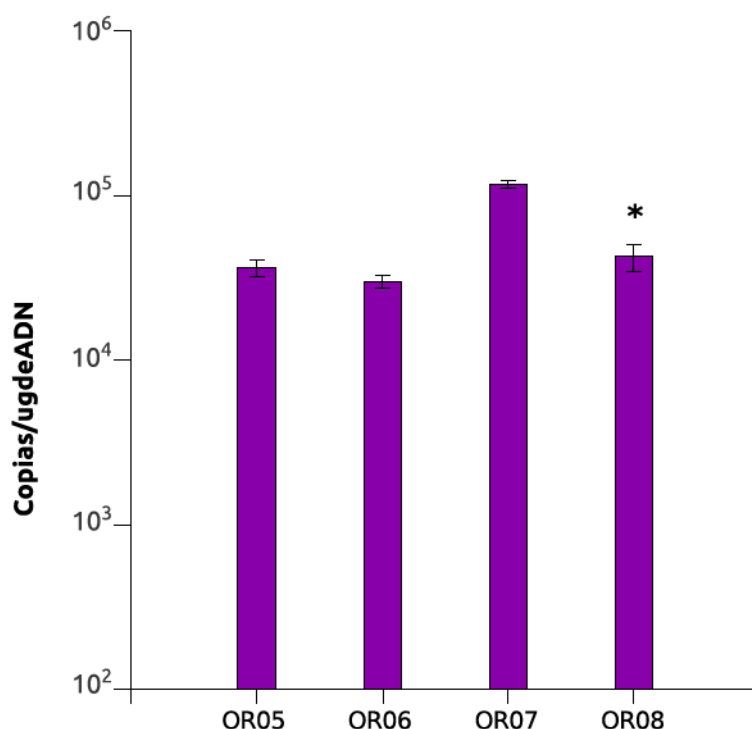


Figura 3.11: Abundancia de genes correspondientes a la variante T mediante qPCR. El asterisco se indica la muestra en la que se observó amplificación inespecífica, con lo cual la abundancia podría estar sobreestimada.

3.3. Discusión

En el presente capítulo se caracterizaron genes codificantes para enzimas dioxigenasas de anillos aromáticos (RHO) presentes en sedimentos intermareales de Bahía Ushuaia. La detección de estos genes se realizó utilizando la metodología independiente del cultivo de microorganismos basada en la construcción y análisis de bibliotecas de productos de amplificación. Entre los pares de cebadores evaluados en las reacciones de amplificación, el par Ac114f/Ac596r fue uno de los que permitieron la identificación de fragmentos de ADN correspondientes a la subunidad alfa de enzimas RHO. El diseño de estos cebadores, realizado por Wilson y colaboradores, se basó mayormente en secuencias de genes de dioxigenasas de diferentes cepas de *Pseudomonas* aisladas de suelo [Wilson et al., 1999]. Los amplicones generados con el par Ac114f/Ac596r comprenden una región que abarca casi la totalidad del dominio Rieske y aproximadamente 40 aminoácidos del dominio catalítico correspondiente a la subunidad mayor de la enzima de referencia naftaleno 1,2-dioxigenasa perteneciente a *P. putida* NCIB9816-4 [Kaupii et al., 1998]. Dado que estos cebadores poseen sitios con degeneraciones [Wilson et al., 1999],

no sólo permitieron la detección genes *nahAc* arquetípicos de *Pseudomonas* en la muestra OR07, sino también de otras variantes génicas (C y B). Utilizando el mismo par de cebadores, las variantes génicas C y B habían sido identificadas previamente en sedimentos intermareales de Bahía Ushuaia junto con las variantes génicas A, D y E [Lozada et al., 2008], las cuales habían sido detectadas por primera vez en este sitio. Si bien se observó un incremento en la proporción y la diversidad de dichas variantes en la serie temporal comprendida entre los años 2004 y 2006 [Lozada et al., 2008], en la muestra OR07 no se detectaron nuevas variantes de genes codificantes para enzimas dioxigenasas. No obstante, en OR07 la proporción de la variante C fue mayor respecto de años anteriores [Lozada et al., 2008].

Otros pares de cebadores fueron evaluados en el presente trabajo, no sólo con el fin de identificar nuevas variantes génicas que podrían ser de importancia en la degradación de HAPs, sino también para analizar si los mismos podrían ser utilizados durante la búsqueda de clones de interés en una biblioteca metagenómica. Si bien a partir de la muestra OR07 los cebadores Ac114f/Ac596r generaron un bajo porcentaje de clones conteniendo amplicones inespecíficos, estudios previos demostraron que hasta un 50% de los clones analizados podrían presentar insertos generados por la hibridación inespecífica de estos cebadores [Lozada et al., 2008]. Asimismo, se detectó alta proporción de genes *nahAc* de *Pseudomonas* utilizando estos cebadores [Lozada et al., 2008], al igual que en este trabajo. Probablemente esto se deba a las secuencias utilizadas para su diseño. Dado que el par de cebadores Ac114f/Ac596r podría dar lugar a la detección de una gran proporción de clones conteniendo tanto insertos inespecíficos como genes *nahAc* (altamente caracterizados), no serían adecuados para el análisis de una biblioteca metagenómica a partir de ensayos de PCR (ensayos moleculares). Otros tres pares de cebadores fueron evaluados, sin embargo sólo el par Nah-for/Ac596r permitió obtener productos de amplificación del tamaño esperado. El cebador Nah-for fue diseñado por Zhou y colaboradores en base a regiones conservadas de genes codificantes para enzimas dioxigenasas de *Pseudomonas putida* G7 (*nahAc*), *Alcaligenes faecalis* AFK2 (*phnAc*), *Ralstonia* sp. U2 (*nagAc*), *Burkholderia* sp. RP007 (*phnAc*) y *Cycloclasticus* sp. A5 (*phnA1*) [Zhou et al., 2006]. A su vez, es considerado un cebador de amplia cobertura, dado que su secuencia posee seis bases con degeneraciones, permitiendo su hibridación con diversos genes de dioxigenasas pertenecientes tanto a bacterias Gram-positivas como Gram-negativas [Iwai et al., 2011, Zhou et al., 2006]. Junto con el cebador Ac596r generan productos de amplificación de aproximadamente 300 pb, las cuales codifican para una parte de la región correspondiente al sitio Rieske (62 aminoácidos menos respecto de la región comprendida por los cebadores Ac114f y Ac596r) y aproximadamente 40 aminoácidos del dominio catalítico de la enzima naftaleno 1,2-dioxigenasa de *P. putida* NCIB9816-4 [Kaupii et al., 1998]. A partir del clonado y posterior secuenciación de los amplicones generados con el par de cebadores Nah-for/Ac596r, en el presente trabajo se lograron identificar productos específicos correspondientes a tres variantes génicas diferentes de enzimas RHO. Más aún, dos de estas variantes se desconocían hasta el momento, y fueron nombradas

T y U siguiendo la nomenclatura utilizada en trabajos anteriores [Lozada et al., 2008, Marcos et al., 2009]. Debido a que se encontraron variantes génicas novedosas y a que no se evidenciaron desvíos relacionados con el diseño de los cebadores Nah-for/Ac596r, dichos cebadores fueron seleccionados para el análisis de los clones de la biblioteca metagenómica mediante ensayos moleculares, los cuales se detallarán en el capítulo siguiente.

Entre las variantes novedosas identificadas en sedimentos intermareales cercanos a Planta Orión, la variante T fue la que presentó mayores porcentajes de identidad con las variantes descritas anteriormente en sedimentos intermareales de Bahía Ushuaia. Las variantes T y U se encontraron moderadamente relacionadas (59 a 67% de identidad a nivel de aminoácidos) con secuencias de enzimas oxigenasas identificadas tanto en microorganismos cultivables como no cultivables. La tercer variante génica encontrada con estos cebadores presentó un 85% de identidad a nivel de aminoácidos respecto de la variante génica E caracterizada previamente en el trabajo de Lozada y colaboradores [Lozada et al., 2008]. Un porcentaje de identidad similar se obtuvo respecto de una secuencia correspondiente a la enzima naftaleno 1,2-dioxigenasa identificada en el genoma recientemente secuenciado de *Polycyclovorans algicola* TG408, gamaproteobacteria aislada a partir de un cultivo de laboratorio de la diatomea marina *Skeletonema costatum* [Gutierrez et al., 2013]. Mediante ensayos de qPCR en los que se utilizó como blanco el gen ARNr 16S de *P. algicola* se observó que en diferentes ambientes marinos, entre los cuales se encuentran el mar del Norte, el Océano Pacífico y en el mar de Java, dicho microorganismo forma parte de la microbiota asociada a seis especies diferentes de fitoplancton [Gutierrez et al., 2013]. Esta asociación podría estar basada en la habilidad que poseen las microalgas para secuestrar, acumular, y/o sintetizar HAPs [Gutierrez et al., 2013]. Asimismo, se sugiere que la adsorción de HAPs a las células del fitoplancton cumple un rol importante en el transporte de estos contaminantes hacia el fondo marino como resultado del flujo vertical, reduciendo los niveles de contaminación en la columna de agua [Witt, 2002]. La detección de la variante génica E en los sedimentos intermareales de Bahía Ushuaia, podría responder a este mecanismo. Aunque secuencias con un alto porcentaje de identidad respecto del gen codificante para la enzima naftaleno 1,2-dioxigenasa de *P. algicola* fueron detectadas en este trabajo, la pirosecuenciación de amplicones del gen ARNr 16S de muestras de sedimentos del sitio Planta Orión no evidenció la presencia de dicho microorganismo [Guibert et al., 2012, Lozada et al., 2014]. Otros estudios son necesarios para determinar cuáles son los microorganismos que podrían contener en su genoma la variante E identificada en este sitio.

Si bien las bibliotecas de productos de amplificación permiten identificar parte de las variantes génicas que se encuentran en una muestra ambiental, no posibilitan una estimación precisa sobre la abundancia de dichos genes. Esto se debe a que en las reacciones de PCR tradicional ocurren desvíos asociados a la amplificación de múltiples templados, los cuales están presentes en distintas abundancias relativas. Por lo tanto, la abundancia de los genes pertenecientes a variante génica T en muestras de

sedimento intermareal de diferentes años fue estimada mediante ensayos de PCR cuantitativa (qPCR). Esta herramienta, aún más sensible que la PCR tradicional, ha permitido estimar la abundancia relativa de genes degradativos en muestras ambientales [Beller et al., 2002, Cébron et al., 2008, Marcos et al., 2012]. A diferencia de los cebadores Ac596r y Nah-for, de amplia cobertura, los cebadores empleados en los ensayos de qPCR (ARHD-T-F y ARHD-T-R) fueron diseñados específicamente para la amplificación de genes correspondientes a la variante génica T. Se utilizaron 12 secuencias pertenecientes a la variante T para el diseño de los cebadores. Estas secuencias fueron identificadas en bibliotecas de productos de amplificación generadas a partir de muestras de sedimentos intermareales crónicamente contaminados (Bahía Ushuaia y Caleta Córdova, [Marcos et al., 2012]) y de muestras provenientes de sistemas experimentales expuestos durante 20 días a petróleo crudo (OR08-O, [Guibert et al., 2012]), utilizando el par de cebadores Nah-for/Ac596r. Debido a que sólo se identificó una secuencia correspondiente a la variante génica U, no fue posible diseñar cebadores que garanticen la cobertura apropiada para la estimación de su abundancia.

La optimización de la temperatura de hibridación y de la concentración de los cebadores ARHD-T-F y ARHD-T-R se llevó a cabo utilizando ADN estándar así como también ADN metagenómico. Esto se realizó debido a que, a diferencia del ADN estándar, el ADN metagenómico posee diferentes genes que podrían afectar la especificidad de la reacción y por ende la estimación de la abundancia del gen de interés [Powell et al., 2006]. Aunque no se secuenciaron los amplicones generados, el análisis del tamaño de los productos de amplificación y la obtención de picos bien definidos en las curvas de desnaturalización demostraron que, en condiciones óptimas, dichos cebadores permiten obtener productos de amplificación específicos a partir de la mayoría de las muestras provenientes de sedimentos intermareales cercanos a Planta Orión.

La precisión, eficiencia y sensibilidad del ensayo de qPCR, así como también el rango confiable de cuantificación, son datos que deben ser incluidos al reportar resultados provenientes de ensayos de qPCR para garantizar la correcta interpretación de los resultados [Bustin et al., 2009]. Parte de esta información puede obtenerse a partir de la curva de calibración [Kavanagh et al., 2011]. Si bien dicha curva es realizada a partir de ADN estándar, generalmente se asume que es representativa de otras bacterias conteniendo el gen de interés. Esta suposición es necesaria dada la diversidad genética que se encuentra inevitablemente en muestras ambientales [Beller et al., 2002]. Utilizando las condiciones óptimas para el ensayo de cuantificación de los genes correspondientes a la variante génica T, las reacciones de amplificación presentaron un 98 % de eficiencia y un rango de cuantificación entre 5 y 10^7 copias por reacción. Estos valores de eficiencia se encontraron dentro de los valores aceptables (90-100 % de eficiencia) para lograr resultados reproducibles [Kavanagh et al., 2011]. Por otro lado, la variabilidad del ensayo determinada a partir de las cuatro réplicas se encontró entre 5,5 y 18,8 %. En trabajos anteriores, donde la cuantificación de genes se realizó a partir de muestras ambientales,

porcentajes similares permitieron considerar al ensayo como reproducible [Hristova et al., 2001, Powell et al., 2006].

La estimación de la abundancia de genes correspondientes a la variante génica T en sedimentos del sitio Planta Orión obtenidos durante los años 2005 a 2008, sugieren que dichos genes estarían presentes en miembros estables de la comunidad microbiana. Además, su abundancia fue comparable con otras variantes génicas encontradas en este sitio. La abundancia de este gen varió entre 10^4 y 10^5 copias/ μg de ADN, valores inferiores respecto de la variante más abundante encontrada en estos sedimentos (variante D, 10^5 - 10^6 copias/ μg , [Marcos et al., 2012]). Sin embargo, en el caso de los sedimentos de OR07 y OR08, la abundancia de variante T superó en un orden de magnitud a la variante C. La variante génica T también fue detectada en sedimentos intermareales de Caleta Córdova contaminados con hidrocarburos (Lozada, comunicación personal). Este sitio es una pequeña caleta ubicada en el Golfo San Jorge, sobre el Océano Atlántico (provincia de Chubut), expuesta a la contaminación con hidrocarburos como resultado de la extracción y transporte de petróleo crudo [Marcos et al., 2012]. Sistemas experimentales, en los que se adicionó petróleo crudo, fenantreno o pireno a sedimentos de Planta Orión y Caleta Córdova, mostraron un aumento en la abundancia de dicha variante respecto a sistemas experimentales en los que no se adicionaron hidrocarburos. En algunos casos, la respuesta observada con respecto al gen biomarcador T fue comparable a la observada para genes *phnA1* de *Cycloclasticus*. En conjunto, estos resultados sugieren que poblaciones microbianas conteniendo la variante T podrían tener un rol relevante en la degradación de HAPs en estos ambientes. Asimismo, estos microorganismos parecerían estar distribuidos al menos en dos ecorregiones diferentes: *Canales y Fiordos del Sur de Chile* y *Golfos de la Patagonia Norte*, [Marcos et al., 2012].

En base a estudios previos [Guibert et al., 2012, Lozada et al., 2008, Marcos et al., 2009] y a los resultados obtenidos en este capítulo, la muestra OR07 fue seleccionada para la construcción de la biblioteca metagenómica. Particularmente, Guibert y colaboradores observaron una gran diversidad de genes *alkB* relacionados con la degradación de hidrocarburos alifáticos en dicha muestra [Guibert et al., 2012]. Las secuencias deducidas de aminoácidos de los genes *alkB* presentes en mayor proporción en OR07, se encontraron relacionados con una secuencia identificada en una muestra de suelo del *Ártico* y con la secuencia AlkB de *Nocardioides*, actinobacteria asociada a la degradación de hidrocarburos [Guibert et al., 2012]. En la muestra OR07 también se observaron diferentes variantes de genes codificantes para la subunidad alfa de enzimas RHO relacionadas con aquellas identificadas en bacterias Gram-positivas (grupos M, N, G, S, I, L, F, [Marcos et al., 2009]). Las secuencias correspondientes a la variante M se clasificaron como dioxigenasas de tipo V [Marcos et al., 2009], de acuerdo a la clasificación de Kweon y colaboradores [Kweon et al., 2008]. Este tipo de enzimas son diversas en cuanto a los sustratos que pueden utilizar, y se caracterizan por poseer ferredoxinas con

dominio [3Fe-4S]. Entre las enzimas de tipo V se encuentran dioxigenasas de bacterias Gram-positivas degradadoras de HAPs, tales como la bacteria marina *Nocardioides* sp. KP7 y bacterias pertenecientes a los géneros *Mycobacterium*, *Rhodococcus* y *Terrabacter* [Kweon et al., 2008]. La variante F de enzimas RHO detectadas en OR07, formaron parte de las enzimas dioxigenasas de tipo IV [Marcos et al., 2009]. Este tipo de enzimas incluye principalmente dioxigenasas de bifenilos y bifenilos policlorados de diversos géneros bacterianos y se caracteriza por la presencia de ferredoxinas de tipo [2Fe-2S] en los sistemas transportadores de electrones [Kweon et al., 2008]. El resto de los grupos identificados en el trabajo de Marcos y colaboradores no pudieron ser asignados a un tipo de enzima en particular [Marcos et al., 2009]. No obstante, las variantes N, G, S e I mostraron un origen común con enzimas de tipo V [Marcos et al., 2009].

La información sobre la abundancia de las diferentes variantes génicas presentes en el sitio Planta Orión a lo largo de los años, hubiera sido útil al momento de la selección de la muestra, sin embargo no se encontraba disponible. El hecho de haber encontrado en la muestra OR07 una gran diversidad de genes novedosos que podrían estar involucrados en la biodegradación de hidrocarburos alifáticos y poliaromáticos, demuestra el potencial que poseen los microorganismos del sitio Planta Orión para degradar dichos compuestos en este ambiente frío crónicamente contaminado. Debido a limitaciones metodológicas, los estudios presentados en el presente capítulo y en trabajos anteriores [Guibert et al., 2012, Lozada et al., 2008, Marcos et al., 2012, 2009], sólo han permitido conocer un pequeño fragmento de estos genes biomarcadores. En los próximos capítulos se describe la construcción de una biblioteca metagenómica en fósmidos a partir de ADN proveniente de la muestra OR07. Dado que dicha metodología posibilita el clonado de grandes fragmentos de ADN, podrá brindar mayor información sobre los genes degradativos presentes en estos sedimentos, sus regiones lindantes y hasta tal vez aportar datos importantes sobre la ubicación taxonómica o la fisiología del microorganismo del cual provienen los mismos.

Capítulo 4

CONSTRUCCIÓN Y ANÁLISIS DE UNA BIBLIOTECA METAGENÓMICA A PARTIR DE SEDIMENTOS INTERMAREALES DE BAHÍA USHUAIA

4.1. Introducción

El acceso a las secuencias completas de genes codificantes para la subunidad α de enzimas dioxigenasas pertenecientes a bacterias no cultivables degradadoras de hidrocarburos aromáticos, así como también el estudio de su contexto genómico, es de importancia para poder comprender el potencial catabólico de las comunidades microbianas [Rayu et al., 2012]. Las bibliotecas metagenómicas construidas utilizando fósmidos, cósmidos o BACs constituyen una herramienta alternativa capaz de brindar dicha información, ya que permiten recuperar grandes fragmentos de los genomas de los microorganismos ambientales. Esto es particularmente importante dado que en el genoma de dichos microorganismos los genes involucrados en las rutas degradativas de hidrocarburos aromáticos pueden estar agrupados en un mismo operón [Habe et al., 2003].

Durante la construcción de estas bibliotecas, la extracción de ADN metagenómico a partir de muestras ambientales representa un paso crítico. Debido a que los vectores fosmídicos permiten el clonado de fragmentos de ADN de un tamaño entre 20 y 40 kb, el método de extracción seleccionado debe producir un alto rendimiento de ADN del tamaño adecuado. Además, es importante que el ADN obtenido sea representativo de toda la comunidad microbiana y que posea un bajo porcentaje de sustancias contaminantes que puedan interferir durante la construcción de la biblioteca [Singh et al., 2009]. Sin embargo, este punto es más crítico en el caso de ensayos moleculares dependientes de reacciones de amplificación a partir de ADN metagenómico, como los descritos en el capítulo anterior, en particular la qPCR.

En este capítulo se describen los pasos llevados a cabo para la construcción y análisis de una biblioteca metagenómica en fósmidos a partir de sedimentos intermareales cercanos a la Planta de combustible Orión de Bahía Ushuaia. Dicha biblioteca representa un reservorio invaluable de informa-

ción sobre el potencial metabólico de los microorganismos presentes en este sitio y, por lo tanto, de las posibles rutas utilizadas por estos microorganismos para la degradación de hidrocarburos aromáticos.

4.2. Resultados

4.2.1. Extracción de ADN metagenómico a partir de sedimentos

En el presente trabajo se evaluaron dos métodos de extracción directa de ADN a partir de la muestra de sedimento intermareal OR07. Uno de ellos se basó en el protocolo descrito por Zhou y colaboradores [Zhou et al., 1996], el cual, a partir de muestras ambientales tales como suelo o sedimento, permite extraer ADN metagenómico manualmente luego de una ruptura suave de las células mediante lisis química. El otro método evaluado consistió en la extracción de ADN mediante la utilización de un kit comercial específico para muestras ambientales (FastDNA Spin kit for Soil, MP Biomedicals), el cual ha sido empleado con éxito para extraer ADN de sedimentos. A partir de este kit comercial es posible extraer ADN de alta pureza, permitiendo la amplificación de fragmentos de genes relacionados con la biodegradación de HAPs, tal como se observó en el capítulo 3 de esta Tesis y en trabajos anteriores [Lozada et al., 2008, Marcos et al., 2012].

Tal como puede observarse en la tabla 4.1, utilizando el método de extracción manual se obtuvo un rendimiento de ADN tres veces mayor respecto al obtenido con el kit comercial. Por otro lado, el método de extracción manual generó una alta proporción de fragmentos de aproximadamente 40 kb, mientras que al utilizar la extracción realizada con el kit comercial se obtuvieron fragmentos de tamaño menor (Figura 4.1).

Tabla 4.1: Comparación de los métodos de extracción de ADN metagenómico

| Método | Concentración ADN (ng/μl) | ADN total (μg) | Rendimiento (μgr ADN/gr. de sedimento húmedo) |
|-------------------|---|--------------------------------------|---|
| Extracción manual | 46 | 9,2 | 1,8 |
| Kit comercial | 6,3 | 1,1 | 0,6 |

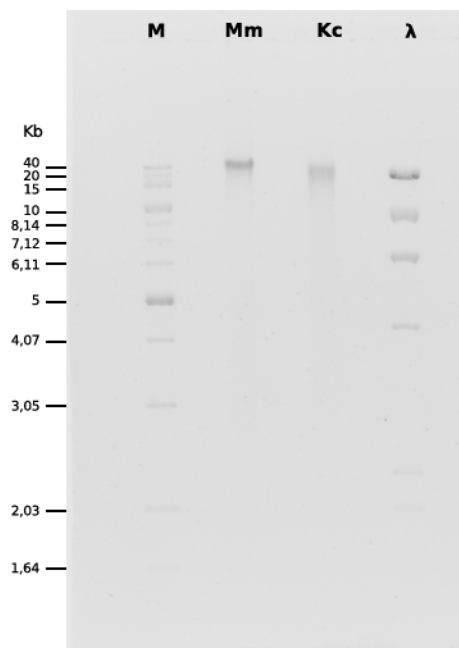


Figura 4.1: Corrida electroforética en gel de agarosa 0,7% (p/v). Las calles indicadas como Mm y Kc corresponden a ADN extraído con el método manual desarrollado por Zhou y colaboradores, y con el kit comercial, respectivamente. M: marcador 1Kb Extension Ladder (Invitrogen), λ : ADN del fago lambda digerido con la enzima HindIII.

Para la construcción de una biblioteca metagenómica en fósmidos es necesario utilizar fragmentos de ADN de aproximadamente 35-40 kb, ya que fragmentos de menor tamaño pueden resultar en la producción de quimeras, y tamaños mayores a 40kb no permiten el correcto empaquetamiento del vector con su inserto. Debido a que el protocolo de extracción manual permitió obtener mayor rendimiento de ADN y un tamaño de fragmentos adecuado para la construcción de la biblioteca metagenómica, dicho ADN fue utilizado en los pasos de clonado posteriores.

4.2.2. Construcción de la biblioteca metagenómica

A partir del ADN metagenómico, y luego de haber realizado los controles de ligación y de eficiencia de empaquetado para evaluar el correcto funcionamiento de estas etapas críticas de la metodología, se llevó a cabo la construcción de la biblioteca metagenómica (Figura 4.2). Para ello, en primer lugar, fue necesario reparar dicho ADN con el objetivo de generar insertos romos y fosforilados en el extremo 5', adecuados para el clonado. Los insertos reparados luego se separaron por tamaño mediante una corrida electroforética en gel de agarosa de bajo punto de fusión. Aquellos fragmentos que presentaron un tamaño de aproximadamente 35-40 kb fueron seleccionados del gel y extraídos mediante reacción enzimática con gelasa. A partir de esta purificación, se recuperó un 20% del ADN metagenómico sembrado inicialmente en el gel. Seguidamente, el ADN purificado a partir del gel fue ligado al vector de clonado pCC2FOS y el producto de ligación fue empaquetado y luego utilizado para la infección de células EPI300-T1 (Figura 4.2).

Una vez obtenidos los clones, y a fin de determinar el tamaño de la biblioteca metagenómica, se llevó a cabo la titulación de las células transformadas, las cuales fueron seleccionadas por su capacidad de crecer en presencia de cloranfenicol. Se obtuvieron un total de 45.600 clones, aproximadamente. Dicha biblioteca fue almacenada en forma de suspensiones celulares conteniendo grupos de 100 clones amplificados (ver sección 2.7.3 para más detalle), lo cual evitaría pérdidas de los mismos durante su conservación. De acuerdo a la titulación de seis de estos grupos, cada clon amplificado estaría representado 10^4 veces en $1 \mu\text{l}$ de células resuspendidas.

4.2.3. Identificación de clones conteniendo genes de interés

Se utilizaron dos estrategias diferentes para la identificación de clones conteniendo genes codificantes para enzimas involucradas en la degradación de hidrocarburos aromáticos. En primer lugar se utilizó una estrategia molecular, la cual consistió en la amplificación de fragmentos de genes que codifican para la subunidad mayor del componente catalítico de las enzimas RHO involucradas en el primer paso de la ruta degradativa de HAPs. La segunda estrategia de análisis (denominada estrategia funcional), se basó en la detección de actividad enzimática de dioxigenasas iniciales así como también de extradiol dioxigenasas, las cuales participan de la ruptura del anillo aromático.

4.2.3.1. Estrategia molecular

Optimización y controles. Previo al análisis molecular de la biblioteca metagenómica se seleccionaron los cebadores adecuados para la detección de los clones de interés a partir de reacciones de amplificación. Dado que Marcos y colaboradores [Marcos et al., 2012] observaron alta abundancia de genes correspondientes a la variante D de dioxigenasas en la muestra OR07, se decidió utilizar el par de cebadores ARHD-D-f/ARHD-D-r, los cuales permiten amplificar específicamente fragmentos de genes pertenecientes a dicha variante. El par de cebadores Nah-for/Ac596r también fue seleccionado para la optimización de los ensayos moleculares, ya que (como se observó en el capítulo anterior) presentan una amplia cobertura y por lo tanto posibilitan la identificación de genes novedosos.

A fin de reducir el número de reacciones de amplificación y facilitar el análisis de los clones de la biblioteca, se utilizaron dos estrategias. En primer lugar, el análisis se realizó a partir de extractos celulares para evitar la extracción de los fósmidos. En segundo lugar, se realizó el análisis en etapas, comenzando por grupos de clones (obtenidos en la sección 4.2.2), para luego identificar el clon conteniendo el gen de interés dentro del grupo de clones correspondiente. Esto fue posible gracias a la alta sensibilidad de la metodología utilizada. Sin embargo, fue necesario evaluar la posible inhibición de las reacciones de amplificación a causa del templado utilizado y la posibilidad de encontrar un

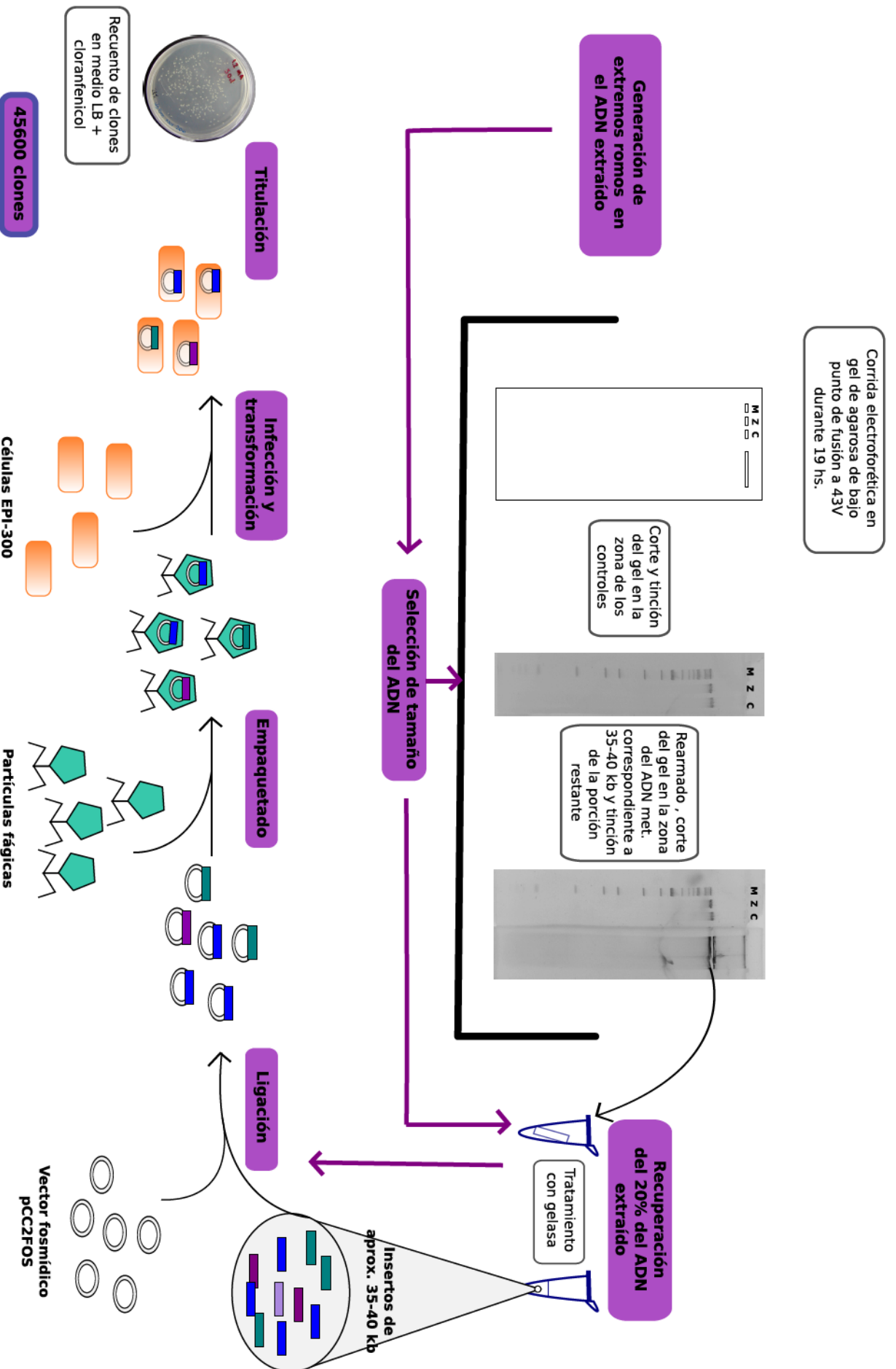


Figura 4.2: Construcción de la biblioteca metagenómica a partir de sedimento intermareal cercano a Planta Orión (OR07). Arriba: preparación y selección de ADN del tamaño adecuado. En los gels de agarosa M, Z y C corresponden al marcador 1 kb. Extension Ladder, 2 μ l de ADN extraído mediante el método manual y 1 μ l de fósido control respectivamente. Abajo: diferentes pasos en la construcción de la biblioteca metagenómica utilizando el kit CopyControl™ HTP Fosmid Library Production Kit, (Epicentre).

clon positivo dentro de un grupo de al menos 100 clones. Debido a que no se contaba con un fósforo control conteniendo el gen de interés, como control positivo para las reacciones de amplificación se seleccionó un clon de una biblioteca de productos de amplificación que contiene un fragmento del gen perteneciente a la variante D de dioxigenasa (*E. coli* DH5 α /pCR4-TOPO-Ac-OR06-6, [Lozada et al., 2008]). Ambos pares de cebadores seleccionados son capaces de hibridar con dicho gen. Con el objetivo de asemejar las condiciones que serían encontradas al utilizar como templado extractos celulares pertenecientes a un grupo de clones, en el control positivo se simuló la presencia de un clon conteniendo el gen de interés dentro de un grupo de aproximadamente 100 clones amplificados. Para ello tuvieron en cuenta las diferencias en el número de copias por célula entre el plásmido control y los fósforos de la biblioteca metagenómica y se utilizaron suspensiones celulares de clones Ac-OR06-6 de título conocido. Sabiendo que por microlitro de células resuspendidas se obtuvieron aproximadamente 10^4 copias de un clon de la biblioteca metagenómica (sección 4.2.2), se realizaron diluciones correspondientes del clon AcOR06_6 para obtener, aproximadamente, 10^4 copias del plásmido por microlitro. Para determinar el límite de detección del ensayo, se realizaron reacciones de amplificación a partir de diferentes diluciones de células del clon AcOR06_6, de manera tal de obtener aproximadamente 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 y 10 copias del plásmido por reacción. En dichas reacciones se evaluaron los dos pares de cebadores seleccionados. Ambos cebadores generaron productos de amplificación del tamaño esperado en aquellas reacciones en las que el templado control varió de 10^5 a 10^3 copias aproximadamente, sin observarse inhibición. Estos resultados sugieren que sería esperable identificar los genes de interés mediante reacciones de amplificación utilizando grupos de clones.

Análisis de la biblioteca. El análisis molecular de la biblioteca metagenómica se llevó a cabo a partir de los extractos celulares correspondientes a cada grupo de clones, y utilizando los cebadores ARHD-D-f/ARHD-D-r y Nah-for/Ac596r. Al emplear cebadores específicos para la amplificación de genes de dioxigenasas pertenecientes a la variante D, se observaron productos de amplificación de forma consistente y del tamaño esperado en sólo un grupo de clones (número 14). Con respecto a la búsqueda de genes codificantes para enzimas RHO utilizando cebadores de amplia cobertura (Nah-for/Ac596r), dos grupos de clones (32 y 117) generaron bandas nítidas y del tamaño esperado.

A partir de cada uno de los grupos de clones que resultaron en la amplificación de fragmentos del tamaño esperado, se generaron subgrupos de clones, los cuales fueron analizados mediante la misma metodología. Para ello, se realizaron cultivos en medio LB agar con cloranfenicol a partir de las suspensiones celulares de dichos grupos, de manera tal de obtener un promedio de 35 clones por placa. Cada una de estas placas representó un subgrupo de clones, los cuales fueron replicados y posteriormente resuspendidos mediante el lavado de las colonias (Figura 4.3). Alícuotas de las suspensiones celulares de los subgrupos fueron analizadas utilizando los cebadores correspondientes. Por

medio de este procedimiento fue posible eliminar del análisis aquellos clones que no contenían el gen identificado, acotando así la búsqueda del clon de interés. En la tabla 4.2 se muestra la cantidad de subgrupos generados, los subgrupos que generaron producto de amplificación (Subgrupos +) y el total de clones analizados por grupo.

Tabla 4.2: Grupos de clones que mostraron amplificación en los ensayos moleculares.

| Grupo | Cantidad de subgrupos | Cebadores utilizados | Subgrupos + | Total clones analizados |
|-------|-----------------------|----------------------|-------------|-------------------------|
| 14 | 12 (A a L) | ARHD-D-f/ARHD-D-r | A | 149 |
| 32 | 22 (A a V) | Nah-for/Ac596r | M | 1340 |
| 117 | 23 (A a W) | Nah-for/Ac596r | T | 817 |

Con el objetivo de identificar los clones conteniendo el gen de interés, cada uno de los clones pertenecientes a los subgrupos que generaron productos de amplificación, fueron analizados por PCR a partir de sus colonias (Figura 4.3). En cada subgrupo se identificó un clon con capacidad de generar amplicones. Para verificar la presencia de genes de dioxigenasa en los clones aislados, se purificaron los fósmidos correspondientes y se secuenció la región comprendida entre los cebadores utilizados para el análisis molecular. En la tabla 4.3 se muestra el análisis basado en la búsqueda por similitud utilizando el algoritmo blastx y la base de datos del NCBI.

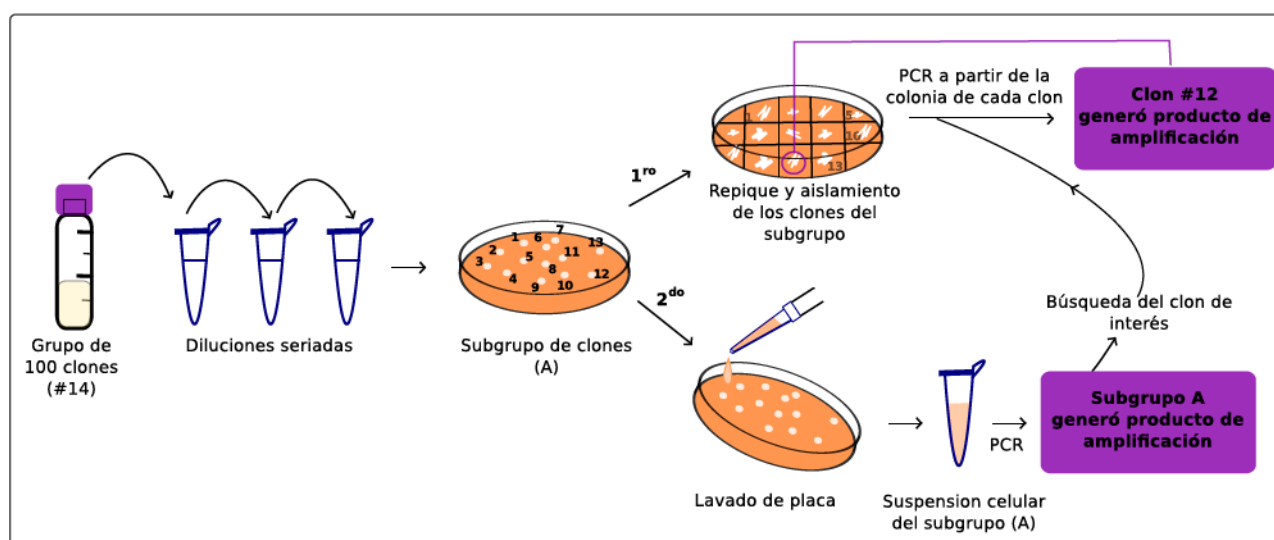


Figura 4.3: Búsqueda de clones de interés mediante la estrategia molecular. Como ejemplo se muestra el procedimiento realizado para aislar el clon 14A-12, a partir de la suspensión de un grupo de clones amplificados (grupo 14) obtenido en la sección 4.2.2.

Tabla 4.3: Análisis de similitud de las secuencias obtenidas

| Fósmido | Blastx | % de cobertura | % de id. ¹ | Valor E | Nº de acceso |
|------------------|---|----------------|-----------------------|----------------------|--------------|
| 14A-12 (259 pb) | Proteína con dominio Rieske (<i>P. denitrificans</i> PD1222) | 99 | 64 | 1,00 ⁻³⁰ | YP917232 |
| 32M-3 (283 pb) | Proteína hipotética con dominio Rieske (<i>K.gwangyangensis</i>) | 99 | 78 | 9,00e ⁻⁴³ | WP0203986501 |
| 117T-34 (669 pb) | Dioxigenasa de compuestos aromáticos (<i>Cycloclasticus</i> sp. P1) | 85 | 65 | 5,00e ⁻⁸⁷ | YP0068375171 |

1: Porcentaje de identidad.

La secuenciación del fósmido 14A-12, utilizando el cebador ARHD-D-f (Tabla 1.3), mostró que el fragmento amplificado presentaba un 64 % de identidad a nivel de aminoácidos respecto de la secuencia más relacionada. Dicha secuencia corresponde al dominio C-terminal de una enzima con sitio Rieske asociada a fenilpropionato dioxigenasas o 2,4-D oxigenasas. En cuanto a la secuencia obtenida a partir del cebador ARHD-D-r, no evidenció homología con secuencias codificantes para enzimas oxigenasas. Más aún, el análisis de su secuencia mostró un 67 % de identidad a nivel de aminoácidos respecto de una integrasa de *Thalassobium* sp. R2A62 (con una cobertura del 50 %, y un valor E de 5,00⁻³¹). Posiblemente esto haya ocurrido por causa de un evento de hibridación inespecífica del cebador ARHD-D-r durante la secuenciación. Por lo tanto, el análisis molecular de la biblioteca utilizando cebadores específicos para genes de dioxigenasas de la variante D no fue capaz de detectar un clon conteniendo dicho gen.

Respecto del fósmido 117T-34, el fragmento secuenciado mostró un porcentaje de identidad a nivel de aminoácidos del 65 % respecto de una dioxigenasa de *Cycloclasticus* sp. P1. Dado que el gen correspondiente a la variante T identificada previamente en sedimentos de este sitio (Capítulo 3) mostró un porcentaje de identidad similar cuando fue comparada con la misma dioxigenasa de *Cycloclasticus* sp. P1, la secuencia generada a partir del fósmido M117 también se comparó con secuencias de los fragmentos correspondientes a la variante T. Los altos porcentajes de identidad encontrados entre ambos fragmentos (98-100 % a nivel de nucleótidos y 100 % a nivel de aminoácidos) indicaron que dicho clon contiene el gen correspondiente a la enzima RHO de la variante T.

Por último, la secuencia de la base de datos más relacionada con el fragmento secuenciado del fósmido 32M-3 presentó un 78 % de identidad a nivel de aminoácidos. La misma corresponde a una proteína hipotética con dominio Rieske de *Kordiimonas gwangyangensis*, por lo que probablemente dicho fósmido también posea un gen codificante para una enzima RHO.

4.2.3.2. Estrategia funcional

Detección de actividad extradiol dioxigenasa (EXDO). El clivaje del catecol mediante enzimas EXDO da lugar a la formación de semialdehído-2-hidroxiácido, fácilmente detectable por su coloración amarilla. Es por esto que el ensayo funcional para la identificación de clones conteniendo EXDO se basó en la detección de colonias amarillas generadas por el producto de la ruptura del catecol. Se realizaron diluciones a partir de cada uno de los tubos conteniendo grupos de 100 clones, de manera de obtener aproximadamente 300 clones por placa de medio LB agar con cloranfenicol y suplementado con arabinosa. La arabinosa agregada al medio permitió inducir el aumento del número de copias de los fósidos, facilitando así la detección de clones con genes EXDO. Se cultivaron tres placas por cada grupo de clones y luego de la incubación a 37°C durante 36 hs, las colonias formadas fueron rociadas con una solución estéril de catecol. Aquellos clones que generaron coloración amarilla en sus colonias fueron aislados directamente a partir de la placa, debido a que tanto el catecol como su producto de degradación no producen pérdida de viabilidad de las células de interés.

En cinco grupos de clones (78, 165, 293, 334 y 340) fue posible detectar actividad EXDO. Tres de dichos grupos presentaron sólo un clon positivo (293, 334 y 340), mientras que en dos de ellos (grupo 78 y 165) se observó más de uno. Debido a que es probable que los clones identificados en un mismo grupo sean idénticos, se realizó un ensayo de restricción con enzima NotI a partir de sus fósidos purificados con el objetivo de eliminar copias de un mismo clon en los análisis posteriores. En la figura 4.4 se puede observar que los clones identificados del grupo 78 (78a y 78b) poseen fósidos que generan el mismo patrón de restricción. De manera similar, tanto el fósido proveniente del clon 165c como el del clon 165f presentaron iguales patrones de restricción entre sí, lo que indicaría que dichos clones son copias idénticas. El resto de los fósidos aislados mostraron patrones de restricción únicos.

Detección de actividad naftaleno dioxigenasa. El ensayo funcional destinado a la búsqueda de enzimas RHO involucradas en el primer paso de la degradación de HAPs se basó en la capacidad de los clones de oxidar indol. En presencia de indol, la expresión de dichas enzimas puede dar lugar a la formación de cis-indol-2,3-dihidrodiol el cual luego es transformado a índigo. Este último compuesto es el responsable del color azul en las colonias con actividad dioxigenasa, lo que permite identificar clones de interés mediante ensayos en placa.

Para detectar actividad dioxigenasa en los clones de la biblioteca metagenómica, se realizó un ensayo similar al indicado en el punto anterior. A partir de cada grupo de clones se cultivaron tres placas conteniendo aproximadamente 300 clones, y las mismas fueron incubadas durante 24 hs a 37°C. Luego de la incubación, se agregaron cristales de indol en la tapa de las placas hasta observar coloración

azul en las colonias correspondientes. Sólo un clon perteneciente al grupo de clones denominado 342 presentó actividad dioxigenasa. Debido a que la exposición de las células a vapores de indol inhibe su crecimiento, se realizaron réplicas en medio sólido LB con cloranfenicol para poder aislar el clon de interés.

A fin de simplificar la nomenclatura de los fósmidos extraídos, de aquí en adelante se los identificará con un sólo número correspondiente al grupo del cual proviene y con una letra inicial de acuerdo a la estrategia con la que fue detectado: C, estrategia funcional con catecol; I, estrategia con indol y M, para la estrategia molecular.

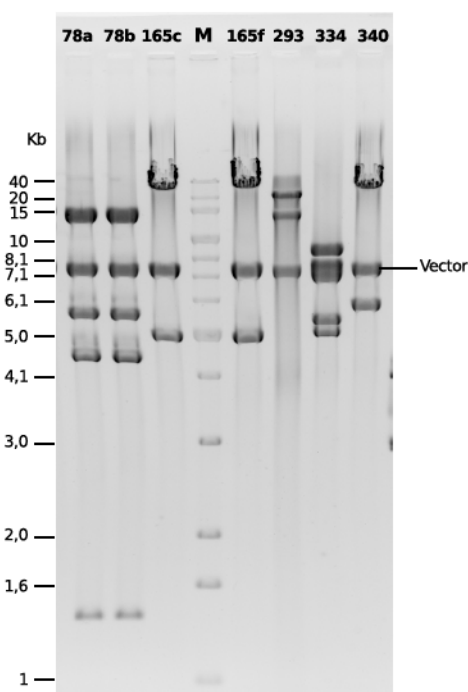


Figura 4.4: Corrida electroforética en gel de agarosa 0,7% (p/v) de los fragmentos de restricción generados con la enzima NotI a partir de los fósmidos aislados durante el ensayo funcional con catecol. M: marcador 1Kb Extension Ladder (Invitrogen). Se indica también la banda correspondiente al vector (aprox.7,5 kb)

4.2.4. Purificación y secuenciación completa de los fósmidos identificados

Luego de la identificación y aislamiento de los clones de interés, se purificaron los fósmidos correspondientes con el objetivo de secuenciarlos completamente. Para ello, se tuvieron en cuenta los requerimientos tanto de cantidad (al menos 1,5 μ g de ADN) como de calidad (alta pureza y bajo nivel de contaminación con ADN cromosomal de *E. coli*), necesarios para la secuenciación de los fósmidos utilizando la plataforma de secuenciación de alto rendimiento Roche 454.

4.2.4.1. Rendimiento y calidad de de los fósmidos extraídos

El kit comercial utilizado para la extracción de los fósmidos (QIAprep Miniprep, Qiagen) permitió obtener altos rendimientos de ADN fosmídico (entre 3,1 y 30 μg de ADN) con una relación de absorvancia 260/280 promedio de aproximadamente 1,8. Por otra parte, se evaluó el grado de contaminación con ADN cromosomal de *E. coli*, ya que éste podría interferir tanto en la secuenciación de los fósmidos como en el ensamblado de las secuencias generadas. En primer lugar, se realizó una corrida electroforética de 300 ng de los fósmidos purificados, observando bandas delgadas pero bien definidas que podrían corresponder a la conformación lineal de los fósmidos (tamaño aproximado de 40kb, Figura 4.5). Además, se identificaron bandas de mayor peso molecular que podrían pertenecer a ADN genómico o a otras conformaciones del fósrido. A fin de estudiar con mayor detalle este punto, se digirió el ADN fosmídico utilizando la enzima de restricción EcoRI. Debido a que el vector de clonado sólo posee un sitio de corte para esta enzima, podría generar fósmidos linealizados diferenciándolos del ADN genómico, aunque los insertos clonados también pueden contener sitios de restricción para EcoRI. La digestión de cada extracto fosmídico generó bandas bien definidas que en su totalidad sumaron entre 32 y 48 kb, valores similares a los obtenidos cuando los mismos fósmidos se digirieron con la enzima NotI (Figura 4.4). Este resultado indica que la mayor parte del ADN purificado corresponde al fósrido. Sin embargo, también se observaron fragmentos de ADN de diversos tamaños (evidenciados por una fluorescencia más tenue a lo largo de las calles del gel de agarosa, Figura 4.5), lo cual podría corresponder al ADN genómico digerido.

Con el objetivo de evaluar la proporción aproximada de ADN genómico de *E. coli* presente en el ADN fosmídico, se estimó la abundancia relativa de genes que codifican para el gen ARNr 16S bacteriano utilizando la técnica de qPCR. Para ello se asumió que los insertos clonados no contenían genes ARNr 16S. Además, dado que existen alrededor de siete copias de este gen por cromosoma de *E. coli* [Klappenbach et al., 2000], se consideró que cada siete copias del gen ARNr 16S detectadas se extrae un cromosoma de la célula hospedadora. En base a este análisis, se pudo estimar que el ADN cromosomal representaría menos del 3,8% del ADN purificado (Tabla 4.4). Este nivel de contaminación fue considerado aceptable, en particular debido a la alta cobertura de secuenciación que posibilita el uso de la plataforma 454 Roche.

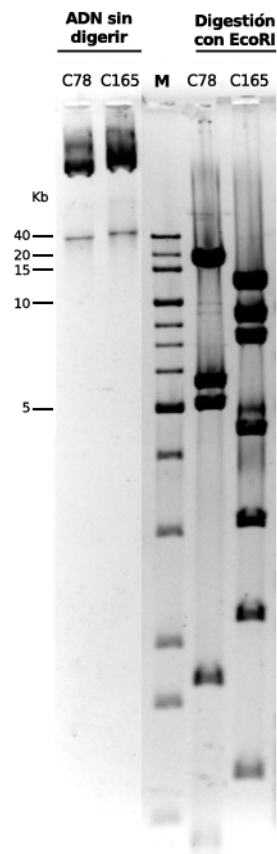


Figura 4.5: Corrida electroforética en gel de agarosa 0,7% (p/v). Sólo se muestran, de manera representativa, los resultados obtenidos con los fósmidos C78 y C165. M: marcador 1Kb Extension Ladder (Invitrogen).

Tabla 4.4: Estimación de la abundancia de genes ARNr 16S en los extractos de ADN fosmídico.

| Fósmido ¹ | copias del gen | |
|----------------------|-----------------------|-------------------------|
| | ARNr 16S por reacción | % de ADN <i>E. coli</i> |
| C78 | $3,53 \cdot 10^5$ | 2,5 |
| C165 | $3,47 \cdot 10^5$ | 2,5 |
| C334 | $5,36 \cdot 10^5$ | 3,8 |
| C340 | $3,11 \cdot 10^5$ | 2,2 |
| I342 | $3,51 \cdot 10^5$ | 2,5 |
| M32 | $4,89 \cdot 10^5$ | 3,5 |

1: Durante la extracción de los fósmidos provenientes de los clones M117 y C293 se obtuvo menor cantidad de ADN respecto del resto, por lo que no fue suficiente para poder realizar la estimación de genes ARNr 16S en dichos extractos.

4.2.4.2. Secuenciación

La secuenciación completa de los fósmidos fue realizada mediante pirosecuenciación utilizando la plataforma 454 Roche en el Instituto de Agrobiotecnología Rosario (INDEAR). Las secuencias obtenidas presentaron un tamaño promedio que varió entre 295 y 330 pb. La calidad de las mismas fue aceptable ya que en su mayoría mostraron menos de una base incorrecta por cada 100 bases secuenciadas (Q mayor a 20). Dichos errores, comunes en esta tecnología de secuenciación, se vieron compensados por una alta cobertura de las secuencias generadas, la cual varió entre 39 y 116.

Luego de obtener la secuencia completa de los fósmidos, se eliminó manualmente la secuencia del vector. Los fragmentos clonados mostraron valores de GC entre 50,7 y 61,4% y una longitud entre 24,8 y 41,3 kb (Tabla 4.5). Considerando un tamaño de inserto promedio de 34,5 kb, estos resultados permiten deducir que a partir de la biblioteca metagenómica construida en el presente trabajo, ha sido posible identificar un fósrido conteniendo genes de interés cada 200 Mb analizadas.

Tabla 4.5: Tamaño y porcentaje de GC de los insertos clonados

| Inserto | Tamaño (kb) | % de GC |
|---------|-------------|---------|
| M117 | 36,7 | 54,1 |
| M32 | 37,6 | 61,1 |
| C78 | 24,8 | 50,7 |
| C165 | 32,2 | 61,4 |
| C293 | 41,3 | 57,8 |
| C334 | 34,3 | 56 |
| C340 | 31,7 | 55,6 |
| I342 | 37,4 | 53 |

4.3. Discusión

Un paso crítico en los análisis metagenómicos es el acceso al material genético contenido en una muestra ambiental. Al respecto, varios protocolos de extracción de ADN han sido diseñados a fin de obtener ADN metagenómico a partir de suelo o sedimentos contaminados [Desai y Madamwar, 2007, Fortin et al., 2004, Zhou et al., 1996]. En el presente estudio se evaluaron dos métodos de extracción directa de ADN, en los que la ruptura celular se realizó en presencia de la matriz que compone la

muestra ambiental (lisis *in situ*). A diferencia de los métodos de extracción indirecta, en los que las células son separadas de la matriz previo a su ruptura, los métodos directos son más diversos y permiten obtener mayor rendimiento de ADN [Delmont et al., 2011, Gabor et al., 2003]. Rendimientos de extracción mayores generalmente se asocian directamente a la obtención de ADN proveniente de una fracción más representativa de las poblaciones microbianas presentes en la muestra y, por lo tanto, a mayor diversidad genética [Roose-Amsaleg et al., 2001]. Sin embargo, aún no se ha desarrollado un método de extracción de ADN metagenómico que no se vea afectado por desvíos ni influenciado por el tipo de muestra y por el proceso de extracción [Carrigg et al., 2007, Delmont et al., 2011, Gabor et al., 2003, Singh et al., 2009]. Esto representa uno de los principales desafíos en los análisis de comunidades utilizando metodologías independientes del cultivo de microorganismos. Para la construcción de la biblioteca metagenómica se seleccionó el método manual, dado que permitió obtener mayor rendimiento y un tamaño de ADN adecuado para el clonado en fósmidos. Asimismo, la calidad del ADN fue adecuada, debido a que se logró obtener aproximadamente 8000 clones por reacción de clonado. Generalmente, el kit CopyControl HTP Fosmid Library Production de Epicentre, permite generar entre 10.000 y 50.000 clones por reacción al utilizar ADN purificado de muestras ambientales. Sin embargo, dependiendo de la calidad y la pureza del ADN metagenómico utilizado, el rendimiento puede variar entre 3.000 y 80.000 clones por reacción [Taupp et al., 2009].

Otro aspecto a tener en cuenta, previo a la construcción de una biblioteca metagenómica, es la cobertura deseada. Idealmente sería deseable que la totalidad de los genes presentes en una muestra ambiental se encuentren representados en la biblioteca al menos una vez. Si bien la generación de este tipo de bibliotecas es relativamente simple, el gran número de clones necesarios para una cobertura significativa del metagenoma de comunidades complejas (como aquellos derivadas de muestras de suelo o sedimentos), hace que la construcción y análisis de las mismas represente un gran desafío. Principalmente, esto se debe a que los miembros individuales de una comunidad generalmente se encuentran en proporciones desiguales y por lo tanto resulta difícil analizar a los miembros menos abundantes de las comunidades microbianas [Ferrer et al., 2009, Vieites et al., 2010]. Por esta razón, los intentos de calcular el tamaño de una biblioteca para lograr una cobertura adecuada de los genomas presentes en una muestra ambiental son poco frecuentes. La mayoría de las bibliotecas metagenómicas cuyos clones poseen insertos de alto peso molecular contienen menos de 100.000 clones, número que es varios órdenes de magnitud menor al requerido para capturar la totalidad de la diversidad microbiana en una comunidad compleja [Riesenfeld et al., 2004]. A pesar de ello, aún bibliotecas de menos de 50.000 clones obtenidos a partir de muestras de ambientes complejos son capaces de proveer un reservorio invaluable de información genética, imposible de acceder por métodos convencionales [Steele et al., 2009]. El tamaño de la biblioteca metagenómica realizada en el presente trabajo fue calculada en base a la abundancia relativa, estimada por qPCR, de genes de dioxigenasas correspondientes a las variantes

C, D y T en la muestra OR07. Teniendo en cuenta que la abundancia de estos genes fue hasta dos órdenes de magnitud menor respecto de los genes ARNr 16S (Capítulo 3, [Marcos et al., 2012]) y que los genomas de bacterias marinas pueden poseer en promedio 1,5 copias del gen ARNr 16S por genoma [Lee et al., 2009], se necesitarían clonar aproximadamente 0,13 Gb para encontrar una copia del gen de interés. Para ello se asumió además, que el tamaño promedio del genoma de las bacterias presentes en el sedimentos es de aproximadamente 2 Mb [Sabehi et al., 2005] y que la abundancia de genomas provenientes de organismos eucariotas es despreciable. Sin embargo, con el fin de aumentar las probabilidades de encontrar genes de interés en la biblioteca metagenómica construida, se clonaron aproximadamente 1,6 Gb de información genética de la comunidad. Por lo tanto, en esta biblioteca estaría representada la información equivalente a aproximadamente 800 genomas de los organismos más abundantes de la comunidad microbiana presente en la muestra OR07.

La identificación de clones conteniendo genes de interés dentro de la biblioteca metagenómica se realizó utilizando dos estrategias diferentes, aunque complementarias entre sí [Riesenfeld et al., 2004, Suenaga, 2012]. Una de ellas, la estrategia molecular, se basó en la identificación de genes codificantes para la subunidad mayor de enzimas RHO involucradas en el primer paso de la degradación de HAPs a partir de reacciones de PCR, utilizando tanto cebadores específicos como de amplia cobertura. Con dicha estrategia se lograron identificar tres clones, uno de los cuales (M117) posee el gen de la variante T de enzimas RHO descrita en el capítulo 3. Esta variante fue abundante en sedimentos de Planta Orión, lo cual sugiere que los microorganismos conteniendo dicha variante alélica podrían ser miembros relevantes de la comunidad microbiana. Por lo tanto, la secuenciación del fósido M117 se consideró de particular interés. El análisis de su secuencia permitiría conocer la secuencia completa de este gen, así como también su contexto genómico.

Durante el análisis molecular se intentó identificar clones conteniendo genes de dioxigenasas correspondientes a la variante D, otra de las variantes más abundantes del sitio. Sin embargo, no fue posible detectar clones conteniendo dicha variante. Debido a que es probable que los cebadores utilizados hayan generado productos de amplificación como consecuencia de su hibridación inespecífica, el fósido 14A-12 no fue seleccionado para ser secuenciado completamente. No obstante, podría contener genes codificante para enzimas fenilpropionato dioxigenasas y 2,4-D oxigenasas. Si bien estas enzimas poseen un dominio Rieske conservado, no pertenecen al grupo de oxigenasas capaces hidroxilar HAPs [Pérez-Pantoja et al., 2010b, Pieper et al., 2010]. Sin embargo, su análisis podría ser de interés en el estudio de genes involucrados en la degradación de compuestos monoaromáticos sustituidos. El hecho de no haber identificado clones conteniendo genes de la variante D de enzimas RHO en la biblioteca metagenómica podría deberse a que durante la construcción de la misma se utilizó un método de extracción de ADN diferente al empleado en la determinación de la abundancia de genes D. Luna y colaboradores observaron que, al utilizar el protocolo de extracción de ADN desarrollado por Zhou y

colaboradores [Zhou et al., 1996], se obtienen ribotipos que no logran ser detectados con otros métodos de extracción y viceversa [Luna et al., 2006]. Otra razón, por la que estos genes no lograron ser identificados en la biblioteca metagenómica, podría deberse a que los mismos se encuentren codificados en plásmidos. Dado que el ADN plasmídico generalmente posee un tamaño menor al requerido para su clonado en fósidos, es posible que sus secuencias no se vean representadas en la biblioteca construida en el presente trabajo.

La identificación de clones utilizando ensayos moleculares posee el potencial de identificar secuencias que no pueden ser expresadas en el huésped. Sin embargo, debido a que dichos ensayos dependen del conocimiento previo de secuencias de interés, pocas veces permiten identificar genes con funciones novedosas. Estrategias de búsqueda mediante ensayos funcionales superan esta limitación, ya que su principal ventaja es que son capaces de detectar productos de genes funcionales, y por ende genes completos, sin necesidad de conocer previamente al menos parte de sus secuencias [Simon y Daniel, 2009]. Una combinación de estrategias de análisis posibilita el acceso a una mayor diversidad de los genes de interés a partir de una biblioteca metagenómica [Riesenfeld et al., 2004]. Por esta razón, se utilizaron tanto estrategias moleculares y funcionales para la identificación de clones conteniendo genes involucrados en la degradación de hidrocarburos aromáticos. Uno de los ensayos funcionales seleccionados consistió en la detección de enzimas RHO involucradas en el primer paso de la degradación de HAPs, utilizando indol como sustrato de las mismas. Si bien en el sitio de estudio se encontró una gran abundancia de genes codificantes para dichas enzimas (Capítulo 3, [Marcos et al., 2012]), sólo el clon I342 presentó un color azul tenue producto de la oxidación del indol por actividad dioxigenasa [Ensley et al., 1983]. Es posible que la biblioteca posea mayor cantidad de clones conteniendo genes de dioxigenasa iniciales, pero probablemente no sean expresados por falta de sus promotores o secuencias reguladoras en el inserto que las contiene. Por otro lado, posiblemente el indol no haya sido el sustrato adecuado para estas enzimas, debido a que muchas de ellas pueden poseer mayor afinidad por otros sustratos aromáticos [Carredano et al., 2000, Parales et al., 2000]. No obstante, no existen otros ensayos funcionales disponibles para dichas enzimas.

Otro ensayo funcional utilizado para la detección de clones de interés se basó en el clivaje de catecol por actividad de enzimas extradiol dioxigenasas. Dentro del grupo de enzimas EXDO, las catecol 2,3 dioxigenasas intervienen en la vía baja de la degradación de HAPs, con preferencia por sustratos monocíclicos como 1,2-dihidroxibenceno (o catecol) [Junca et al., 2004, Suenaga et al., 2007]. Con esta metodología fue posible aislar cinco clones con capacidad de expresar estas enzimas. El clivaje del catecol no es una reacción específica de enzimas catecol 2,3 dioxigenasas. Suenaga y colaboradores reportaron que subfamilias de EXDO no sólo presentan la capacidad de romper el anillo de catecol, sino que también poseen especificidad por otros sustratos aromáticos como 2,3-dihidroxibifenilo, 3-metilcatecol, 4-metilcatecol y 4-clorocatecol [Suenaga et al., 2007]. Particularmente, la subfamilia de

EXDO 1.2.G mostró la misma reactividad frente catecol y 2,3-dihidroxibifenilo, siendo su homóloga más cercana una 2,3 dihidroxibifenil-1,2-dioxigenasa [Suenaga et al., 2007], enzima involucrada en la vía alta de degradación de HAPs. Por lo que aquellos clones capaces de degradar catecol podrían contener tanto genes EXDO de la vía baja de degradación de HAPs, como EXDO que participen de la ruptura de anillos aromáticos en la vía alta. Esta hipótesis será examinada en el siguiente capítulo, por medio del análisis de las secuencias de dichos clones.

A pesar de que se observó ADN de *E. coli* en el extracto fosmídico utilizado para la secuenciación, fue posible ensamblar con alta cobertura la secuencia completa de cada uno de insertos clonados. El tamaño promedio de los mismos fue de 34,5 kb, por lo que probablemente contengan operones completos involucrados en la degradación de hidrocarburos aromáticos y en particular de HAPs. La organización génica de estos fragmentos, así como el análisis de las posibles rutas degradativas utilizadas por los microorganismos autóctonos de sedimentos intermareales de Bahía Ushuaia, se presentará en el Capítulo 5. Sólo en pocos trabajos se han utilizado bibliotecas metagenómicas para el estudio de la degradación de compuestos aromáticos [Brennerova et al., 2009, Ono et al., 2007, Silva et al., 2013, Suenaga et al., 2009]. En ninguno de estos trabajos se estudiaron sedimentos de ambientes marinos, matriz que acumula HAPs debido a la hidrofobicidad de estos compuestos [Commendatore et al., 2012]. Por lo tanto, la biblioteca metagenómica de OR07 representa un recurso con gran potencial para el descubrimiento de genes, enzimas y rutas metabólicas novedosas.

Capítulo 5

ANÁLISIS DE LOS FRAGMENTOS IDENTIFICADOS EN LA BIBLIOTECA METAGENÓMICA: ASIGNACIÓN TAXONÓMICA Y ANOTACIÓN FUNCIONAL

5.1. Introducción

Numerosas cepas bacterianas aisladas a partir de hábitats marinos poseen la capacidad de utilizar HAPs como única fuente de carbono y energía. Los estudios realizados sobre la capacidad degradativa de estas bacterias generalmente se centran en las características fisiológicas y ecológicas de las mismas, así como también en el análisis de genes específicos como por ejemplo aquellos codificantes para enzimas que participan de las rutas degradativas de estos compuestos [Hedlund y Costa, 2010, Pinyakong et al., 2012, Staley, 2010]. La secuenciación reciente de los genomas de cepas marinas del género *Cycloclasticus* y *Novosphingobium* ha permitido tener acceso a los genes que podrían estar involucrados en las vías degradativas de HAPs. Particularmente, en los genomas de *Cycloclasticus* sp. P1 y *Cycloclasticus* sp. PY97M, se detectaron 18 y 12 genes codificantes para la subunidad alfa de enzimas RHO, respectivamente [Cui et al., 2013, Lai et al., 2012]. En cuanto a las cepas secuenciadas del género *Novosphingobium* (US6-1 y PP1Y), capaces de utilizar diferentes compuestos aromáticos [D'Argenio et al., 2011, Luo et al., 2012], también presentan múltiples copias (7 y 13 copias respectivamente, [Gan et al., 2013]) de genes codificantes para enzimas RHO. Por lo que se considera que estos microorganismos se encuentran altamente especializados en la degradación de HAPs [Aylward et al., 2013].

A pesar de ello, poco se conoce sobre la presencia de otros genes degradativos y su participación en las rutas catabólicas empleadas durante la biodegradación de estos compuestos en el ambiente marino. De los genomas secuenciados, sólo se estudiaron en detalle los genes degradativos de *Novosphingobium* US6-1. Los mismos se encontraron distribuidos en el cromosoma y en el plásmido pLA1, de 188 kpb [Stolz, 2014, Yun et al., 2014]. A su vez, Yun y colaboradores demostraron que el plásmido

pLA1 posee genes codificantes para las enzimas de la vía degradativa de HAPs de bajo peso molecular mediada por la enzima catecol 2,3-dioxigenasa. Mientras que los genes correspondientes a la vía degradativa de *p*-hidroxibenzoato (mediada por la enzima protocatéquico 4,5-dioxigenasa) se localizan en el cromosoma de esta bacteria [Yun et al., 2014].

Por otra parte, mucho menos se conoce sobre las rutas degradativas utilizadas por microorganismos no cultivados de ambientes marinos. Estos últimos pueden ser más abundantes que los microorganismos cultivados, tal como se ha demostrado en ambientes Subantárticos [Marcos et al., 2012]. En este capítulo se describe el análisis de los fragmentos genómicos provenientes de microorganismos de sedimentos de Bahía Ushuaia, los cuales fueron seleccionados a partir de la biblioteca metagenómica descrita en el capítulo anterior en base a la presencia de genes que podrían codificar para enzimas de las vías degradativas de hidrocarburos aromáticos. En primer lugar, se realizó la anotación funcional de los genes identificados en los insertos secuenciados. Asimismo, se llevó a cabo la asignación taxonómica de los fragmentos clonados con el fin de determinar la posible afiliación filogenética de los microorganismos que contienen dichos fragmentos en su genoma. Por último, se estudiaron en detalle los genes involucrados en la degradación de hidrocarburos aromáticos, su entorno genómico y las diferentes reacciones que podrían catalizar las enzimas codificadas por estos genes. Esta información contribuye a la comprensión de los mecanismos degradativos utilizados por los microorganismos aún no cultivados de este ambiente.

5.2. Resultados

5.2.1. Información general sobre los fragmentos clonados

5.2.1.1. Predicción de genes y anotación funcional

La predicción de los genes presentes en los fragmentos clonados y su asignación funcional (anotación) se realizó utilizando dos sistemas integrales de predicción y anotación automática: Integrative Services for Genomic Analysis (ISGA) y Rapid Annotation using Subsystem Technology (RAST). Ambos sistemas utilizan programas de predicción similares (Glimmer), los cuales realizan la búsqueda y ubicación de genes mediante patrones estadísticos basados en la información intrínseca del ADN [Aziz et al., 2008, Hemmerich et al., 2010]. Sin embargo, utilizan bases de datos diferentes durante la asignación funcional, lo que permite complementar la información obtenida a partir de cada uno de estos sistemas. A su vez, y con el fin de verificar las predicciones obtenidas con los sistemas automáticos, se empleó el programa FgeneB, ya que permite realizar predicciones de genes de manera más exacta [Angelova et al., 2010, Solovyev y Salamov, 2011].

Las incongruencias en la predicciones fueron examinadas y corregidas manualmente mediante el análisis por homología de secuencias utilizando la herramienta tblastx [Altschul et al., 1990]. Las potenciales funciones de los genes identificados también fueron analizadas manualmente a fin de confirmar la presencia de dominios conservados en sus secuencias traducidas (a partir del programa InterPro [Jones et al., 2014]) y estimar su participación en diferentes rutas metabólicas (mediante la base de datos KEEG [Kanehisa et al., 2014]). Se identificaron entre 34 y 50 secuencias codificantes de proteínas (CDS, por la abreviatura de *coding sequences* en inglés) en cada uno de los fragmentos clonados, sumando un total de 316 CDSs (Tabla 5.1).

Tabla 5.1: Asignación funcional de los genes identificados en los fragmentos de ADN clonados

| Secuencia | Hebra | Inicio | Fin | Predicción génica | Blastp (primer alineamiento) | %id | Nº de acceso |
|-----------------------|-------|--------|-------|--|--|-----|----------------|
| FRAGMENTO M117 | | | | | | | |
| M117-01 | + | 2 | 535 | Fosforribosiltransferasa | N-(5'-fosforribosil) antranilato isomerasa [<i>Pseudomonas</i> sp. M47T1] | 52 | WP_008375506.1 |
| M117-02 | + | 528 | 1745 | Triptofano sintasa, sub.β | Triptofano sintasa, sub.β [<i>Allochromatium vinosum</i> DSM 180] | 76 | YP_003443566.1 |
| M117-03 | + | 1742 | 2551 | Triptofano sintasa, sub.α | Triptofano sintasa, sub.α [<i>Thioalkalibrio sulfidophilus</i> HL-EbGr7] | 54 | YP_002513327.1 |
| M117-04 | + | 2555 | 3469 | Acetyl-coenzyma A carboxiltransferasa | Acetyl-coenzyma A carboxiltransferasa [endosymbiont of <i>Riftia pachyptila</i>] | 70 | WP_005965843.1 |
| M117-05 | + | 3586 | 4854 | Folilpoliglutamato/dihidrofolato sintasa | Folilpoliglutamato/dihidrofolato sintasa [<i>Methylovorus glucosectrophus</i> SIP3-4] | 46 | YP_003051315.1 |
| M117-06 | + | 4966 | 5562 | Prot. Relacionada con la esporulación (DedD) | Prot. de esporulación [<i>Cycloclasticus</i> sp. P1] | 38 | YP_006837627.1 |
| M117-07 | + | 5677 | 6174 | Prot. Productora de colicina V | Proteína de membrana [<i>Ralstonia solanacearum</i> CFBP2957] | 35 | YP_003745326.1 |
| M117-08 | + | 6222 | 7730 | Amidofosforribosil transferasa | Amidofosforribosil transferasa [<i>Nitrosococcus halophilus</i> Nc 4] | 66 | YP_003528550.1 |
| M117-09 | + | 7714 | 9255 | Xaa-His dipeptidasa | Dipeptidasa [<i>Thermosipho africanus</i>] | 32 | WP_004103090.1 |
| M117-10 | - | 10088 | 9405 | Posible peptidasa dependiente de metales | Proteína hipotética [<i>Reinekea blandensis</i>] | 50 | WP_008047766.1 |
| M117-11 | - | 10701 | 10138 | Familia de prot. Lipido A 3-O-desacilasa | Proteína hipotética [<i>Methylobacillus flagellatus</i> KT] | 37 | YP_544958.1 |
| M117-12 | + | 10931 | 11365 | Superfamilia de tioesterasas | Proteína hipotética [<i>Neisseria elongata</i>] | 45 | WP_003769932.1 |
| M117-13 | + | 11408 | 13228 | Prot. de unión a GTP, TypA/BipA | Prot. de unión a GTP, TypA [<i>Methylococcus capsulatus</i>] | 68 | YP_115246.1 |
| M117-14 | + | 13228 | 13665 | D-tirosil-tRNA(Tyr) desacilasa | D-tirosil-tRNA(Tyr) desacilasa [<i>Methylophaga aminisulfidivorans</i>] | 57 | WP_007145718.1 |
| M117-15 | + | 13712 | 14530 | Bis(5'-nucleosil)-tetrafosfatasa simétrica | Bis(5'-nucleosil)-tetrafosfatasa simétrica [<i>Thiorhodococcus dreusii</i>] | 55 | WP_007039786.1 |
| M117-16 | + | 14606 | 15874 | 1,2-orto-halobenzoato dioxigenasa, sub. α | Prot. Hipotética [<i>Bacillus</i> sp. L1] | 50 | WP_017727645.1 |
| M117-17 | + | 16016 | 16885 | Xantin deshidrogenasa, sub. de unión a FAD | Posible dominio de unión a FAD [microorg. marino no cult.] | 60 | ABZ06268.1 |
| M117-18 | + | 16901 | 17377 | Xantin deshidrogenasa sub. Fe-S | Posible subunidad menor de oxidorreductasa [<i>Poribacteria bacterium</i> no cult.] | 73 | AAW84297.1 |
| M117-19 | + | 17380 | 19668 | Xantin deshidrogenasa, sub. de unión a Mo | Posible subunidad mayor de oxidorreductasa [<i>Poribacteria bacterium</i> no cult.] | 53 | AAW84298.1 |
| M117-20 | + | 19675 | 19965 | Familia proteica thiS | Proteína hipotética [<i>Blastopirellula marina</i>] | 40 | WP_002654064.1 |
| M117-21 | - | 20569 | 20063 | Sub. β de dioxigenasa de aromáticos | Sub. β benzoato 1,2-dioxigenasa [<i>Rhizobium leguminosarum</i>] | 42 | WP_003550359.1 |
| M117-22 | - | 21908 | 20559 | Benzoato 1,2-dioxigenasa, sub. α | Sub. α de benzoato 1,2-dioxigenasa [<i>Alisewanella jeotgali</i>] | 47 | WP_008949535.1 |
| M117-23 | + | 22335 | 23594 | Posible benzoato 1,2 dioxigenasa | Dioxigenasa de anillos aromáticos, sub α [<i>Cycloclasticus</i> sp. P1] | 64 | YP_006837858.1 |
| M117-24 | + | 23614 | 24099 | Sub. β de benzoato 1,2-dioxigenasa | Dioxigenasa de anillos aromáticos, sub. β [<i>Cycloclasticus</i> sp. P1] | 55 | YP_006837857.1 |
| M117-25 | + | 24262 | 25221 | 4-carboximucolactona descarboxilasa | Glioxalasa [<i>Cycloclasticus</i> sp. P1] | 74 | YP_006837855.1 |
| M117-26 | + | 25325 | 26392 | Proteína hipotética | Lactoilglutatin liasa [<i>Cycloclasticus</i> sp. P1] | 49 | YP_006837854.1 |
| M117-27 | + | 26416 | 26934 | G:T/U ADN-glicosilasa | G:T/U uracil/timina ADN-glicosilasa [<i>Methylophaga</i> sp. JAMI1] | 49 | YP_006295458.1 |
| M117-28 | + | 27162 | 28070 | Desaturasa de ácidos grasos | Desaturasa de ácidos grasos [<i>Cycloclasticus</i> sp. P1] | 56 | YP_006837041.1 |

| Secuencia | Hebra | Inicio | Fin | Predicción génica | Blastp (primer alineamiento) | %id | Nº de acceso |
|-----------|-------|--------|-------|---|---|-----|----------------|
| M117-29 | + | 28310 | 28483 | Rubredoxina | Rubredoxin-NAD(+) reductasa [<i>Methylophaga Ionarensis</i>] | 65 | WP_009725665.1 |
| M117-30 | + | 28711 | 29166 | Familia de prot. de canales iónicos | Transportador iónico [<i>Pseudomonas syringae</i>] | 51 | WP_007251521.1 |
| M117-31 | + | 29260 | 30033 | Proteína hipotética conservada | Proteína hipotética [<i>Neptunibacter caesariensis</i>] | 61 | WP_007020791.1 |
| M117-32 | - | 30598 | 30044 | Sub. β de naf/bif dioxigenasa | Sub. β de dioxigenasa de HAPs [<i>Cycloclasticus</i> sp. P1] | 54 | YP_006837518.1 |
| M117-33 | - | 31932 | 30598 | Sub. α de naf/bif dioxigenasa | Sub. α de dioxigenasa de HAPs [<i>Cycloclasticus</i> sp. P1] | 59 | YP_006837517.1 |
| M117-34 | - | 33171 | 32056 | Desaturasa de ácidos grasos | Desaturasa de ácidos grasos [<i>Novosphingobium</i> sp. PP1Y] | 48 | YP_004535707.1 |
| M117-35 | - | 33765 | 33217 | Sub. β de naf/bif dioxigenasa | Sub. β de dioxigenasa de HAPs [<i>Cycloclasticus</i> sp. P1] | 71 | YP_006838779.1 |
| M117-36 | - | 35109 | 33778 | Sub. α de naf/bif dioxigenasa | Sub. α de dioxigenasa de HAPs [<i>Cycloclasticus</i> sp. P1] | 70 | YP_006838780.1 |
| M117-37 | - | 35724 | 35167 | Sub. β de oxigenasa de anillos aromáticos | Sub. β de oxigenasa [<i>Sphingomonas</i> sp. P2] | 46 | BAC65447.1 |
| M117-38 | - | 36728 | 35724 | Sub. α de naf/bif dioxigenasa | Sub. α de oxigenasa de aromáticos [<i>Novosphingobium aromaticivorans</i>] | 68 | NP_049184.1 |

FRAGMENTO M32

| | | | | | | | |
|--------|---|-------|-------|--|--|----|----------------|
| M32-01 | - | 2 | 464 | Posible proteína de membrana | Proteína hipotética [<i>Asticcacaulis</i> sp. AC466] | 36 | WP_023460097.1 |
| M32-02 | - | 835 | 461 | Regulador de la transcripción de la familia PadR | Regulador de la transcripción de la familia PadR [<i>Asticcacaulis</i>] | 49 | WP_006271480.1 |
| M32-03 | + | 854 | 994 | Proteína hipotética | - | - | - |
| M32-04 | - | 1753 | 1205 | Proteína hipotética | - | - | - |
| M32-05 | - | 4737 | 1993 | Alanin aminopeptidasa de membrana | Alanin aminopeptidasa de membrana M1 [<i>Kangitella koreensis</i> DSM 16069] | 35 | YP_003147377.1 |
| M32-06 | - | 5741 | 4734 | Proteína hipotética con dominio CAAX | - | - | - |
| M32-07 | - | 6543 | 5806 | Regulador de la transcripción de la familia AraC | Regulador de la transcripción de la familia AraC [<i>Rubrivivax gelatinosus</i>] | 39 | YP_005435522.1 |
| M32-08 | - | 6894 | 7208 | Ferredoxina, 2Fe-2S | Ferredoxina de 3-fenilpropionato dioxigenasa [<i>Novosphingobium</i>] | 49 | WP_008070362.1 |
| M32-09 | - | 8106 | 7198 | 2,3-dihidroxibifenil 1,2-dioxigenasa | 2,3-dihidroxibifenil 1,2-dioxigenasa [<i>Sphingobium chlorophenolicum</i> L-1] | 56 | YP_004555540.1 |
| M32-10 | - | 8804 | 8184 | Proteína reguladora de la familia TetR | Proteína reguladora de la familia TetR [<i>Collimonas fungivorans</i> Ter331] | 47 | YP_004754110.1 |
| M32-11 | + | 8934 | 9770 | 2-hidroximucónico semialdehído hidrolasa | 2,6-dioxo-6-fenilhexa-3-enoato hidrolasa [<i>Sphingobium chloroph. L-1</i>] | 67 | YP_004555539.1 |
| M32-12 | + | 9828 | 11135 | Subunidad mayor de naf/bif dioxigenasa | Prot. Hipotética [<i>Kordiimonas guangyangensis</i>] | 79 | WP_020398650 |
| M32-13 | + | 11132 | 11689 | Subunidad menor de naf/bif dioxigenasa | Prot. Hipotética [<i>Kordiimonas guangyangensis</i>] | 60 | WP_020398651 |
| M32-14 | + | 11719 | 12498 | cis-2,3-dihidrobifenil-2,3-diol dehidrogenasa | cis-2,3-dihidrobifenil-2,3-diol dehidrogenasa [<i>Sphingobium chloroph. L-1</i>] | 60 | YP_004555537.1 |
| M32-15 | + | 12547 | 13641 | Precursor protéico toIB | Proteína hipotética [<i>Candidatus Poribacteria</i> sp. WGA-4E] | 38 | WP_020384323.1 |
| M32-16 | + | 13680 | 15200 | Fosfatasa alcalina | Fosfatasa alcalina [<i>Croceibacter atlanticus</i> HTCC2559] | 31 | YP_003716291.1 |
| M32-17 | + | 15301 | 16812 | Beta-lactamasa | Beta-lactamasa [<i>Granulicella tundricola</i> MP5ACTX9] | 27 | YP_004210553.1 |
| M32-18 | + | 17007 | 18524 | Beta-lactamasa | Beta-lactamasa [<i>Caulobacter segnis</i> ATCC 21756] | 43 | YP_003591852.1 |
| M32-19 | - | 19202 | 18606 | Proteína hipotética | - | - | - |
| M32-20 | - | 20191 | 19202 | SMP-30/Gluconolactonasa | SMP-30/Gluconolactonasa/dominioLRE [<i>Burkholderia</i> sp. H160] | 35 | WP_008917135.1 |

| Secuencia | Hebra | Inicio | Fin | Predicción génica | Blastp (primer alineamiento) | %id | Nº de acceso |
|----------------------|-------|--------|-------|--|---|-----|----------------|
| M32-21 | - | 20994 | 20230 | Cadena corta de dehidrogenasa | Cadena corta de dehidrogenasa [<i>Ralstonia eutropha</i> JMP134] | 47 | YP_293391.1 |
| M32-22 | - | 21895 | 20996 | Proteína hipotética no caracterizada | Prot. Hipotética Reut_C6226 [<i>Ralstonia eutropha</i> JMP134] | 63 | YP_293392.1 |
| M32-23 | - | 22848 | 21892 | 3-hidroxiacil-CoA dehidrogenasa | 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa [<i>Achromobacter xylosoxidans</i> A8] | 47 | YP_003980885.1 |
| M32-24 | - | 24212 | 22845 | Proteína MFS | transportador hipotético [<i>Pseudomonas alcaligenes</i>] | 43 | WP_021699138.1 |
| M32-25 | - | 24844 | 24209 | Proteína reguladora de la familia TetR | Proteína reguladora de la familia TetR [<i>Verrucosisspora maris</i>] | 34 | YP_004408275.1 |
| M32-26 | - | 25788 | 24889 | Beta-cetoadípico enol-lactona hidrolasa | Posible prolil aminopeptidasa [bacteria no cultivable A1Q1-fos.515] | 43 | AGC71332.1 |
| M32-27 | - | 25798 | 26892 | Proteína hipotética no caracterizada | Proteína hipotética [<i>Pseudomonas fluorescens</i>] | 38 | WP_003228181.1 |
| M32-28 | - | 26932 | 29070 | Receptor dependiente de TonB | Proteína hipotética [<i>Dasania marina</i>] | 36 | WP_019528999.1 |
| M32-29 | - | 29110 | 29280 | Proteína hipotética | - | - | - |
| M32-30 | + | 29271 | 31295 | CoA-ligasa de ácidos grasos de cadena larga | Proteína hipotética [<i>Sphingobium lactosutens</i>] | 42 | WP_021224688.1 |
| M32-31 | - | 31397 | 31573 | Proteína hipotética | - | - | - |
| M32-32 | - | 31586 | 32320 | Proteasa con dominio CAAAX | Proteína hipotética [<i>Rudamella lutea</i>] | 37 | WP_019987697.1 |
| M32-33 | + | 32387 | 33271 | Proteína hipotética con motivo HTH | Proteína con dominio HTH [<i>Flavobacterium johnsoniae</i> UW101] | 26 | YP_001193638.1 |
| M32-34 | - | 33750 | 33586 | Proteína hipotética | - | - | - |
| M32-35 | + | 33762 | 34160 | Proteína hipotética | - | - | - |
| M32-36 | - | 34413 | 34628 | Proteína hipotética | 3'-5' exonucleasa [<i>Thioalkalivibrio thiocyanoxidans</i>] | 46 | WP_006747890.1 |
| M32-37 | + | 34850 | 35092 | Proteína hipotética | - | - | - |
| M32-38 | - | 35733 | 35416 | Proteína hipotética | Proteína hipotética [<i>Novosphingobium nitrogenifigens</i>] | 42 | WP_018075945.1 |
| M32-39 | - | 37567 | 35798 | Familia protéica X-Pro dipeptidil-peptidasa | Proteína hipotética [<i>Henriciella marina</i>] | 40 | WP_018148565.1 |
| FRAGMENTO C78 | | | | | | | |
| C78-01 | + | 2 | 241 | Hidroxibencilendipiruvato hidratasa-aldolasa | Aldolasa [<i>Hydrocarboniphaga effusa</i>] | 80 | WP_007184427.1 |
| C78-02 | + | 244 | 861 | 2-hidroxicromen-2-carboxilato isomerasa | 2-hidroxicromen-2-carboxilato isomerasa [<i>Hydrocarboniphaga effusa</i>] | 58 | WP_007184424.1 |
| C78-03 | + | 858 | 2189 | Sub.α naftaleno 1,2-dioxigenasa | Sub.α de dioxigenasa de HAPs [<i>Sphingomonas</i> sp. A4] | 74 | BAD34447.1 - |
| C78-04 | + | 2234 | 2809 | Sub.β de RHO | Sub.β de dioxigenasa de HAPs [<i>Sphingomonas</i> sp. A4] | 55 | BAD34448.1 |
| C78-05 | + | 2840 | 3661 | Dihidrodiol deshidrogenasa | 2,3-dihidroxi-2,3-dihidrofenilpropionato deshidr. [<i>Hydrocarboniphaga</i> cf.] | 70 | WP_007184421.1 |
| C78-06 | + | 3692 | 4558 | Fumaril acetoacetato hidrolasa | Prot. hipotética [<i>Sphingomonas</i> sp. A4] | 64 | BAD34449.1 |
| C78-07 | + | 4607 | 5587 | Ferredoxin reductasa | Prot. hipotética [<i>Sphingomonas</i> sp. A4] | 26 | BAE93952.1 |
| C78-08 | + | 5609 | 6652 | Gentisato 1,2-dioxigenasa | Gentisato 1,2-dioxigenasa [<i>Hydrocarboniphaga effusa</i>] | 68 | WP_007184411.1 |
| C78-09 | + | 6685 | 7365 | Fumarilpiruvato hidrolasa | Fumarilacetoacetato hidrolasa [<i>Acidovorax radicans</i>] | 63 | WP_010461135.1 |
| C78-10 | + | 7381 | 8643 | Sub.α orto-halobenzoato 1,2 dioxigenasa | Sub.α RHO [<i>Hydrocarboniphaga effusa</i>] | 70 | WP_007184409.1 |
| C78-11 | + | 8647 | 9117 | Sub.β orto-halobenzoato 1,2 dioxigenasa | Sub.β RHO [<i>Leptothrix cholodnii</i> SP-6] | 60 | YP_001789833.1 |

| Secuencia | Hebra | Inicio | Fin | Predicción génica | Blastp (primer alineamiento) | %id | Nº de acceso |
|-----------|-------|--------|-------|--|--|-----|----------------|
| C78-12 | + | 9135 | 9773 | Maleilacetato isomerasa | Maleilacetato isomerasa [<i>Massilia timonae</i>] | 55 | WP_005666315.1 |
| C78-13 | + | 9946 | 10086 | Prot. hipotética | Posible transposasa [<i>Sphingobium</i> sp. SYK-6] | 72 | YP_004831235.1 |
| C78-14 | - | 11288 | 10209 | Prot. de transferencia de ADN | Posible transposasa [<i>Acidiphilium multivorum</i> AIU301] | 73 | YP_004284811.1 |
| C78-15 | - | 12374 | 11475 | Regulador transcripcional de la familia LysR | Regulador transcripcional de la familia LysR [<i>Sphingomonas</i> sp. A4] | 48 | BAE93937.1 |
| C78-16 | + | 12488 | 12607 | Proteína hipotética | - | - | - |
| C78-17 | + | 12567 | 12872 | Ferredoxina | Ferredoxina de dioxigenasa inicial [<i>Burkholderia</i> sp. DBT1] | 59 | AAK96190.1 |
| C78-18 | + | 12909 | 14429 | Aldehído deshidrogenasa | Posible salcildaldehído deshidrogenasa [<i>Hydrocarboniphaga effusa</i>] | 75 | WP_007184417.1 |
| C78-19 | + | 14440 | 15468 | Dominio protéico 2Fe-2S | Ferredoxin reductasa [<i>Sphingomonas</i> sp. A4] | 52 | BAE93942.1 |
| C78-20 | + | 15484 | 16728 | Dominio protéico Rieske 2Fe-2S | Sub.α salicilato 1-hidroxilasa [<i>Novosphingobium pentaromativorans</i>] | 53 | WP_007015975.1 |
| C78-21 | + | 16725 | 17195 | Sub.β orto-halobenzoato 1,2 dioxigenasa | Posible sub.β de oxigenasa [<i>Sphingomonas</i> sp. A4] | 43 | BAE93944.1 |
| C78-22 | + | 17223 | 18128 | 1,2-dihidroxinaftaleno dioxigenasa | 2,3-dihidroxibifenil-1,2-dioxigenasa [<i>Sphingomonas</i> sp. A4] | 79 | BAE93945.1 |
| C78-23 | + | 18530 | 18994 | Prot. de elementos móviles | Transposasa [<i>Gluconobacter thailandicus</i>] | 84 | WP_007284728.1 |
| C78-24 | + | 19003 | 19311 | Prot. de elementos móviles | Transposasa truncada [<i>Sphingomonas</i> sp. SKA58] | 78 | WP_009822135.1 |
| C78-25 | + | 19281 | 19457 | Proteína hipotética | - | - | - |
| C78-26 | + | 19545 | 19874 | Proteína de la familia transposasas | Prot. de elementos móviles [<i>Sphingobium japonicum</i>] | 88 | WP_006959279.1 |
| C78-27 | + | 19871 | 20593 | Integrasa | Posible transposasa [<i>Novosphingobium pentaromativorans</i>] | 88 | WP_007011061.1 |
| C78-28 | + | 20644 | 20970 | Proteína de la familia transposasas | Proteína hipotética [<i>Sphingobium yanoikuyae</i>] | 85 | WP_004212608.1 |
| C78-29 | + | 20967 | 21722 | Integrasa | Posible transposasa [<i>Sphingobium</i> sp. SYK-6] | 84 | YP_004835373.1 |
| C78-30 | + | 21849 | 22907 | CoA-ligasa de ácidos grasos de cadena larga | Posible transposasa de la familia IS110 [<i>Octadecabacter antarcticus</i> 307] | 78 | YP_007703449.1 |
| C78-31 | + | 22966 | 23139 | Prot. de elementos móviles | Región catalítica de integrasa [<i>Erythrobacter</i> sp. SD-21] | 88 | WP_006832477.1 |
| C78-32 | - | 23141 | 23254 | Proteína hipotética | Prot. de elementos móviles [<i>Sphingobium japonicum</i>] | 89 | WP_006961871.1 |
| C78-33 | - | 24581 | 23517 | Endonucleasa de la transferencia de ADN | Relaxasa [<i>Sphingobium yanoikuyae</i>] | 53 | WP_010339506.1 |
| C78-34 | - | 24778 | 24581 | Proteína hipotética | Proteína hipotética [<i>Sphingobium yanoikuyae</i>] | 68 | WP_010339507.1 |

FRAGMENTO C165

| | | | | | | | |
|---------|---|------|------|-------------------------------------|--|----|----------------|
| C165-01 | + | 16 | 168 | Lactoilglutación liasa | Proteína de resistencia a bleomicina [<i>Thalassospira profundimaris</i>] | 83 | WP_008888757.1 |
| C165-02 | + | 403 | 582 | Proteína hipotética | - | - | - |
| C165-03 | - | 1737 | 688 | 4-hidroxi-2-oxovalerato aldolasa | 4-hidroxi-2-oxovalerato aldolasa [<i>Thauera</i> sp. MZ1T] | 91 | YP_002355716.1 |
| C165-04 | - | 2675 | 1764 | Acetaldehído deshidrogenasa | Acetaldehído deshidrogenasa [bacteria no cultivable] | 93 | BAM45399.1 |
| C165-05 | - | 3274 | 2672 | Carboximuconolactona descarboxilasa | Carboximuconolactona descarboxilasa [<i>Methyloversatilis universalis</i>] | 76 | WP_008064265.1 |
| C165-06 | - | 3533 | 3342 | 4-oxalocrotonato tautomerasa | 4-oxalocrotonato tautomerasa [<i>Azoarcus toluclasticus</i>] | 84 | WP_018993067.1 |
| C165-07 | - | 4350 | 3559 | 4-oxalocrotonato descarboxilasa | Hidratasa/descarboxilasa [<i>Comamonas testosteroni</i>] | 78 | WP_003066638.1 |

| Secuencia | Hebra | Inicio | Fin | Predicción génica | Blastp (primer alineamiento) | %id | Nº de acceso |
|-----------|-------|--------|-------|---|---|-----|----------------|
| C165-08 | - | 4369 | 5157 | 2-oxopent-4-enoato hidratasa | 2-hidroxipent-2,4-dienoato hidratasa [<i>Cupriavidus metallidurans</i>] | 78 | YP_583473.1 |
| C165-09 | - | 5215 | 6069 | 2-hidroximucónico semialdehído hidrolasa | 2-hidroxi-6-oxo-2,4-heptadienoato hidrolasa [<i>Burkholderiales</i>] | 87 | WP_008328861.1 |
| C165-10 | - | 7654 | 6200 | 2-hidroximucónico semialdehído deshidrogenasa | 2-hidroximucónico semialdehído deshidrogenasa [<i>Burkholderia</i> sp. SJ98] | 92 | WP_008344256.1 |
| C165-11 | - | 8115 | 7684 | Proteína hipotética | Proteína hipotética [bacteria no cultivable] | 80 | BAM45392.1 |
| C165-12 | - | 9244 | 8300 | Catecol 2,3 dioxigenasa | Catecol 2,3 dioxigenasa [<i>Leptothrix cholodnii</i> SP-6] | 91 | YP_001792379.1 |
| C165-13 | - | 9631 | 9266 | Prot. Fe-S de transferencia de electrones | ferredoxina [<i>Acidovorax</i> sp. JS42] | 74 | YP_984544.1 |
| C165-14 | + | 9815 | 10726 | Regulador transcripcional CatR (familia LysR) | Regulador transcripcional de la familia LysR [<i>Acidovorax</i> sp. JS42] | 79 | YP_984543.1 |
| C165-15 | - | 11774 | 10713 | Fenol hidroxilasa DmpP | Oxido reductasa, subunidad de unión a FAD [<i>Verminephrobacter eis.</i> EF01-2] | 80 | YP_997547.1 |
| C165-16 | - | 12299 | 11943 | Fenol hidroxilasa DmpO | Subunidad de fenol hidroxilasa [<i>Diaphorobacter</i> sp. PCA039] | 83 | ACN62957.1 |
| C165-17 | - | 13855 | 12296 | Fenol hidroxilasa DmpN | Metano/tolueno/fenol hidroxilasa [<i>Leptothrix cholodnii</i> SP-6] | 92 | YP_001792383.1 |
| C165-18 | - | 14153 | 13884 | Fenol hidroxilasa DmpM | Componente MmoB/DmpM de monooxigenasa [<i>Verminephrobacter eis.</i> EF01-2] | 87 | YP_997550.1 |
| C165-19 | - | 15174 | 14179 | Fenol hidroxilasa DmpK/DmpL | Metano/tolueno/fenol hidroxilasa [<i>Verminephrobacter eiseniae</i> EF01-2] | 88 | YP_997551.1 |
| C165-20 | - | 15421 | 15212 | Fenol hidroxilasa DmpK | Subunidad fenol hidroxilasa [<i>Verminephrobacter eiseniae</i> EF01-2] | 70 | YP_997552.1 |
| C165-21 | + | 15520 | 15693 | Proteína hipotética | - | - | - |
| C165-22 | + | 15742 | 17424 | Regulador positivo de fenol hidroxilasa | Regulador transcripcional [<i>Verminephrobacter eiseniae</i> EF01-2] | 87 | YP_997553.1 |
| C165-23 | + | 17421 | 18200 | Proteína regulatoria GntR | Regulador transcripcional GntR [<i>Verminephrobacter eis.</i> EF01-2] | 73 | YP_997554.1 |
| C165-24 | - | 18172 | 18795 | Proteína de resistencia a antibióticos Mar-C | Proteína de resistencia a antibióticos Mar-C [<i>Hydrogenophaga</i> sp. PBC] | 87 | WP_009519313.1 |
| C165-25 | - | 19372 | 18884 | Acil deshidratasa | Deshidratasa de la familia MaoC [<i>Hydrogenophaga</i> sp. PBC] | 80 | WP_009519312.1 |
| C165-26 | - | 20327 | 19581 | Deshidrogenasa de cadena corta | Deshidrogenasa [<i>Ramlibacter tataouinensis</i> TTB310] | 81 | YP_004617397.1 |
| C165-27 | + | 20540 | 21139 | 2-hidroxicromen-2-carboxilato isomerasa | DSBA oxidorreductasa [<i>Polaromonas</i> sp. JS666] | 68 | YP_547103.1 |
| C165-28 | + | 21177 | 21860 | Dienelactona de la familia de hidrolasas | Carboximetilnbutenolida [<i>Variovorax paradoxus</i> EPS] | 72 | YP_004157875.1 |
| C165-29 | + | 21867 | 22805 | Proteína de la familia de amidhidrolasas | amidhidrolasa [<i>Hydrogenophaga</i> sp. PBC] | 68 | WP_009519308.1 |
| C165-30 | + | 22802 | 23455 | Glutathion S-transferasa | Glutathion S-transferasa [<i>Ramlibacter tataouinensis</i> TTB310] | 71 | YP_004617400.1 |
| C165-31 | - | 24576 | 23452 | Proteína CorA transportadora de Mg y Co | Proteína transportadora de Mg ⁺² [<i>Hydrogenophaga</i> sp. PBC] | 70 | WP_009520565.1 |
| C165-32 | - | 24605 | 25606 | Porfobilinogen sintasa | Deshidratasa de ácido delta-aminolevulinico [<i>Limnhabitans</i> sp. Rim28] | 87 | WP_019426269.1 |
| C165-33 | + | 25601 | 25732 | Proteína hipotética | - | - | - |
| C165-34 | + | 25899 | 27071 | Proteína hipotética | Proteína hipotética [<i>Hydrogenophaga</i> sp. PBC] | 56 | WP_009520563.1 |
| C165-35 | + | 27381 | 27809 | Proteína de membrana de función desconocida | Proteína hipotética [<i>Acidovorax</i> sp. KKS102] | 81 | YP_006852724.1 |
| C165-36 | + | 27832 | 28938 | Probable proteína transmembrana | Proteína VanZ [<i>Hydrogenophaga</i> sp. PBC] | 57 | WP_009516233.1 |
| C165-37 | + | 28955 | 29296 | Ferredoxina, 2Fe-2S | ferredoxina [<i>Hydrogenophaga</i> sp. PBC] | 83 | WP_009516234.1 |
| C165-38 | + | 29304 | 29927 | Alfa/beta hidrolasa | Proteína de transmembrana [<i>Variovorax paradoxus</i> S110] | 72 | YP_002946792.1 |
| C165-39 | + | 29974 | 31152 | D-alanina carboxipeptidasa | Beta-lactamasa [<i>Hydrogenophaga</i> sp. PBC] | 76 | WP_009516236.1 |

| Secuencia | Hebra | Inicio | Fin | Predicción génica | Blastp (primer alineamiento) | %id | Nº de acceso |
|-----------|-------|--------|-------|------------------------------------|--|-----|----------------|
| C165-40 | + | 31344 | 31721 | SSU Proteína ribosomal S12p (S23e) | 30S Proteína ribosomal S12 [Acidovorax sp. KKS102] | 98 | YP_006852729.1 |
| C165-41 | + | 31896 | 32178 | Proteína ribosomal S7 | 30S Proteína ribosomal S7 [Hydrogenophaga sp. PBC] | 98 | WP_009516238.1 |

FRAGMENTO C293

| | | | | | | | |
|---------|---|-------|-------|--|---|----|----------------|
| C293-01 | + | 59 | 274 | Sub. Beta de benzoato 1,2-dioxigenasa | Sub. Beta RHO [Novosphingobium sp. PP1Y] | 73 | YP_004534259.1 |
| C293-02 | + | 258 | 1250 | 4-hidroxitreonina-4-fosfato deshidrogenasa | 4-hidroxitreonina-4-fosfato deshidrogenasa [Novosphingobium sp. PP1Y] | 88 | YP_004534260.1 |
| C293-03 | + | 1247 | 2527 | Proteína con dominio rieske [2Fe-2S] | Subunidad mayor de oxigenasa [Sphingomonas sp. P2] | 92 | BAC65433.1 |
| C293-04 | + | 2524 | 3003 | Sub. Beta RHO | Subunidad pequeña de fenilpropionato dioxisig. [Novosphingobium sp. PP1Y] | 89 | YP_004534262.1 |
| C293-05 | + | 3046 | 3651 | Glutación S-transferasa | Glutación S-transferasa [Novosphingobium sp. PP1Y] | 88 | YP_004534263.1 |
| C293-06 | + | 3831 | 4682 | 2-hidroxiimucónico semialdehído hidrolasa | Alfa/beta hidrolasa [Novosphingobium sp. PP1Y] | 82 | YP_004534264.1 |
| C293-07 | + | 4702 | 5625 | Catecol 2,3-dioxigenase | Proteína de resistencia a bleomicina [Novosphingobium sp. PP1Y] | 95 | YP_004534265.1 |
| C293-08 | + | 5627 | 6058 | Proteína hipotética de dominio conservado (GlcG) | Proteína hipotética [Novosphingobium sp. PP1Y] | 76 | YP_004534266.1 |
| C293-09 | + | 6098 | 7582 | Hidroximuconato semialdehído deshidr. | Aldehído deshidrogenasa [Novosphingobium sp. PP1Y] | 86 | YP_004534267.1 |
| C293-10 | + | 7587 | 8399 | 2-ceto-4-pentenoato hidratasa | Hidratasa/descarboxilasa [Novosphingobium sp. PP1Y] | 92 | YP_004534268.1 |
| C293-11 | + | 8422 | 9360 | Acetaldehído deshidrogenasa | Posible acetaldéido deshidrogenasa [Sphingomonas sp. P2] | 91 | BAC65441.1 |
| C293-12 | + | 9357 | 10388 | 4-hidroxi-2-oxovalerato aldolasa | 4-hidroxi-2-oxovalerato aldolasa [Novosphingobium sp. PP1Y] | 97 | YP_004534270.1 |
| C293-13 | + | 10398 | 11168 | 4-oxalocrotonate decarboxylase (EC 4.1.1.77) | 4-oxalocrotonate decarboxylase [Novosphingobium pentaromativorans] | 91 | WP_007015985.1 |
| C293-14 | + | 11169 | 11381 | 4-oxalocrotonato tautomerasa | 4-oxalocrotonato tautomerasa [Novosphingobium sp. PP1Y] | 88 | YP_004534272.1 |
| C293-15 | + | 11383 | 11661 | Prot. Fe-S de transferencia de electrones | Proteína hipotética [Sphingobium xenophagum] | 84 | WP_019054254.1 |
| C293-16 | + | 11683 | 13182 | Aldehído deshidrogenasa | Salicilaldehído deshidrogenasa [Sphingobium xenophagum] | 96 | AAD45415.1 |
| C293-17 | + | 13222 | 14022 | Dihidrodiol deshidrogenasa | Posible dihidrodiol deshidrogenasa [Sphingobium xenophagum] | 89 | AAD45414.1 |
| C293-18 | + | 14048 | 14428 | Proteína hipotética | Proteína hipotética [Novosphingobium pentaromativorans] | 83 | WP_007015990.1 |
| C293-19 | - | 16076 | 14904 | Familia de prot. CoA transferasa III | L-carnitina deshidratasa [Novosphingobium sp. PP1Y] | 81 | YP_004535759.1 |
| C293-20 | - | 16867 | 16073 | Butiril CoA deshidrogenasa | Aldolasa [Novosphingobium sp. PP1Y] | 76 | YP_004534239.1 |
| C293-21 | - | 17721 | 16876 | Hidratasa de ácido 2-oxo-hepta-3-en-1,7-dioico | Hidratasa de ácido 2-oxo-hepta-3-en-1,7-dioico [Novosphingobium sp. PP1Y] | 80 | YP_004534240.1 |
| C293-22 | + | 17846 | 18706 | Alfa/beta hidrolasa | Alfa/beta hidrolasa [Novosphingobium sp. PP1Y] | 94 | YP_004534241.1 |
| C293-23 | - | 19802 | 18723 | Proteína de elementos móviles | Prot. De inserción de secuencias [Simorhizobium fredii HH103] | 85 | YP_005191839.1 |
| C293-24 | + | 20044 | 21246 | Alcano 1-monooxigenasa | Alcano 1-monooxigenasa [Alcanivorax borkumensis SK2] | 76 | YP_694427.1 |
| C293-25 | + | 21431 | 21844 | Rubredoxina | Rubredoxina [Marinobacter aquaeolei VT8] | 52 | YP_957727.1 |
| C293-26 | + | 21875 | 23329 | Aldehído deshidrogenasa | Aldehído deshidrogenasa [Oceanicaulis sp. HTCC2633] | 64 | WP_009802136.1 |
| C293-27 | + | 23360 | 24982 | Alcohol deshidrogenasa | Alcohol deshidrogenasa hipotética [Oceanicaulis sp. HTCC2633] | 77 | WP_009802135.1 |
| C293-28 | + | 25078 | 25752 | Proteína de membrana externa (precursor) | Familia de proteínas OmpW [Marinobacter aquaeolei VT8] | 56 | YP_957722.1 |

| Secuencia | Hebra | Inicio | Fin | Predicción génica | Blastp (primer alineamiento) | %id | Nº de acceso |
|-----------|-------|--------|-------|---|---|-----|----------------|
| C293-29 | + | 25845 | 28496 | Regulador bacteriano de la familia luxR | Regulador de genes <i>alk</i> [<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>] | 36 | YP_005430735.1 |
| C293-30 | + | 28515 | 29702 | Ferredoxin reductasa | Oxidorreductasa dependiente de FAD [<i>Marinobacter aquaeolei</i> VT8] | 46 | YP_957730.1 |
| C293-31 | + | 29949 | 30341 | Proteína no caracterizada | Proteína desconocida [<i>Novosphingobium aromaticivorans</i>] | 57 | NP_049067.1 |
| C293-32 | + | 30338 | 30556 | Proteína hipotética | - | - | - |
| C293-33 | - | 31695 | 31216 | Regulador transcripcional de la famili MarR | Proteína reguladora de la transcripción [<i>Erythrobacter</i> sp. NAP1] | 56 | WP_007163782.1 |
| C293-34 | + | 31770 | 32654 | Hidrolasa | Alfa/beta hidrolasa [<i>Erythrobacter</i> sp. NAP1] | 63 | WP_007163783.1 |
| C293-35 | + | 32651 | 33784 | Sistema tripartito de resistencia a multidirogas | Proteína de secreción de la flía. HlyD [<i>Erythrobacter litoralis</i> HTCC2594] | 67 | YP_459892.1 |
| C293-36 | + | 33787 | 35340 | Sistema tripartito de resistencia (membrana int.) | Probable proteína transmembrana [<i>Erythrobacter</i> sp. SD-21] | 79 | WP_006834177.1 |
| C293-37 | + | 35348 | 36784 | Sistema tripartito de resistencia (membrana ext.) | Proteína de membrana externa, precursor OprN [<i>Erythrobacter</i> sp. SD-21] | 62 | WP_006834178.1 |
| C293-38 | + | 36971 | 38560 | Familia de proteínas ABC1 | Proteína de síntesis de ubiquinona [<i>Sphingomonas</i> sp. SKA58] | 50 | WP_009824041.1 |
| C293-39 | + | 38695 | 39543 | Posible transposasa | transposasa [<i>Novosphingobium pentaromaticivorans</i>] | 90 | WP_007015319.1 |
| C293-40 | + | 39720 | 40349 | Proteína de elementos móviles | Proteína hipotética [<i>Sphingobium yanoikuyae</i>] | 77 | WP_004209593.1 |
| C293-41 | - | 40889 | 40599 | Proteína hipotética | Proteína hipotética [<i>Sphingopyxis baekryungensis</i>] | 100 | WP_022673015.1 |
| C293-42 | + | 40999 | 41269 | Proteína hipotética | Proteína hipotética [<i>Sphingopyxis baekryungensis</i>] | 99 | WP_022673014.1 |

FRAGMENTO C334

| | | | | | | | |
|---------|---|-------|-------|---|---|----|----------------|
| C334-01 | - | 2444 | 48 | Sensor proteóico | Sensor del sistema de transporte histidin quinasa PgtB [<i>Glactecola arctica</i>] | 40 | WP_007615937.1 |
| C334-02 | + | 2638 | 2847 | Proteína hipotética | - | - | - |
| C334-03 | - | 3974 | 3843 | Proteína hipotética | - | - | - |
| C334-04 | - | 3958 | 4827 | Alfa/beta hidrolasa | Hidrolasa CmtE [<i>Pseudomonas</i> sp.] | 60 | AEO27352.1 |
| C334-05 | - | 5200 | 4880 | Ferredoxina de fenilpropionato dioxigenasa | Ferredoxina de dioxigenasa de HAPs [<i>Cycloclasticus</i> sp. P1] | 59 | YP_006838755.1 |
| C334-06 | - | 6530 | 5274 | Orto-halobenzoato 1,2-dioxigenasa subunidad alfa | Fenilpropionato dioxigenasa, subunidad alfa [<i>Pseudozanthomonas spadiæ</i>] | 67 | YP_004931652.1 |
| C334-07 | - | 7040 | 6543 | Orto-halobenzoato 1,2-dioxigenasa subunidad beta | Subunidad beta de oxigenasa de aromáticos [<i>Pseudozanthomonas spadiæ</i>] | 55 | YP_004931653.1 |
| C334-08 | - | 7307 | 7179 | Proteína hipotética | - | - | - |
| C334-09 | + | 7348 | 8133 | 2,3-dihidroxi-2,3-dihidrofenilpropionato deshidr. | 2,3-dihidroxi-2,3-dihidrofenilpropionato deshidrogenasa [<i>Cycloclasticus pugetii</i>] | 61 | WP_020162779.1 |
| C334-10 | + | 8178 | 9482 | RHO | Proteína hipotética [<i>Geobacillus</i> sp. JF8] | 50 | YP_008431363.1 |
| C334-11 | + | 9484 | 10008 | Subunidad beta de naph/bph dioxigenasa | Subunidad beta de bifenil dioxigenasa [<i>Bacillus</i> sp. JF8] | 60 | BAC79227.1 |
| C334-12 | + | 10018 | 10797 | Dihidrodihidroxibenzoato deshidrogenasa | Prot. De transferencia de electrones [<i>Cycloclasticus</i> sp. P1] | 66 | YP_006838781.1 |
| C334-13 | - | 12007 | 10910 | Alcanal monooxigenasa | Alcanal monooxigenasa [<i>Parvibaculum lavamentivorans</i> DS-1] | 47 | YP_001413068.1 |
| C334-14 | + | 12006 | 12146 | Proteína hipotética | - | - | - |
| C334-15 | - | 13327 | 12143 | Acyl-CoA deshidrogenasa | Proteína hipotética [<i>Rhodopseudomonas palustris</i> HaA2] | 38 | YP_484318.1 |
| C334-16 | - | 14495 | 13491 | Trans-O-hidroxi-bencilpiruvato hidratasa/ald. | Posible 2-hidroxi-bencilpiruvato aldolasa [<i>Novosphingobium pentaromat.</i>] | 71 | WP_007015994.1 |

| Secuencia | Hebra | Inicio | Fin | Predicción génica | Blastp (primer alineamiento) | %id | Nº de acceso |
|-----------|-------|--------|-------|--|---|-----|-----------------|
| C334-17 | - | 15401 | 14568 | Protocatecuato 4,5-dioxigenasa, sub. Beta | Protocatecuato 4,5-dioxigenasa, sub. Beta [<i>Hydrocarbomiphaga effusa</i>] | 52 | WP_007184425.1 |
| C334-18 | - | 15750 | 15463 | Dioxigenasa LigAB, subunidad LigA | Proteína hipotética [<i>Hydrocarbomiphaga effusa</i>] | 43 | WP_007184426.1 |
| C334-19 | - | 16330 | 15773 | Subunidad beta de naph/bph dioxigenasa | Subunidad beta de RHO [<i>Novosphingobium</i> sp. H25] | 61 | ACD910668.1 |
| C334-20 | - | 17709 | 16351 | Subunidad alfa de naph/bph dioxigenasa | Dioxigenasa de HAPs, subunidad alfa [<i>Cycloclasticus</i> sp. A5] | 64 | BAC81541.1 |
| C334-21 | - | 18784 | 17765 | 2-dehidropantoato 2-reductasa | Cetopantoato reductasa ApbA/PanE [<i>Cycloclasticus</i> sp. PY97M] | 57 | WP_0163389699.1 |
| C334-22 | + | 18940 | 19683 | Regulador transcripcional (GntR) | Proteína hipotética [<i>Neuskiea ramosa</i>] | 47 | WP_022974997.1 |
| C334-23 | + | 19732 | 20331 | 2-hidroxicromen-2-carboxilato isomerasa | 2-hidroxicromen-2-carboxilato isomerasa [<i>Neuskiea ramosa</i>] | 53 | WP_022978280.1 |
| C334-24 | + | 20377 | 21408 | L-treonina-3-deshidrogenasa | TmbW [<i>Pseudomonas putida</i>] | 56 | AAA84986.1 |
| C334-25 | + | 21455 | 22639 | Proteína con dominio rieske [2Fe-2S] | Subunidad alfa de RHO [<i>Sphingomonas</i> sp. LH128] | 65 | WP_008829815.1 |
| C334-26 | + | 22639 | 23130 | Orto-halobenzoato 1,2-dioxigenasa subunidad beta | Subunidad beta de oxigenasa [<i>Sphingomonas</i> sp. P2] | 53 | BAC65454.1 |
| C334-27 | - | 24054 | 23221 | 2-hidroxiimucónico semialdehído hidrolasa | Hidrolasa [<i>Dyella ginsengisoli</i> LA-4] | 68 | ACH87186.1 |
| C334-28 | - | 24631 | 24098 | Subunidad beta de naph/bph dioxigenasa | Subunidad beta de RHO [<i>Novosphingobium pentaromativorans</i>] | 49 | WP_007016011.1 |
| C334-29 | - | 25956 | 24628 | Subunidad alfa de naph/bph dioxigenasa | Subunidad alfa de RHO [<i>Cycloclasticus</i> sp. P1] | 50 | YP_006837517.1 |
| C334-30 | - | 26392 | 25982 | Proteína BphX | Proteína de membrana [<i>Cycloclasticus zancles</i> 7-ME] | 58 | YP_006838319.1 |
| C334-31 | - | 27296 | 26400 | 2,3-dihidroxi-bifenil 1,2-dioxigenasa | 2,3-dihidroxi-bifenil 1,2-dioxigenasa [<i>Novosphingobium pentarom.</i>] | 73 | WP_007015971.1 |
| C334-32 | - | 27857 | 27342 | Subunidad beta de naph/bph dioxigenasa | Subunidad beta de RHO [<i>Novosphingobium</i> sp. PPIY] | 52 | YP_004534280.1 |
| C334-33 | - | 29218 | 27854 | Subunidad alfa de naph/bph dioxigenasa | Subunidad alfa de RHO [<i>Cycloclasticus</i> sp.] | 64 | WP_016390886.1 |
| C334-34 | + | 29480 | 30592 | Xilen monooxigenasa | Xylen monooxigenasa [<i>Cycloclasticus</i> sp. P1] | 50 | YP_006838204.1 |
| C334-35 | + | 30589 | 31953 | Benzoato 1,2-dioxigenasa subunidad alfa | Subunidad alfa de RHO [<i>Cycloclasticus</i> sp. P1] | 52 | YP_006837042.1 |
| C334-36 | + | 31943 | 32434 | 2-halobenzoato 1,2-dioxigenasa, sub. Beta | Benzoato 1,2-dioxigenasa subunidad beta [<i>Cycloclasticus</i> sp. P1] | 51 | YP_006837043.1 |
| C334-37 | + | 32467 | 33591 | Desaturasa de cidos grasos | Xilen monooxigenasa [<i>Cycloclasticus</i> sp. P1] | 46 | YP_006838437.1 |
| C334-38 | + | 33597 | 34326 | Proteína hipotética | Xilen monooxigenasa subunidad 1 [<i>Cycloclasticus</i> sp.] | 54 | WP_016390893.1 |

| FRAGMENTO C340 | | | | | | | |
|----------------|---|------|------|--|---|----|----------------|
| C340-01 | - | 1416 | 184 | Dienelactona de la familia de hidrolasas | Carboximetilbutenolidasa [<i>Bradyrhizobium</i> sp. STM 3843] | 57 | WP_008969119.1 |
| C340-02 | - | 3335 | 1530 | Dominio proteico de la vía de señales (tat) | Sulfatasa [<i>Rhodopsseudomonas palustris</i> TIE-1] | 40 | YP_001991198.1 |
| C340-03 | - | 5174 | 3453 | Serin/treonina proteín quinasa | Serin/treonina proteín quinasa [<i>Methylomicrobium album</i>] | 72 | WP_005373011.1 |
| C340-04 | - | 5759 | 5316 | Cianato hidratasa | Cianato hidratasa [<i>Cycloclasticus</i> sp. P1] | 79 | YP_006837346.1 |
| C340-05 | - | 6638 | 5829 | Transportador de nitrito | Transportador [<i>Pseudomonas stutzeri</i>] | 86 | WP_019339561.1 |
| C340-06 | + | 6951 | 8036 | Luciferasa de la familia monooxigenasas | TgaE [<i>Sorangium cellulosum</i>] | 54 | ADH04638.1 |
| C340-07 | - | 8401 | 8123 | Monooxigenasa de la síntesis de antibióticos | Monooxigenasa de la síntesis de antibióticos [<i>Alcanivorax</i>] | 37 | WP_008929652.1 |
| C340-08 | + | 8477 | 9370 | Pseudouridina sintasa A | Pseudouridina sintasa [<i>Enterovibrio norvegicus</i>] | 68 | WP_017003383.1 |

| Secuencia | Hebra | Inicio | Fin | Predicción génica | Blastp (primer alineamiento) | %id | Nº de acceso |
|-----------|-------|--------|-------|--|--|-----|----------------|
| C340-09 | - | 10621 | 9413 | Proteína hipotética con dominio DnaJ | Proteína hipotética [<i>Psychromonas ingrahamii</i> 37] | 26 | YP_943954.1 |
| C340-10 | + | 10709 | 10882 | Proteína hipotética | - | - | - |
| C340-11 | + | 10904 | 11548 | Dominio metil transferasa | Proteína de la familia metil transferasa [<i>Pseudomonas</i> sp. GM41] | 63 | WP_008148258.1 |
| C340-12 | + | 11566 | 12120 | Proteína hipotética con dominio conservado | Proteína de función desconocida [<i>Saccharophagus degradans</i> 2-40] | 54 | YP_529404.1 |
| C340-13 | - | 12395 | 12162 | Inhibidor de la unión al ADN | Proteína hipotética [<i>Thalassolituus oleivorans</i> MIL-1] | 74 | YP_007683013.1 |
| C340-14 | + | 12649 | 13368 | Proteína hipotética con dominio conservado | Posible hidrolasa dependiente de metales [<i>Methanomethylovorans hol.</i>] | 46 | YP_007313115.1 |
| C340-15 | - | 13998 | 13480 | Proteína no caracterizada | Proteína hipotética [<i>Pseudomonas putida</i> W619] | 37 | YP_001749097.1 |
| C340-16 | - | 15611 | 14124 | Ligasa de ácidos grasos de cadena larga | Posible sintetasa/ligasa dependiente de AMP [<i>Azospirillum brasilense</i>] | 61 | YP_004986155.1 |
| C340-17 | - | 16836 | 15664 | Acil CoA-deshidrogenasa | Acil CoA-deshidrogenasa [<i>Alicyciphilus denitrificans</i> BC] | 68 | YP_004127026.1 |
| C340-18 | - | 18097 | 16877 | Complejo piruvato deshidrogenasa | 2-oxo acid dehidrogenase acyltransferase [<i>Halomonas</i> sp. HAL1] | 43 | WP_008957290.1 |
| C340-19 | - | 18889 | 18101 | Enoil-CoA hidratasa | Enoil-CoA hidratasa/isomerasa [<i>Pusillimonas</i> sp. T7-7] | 65 | YP_004417808.1 |
| C340-20 | - | 19951 | 18950 | Alfa-cetoácido deshidrogenasa sub. Beta | Piruvato deshidrogenasa sub. Beta [<i>Bordetella bronchiseptica</i>] | 68 | WP_004567902.1 |
| C340-21 | - | 20859 | 19948 | Acetoin deshidrogenasa, sub. Alfa | Acetoin oxidoreductasa sub. Alfa [<i>Oceanibaculum indicum</i>] | 56 | WP_008944222.1 |
| C340-22 | - | 21536 | 20934 | Glutación S-transferasa | Glutación S-transferasa [<i>Magnetococcus marinus</i> MC-1] | 42 | YP_867572.1 |
| C340-23 | + | 21883 | 22959 | Luciferasa de la familia monooxigenasas | Tetrahidrometanopterin reductasa [<i>Sphingomonas</i> sp. LH128] | 48 | WP_008827675.1 |
| C340-24 | + | 23019 | 23633 | Isocorismatasa | Cisteín hidrolasa [<i>Streptomyces</i> sp. AA4] | 38 | WP_009079783.1 |
| C340-25 | + | 23745 | 24317 | Proteína no caracterizada | Proteína hipotética [<i>Arhodomonas aquacolei</i>] | 56 | WP_018719191.1 |
| C340-26 | - | 24729 | 24418 | Proteína de respuesta a estres con dominio Dabb | Proteína hipotética [<i>Hahella ganghuensis</i>] | 46 | WP_020408597.1 |
| C340-27 | - | 24880 | 24755 | Proteína hipotética | - | - | - |
| C340-28 | - | 25901 | 24966 | Sistema de transporte ABC | Miristoil transferasa [<i>Paenibacillus lactis</i>] | 27 | WP_007128138.1 |
| C340-29 | + | 26059 | 26679 | Regulador de la transcripción (TetR) | Regulador de la transcripción (TetR) [<i>Alcanivorax borkumensis</i> SK2] | 37 | YP_692395.1 |
| C340-30 | + | 26932 | 28257 | Fenilpropionato dioxigenasa, subunidad mayor | Sub. Mayor de proteína Fe-S [<i>Nocardioides</i> sp.] | 40 | BAA84712.1 |
| C340-31 | + | 28257 | 28805 | Subunidad beta de dioxigenasa | Bifenil dioxigenasa, subunidad beta [<i>Bordetella petrii</i> DSM 12804] | 36 | YP_001630120.1 |
| C340-32 | + | 28870 | 30114 | Orto-halobenzoato 1,2-dioxigenasa subunidad alfa | RHO sub. Alfa [<i>Cycloclasticus</i> sp. P1] | 62 | YP_006837505.1 |
| C340-33 | + | 30184 | 31089 | 2,3-dihidroxi-bifenil 1,2-dioxigenasa | Proteína de resistencia a bleomicina/dioxigenasa [<i>Kyrrpidia tusciae</i>] | 54 | YP_003590685.1 |
| C340-34 | + | 31157 | 31739 | Proteína hipotética | Proteína de la superfamilia AGR [<i>Cycloclasticus</i>] | 59 | WP_016390948.1 |

FRAGMENTO I342

| | | | | | | | |
|---------|---|------|------|---|---|----|----------------|
| I342-01 | - | 3 | 279 | Proteína hipotética | Proteína hipotética [<i>Novosphingobium aromaticivorans</i> DSM 12444] | 62 | YP_001166107.1 |
| I342-02 | - | 793 | 281 | Proteína hipotética | Proteína hipotética [<i>Sphingobium quisquiliarium</i>] | 58 | WP_021239343.1 |
| I342-03 | - | 1899 | 817 | Proteína hipotética | Proteína hipotética [gama proteobacteria IMCC3088] | 65 | WP_009575765.1 |
| I342-04 | - | 2666 | 1896 | Proteína de la familia de deshidrogenasas/reductasa | Deshidrogenasa/reductasa SDR [<i>Novosphingobium</i> sp. PPIY] | 73 | YP_004538229.1 |

| Secuencia | Hebra | Inicio | Fin | Predicción génica | Blastp (primer alineamiento) | %id | Nº de acceso |
|-----------|-------|--------|-------|---|---|-----|----------------|
| I342-05 | - | 3832 | 2663 | Proteína hipotética | Sulfotransferasa [<i>Aeromicrobium marinum</i>] | 43 | WP_007078723.1 |
| I342-06 | - | 4347 | 3829 | Proteína hipotética | Proteína hipotética [<i>Novosphingobium tardaugens</i>] | 59 | WP_021689379.1 |
| I342-07 | - | 5759 | 4344 | Fumarato reductasa/succinato deshidrogenasa | Proteína hipotética PP1Y_Mpl3136 [<i>Novosphingobium</i> sp. PP1Y] | 78 | YP_004538228.1 |
| I342-08 | - | 6490 | 5855 | Reductasa dependiente de NADPH | Reductasa dependiente de NADPH [<i>Novosphingobium</i> sp. PP1Y] | 78 | YP_004538227.1 |
| I342-09 | - | 7535 | 6495 | 4-hidroxi-2-oxovalerato aldolasa | 4-hidroxi-2-oxovalerato aldolasa, parcial [<i>Sphingomonas</i> sp. KC8] | 90 | WP_010125098.1 |
| I342-10 | + | 7534 | 7674 | Proteína hipotética | - | - | - |
| I342-11 | - | 8613 | 7684 | Acetaldehído deshidrogenasa | Acetaldehído deshidrogenasa [<i>Novosphingobium</i> sp. PP1Y] | 89 | YP_004538225.1 |
| I342-12 | - | 9411 | 8623 | 2-hidroxipent-2,4-dienoato hidratasa | 2-ceto-4-pentenoato hidratasa [<i>Sphingomonas</i> sp. KC8] | 77 | WP_010125618.1 |
| I342-13 | - | 10222 | 9398 | Alfa/beta hidrolasa | 2-hidroxi-6-oxo-7-metilocta-2,4-dienoato hidrolasa [<i>Novosphingobium tard.</i>] | 75 | WP_021688824.1 |
| I342-14 | - | 10234 | 11448 | Acyl-CoA deshidrogenasa | Acyl-CoA deshidrogenasa tipo 2 [<i>Novosphingobium</i> sp. PP1Y] | 72 | YP_004538222.1 |
| I342-15 | - | 11582 | 11460 | Proteína hipotética | - | - | - |
| I342-16 | + | 11626 | 12381 | Deshidrogenasa/reductasa | Deshidrogenasa, cadena corta [<i>Novosphingobium</i> sp. PP1Y] | 65 | YP_004538221.1 |
| I342-17 | + | 12383 | 13306 | 2,3-dihidroxibifenil 1,2-dioxigenasa | glioxalasa [<i>Novosphingobium lindaniclasticum</i>] | 50 | WP_021234614.1 |
| I342-18 | + | 13306 | 14184 | Posible CoA-transferasa sub. Alfa | CoA-transferasa [<i>Novosphingobium aromaticivorans</i> DSM 12444] | 84 | YP_001166136.1 |
| I342-19 | + | 14184 | 14978 | CoA-transferasa sub. Beta | CoA-transferasa, sub. Beta [<i>Sphingomonas</i> sp. KC8] | 72 | WP_010125408.1 |
| I342-20 | + | 14975 | 15871 | Enoil-CoA hidratasa | Enoil-CoA hidratasa [<i>Oceanicola</i> sp. S124] | 73 | WP_010138702.1 |
| I342-21 | + | 15822 | 15986 | Proteína hipotética | - | - | - |
| I342-22 | + | 16033 | 17121 | 2-nitropropano dioxigenasa | 2-nitropropano dioxigenasa [<i>Novosphingobium lindaniclasticum</i>] | 64 | WP_021234610.1 |
| I342-23 | + | 17121 | 17870 | Posible enoil-CoA hidratasa | Enoil-CoA hidratasa [<i>Novosphingobium</i> sp. PP1Y] | 88 | YP_004538215.1 |
| I342-24 | + | 17870 | 19033 | Butiril-CoA deshidrogenasa | Proteína con dominio acyl-CoA deshidrogenasa [<i>Sphingomonas wittichii</i>] | 81 | YP_001264112.1 |
| I342-25 | + | 19033 | 19965 | Butiril-CoA deshidrogenasa | Proteína con dominio acyl-CoA deshidrogenasa [<i>Sphingomonas</i> sp. MM-1] | 60 | YP_007615286.1 |
| I342-26 | + | 19988 | 21139 | Acetil-CoA acetyltransferase | Acetyl-CoA C-acetiltransferasa [<i>Novosphingobium</i> sp. PP1Y] | 80 | YP_004538212.1 |
| I342-27 | + | 21139 | 22044 | Deshidrogenasa de cadena corta/reductasa | Deshidrogenasa de cadena corta/reductasa [<i>Novosphingobium aromata.</i>] | 83 | YP_001166145.1 |
| I342-28 | + | 22044 | 23099 | Acyl-CoA dehydrogenase, C-terminal | Proteína con dominio acyl-CoA deshidrogenasa [<i>Novosphingobium aromata.</i>] | 70 | YP_001166146.1 |
| I342-29 | + | 23096 | 24274 | FadE30 | Proteína con dominio acyl-CoA deshidrogenasa [<i>Novosphingobium</i> sp.] | 85 | YP_004538192.1 |
| I342-30 | + | 24271 | 25050 | 3-oxoacil-reductase | Deshidrogenasa de cadena corta [<i>Sphingomonas</i> sp. KC8] | 81 | WP_010125396.1 |
| I342-31 | + | 25054 | 25530 | Acil deshidratasa | Deshidratasa [<i>Novosphingobium aromaticivorans</i> DSM 12444] | 70 | YP_001166149.1 |
| I342-32 | + | 25533 | 25910 | Esteroides delta isomerasa | Esteroides delta isomerasa [<i>Sphingomonas</i> sp. MM-1] | 53 | YP_007615293.1 |
| I342-33 | + | 26010 | 27311 | Lipasa | Hidrolasa alfa/beta [gamaproteobacteria marina HTCC2148] | 42 | WP_007229948.1 |
| I342-34 | + | 27342 | 28889 | Ligasa de ácidos grasos de cadena larga | Sintetasa/ligasa dependiente de AMP [<i>Novosphingobium aromata.</i>] | 62 | YP_001166152.1 |
| I342-35 | + | 28901 | 29032 | Proteína hipotética | - | - | - |
| I342-36 | + | 29136 | 29516 | Proteína de elementos móviles | Proteína hipotética [<i>Sphingomonas</i> sp. MM-1] | 62 | YP_007617989.1 |

| Secuencia | Hebra | Inicio | Fin | Predicción génica | Blastp (primer alineamiento) | %id | Nº de acceso |
|-----------|-------|--------|-------|--|---|-----|----------------|
| I342-37 | + | 29513 | 30901 | Relaxasa | Proteína hipotética G432_18380 [<i>Sphingomonas</i> sp. MM_1] | 47 | YP_007617990.1 |
| I342-38 | + | 30929 | 31783 | Proteína hipotética | Proteína hipotética Hden_0665 [<i>Hyphomicrobium denitrificans</i>] | 61 | YP_003754806.1 |
| I342-39 | - | 32086 | 31790 | Proteína hipotética | Proteína hipotética PB2503_05967 [<i>Parvularcula bermudensis</i>] | 46 | YP_003854406.1 |
| I342-40 | - | 32249 | 32061 | Proteína hipotética | - | - | - |
| I342-41 | + | 32252 | 32518 | Proteína del sistema toxina/antitoxina | Proteína hipotética [<i>Blastomonas</i> sp. AAP53] | 60 | WP_017671888.1 |
| I342-42 | + | 32677 | 32814 | Proteína hipotética | Proteína hipotética [<i>Rhodobacteraceae bacterium</i> KLH11] | 49 | WP_008759312.1 |
| I342-43 | + | 33117 | 33965 | Dominio de función desconocida | Proteína hipotética NE0259 [<i>Nitrosomonas europaea</i> ATCC 19718] | 29 | NP_840349.1 |
| I342-44 | - | 34413 | 33955 | Proteína hipotética | Proteína hipotética NE0258 [<i>Nitrosomonas europaea</i> ATCC 19718] | 39 | NP_840348.1 |
| I342-45 | + | 34500 | 35030 | Resolvasa | ADN invertasa [<i>Parascardonia denticolens</i>] | 56 | WP_006292296.1 |
| I342-46 | + | 35027 | 35920 | Proteína hipotética | - | - | - |
| I342-47 | + | 36170 | 36361 | Proteína de función desconocida | Proteína hipotética [<i>Sphingobium lactosutens</i>] | 50 | WP_021225004.1 |
| I342-48 | - | 36773 | 36399 | Proteína hipotética | Proteína hipotética [<i>Novosphingobium tardaugens</i>] | 58 | WP_021691803.1 |
| I342-49 | + | 36835 | 36969 | Proteína hipotética | - | - | - |
| I342-50 | - | 37008 | 37340 | Proteína hipotética | - | - | - |

%id: Porcentaje de identidad

5.2.1.2. Características de las secuencias codificantes identificadas en los fragmentos clonados

La información obtenida al comparar los genes identificados con la base de datos COG (siglas del inglés *Cluster of Orthologous Groups*, [Tatusov et al., 2003]), utilizando el sistema integral ISGA, fue analizada con el fin de estimar las funciones predominantes en los fragmentos clonados. Si bien se detectó un alto porcentaje de secuencias que no lograron ser asignadas a una función en particular (13 a 46%), el resto de las secuencias fueron clasificadas en 18 categorías funcionales diferentes (Figura 5.1). De las secuencias clasificadas, aquellas relacionadas con la biosíntesis de metabolitos secundarios y catabolismo (categoría Q) generalmente se encontraron en alta proporción en los insertos clonados (a excepción de los insertos M32 e I342). Gran parte de las secuencias identificadas pertenecientes a esta categoría corresponden a proteínas que podrían estar involucradas en la degradación de hidrocarburos, sugiriendo que las funciones catabólicas de los fragmentos clonados se encuentran relacionadas con la oxidación de estos compuestos. Secuencias asociadas al transporte de iones y al metabolismo (categoría P) también se encontraron en una alta abundancia, principalmente en los fragmentos M117 y C334 (18,4% y 23,7% respectivamente). Al igual que las enzimas oxigenasas con sitio Rieske de la base de datos COG, todas las oxigenasas detectadas en los fragmentos clonados se clasificaron en esta categoría funcional.

Del total de las CDSs identificadas, el 38% corresponde a enzimas que podrían estar involucradas en las vías degradativas de hidrocarburos aromáticos. El número de genes relacionados con la biodegradación de estos compuestos así como también su organización génica, fue diferente en cada inserto (Figura 5.2, Tabla 5.2). El fragmento C334 presentó una mayor proporción de CDSs relacionadas con la biodegradación de hidrocarburos aromáticos.

En los fragmentos clonados también se detectaron funciones relacionadas al transporte de aminoácidos y al metabolismo, a la producción y conversión de energía, a la regulación de la transcripción, al metabolismo de lípidos y a la replicación, recombinación y reparación del ADN, entre otras. Particularmente, en el fragmento C78 se observó una alta proporción de secuencias vinculadas a la recombinación de ADN. Mayormente, las mismas corresponden a enzimas transposasas e integrasas, lo cual sugiere la presencia de eventos de transferencia horizontal de genes.

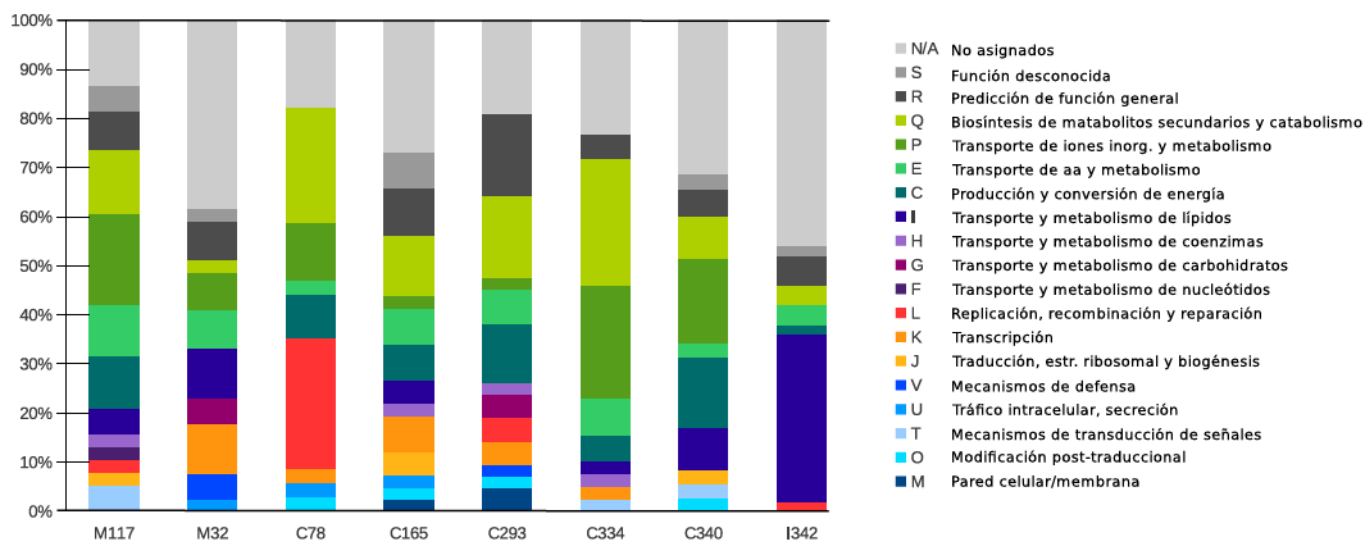


Figura 5.1: Categorías funcionales (basada en COGs) identificadas en los fragmentos clonados

Tabla 5.2: Características generales de las CDSs presentes en los fragmentos clonados

| Inserto | M117 | M32 | C78 | C165 | C293 | C334 | C340 | I342 |
|---|------|-----|-----|------|------|------|------|------|
| Número de CDSs | 38 | 39 | 34 | 41 | 42 | 38 | 34 | 50 |
| Número de CDSs relacionados con vías degradativas | 13 | 6 | 18 | 20 | 24 | 28 | 4 | 6 |
| Número de CDSs codificando oxigenasas de hidrocarburos aromáticos | 6 | 1 | 3 | - | 1 | 7 | 2 | - |
| Número de CDSs relacionados a la transferencia horizontal | - | - | 9 | - | 3 | - | - | 2 |

5.2.1.3. Asignación taxonómica de los fragmentos identificados

Con el objetivo de estimar el origen filogenético de los fragmentos clonados, se realizó la asignación taxonómica de cada CDS utilizando el programa Megan [Huson et al., 2007]. Este programa explora el contenido taxonómico de un conjunto de secuencias en base a los resultados obtenidos por comparación de las mismas contra secuencias conocidas utilizando el algoritmo blast (o cualquier otra herramienta de comparación de secuencias). Posteriormente, un algoritmo sencillo (denominado LCA, de las siglas en inglés “Lowest Common Ancestor”) analiza la taxonomía de las secuencias más similares a la secuencia de interés, de manera tal de asignarle a esta última un taxón común a las secuencias

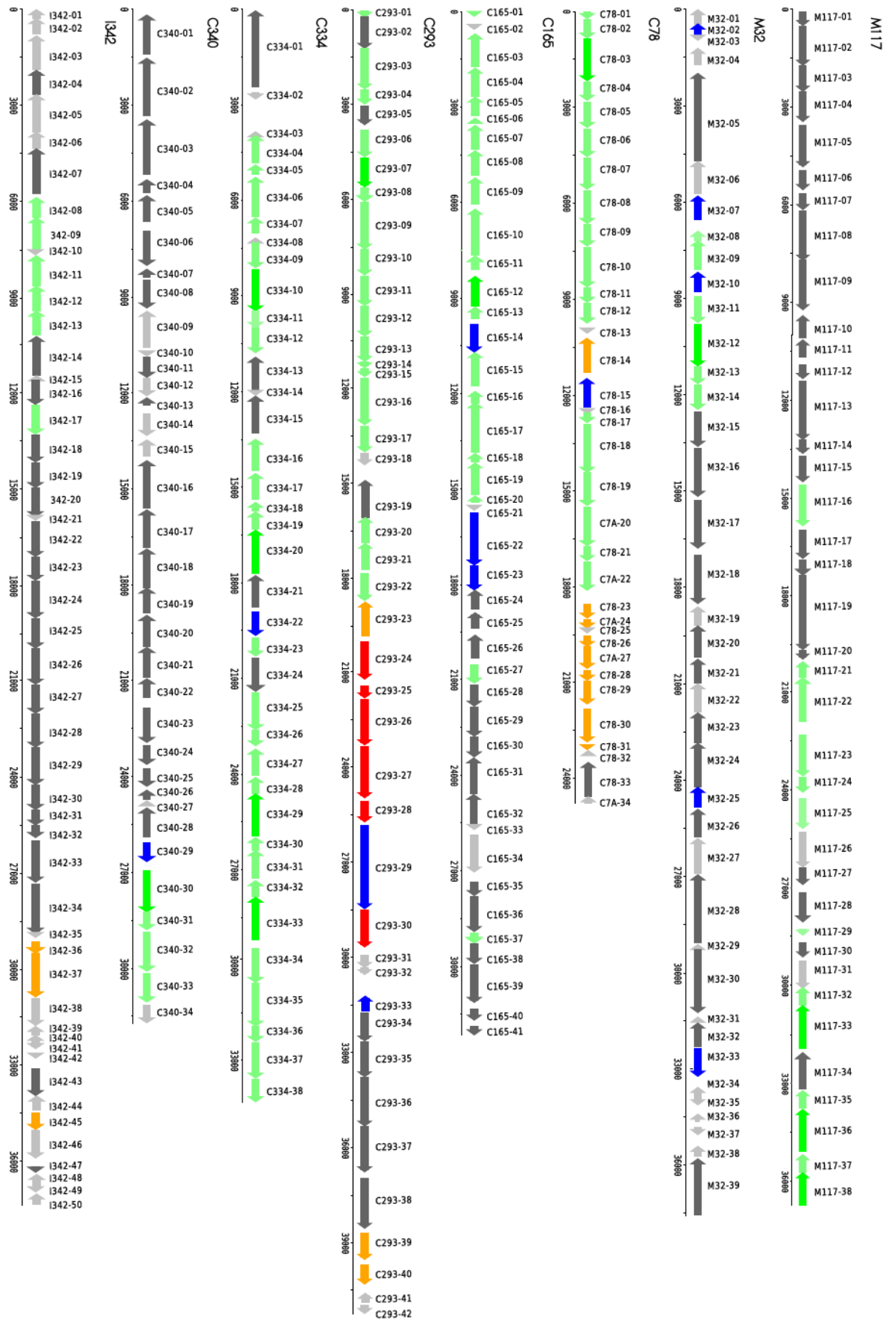


Figura 5.2: Mapas genéticos de los insertos clonados. Cada CDS está representada mediante flechas. La identificación arriba de las flechas representa el fragmento al cual pertenece cada secuencia génica seguido de un número correspondiente a la asignación funcional (Tabla 5.1). Las funciones detectadas para cada secuencia se muestran en diferentes colores: verde, degradación de compuestos aromáticos; rojo, degradación de alcohanos; naranja, transferencia horizontal de genes; azul, regulación de la transcripción; gris, otras funciones; gris claro, proteínas hipotéticas.

cercanas ya conocidas. Por otro lado, para identificar los microorganismos más relacionados con la secuencia completa los fragmentos clonados, se utilizó el algoritmo blastn y la base datos de genomas del NCBI

Utilizando el algoritmo LCA, en todos los fragmentos identificados se observaron bajos porcentajes de asignación de las secuencias a niveles taxonómicos inferiores (Tabla 5.3), lo cual sugiere que los mismos pertenecen a microorganismos divergentes de aquellos estudiados hasta el momento. Inclusive, entre un 12 y 43,6% de las secuencias de cada fragmento no pudieron ser asignadas a ningún nivel taxonómico. En los fragmentos C78, C293 e I342 se observó mayor proporción de CDSs asignadas a la clase Alfaproteobacteria (Tabla 5.3). La secuencia nucleotídica completa de los fragmentos C293 e I342 también mostró una similitud significativa con regiones del genoma de alfaproteobacterias (Figura 5.3, tabla 5.4). Las regiones homólogas pertenecientes a los tres genomas más relacionados con ambos insertos presentaron porcentajes de cobertura de entre 45 y 48 %, y varias de ellas parecen estar conservadas a lo largo de los fragmentos de analizados. Estos resultados sugieren que los fragmentos C293 e I342 podrían pertenecer a microorganismos de la clase Alfaproteobacteria.

Tabla 5.3: Porcentajes de CDSs asignadas utilizando el programa Megan

| Taxón | % de CDSs asignadas | | | | | | | | |
|--|---------------------|------|------|---------|----------|------|------|------|--|
| | M117 | M32 | C78 | C165 | C293 | C334 | C340 | I342 | |
| NA ¹ | 21 | 43,6 | 17,6 | 14,6 | 12 | 16,6 | 23,6 | 32 | |
| Bacteria | 13 | 7,7 | 0 | 0 | 0 | 13,8 | 20,6 | 6 | |
| Proteobacteria | 44,7 | 28,2 | 35,3 | 31,7 | 17 | 69,4 | 44,1 | 18 | |
| Alfaproteobacteria | 0 | 20,5 | 47 | 0 | 71 | 0 | 0 | 44 | |
| Betaproteobacteria | 0 | 0 | 0 | 53,6 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| Gamaproteobacteria | 21 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 11,7 | 0 | |
| Asignación taxonómica² | Prot | Bact | Prot | β | α | Prot | Prot | Prot | |

1: Secuencias no asignadas

2: Asignación taxonómica, considerando más del 50% de las secuencias asignadas a un mismo taxón. Prot: Proteobacteria; Bact: Bacteria; α : Alfaproteobacteria; β : Betaproteobacteria.

Si bien el 47% de las secuencias identificadas en el fragmento C78 fueron asignadas a la clase Alfaproteobacteria, no se encontraron genomas que presentaran homología significativa y alto porcentaje de cobertura respecto de la secuencia completa de dicho inserto (Figura 5.3). Sólo la región correspondiente a las secuencias C78-14 y C78-28-29 (codificantes para transposasas) mostró homología con regiones de fragmentos genómicos pertenecientes a alfaproteobacterias (fragmentos a, b, c, d y e en

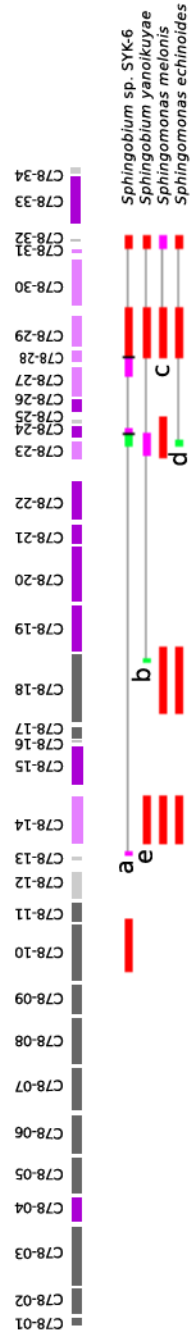
la Figura 5.3). Dado que la mayoría de las secuencias asignadas a este grupo taxonómico (utilizando el programa Megan) se encuentran entre las secuencias C78-14 y C78-28, posiblemente provengan de la transferencia horizontal de genes de una alfa-proteobacteria cuyo genoma completo se desconoce. El inserto C78 podría ser parte del genoma de una proteobacteria (Tabla 5.3), aunque los resultados obtenidos no permitieron estimar la clase a la cual pertenecería este microorganismo.

En cuanto al fragmento C165, aproximadamente la mitad de las secuencias fueron asignadas a la clase Betaproteobacteria (Tabla 5.3). Estos resultados coincidieron con los obtenidos a partir del análisis de este fragmento utilizando el algoritmo blastn, ya que los fragmentos genómicos que mostraron mayor homología (cubriendo un 65-71% de la secuencia de este inserto) corresponden a cepas pertenecientes al orden Burkholderiales, de la clase Betaproteobacteria. Esto sugiere que el inserto C165 podría provenir de microorganismos relacionados con proteobacterias de clase Beta.

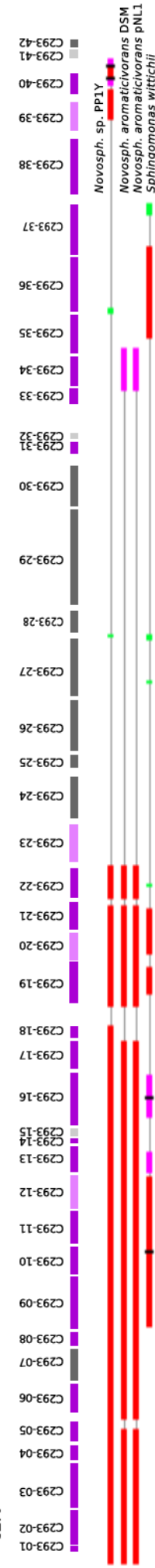
Entre un 45 y un 69% de las secuencias identificadas en los insertos M117, C334 y C340 sólo pudieron ser asignadas al nivel de *phylum* (Proteobacteria), y un porcentaje bajo de secuencias (o nulo en el caso del inserto C334) pudo ser asignado al nivel taxonómico de clase. En el fragmento M117, la zona comprendida entre las secuencias M117-01 y M117-13 mostró homología con regiones conservadas pertenecientes a los genomas de cepas pertenecientes a la clase Gamaproteobacteria (zona *a* en la Figura 5.3), mientras que en el otro extremo del fragmento, la secuencia presentó similitud con regiones de los genomas de cepas de *Novosphingobium* (Alfa-proteobacteria, zona *b* 1 a 3) y *Cycloclasticus* (Gamaproteobacteria, zona *b* 4). Los fragmentos C334 y C340 también presentaron cierta homología con fragmentos genómicos de diferentes clases de proteobacterias, si bien los fragmentos genómicos más relacionados con el inserto C340 mostraron un porcentaje de cobertura relativamente bajo.

Aproximadamente un 50% de las secuencias del inserto M32 fueron asignadas al *phylum* Proteobacteria (% total de secuencias asignadas a proteobacterias y alfa-proteobacterias, Tabla 5.3). Sin embargo, en este fragmento también se observó un alto porcentaje de secuencias que no pudieron ser asignadas (44%). Respecto de los genomas más relacionados con la secuencia completa de este fragmento, pertenecieron a diferentes *phyla* (Actinobacteria y Proteobacteria), cubriendo un bajo porcentaje de dicha secuencia. Con lo cual tanto el análisis del inserto M32 mediante LCA, como la búsqueda de fragmentos genómicos similares, arrojaron resultados poco concluyentes acerca de la taxonomía del microorganismo del cual proviene este fragmento.

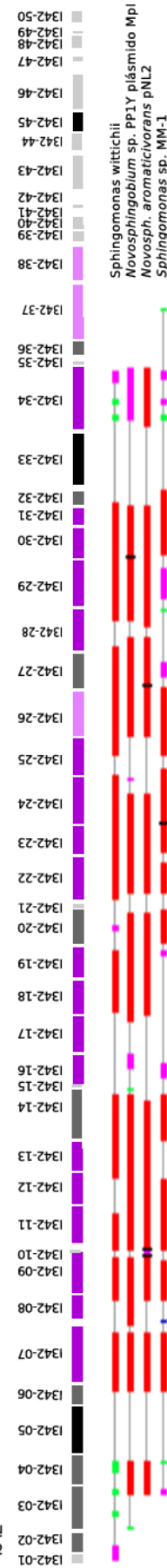
C78



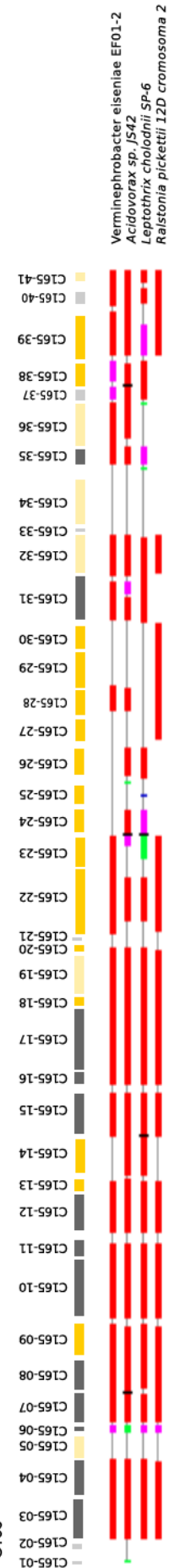
C293



I342



C165



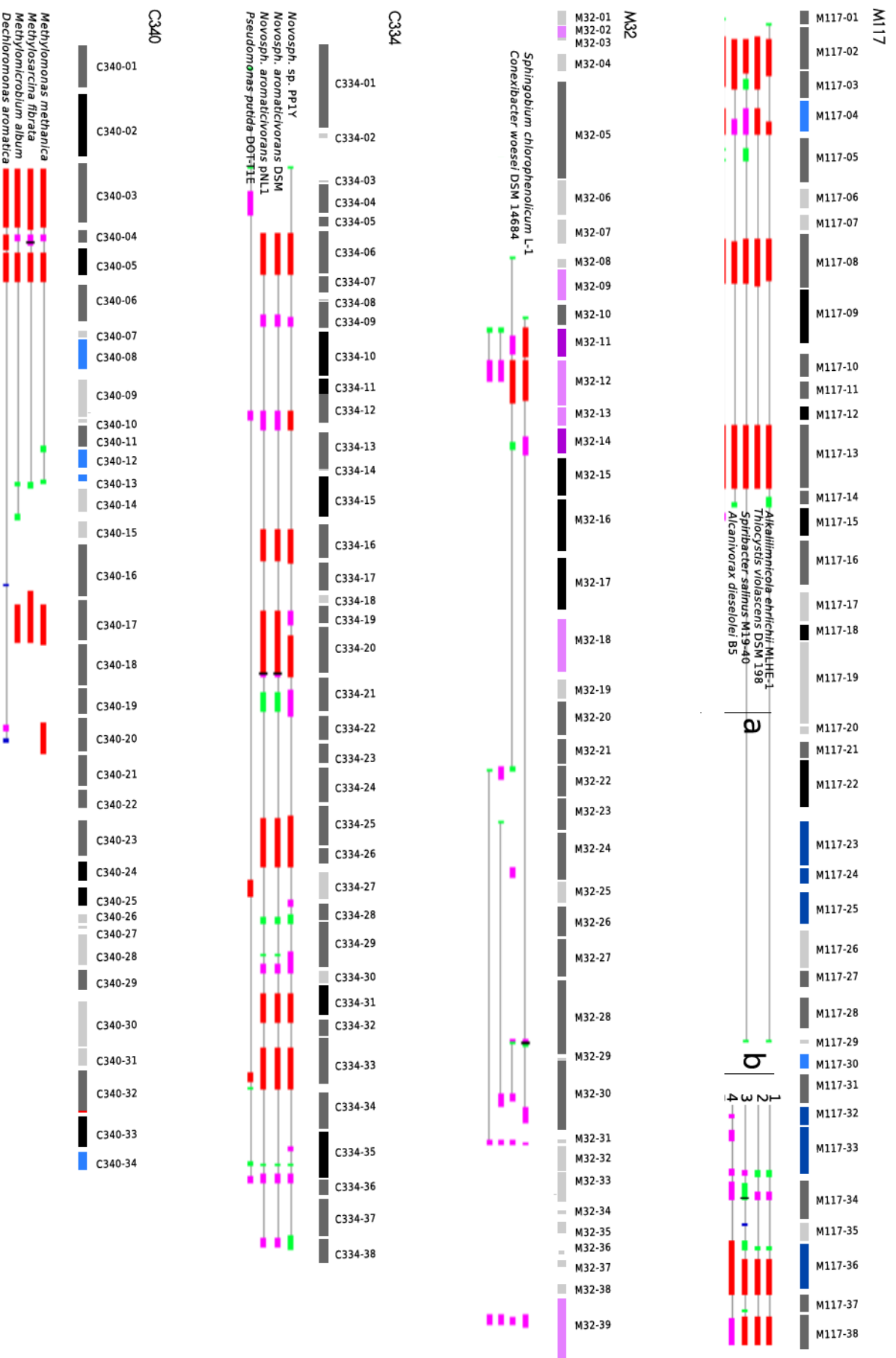


Figura 5.3: Asignación taxonómica utilizando el programa Megan y comparación de las secuencias nucleotídicas de los fragmentos clonados con genomas de la base de datos del NCBI. La asignación taxonómica de cada secuencia codificante, a partir del algoritmo LCA, se indica mediante rectángulos de diferentes colores ubicados debajo de la identificación de cada secuencia. En tonos violeta, secuencias asignadas a la clase Alphaproteobacteria; en amarillo, a Betaproteobacteria; en azul, a Gammaproteobacteria. Dentro de las secuencias pertenecientes a cada clase de proteobacterias, aquellas clasificadas hasta el nivel taxonómico de orden, o niveles inferiores, se presentan en tonos más oscuros del color correspondiente. En gris oscuro, se muestran las secuencias asignadas hasta el filum Proteobacteria; en negro, secuencias asignadas al dominio Bacteria y en gris claro, secuencias que no lograron ser asignadas. Debajo de la clasificación de cada secuencia, se indican fragmentos de los genomas clonados de acuerdo al código de colores de la herramienta BLASTn del NCBI: en rojo, regiones que poseen mayor homología con los insertos donados; en verde, alineamientos con los insertos donados (puntaje igual o mayor a 200); en verde, alineamientos con un puntaje entre 80-200; en verde, alineamientos con un puntaje entre 50-80.

Tabla 5.4: Análisis de los fragmentos clonados utilizando el algoritmo blastn

| Inserto | Mejor alineamiento | % cob ¹ | % id ² | Filogenia |
|---------|--|--------------------|-------------------|--|
| M117 | <i>Alkalilimnicola ehrlichii</i> MLHE-1 | 12 | 68 | Bacteria; Proteobacteria; Gamma-proteobacteria; Chromatiales; Ectothiorhodospiraceae |
| M32 | <i>Sphingobium chlorophenolicum</i> L-1 | 8 | 70 | Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Sphingomonadales; Sphingomonadaceae |
| C78 | <i>Sphingobium</i> sp. SYK-6 | 8 | 78 | Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Sphingomonadales; Sphingomonadaceae |
| C165 | <i>Verminephrobacter eiseniae</i> EF01-2 | 67 | 85 | Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Comamonadaceae |
| C293 | <i>Novosphingobium</i> sp. PP1Y | 48 | 80 | Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Sphingomonadales; Sphingomonadaceae |
| C334 | <i>Novosphingobium</i> sp. PP1Y | 31 | 73 | Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Sphingomonadales; Sphingomonadaceae |
| C340 | <i>Methylomonas methanica</i> MC09 | 9 | 72 | Bacteria; Proteobacteria; Gamma-proteobacteria; Methylococcales; Methylococcaceae |
| I342 | <i>Sphingomonas wittichii</i> RW1 | 45 | 72 | Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Sphingomonadales; Sphingomonadaceae |

1: Porcentaje de cobertura

2: Porcentaje de identidad

5.2.2. Oxigenasas involucradas en las vías degradativas de hidrocarburos aromáticos

5.2.2.1. Oxigenasas hidroxilantes de compuestos aromáticos (RHO)

Las oxigenasas bacterianas involucradas en la degradación de HAPs son muy diversas y poseen gran importancia por ser responsables de guiar diversas rutas catabólicas durante la asimilación de estos compuestos. En particular, las enzimas RHO pertenecen a una de las familias de oxigenasas, y cumplen un rol clave en la activación de las rutas degradativas que utilizan las bacterias en condiciones aeróbicas. Un total de 20 secuencias homólogas a la subunidad alfa de enzimas oxigenasas con sitio Rieske capaces de hidroxilar anillos aromáticos (RHOs), fueron detectadas en seis de los fragmentos clonados (M117, M32, C78, C293, C334, C340), cada uno de ellos conteniendo entre 1 y 7 genes (Tabla 5.2). A excepción de la secuencia M117-38, todas las secuencias de estas enzimas se encontraron completas, presentando un promedio de 425 aminoácidos (Tabla 5.5). Las enzimas homólogas más relacionadas, analizadas mediante el algoritmo blastp utilizando la base de datos de proteínas no redundante del NCBI, correspondieron a la subunidad alfa de enzimas RHO y a proteínas hipotéticas conteniendo un sitio Rieske [2Fe-2S] conservado. Mayoritariamente, dichos homólogos fueron identificados en cepas bacterianas degradadoras de HAPs, varias de ellas aisladas a partir de hábitats marinos, como por ejemplo *Kordiimonas gwangyangensis* DSM 19435 y varias cepas del género *Cycloclasticus* (Tabla 5.1). Sin embargo, la mayor parte de estas secuencias se encontraron moderadamente relacionadas con sus homólogos más cercanos, dado que 17 de las 20 secuencias identificadas mostraron entre un 41 y 70 % de identidad a nivel de aminoácidos. Por otro lado, algunas de estas secuencias mostraron altos porcentajes de identidad respecto de fragmentos de genes amplificados a partir de sedimentos intermareales de Bahía Ushuaia. Particularmente, la secuencia M117-33 presentó un 97,7 a 98,8 % a nivel de aminoácidos respecto de la subunidad alfa perteneciente a la variante T identificada en el Capítulo 3 del presente trabajo.

Clasificación de la subunidad alfa de enzimas RHO encontradas en la biblioteca metagenómica. La clasificación de las enzimas RHOs en diferentes clases funcionales (A a D) puede llevarse a cabo a partir del análisis filogenético de las secuencias de interés pertenecientes a la subunidad alfa, utilizando como referencia secuencias de enzimas previamente clasificadas. De acuerdo a esta clasificación, en los fragmentos clonados se identificaron enzimas RHO pertenecientes a las clases A, B y C (Figura 5.4, Tabla 5.5).

Se detectaron diez secuencias codificantes para RHOs de clase A en la biblioteca metagenómica, de las cuales cuatro pertenecen al fósmino C334 (C334-10, 20, 29 y 33), tres al fósmino M117 (M117-33, 36 y 38) y el resto a los fósminos M32 (M32-12), C78 (C78-03) y C340 (C340-30). Las mis-

Tabla 5.5: Subunidad α de enzimas RHOs identificadas en la biblioteca metagenómica

| Secuencia | Longitud (aa) | Subunidad β^1 | Clase ² |
|----------------------|---------------|---------------------|--------------------|
| M32-12 | 433 | sí | A |
| M117-16 | 422 | no | C |
| M117-22 | 449 | sí | B |
| M117-23 | 419 | sí | B |
| M117-33 | 444 | sí | A |
| M117-36 | 443 | sí | A |
| M117-38 ³ | 334 | sí | A |
| C78-03 | 443 | sí | A |
| C78-10 | 420 | sí | C |
| C78-20 | 414 | sí | C |
| C293-03 | 426 | sí | C |
| C334-06 | 418 | sí | C |
| C334-10 | 429 | sí | A |
| C334-20 | 446 | sí | A |
| C334-25 | 394 | sí | C |
| C334-29 | 410 | sí | A |
| C334-33 | 487 | sí | A |
| C334-35 | 432 | sí | B |
| C340-30 | 441 | sí | A |
| C340-32 | 405 | no | C |

1: Gen codificante para la subunidad β contiguo al gen codificante para la subunidad α de RHO.

2: Afiliación funcional basada en la clasificación propuesta por Chakraborty y colaboradores [Chakraborty et al., 2012].

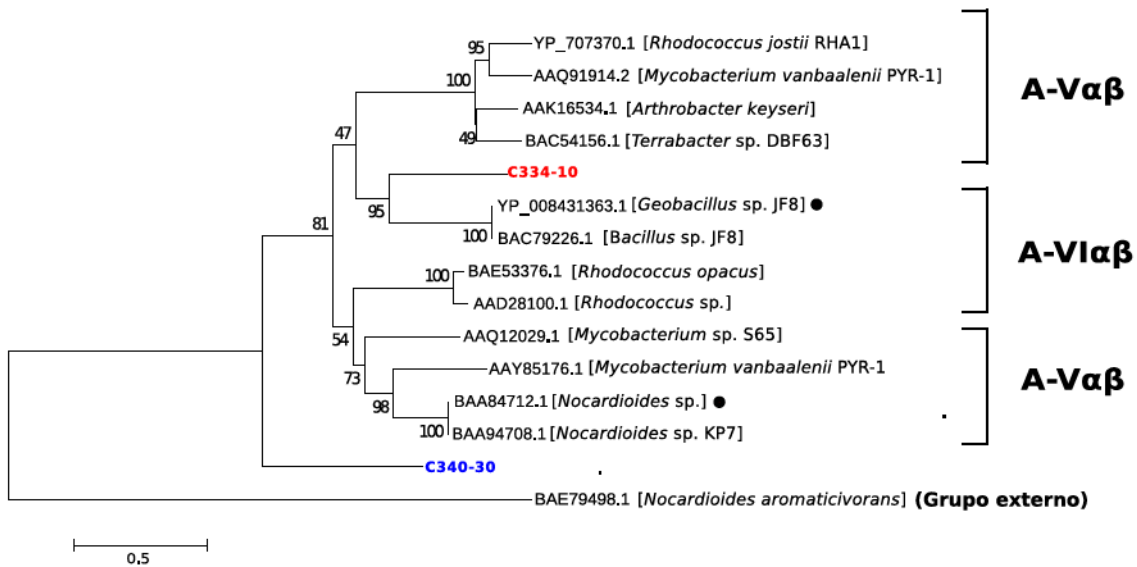
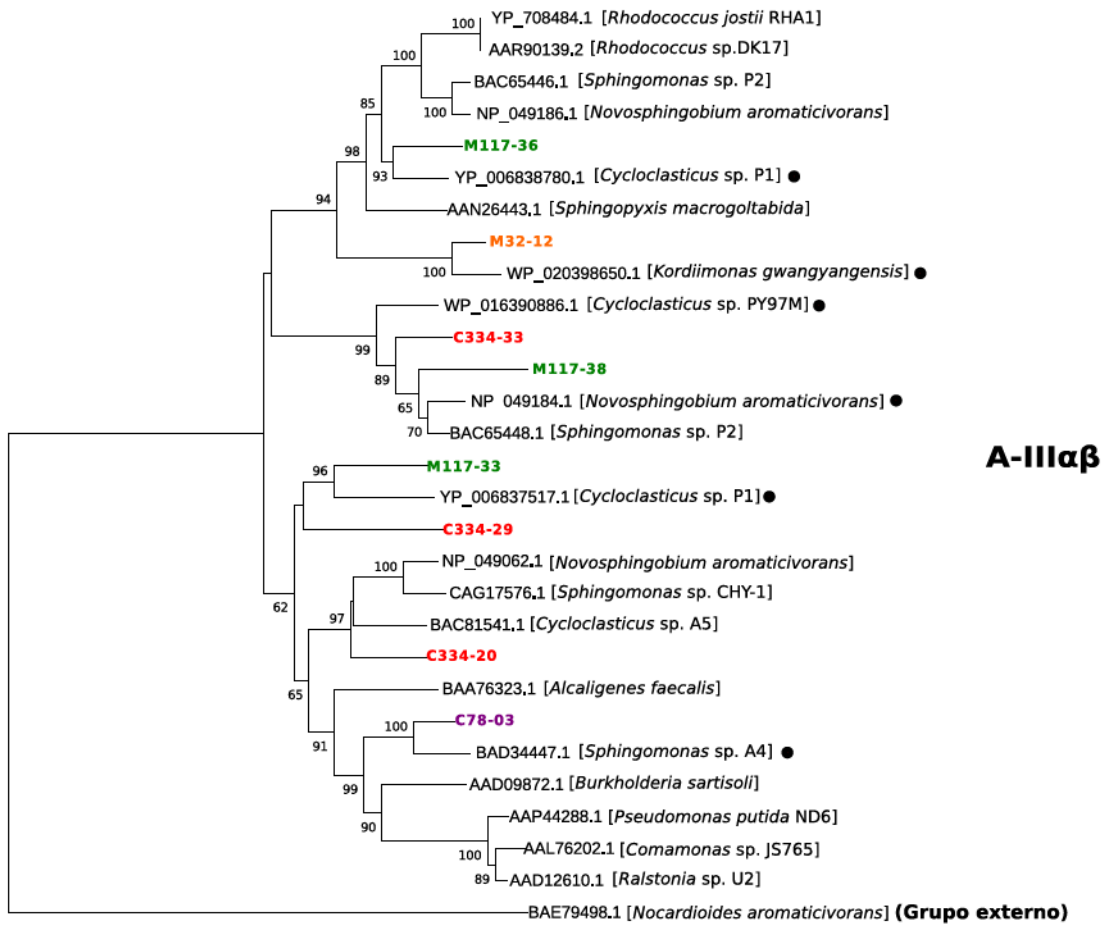
3: Secuencia parcial (ausencia de extremo amino terminal).

mas corresponden a dioxigenasas iniciales, capaces de incorporar átomos de oxígeno en las posiciones alfa/beta de anillos fusionados o anillos aromáticos con sustituyentes como cloro, fenilo, alquilo y carboxilato [Chakraborty et al., 2012]. La totalidad de los genes RHOs de clase A presentaron un gen adyacente y codireccional correspondiente a la subunidad β de enzimas oxigenasas, lo cual sugiere que estas oxigenasas poseen una estructura cuaternaria hetero-multimérica ($\alpha_n\beta_n$). Por otro lado, el análisis filogenético de la subunidad alfa de estas secuencias mostró que ocho de ellas se encuentran

distribuidas en clados bien definidos entre las enzimas RHOs heteromultiméricas de clase A y tipo III (A-III $\alpha\beta$). Las proteínas transportadoras de electrones que se encuentran en este tipo de RHOs incluyen ferredoxinas de tipo Rieske [2Fe-2S] y ferredoxina-NAD⁺ reductasas que poseen un dominio N-terminal [2Fe-2S] típico de proteínas Fe-S (ISP) presente en plantas [Chakraborty et al., 2012]. Las secuencias M32-08, C78-17 y C334-05 codificarían para ferredoxinas de este tipo, mientras que las secuencias C78-19, C165-15 y C334-34, codificarían para ferredoxina-NAD⁺ reductasas. Por lo tanto, los fragmentos C334 y C78 tendrían todos los genes que codifican para cuatro enzimas RHOs multiméricas clasificadas como A-III. El resto de las secuencias de clase A identificadas en los insertos clonados (C334-10 y C340-30) no formaron parte de los clados correspondientes a otros tipos de RHOs previamente definidos. En particular, la secuencia C340-30 fue altamente divergente respecto de secuencias previamente caracterizada, compartiendo sólo un 40 % de identidad a nivel de aminoácidos con la secuencia más cercana de la base de datos (Tabla 5.1).

Tres secuencias codificantes para RHOs de clase B (M117-22, M117-23 y C334-35) fueron identificadas en dos de los fragmentos clonados. Esta clase de enzimas incluye toluato/benzoato dioxigenasas, las cuales incorporan dos grupos oxidrilo en posiciones cercanas a grupos amino o carboxilato. Tal como puede observarse en la figura 5.4, dichas secuencias se encuentran en clados diferentes y, si bien poseen un ancestro común con dioxigenasas clasificadas como B-I $\alpha\beta$ y B-II $\alpha\beta$, son divergentes respecto de los tipos de enzimas definidos hasta el momento. Sin embargo, es posible que el bajo número de secuencias pertenecientes a esta clase de enzimas RHOs afecte la robustez de este análisis.

El resto de las oxigenasas detectadas fueron clasificadas como RHOs de clase C (C334-06, C334-25, M117-16, C340-32, C293-03, 78-10 y C78-20). Dicha clase de enzimas RHOs está compuesta principalmente por salicilato hidroxilasas, enzimas capaces de formar catecol o gentisato a partir de salicilato; y por antranilato dioxigenasas, las cuales catalizan la formación de catecol a partir de antranilato. Actualmente, la clase C se encuentra formada solamente por enzimas con estructuras cuaternarias $\alpha_n\beta_n$ clasificadas en dos tipos diferentes (C-III $\alpha\beta$ y C-IV $\alpha\beta$). Seis de las secuencias de clase C identificadas en el presente trabajo se agruparon con secuencias correspondientes a RHOs con clasificación C-IV $\alpha\beta$ (Figura 5.4, Tabla 5.5). Sorprendentemente, sólo cuatro de los genes codificantes para este tipo de RHOs presentaron un gen adyacente que podría codificar para la subunidad β de estas enzimas.



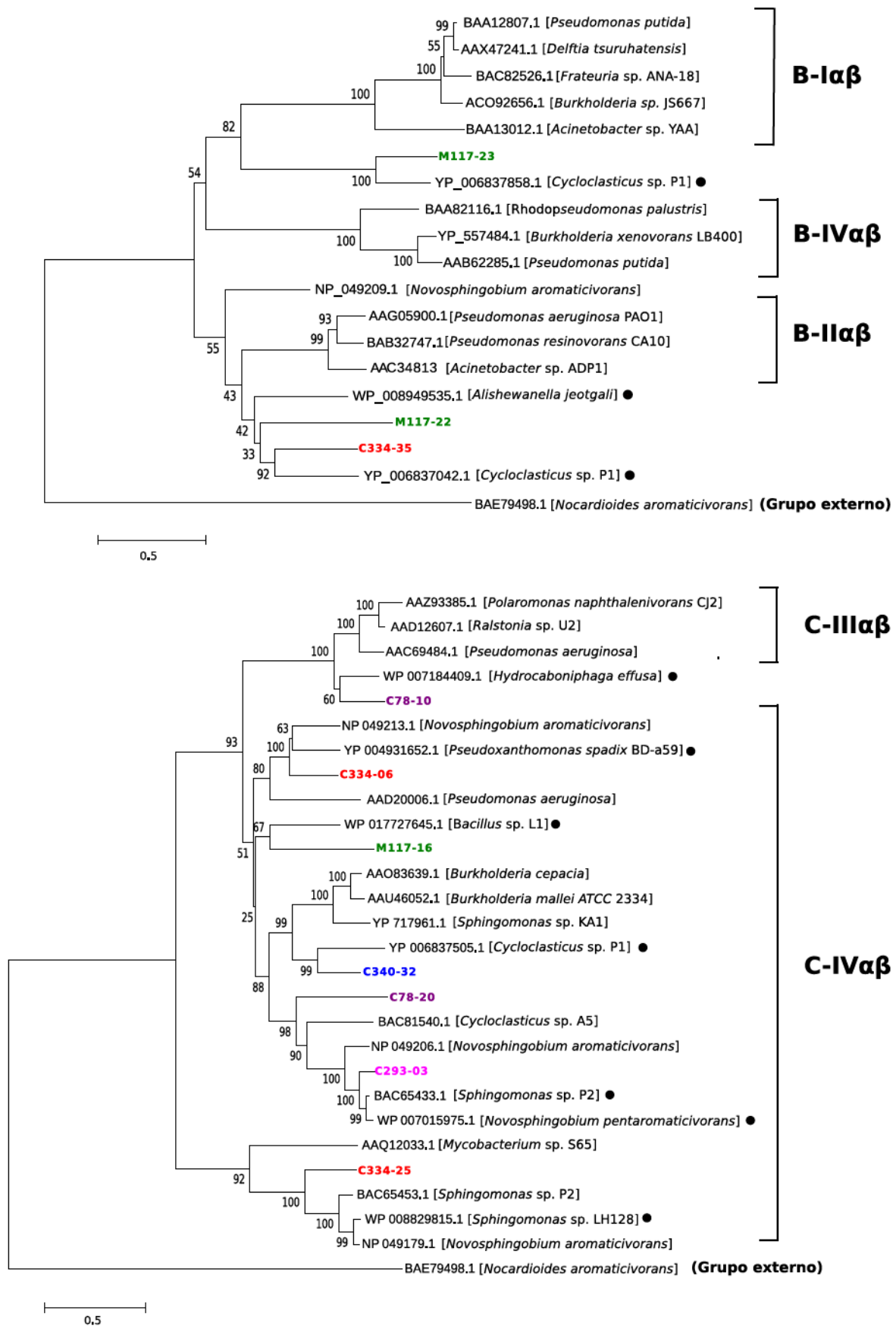


Figura 5.4: Análisis filogenéticos de las secuencias deducidas de aminoácidos correspondientes a la subunidad α de enzimas RHO detectadas en la biblioteca metagenómica. Los árboles filogenéticos fueron realizados con el método *Neighbour Joining* y utilizando tanto secuencias de referencia previamente clasificadas [Chakraborty et al., 2012] como secuencias de los homólogos más cercanos a las secuencias metagenómicas (identificadas mediante círculos negros). Estas secuencias se identifican mediante su número de acceso y el nombre del microorganismo del cual provienen (en corchetes). La clasificación de las enzimas RHO de acuerdo al esquema propuesto por Chakraborty y colaboradores se indica a la derecha de cada árbol filogenético. Los valores de bootstrasp fueron calculados en base a 1000 réplicas, mostrando valores mayores al 50%. La escala representa la cantidad de aminoácidos sustituidos por posición. En cada árbol se muestra una secuencia representativa del grupo externo o *outgroup*, correspondiente a la secuencia de la enzima carbazol 1,9-dioxigenasa de *Nocardioides aromaticivorans* sp.

5.2.2.2. Extradiol Dioxigenasas

Se identificaron siete secuencias codificantes para enzimas extradiol dioxigenasas (EXDO) en los fragmentos clonados. El análisis filogenético de las mismas permitió clasificarlas en dos grandes grupos o familias de acuerdo a la clasificación propuesta por Eltis y colaboradores [Eltis y Bolin, 1996] (Figura 5.5). Entre ellas, las secuencias deducidas de los genes C293-07 y C165-12 se agruparon dentro de la familia de EXDO I.2, cuyas enzimas poseen preferencia por sustratos monocíclicos. Particularmente, la secuencia C293-07 formó parte de un clado que contiene secuencias codificantes para catecol 2,3-dioxigenasas de alfa proteobacterias relacionadas con el gen *xylE* de *Novosphingobium aromaticivorans* F199. Su secuencia homóloga más cercana (95% de identidad a nivel de aminoácidos) correspondió a una proteína de resistencia a bleomicina de *Novosphingobium* sp. PP1Y, bacteria marina degradadora de HAPs. Si bien las proteínas de resistencia a bleomicina no se encuentran relacionadas con la degradación de HAPs, es posible que durante la anotación de dicha secuencia se haya empleado sólo la base de datos Pfam, en la cual las enzimas EXDO I son reconocidas como parte de la superfamilia de proteínas Glioxilasas/proteínas de resistencia a bleomicina/Dioxigenasas. Dado que en el presente trabajo además se utilizaron diferentes bases de datos, en la secuencia de aminoácidos correspondiente a la CDS C293-07 fue posible confirmar la presencia del dominio conservado [GNTIV]-x-H-x(5,7)-[LIVMF]-Y-x(2)-[DENTA]-P-x-[GP]-x(2,3)-E, propio de las EXDO I. La secuencia C165-12, por otro lado, presentó un 91% de identidad a nivel de aminoácidos respecto de la enzima catecol 2,3-dioxigenasa de *Leptothrix cholodnii* SP-6. Asimismo, se agrupó dentro de un clado cuyas secuencias fueron identificadas en cepas pertenecientes a las clases Betaproteobacteria y Gamaproteobacteria.

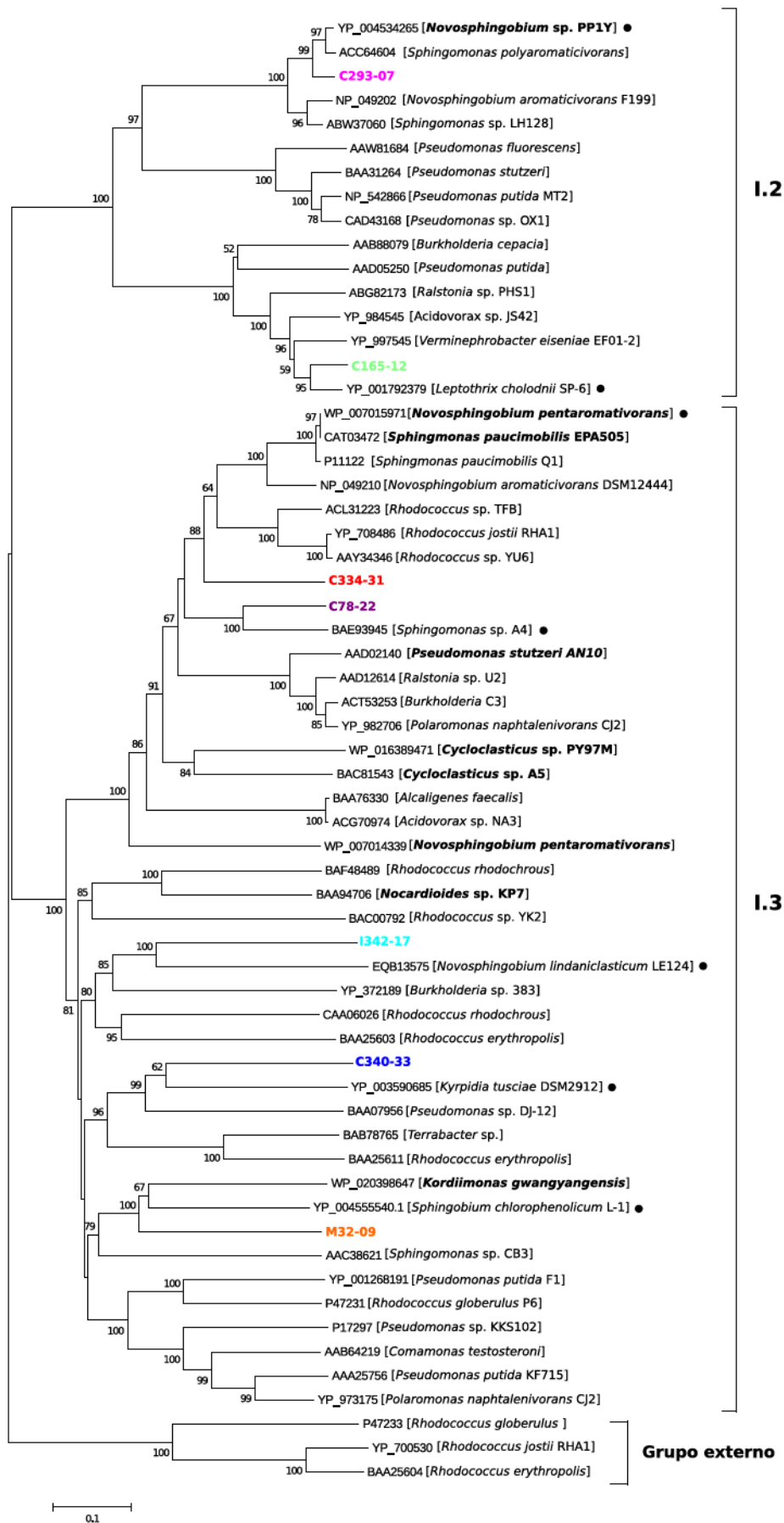


Figura 5.5: Análisis filogenético de las secuencias deducidas de aminoácidos correspondientes a EXDOs identificadas en la biblioteca metagenómica. El árbol filogenético fue realizado con el método *Neighbour Joining*, utilizando tanto secuencias de referencia [Vilchez-Vargas et al., 2013] como secuencias de los homólogos más cercanos a las secuencias metagenómicas (identificadas mediante círculos negros). Dichas secuencias se identifican mediante su número de acceso y el nombre del microorganismo del cual provienen (en corchetes). En negrita se muestran las cepas aisladas a partir ambientes marinos. La clasificación de las enzimas EXDO, de acuerdo al esquema propuesto por Eltis y colaboradores [Eltis y Bolin, 1996], se indica a la derecha. Los valores de bootstrasp fueron calculados en base a 1000 réplicas, indicando valores mayores al 50 %. La escala representa la cantidad de aminoácidos sustituidos por posición.

El resto de las EXDO identificadas formaron parte de la familia EXDO I.3, la cual contiene enzimas que poseen preferencia por el clivaje de sustratos bicíclicos. Al igual que las EXDO codificadas por las secuencias C293-07 y C165-12, las EXDO I.3 identificadas en la biblioteca metagenómica se agruparon en diferentes clados, lo cual es indicativo de la alta diversidad de enzimas EXDO presente en sedimentos intermareales de Bahía Ushuaia. Las secuencias de aminoácidos correspondientes a los genes C334-31 y C78-22 presentaron mayor porcentaje de identidad con enzimas EXDO de *Novosphingobium pentaromativorans* sp. y *Sphingomonas* sp. A4, respectivamente (73-79%), aunque la EXDO codificada por el gen C334-31 mostró ser divergente respecto de su homólogo más cercano. Asimismo, ambas secuencias presentaron similitud con un clado que posee dihidroxinaftaleno dioxigenasas relacionadas con la enzima NahC de *P. stutzeri* AN10, así como también con un clado que contiene la proteína BphC de *Sphingomonas paucimobilis* EPA 505, entre otras. Por otra parte, las secuencias I342-17, M32-09, C340-33 presentaron menor porcentaje de identidad (50-56%) respecto de sus secuencias homólogas más cercanas, las cuales pertenecieron a *Novosphingobium lindaniclasticum* sp., *Sphingobium chlorophenolicum* L-1 y *Kyrpidia tusciae* DSM 2912, respectivamente. A su vez, la proteína codificada por la secuencia I342-17 se encuentra vinculada a enzimas dihidroxibifenil dioxigenasas relacionadas con la enzima BphC1 de *R. erythropolis*, mientras que las proteínas correspondientes a las secuencias M32-09 y C340-33 poseen relación con un clado formado por dihidroxibifenil dioxigenasas asociadas a la enzima BphC de *R. globerulus* P6 y con trihidroxibifenil dioxigenasas vinculadas a la proteína BphC de *Terrabacter*, respectivamente.

5.2.3. Reconstrucción de las rutas degradativas de HAPs a partir de la anotación funcional de los fragmentos clonados

Una vez que se produce la activación de los hidrocarburos aromáticos catalizada por RHOs, otras enzimas de las rutas catabólicas catalizan la conversión de diversos sustratos en intermediarios centrales de las vías degradativas. A continuación se describen las secuencias identificadas en los fragmentos metagenómicos correspondientes a las diferentes enzimas que podrían estar involucradas en las rutas degradativas de hidrocarburos aromáticos.

5.2.3.1. Secuencias involucradas en la vía alta de degradación de HAPs

Además de los genes de dioxigenasas iniciales (clase A) analizados en la sección 5.2.2.1, la anotación funcional permitió detectar, en la mayoría de los fragmentos clonados, genes que podrían codificar para otras enzimas de la vía alta de degradación de hidrocarburos aromáticos (Figura 5.6). En cuatro de los fragmentos identificados se predijeron secuencias que podrían codificar para enzimas dihidrodiol deshidrogenasas (M32-14, C78-05, C293-17 y C334-09). Estas enzimas catalizan la deshidrogenación

del dihidrodiol formado por acción de las oxigenasas iniciales para dar lugar a intermediarios orto o meta dihidroxilados. Las secuencias detectadas codificantes para dichas enzimas presentaron un 42 a 55 % de identidad entre sí a nivel de aminoácidos, y un 60 a 89 % de identidad con deshidrogenasas de microorganismos involucrados en la degradación de hidrocarburos aromáticos (Tabla 5.1). La reacción siguiente de la vía baja de degradación de estos compuestos consiste en la ruptura del anillo aromático de los intermediarios dihidroxilados a través de enzimas extradiol o intradiol dioxigenasas. Las secuencias analizadas en la sección 5.2.2.2, codificantes para extradiol dioxigenasas con preferencia por sustratos bicíclicos (M32-09, C78-22, C334-31, C340-33 y I342-17), podrían estar involucradas en la vía alta de degradación de HAPs. En las etapas siguientes, el producto de reacción obtenido por actividad de las EXDO, puede ser transformado a ácido salicílico o compuestos derivados mediante una serie de reacciones en las que intervienen enzimas isomerasas, hidratasa-aldolasas y aldehído deshidrogenasas. Sólo en el fragmento C78 se encontraron secuencias codificantes para las tres enzimas anteriores (C78-02, C78A-01 y C78-18), las cuales mostraron un 58 a 80 % de identidad con los respectivos homólogos de *Hydrocarboniphaga effusa* (Tabla 5.1). En otros fragmentos clonados también se detectaron genes codificantes para 2-hidroxi-2H-cromen-2-carboxilato isomerasas (C165-27 y C334-23), una trans-O-hidroxibencildenpiruvato hidratasa-aldolasa (C334-16) y una aldehído deshidrogenasa (C293-16).

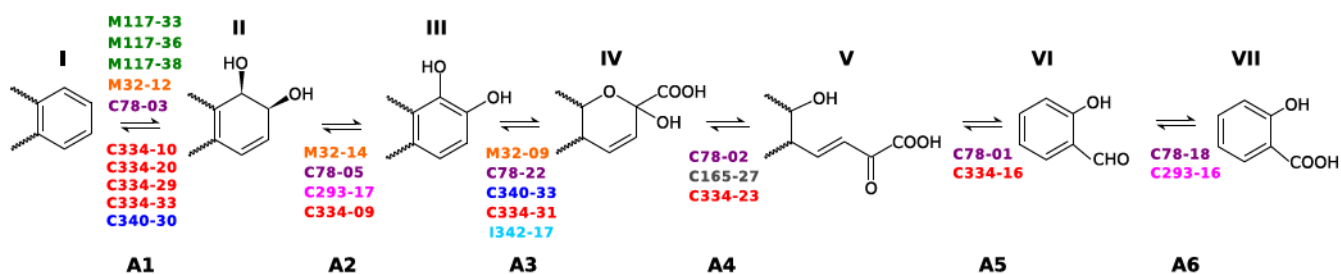


Figura 5.6: Posibles reacciones de la vía alta de degradación de hidrocarburos aromáticos en las que estarían involucradas las secuencias detectadas. A1 a A6: enzimas implicadas en las diferentes etapas de reacción. A1, dioxigenasas iniciales (sólo se indican las CDSs correspondientes a la subunidad alfa de enzimas RHO); A2, deshidrogenasas; A3, extradiol dioxigenasas; A4, isomerasas; A5, hidratasa-aldolasas; A6, aldehído deshidrogenasas. Las secuencias codificantes para las correspondientes enzimas se muestran en diferentes colores de acuerdo al inserto del cual provienen. I a VII, sustratos y/o productos de reacción: I, HAPs; II, *cis*-dihidrodiol; III, dihidroxi-HAP; IV, derivados del ácido 2-hidroxi-2H-cromen-2-carboxílico; V, derivados del ácido *trans*-o-hidroxibencildenpirúvico; VI, salicilaldehído (o derivados); VII, ácido salicílico (o derivados).

5.2.3.2. Secuencias involucradas en la vía baja de degradación de HAPs

El ácido salicílico generado en la vía alta de degradación de HAPs puede ser metabolizado por acción de diferentes salicilato hidroxilasas. Las enzimas salicilato-1-hidroxilasas catalizan la hidroxilación y descarboxilación del ácido salicílico para dar lugar a la formación de catecol. En cambio, las salicilato-5-hidroxilasas utilizan ácido salicílico para generar gentisato como producto de reacción.

Tal como se observó en la sección correspondiente a la clasificación de las enzimas RHO, en cinco fragmentos clonados se detectaron genes codificantes para dichas enzimas (RHOs pertenecientes a la clase funcional C). En los fragmentos M117, C293 y C340 se detectó una copia del gen salicilato-1-hidroxilasa, mientras que en el fragmento C334 se identificaron dos copias de dicho gen. En el fragmento C78 también se detectaron dos copias de genes codificantes para salicilato hidroxilasas, sin embargo, uno de ellos corresponde a una salicilato-1-hidroxilasa (C78-20) y el otro a una enzima salicilato-5-hidroxilasa (C78-10). Estos resultados sugieren que el microorganismo que contiene el fragmento C78 en su genoma podría utilizar el ácido salicílico para formar tanto gentisato como compuestos derivados del catecol.

Dependiendo de la enzima salicilato hidroxilasa utilizada en la vía baja de degradación de hidrocarburos aromáticos, el producto de reacción generado luego puede ser degradado vía catecol, mediante meta u orto-clivaje, o vía gentisato hasta formar intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbóxicos. Los genes codificantes para la totalidad de las enzimas necesarias para la degradación de catecol hacia intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbóxicos fueron identificados en dos de los fragmentos clonados (C165 y C293), mientras que los genes involucrados en la ruta de degradación por gentisato sólo se encontraron en el fragmento C78.

Secuencias involucradas en la degradación de catecol presentes en el fragmento C165. En este fragmento se predijeron, dentro de un mismo operón, secuencias codificantes para las enzimas catecol 2,3-dioxigenasa (C165-12), 2-hidroximucónico semialdehído hidrolasa (C165-09), hidroximucónico semialdehído deshidrogenasa (C165-10), oxalocrotonato tautomerasa (C165-06), oxalocrotonato descarboxilasa (C165-07), 2-ceto-4-pentenoato hidratasa (C165-08), 4-hidroxi-2-oxovalerato aldolasa (C165-03) y acetaldehído deshidrogenasa (C165-04). Estas enzimas permiten el metaclivaje del catecol para dar como producto final piruvato y acetyl-CoA (Figura 5.7a). Los genes correspondientes compartieron entre un 78 a 93 % de identidad a nivel de aminoácidos con las secuencias más cercanas, las cuales pertenecieron mayormente a betaproteobacterias (Tabla 5.1). Más aún, la organización génica de los mismos fue similar a la encontrada en la proteobacteria de clase beta *Verminiphrobacter eiseniae* EF01-2 (Figura 5.7b). Particularmente, la secuencia codificante C165-04 presentó el mayor porcentaje de identidad a nivel de aminoácidos respecto de su secuencia homóloga, la cual corresponde a una secuencia codificante para una enzima acetaldehído deshidrogenasa de un microorganismo no cultivable (Tabla 5.1).

Inmediatamente corriente arriba de este operón se identificó una secuencia (C165-14) que podría codificar para un regulador de la transcripción, debido a que su secuencia proteica comparte un 79 % de identidad con un regulador transcripcional de la familia LysR presente en *Acidovorax* sp. JS42. Por otro lado, precediendo al gen de catecol-2,3-dioxigenasa (C165-12), se detectó una secuencia codificante

para una ferredoxina (C165-13), la cual presentó un 74 % de identidad a nivel de aminoácidos respecto de una ferredoxina de *Acidovorax* sp.JS42. A su vez, tanto la secuencia C165-13 como la secuencia de la ferredoxina de *Acidovorax* sp.JS42, mostraron homología con ferredoxinas capaces de reactivar enzimas catecol 2,3-dioxigenasas. La pérdida de actividad de dichas ferredoxinas puede inhibir el crecimiento de microorganismos que generan compuestos para-sustituidos de metilcatecol, sin embargo permiten el crecimiento ante catecol o 3-metilcatecol. Por lo tanto el gen C165-13 podría estar contribuyendo a la degradación de diferentes compuestos derivados del catecol.

Secuencias involucradas en la degradación de catecol presentes en el fragmento C293.

En este fragmento también se predijeron, dentro de un mismo operón aunque con una organización diferente a la observada en el fragmento C165, genes codificantes para la totalidad de las enzimas necesarias para la degradación de catecol hasta acetil-CoA mediante metaclivaje (secuencias C293-06 a C293-14. Figura 5.7 a y b). Estas secuencias comparten entre 82 y 97 % de identidad a nivel de aminoácidos con secuencias pertenecientes a bacterias de la familia *Sphigomonadaceae*. En su mayoría se encuentran relacionados con enzimas de *Novosphingobium* sp. PP1Y, bacteria marina capaz de crecer en un amplio rango de compuestos aromáticos. Asimismo, estos genes presentan una organización génica similar a la de sus homólogos en *Novosphingobium* sp. PP1Y (Figura 5.7 b).

Secuencias que podrían estar implicadas en la regulación de la transcripción también fueron encontradas en el fragmento C293 (C293-29 y C293-33). Por otra parte, al igual que en el fragmento C165, inmediatamente corriente abajo del gen codificante para catecol 2,3-dioxigenasa se observó la presencia de una secuencia codificante para una proteína hipotética de función desconocida (C293-08), la cual comparte un 76 % de identidad con una proteína hipotética de *Novosphingobium* sp. PP1Y. Si bien en el fragmento C165 dicha secuencia presentó un 80 % de identidad respecto de una proteína hipotética perteneciente a un microorganismo aún no cultivado (C165-11, Tabla 5.1), también mostró alto porcentaje de identidad a nivel de aminoácidos (77 %) con la secuencia homóloga presente en la bacteria *Verminephrobacter eiseniae* EF01-2. Tanto en los fragmentos C165 y C293, como en los fragmentos de los genomas de *Novosphingobium* sp. PP1Y y *Verminephrobacter eiseniae* EF01-2, la secuencia codificante para la proteína hipotética fue detectada dentro un operón conteniendo genes que podrían estar involucrados en la degradación de catecol por metaclivaje (Figura 5.7b). Estos resultados sugieren que dichos genes podrían estar involucrados en funciones similares, probablemente asociadas a la degradación de hidrocarburos aromáticos.

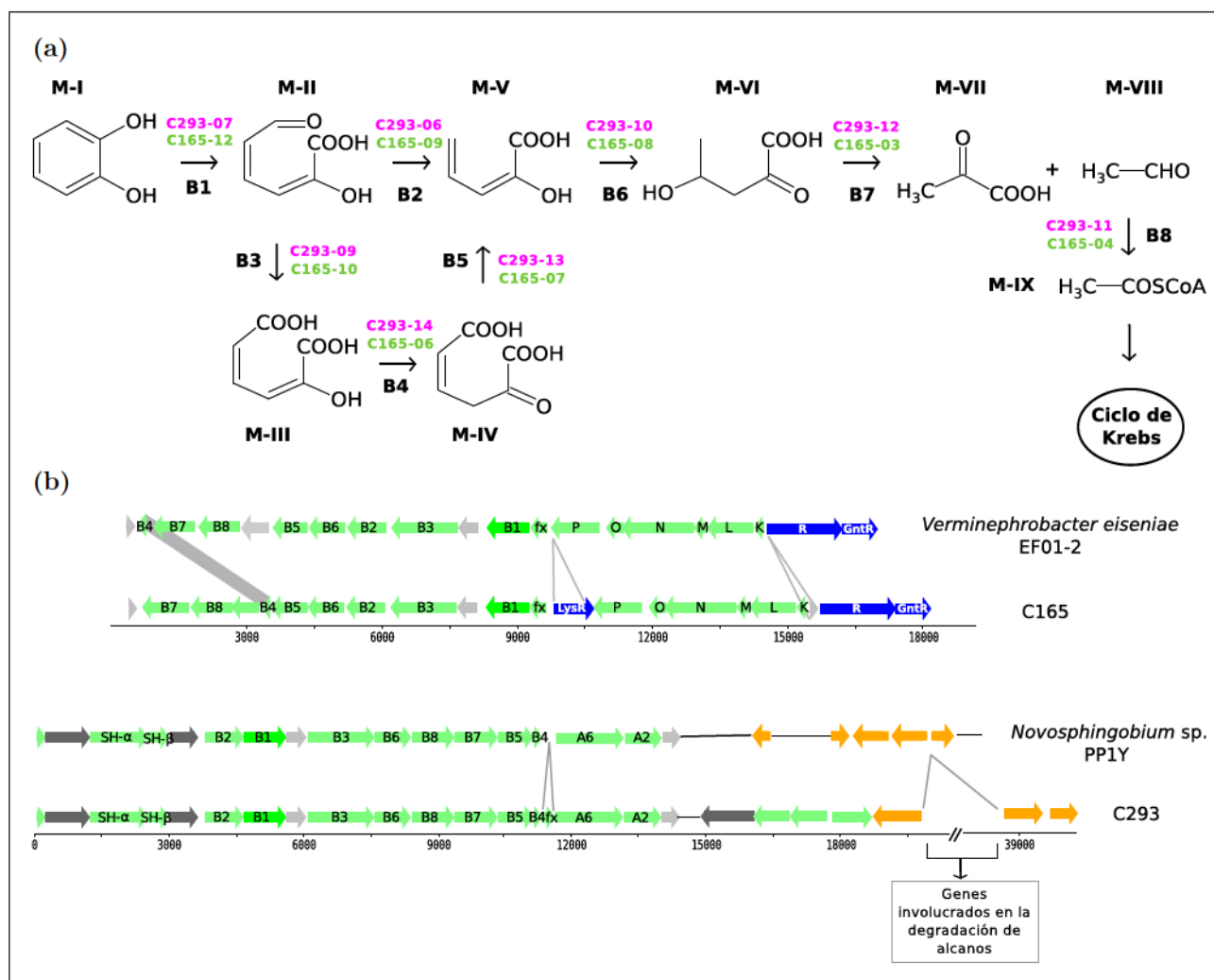


Figura 5.7: Genes codificantes para enzimas de la vía baja de degradación de hidrocarburos aromáticos por metaclivaje del catecol identificados en los insertos C165 y C293. (a): reacciones en las que podrían estar involucradas las enzimas codificadas por dichos genes. B1 a B8, enzimas implicadas en las diferentes etapas de reacción: B1, catecol 2,3 dioxigenasa; B2, hidroximuconico semialdehído hidrolasa; B3, hidroximuconato semialdehído deshidrogenasa; B4, oxalocrotonato tautomerasa; B5, oxalocrotonato descarboxilasa; B6, 2-ceto-4-pentenoato hidratasa; B7, 4-hidroxi-2-oxoalérido aldolasa; B8, acetaldehído deshidrogenasa. Los genes codificantes para cada una de estas enzimas se identifican en colores de acuerdo al fragmento del cual provienen. M-I a M-VIII, sustratos y/o productos de reacción: M-I, catecol; M-II, 2-hidroximuconico-semialdehído; M-III, ácido 2-hidroximuconico; M-IV, 4-oxalocrotonato; M-V, ácido 2-oxo-4-penténico; M-VI, ácido 4-hidroxi-2-oxoalérido; M-VII, ácido pirúvico; M-VIII, acetaldehído; M-IX, acetyl-CoA. (b): organización de los genes de la vía baja de degradación por metaclivaje identificados en los insertos C165 y C293 y su comparación con la organización de genes homólogos presentes en *Verminephrobacter eiseniae* EF01-2 y *Novosphingobium* sp. PP1Y, respectivamente. Los genes se indican mediante flechas y en diferentes colores de acuerdo a su posible función: verde, genes involucrados en la degradación de hidrocarburos aromáticos; azul, reguladores de la transcripción; naranja, transferencia horizontal de ADN; gris oscuro, otros genes; gris claro, genes codificantes de proteínas hipotéticas. Dentro de cada flecha, se indica el producto génico correspondiente: B1 a B8, enzimas de la vía baja de degradación de hidrocarburos aromáticos por metaclivaje de catecol; fx, ferredoxina; R, regulador de la transcripción dependiente del factor σ ; LysR, regulador de la transcripción; GntR, represor de la transcripción; P, O, N, M, L, K, diferentes subunidades de la enzima fenol hidroxilasa; SH, subunidad α y β de la enzima salicilato hidroxilasa; A2, dihidrodil deshidrogenasa; A6, aldehído deshidrogenasa.

Genes involucrados en la degradación de hidrocarburos aromáticos vía gentisato. Los genes de la vía baja involucrados en la degradación de gentisato del fragmento C78 se encontraron dentro

de un mismo operón. Además del gen correspondiente a la enzima salicilato-5-hidroxilasa mencionada anteriormente, dicho operón presentó genes codificantes para las enzimas gentisato 1,2-dioxigenasa (C78-08), maleilpiruvato isomerasa (C78-12) y fumarilpiruvato hidrolasa (C78-09). Estas enzimas catalizan la degradación del gentisato hasta metabolitos centrales del ciclo de Krebs, como piruvato y fumarato (Figura 5.8 a).

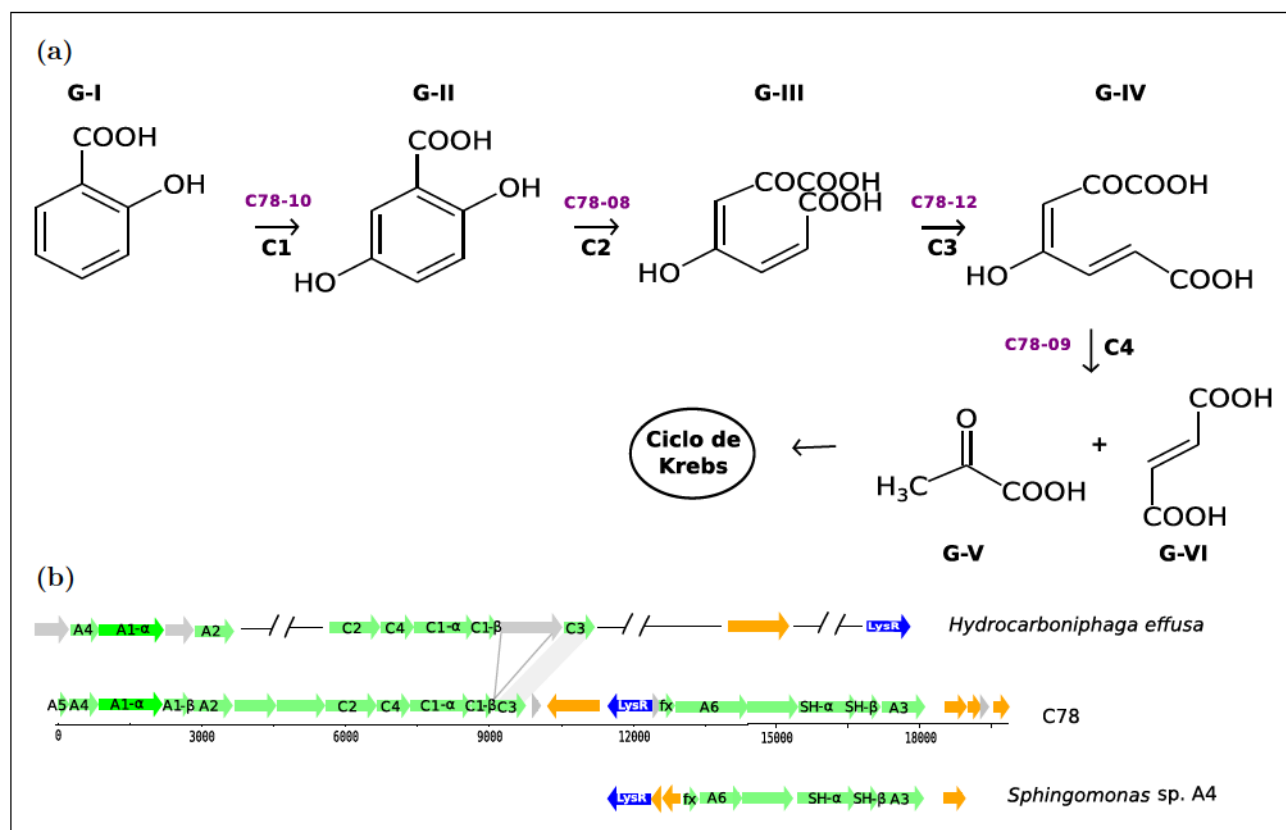


Figura 5.8: Genes codificantes para enzimas de la vía baja de degradación de hidrocarburos aromáticos mediante gentisato identificados en el inserto C78. (a): reacciones en las que podrían estar involucradas las enzimas codificadas por dichos genes. C1 a C4, enzimas implicadas en las diferentes etapas de reacción: C1- α y C1- β , subunidad mayor y menor, respectivamente, de la enzima salicilato-5-hidroxilasa; C2, gentisato-1,2-dioxigenasa; C3, maleilpiruvato isomerasa y C4, fumarilpiruvato hidrolasa. Los genes codificantes para cada una de estas enzimas, se identifican en colores de acuerdo al fragmento del cual provienen. G-I a G-VI, sustratos y/o productos de reacción: G-I, ácido salicílico; G-II, gentisato; G-III, ácido maleilpirúvico; G-IV, ácido fumarilpirúvico; G-V, piruvato; G-VI, ácido fumárico. (b): organización de los genes de la vía baja de degradación mediante gentisato identificados en el inserto C78, y su comparación con la organización de genes homólogos presentes en *Hydrocarboniphaga effusa*. También se muestra la organización de otros genes identificados en el inserto C78, respecto de los genes presentes en un fragmento genómico de 16,4 kb de *Sphingomonas sp. A4*. Los genes se indican mediante flechas y en diferentes colores de acuerdo a su posible función: verde, genes involucrados en la degradación de hidrocarburos aromáticos; azul, reguladores de la transcripción; naranja, transferencia horizontal de ADN; gris claro, genes codificantes de proteínas hipotéticas. Dentro de cada flecha, se indica el producto génico correspondiente: C1 a C4, enzimas de la vía baja de degradación de hidrocarburos aromáticos mediante gentisato; fx, ferredoxina; LysR, regulador de la transcripción; SH, subunidad α y β de la enzima salicilato hidroxilasa; A1- α y A1- β , subunidad mayor y menor, respectivamente, de oxigenasas iniciales; A2, dihidrodiol deshidrogenasas; A3, dihidroxi-HAP dioxigenasa; A4, isomerasas; A5, hidratasa-aldolasa; A6, aldehído deshidrogenasas.

En el fragmento C78 los genes de esta vía degradativa se encuentran organizados de manera similar a los genes homólogos identificados en un fragmento del genoma de *Hydrocarboniphaga effusa*,

Gamaproteobacteria capaz de degradar hidrocarburos aromáticos y alcanos. La totalidad de los genes que permiten la degradación de salicilato vía gentisato también se encuentran dentro de un mismo operón en este microorganismo. Sin embargo, a diferencia del fragmento C78, este operón posee un gen codificante para una proteína hipotética entre los genes correspondientes a la subunidad beta de salicilato 5-hidroxilasa y maleilpiruvato isomerasa. El resto de los genes de esta vía se encontraron en el mismo orden (Figura 5.8 b).

5.3. Discusión

Los avances metodológicos de la última década han permitido acceder a la información genética contenida en las comunidades microbianas de una forma más directa y sin las restricciones impuestas por la imposibilidad de cultivar en el laboratorio la gran mayoría de los microorganismos ambientales. En particular, las estrategias metagenómicas son capaces de brindar información sin precedentes sobre el potencial metabólico de una comunidad microbiana [Rayu et al., 2012]. En esta Tesis Doctoral, la construcción de una biblioteca metagenómica ha permitido develar los mecanismos que podrían utilizar distintas proteobacterias autóctonas de los sedimentos de Bahía Ushuaia para la biodegradación de hidrocarburos aromáticos, en particular HAPs. Una de las limitaciones de esta estrategia metagenómica es la dificultad de conocer con precisión de qué microorganismo proviene cada fragmento de ADN clonado. Esta información es de gran interés, ya que permite relacionar genes y sus posibles funciones con la filogenia de un microorganismo no caracterizado [Sierra-García et al., 2014]. Distintas herramientas permiten la asignación taxonómica de fragmentos de ADN metagenómico, aunque las mismas se encuentran limitadas por la falta de información sobre los microorganismos ambientales. Una de estas herramientas, denominada Megan, se basa en la similaridad de las secuencias con aquellas depositadas en bases de datos [Huson y Mitra, 2012]. Los análisis realizados sobre la asignación taxonómica utilizando esta herramienta sugieren que la mayoría de los fragmentos identificados en la biblioteca metagenómica se encuentran afiliados con el *phylum* Proteobacteria, grupo taxonómico al cual pertenece la mayor parte de las bacterias degradadoras de hidrocarburos formalmente descritas [Prince et al., 2010]. Particularmente, más de la mitad de las secuencias codificantes del fragmento C165 fueron asignadas a la clase Betaproteobacteria. Varios miembros de la clase Betaproteobacteria son capaces de degradar, en condiciones aeróbicas, hidrocarburos aromáticos, incluyendo HAPs, compuestos cloroaromáticos, nitroaromáticos y aminoaromáticos [Parales, 2010]. La mayoría de las cepas con capacidades degradativas pertenecientes a esta clase de proteobacterias fueron aisladas a partir de suelo, aunque betaproteobacterias con capacidad de degradar hidrocarburos aromáticos también fueron identificadas en acuíferos contaminados [Alfreider y Vogt, 2007, Fahy et al., 2008]. Dada la escasa información existente sobre microorganismos de ambientes marinos de la clase Betaproteobacteria con

capacidad de degradar HAPs, este trabajo representa una importante contribución al conocimiento de dichos microorganismos.

Utilizando el programa Megan, la mitad de los clones identificados en la biblioteca metagenómica presentaron secuencias codificantes relacionadas con el *phylum* Alfaproteobacteria. Si bien el porcentaje de secuencias clasificadas en esta clase fue bajo en algunos casos, dicha clasificación fue corroborada (H. Dionisi, comunicación personal) utilizando otro método de clasificación taxonómica basado en las propiedades intrínsecas de las secuencias, llamado PhyloPythiaS [Patil et al., 2012]. A partir de hábitats marinos se han aislado numerosas cepas pertenecientes a esta clase de proteobacterias, sin embargo sólo unas pocas especies poseen la capacidad de degradar HAPs [Kim y Kwon, 2010]. Entre ellas se encuentran miembros pertenecientes a los órdenes Sphingomonadales y Rhodobacterales, capaces de degradar tanto hidrocarburos alifáticos como un amplio rango de hidrocarburos aromáticos [D'Argenio et al., 2011, Harwati et al., 2007]. Estudios realizados recientemente sobre la estructura de la comunidad bacteriana en muestras de sedimentos intermareales de Bahía Ushuaia también evidenciaron una alta abundancia de alfaproteobacterias en este sitio [Guibert et al., 2012]. Más aún, la proporción de bacterias pertenecientes a esta clase se vio incrementada en sistemas experimentales en los que se adicionó petróleo crudo, lo cual indicaría que sus miembros podrían tener un rol importante en la degradación de hidrocarburos [Guibert et al., 2012]. Por otro lado, una baja proporción de las secuencias identificadas en los fragmentos M117 y C340 fueron asignadas a la clase Gamaproteobacteria, resultados que fueron confirmados al utilizar el programa PhyloPythiaS (H. Dionisi, comunicación personal). Bacterias marinas del género *Cycloclasticus*, degradadoras obligadas de HAPs, pertenecen a esta clase de proteobacterias [Cui et al., 2013, Yakimov et al., 2007]. Por último, ninguna de las secuencias del fragmento C334 pudieron ser clasificadas al nivel taxonómico de clase al utilizar el programa Megan. Si bien todos los fragmentos metagenómicos identificados en el presente trabajo estuvieron asociados al *phylum* Proteobacteria, y en cierta medida relacionados con tres clases diferentes dentro de dicho *phylum*, éstos no lograron ser asignados a niveles taxonómicos inferiores. Estos resultados, como así también los porcentajes de identidad moderados de las secuencias identificadas con respecto a las secuencias de las bases de datos, indican que los fragmentos identificados pertenecen a microorganismos desconocidos.

El análisis de los genes presentes en los fragmentos clonados permitió identificar (en seis de ellos) secuencias codificantes para las subunidades α y β de enzimas RHO, las cuales representaron un 12% del total de los genes identificados. La mayoría de las secuencias identificadas codificantes para la subunidad catalítica de RHOs, mostraron homología con oxigenasas pertenecientes a microorganismos degradadores de HAPs, como por ejemplo *Kordiimonas gwangyangensis* DSM 19435, diferentes cepas del género *Cycloclasticus* y *Novosphingobium* sp. PP1Y [Cui et al., 2013, D'Argenio et al., 2011, Lai et al., 2012]. Asimismo, algunas de ellas presentaron altos porcentajes de identidad con fragmentos

de genes previamente identificados en sedimentos intermareales de Bahía Ushuaia. Además de un gen completo casi idéntico a fragmentos de ADN pertenecientes a la variante génica T (Capítulo 3) presente en el fragmento M117, en el fragmento C334 se identificaron dos secuencias (C334-10 y C-334-20) que presentaron un 80 y un 85 % de identidad a nivel de aminoácidos respecto de las variantes génicas J y B identificadas en sedimentos del sitio Planta Orión [Lozada et al., 2008, Marcos et al., 2009]. En ambos estudios, la detección de dichas variantes fue realizada mediante reacciones de amplificación utilizando cebadores diseñados a partir de secuencias de bacterias Gram positivas (variante J) y Gram negativas (variante B) degradadoras de hidrocarburos aromáticos. Por tanto, la presencia de genes relacionados con estas variantes génicas y su proximidad dentro de un mismo fragmento genómico fue inesperada. Las secuencias completas más cercanas a las CDSs C334-10 y C334-20 fueron identificadas en miembros de diferentes fila aunque con porcentajes de identidad moderados (50 % con *Geobacillus*, *Firmicutes* y 64 % con *Cycloclasticus*, *Proteobacteria*, respectivamente). El resto de las subunidades alfa de enzimas RHOs identificadas en la biblioteca metagenómica compartieron un 36 a 66 % de identidad con secuencias identificadas en otros estudios independientes del cultivo de microorganismos, la mayoría de ellas provenientes de muestras de ambientes terrestres contaminados con hidrocarburos [Singleton et al., 2012, Suenaga et al., 2007, Uchiyama y Miyazaki, 2013].

Las enzimas RHO pueden diferenciarse entre sí de acuerdo a su preferencia por sitios de oxigenación y estructura de sus sustratos, siendo capaces de oxidar un amplio rango de compuestos [Chakraborty et al., 2012]. Estas diferencias fueron evidenciadas recientemente en un trabajo publicado por el grupo de Chakraborty y colaboradores [Chakraborty et al., 2012], en el cual reportan el análisis filogenético de las secuencias conocidas hasta el momento de las enzimas RHO de microorganismos aislados, y la clasificación de las mismas en cuatro clases funcionales (A a D) y una clase adicional (D*) que incluye enzimas aún no caracterizadas. A su vez, las enzimas RHO pueden ser clasificadas en diferentes tipos (I a VII) en base a su sistema transportador de electrones. Teniendo en cuenta que el componente catalítico de las enzimas RHO puede además adoptar una forma heteromultimérica ($\alpha_n\beta_n$) u homo-multimérica (α_n), el sistema de clasificación desarrollado inicialmente por Kweon y colaboradores [Kweon et al., 2008] y actualizado por Chakraborty y colaboradores [Chakraborty et al., 2012] comprende 11 grupos diferentes de estas enzimas. Sin embargo, dado el escaso conocimiento que existe hasta el momento sobre la diversidad de estas enzimas, es posible que esta clasificación se expanda para incorporar otros tipos de enzimas. A partir del análisis filogenético de las 20 secuencias de aminoácidos de enzimas RHO detectadas en los fragmentos clonados se identificaron secuencias pertenecientes a tres clases diferentes de estas enzimas (A, B y C), aunque sólo 15 de ellas pudieron ser clasificadas con respecto al posible sistema transportador de electrones. Particularmente, las RHOs de clase C clasificadas hasta el momento poseen estructuras cuaternarias $\alpha_n\beta_n$ [Chakraborty et al., 2012]. No obstante, en dos de las secuencias asignadas a la clase C y tipo IV (M117-16 y

C340-32) no se identificaron secuencias codificantes para sus respectivas subunidades β . Los estudios realizados en el presente trabajo no permitieron determinar si ambas oxigenasas realmente presentan una estructura cuaternaria homo-multimérica o si el gen correspondiente no fue detectado por encontrarse en otra región del genoma. El gen codificante para la subunidad β de RHOs, generalmente se localiza junto al gen codificante para la subunidad alfa y el análisis filogenético de ambas proteínas sugiere una co-evolución de las mismas [Chakraborty et al., 2012]. Sin embargo, en algunas bacterias especializadas en la degradación de HAPs se han detectado genes correspondientes a la subunidad β alejados de genes que codifican para la subunidad α [Zhang et. al., 2012]. El resto de las secuencias que codifican para la subunidad α de enzimas RHO identificadas en la biblioteca metagenómica (dos de clase A y tres de clase B) no lograron ser clasificadas dentro de ninguno de los tipos previamente definidos. Dado que la clasificación puede sufrir modificaciones a medida que aumente la información sobre estas enzimas (particularmente de bacterias no cultivables, [Capyk y Eltis, 2012, Chakraborty et al., 2012]), dichas secuencias podrían formar parte de diferentes tipos de enzimas RHO aún no definidos.

Luego de los análisis realizados en el presente trabajo, se desarrollaron una serie de herramientas de análisis para secuencias de enzimas RHO, las cuales se encuentran en el servidor localizado en el sitio RHObase (<http://bicresources.jcbose.ac.in/ssaha4/Rhobase/>), [Chakraborty et al., 2014]. Estas herramientas de análisis permiten predecir la clase funcional a la que pertenecen las secuencias de interés, así como también sus posibles sustratos. El análisis posterior de las secuencias correspondientes al componente catalítico de las RHOs identificadas en la biblioteca metagenómica utilizando el servidor RHObase, proporcionó iguales resultados a los obtenidos a partir del análisis filogenético de las mismas (resultados no mostrados). Sin embargo, resultó de interés el análisis de los potenciales sustratos de las enzimas identificadas. Entre los posibles sustratos utilizados por las RHO identificadas como clase A se encuentran HAPs de bajo y alto peso molecular, alquilbencenos, bifenilos, hidrocarburos heteropolicíclicos y/o tetralina. Dado que las 10 secuencias clasificadas dentro de esta clase (dos de ellas relacionadas con genes previamente descritos en Bahía Ushuaia) podrían iniciar la degradación de un amplio rango de hidrocarburos aromáticos, representan potenciales biomarcadores de contaminación en sedimentos subantárticos. Las tres benzoato dioxigenasas correspondientes a la clase B podrían emplear sustratos carboxilados tales como benzoato y/o toluato. Compuestos como el benzoato pueden ser generados por la descarboxilación del ftalato, producto formado por el ortoclivaje de anillos aromáticos durante la degradación de HAPs de bajo peso molecular [Mallick et al., 2011]. Las enzimas benzoato dioxigenasas permiten la formación de catecol a partir de benzoato [Das y Chandran, 2011, Mallick et al., 2011], lo cual sugiere la participación de estas enzimas en la activación de la vía baja de degradación de hidrocarburos aromáticos. Entre los sustratos que podrían utilizar las oxigenasas de clase C detectadas en los insertos clonados, se encuentran compuestos aromáticos carboxilados como

el salicilato y antranilato, intermediarios de la vía baja de degradación de HAPs [Habe et al., 2003, Mallick et al., 2011]. Dichas enzimas permitirían la conversión de salicilato a catecol o gentisato (dependiendo si se trata de una RHO C-IV $\alpha\beta$ o de una RHO C-III $\alpha\beta$, respectivamente, [Chakraborty et al., 2012]). Sólo en el fragmento C78 se detectaron ambos tipos de enzimas RHO pertenecientes a la clase funcional C. En consecuencia, los microorganismos conteniendo dicho inserto podrían tener la capacidad de utilizar dos mecanismos diferentes durante la vía baja de degradación de HAPs.

Si bien las rutas catabólicas involucradas en la degradación aeróbica de compuestos aromáticos son diversas, comúnmente producen intermediarios de reacción derivados del catecol [Kasuga et al., 2007]. Las enzimas EXDO permiten el clivaje de estos intermediarios, reacción clave en la degradación de hidrocarburos aromáticos [Suenaga et al., 2014], y al igual que algunas enzimas RHOs, las secuencias de estas enzimas han sido utilizadas como marcadores funcionales para estimar el potencial biodegradativo de comunidades bacterianas [Brennerova et al., 2009, Vilchez-Vargas et al., 2013]. En los fragmentos clonados se identificaron un total de siete secuencias codificantes para enzimas extradiol dioxigenasas pertenecientes a la familia EXDO I, las cuales corresponden a la superfamilia de enzimas quelantes de oxígenos vecinales y sólo poseen una sola subunidad [Pérez-Pantoja et al., 2010b, Suenaga et al., 2014]. Sus secuencias de aminoácidos presentaron porcentajes de identidad altos a moderados (95 a 46 %) respecto de otras EXDO pertenecientes, en su mayoría, a microorganismos degradadores de hidrocarburos [Kertesz y Kawasaki, 2010, Pinyakong et al., 2004, 2012]. Aunque no se mostraron resultados, estas secuencias también compartieron un 41 a 50 % de identidad (84-100 % de cobertura) con secuencias provenientes de metagenomas de hábitats marinos [Rusch et al., 2007].

Las secuencias de enzimas EXDO I identificadas formaron parte de dos subfamilias diferentes [Eltis y Bolin, 1996, Suenaga et al., 2014]. Una de ellas posee preferencia por sustratos monocíclicos como el catecol (subfamilia I.2, CDSs C165-12 y C293-07). La otra subfamilia contiene EXDO capaces de actuar sobre compuestos aromáticos bicíclicos (subfamilia I.3, CDSs M32-09, C78-22, C334-31, C340-33, C342-17). Estas secuencias se agruparon en diferentes clados dentro de cada subfamilia. Coincidentemente con el análisis de asignación taxonómica de los fragmentos C165 y C293, las secuencias C165-12 y C293-07 formaron parte de subclados conteniendo secuencias identificadas en microorganismos pertenecientes a las clases Gamaproteobacteria y Betaproteobacteria, y de microorganismos del orden *Sphingomonadales* (Alfaproteobacteria), respectivamente. El resto de las secuencias mostraron ser divergentes respecto de los diferentes clados identificados en las EXDO I.3, demostrando que los microorganismos presentes en sedimentos intermareales de Bahía Ushuaia poseen diversas EXDO I novedosas. Por otro lado, el hecho de haber detectado EXDO pertenecientes a la subfamilia I.3 durante el análisis funcional de la biblioteca metagenómica utilizando catecol como sustrato, aporta evidencia de que estas enzimas, además de tener preferencia por compuestos bicíclicos, poseen la capacidad de clivar compuestos monoaromáticos. No obstante, es probable que estas enzimas posean menor especifi-

cidad para utilizar sustratos monaromáticos, tal como sucede con otras EXDO de la misma subfamilia [Brennerova et al., 2009, Kasuga et al., 1997, Suenaga et al., 2009, 2014]. En los fragmentos C78 y C334 también se predijeron genes que podrían codificar para enzimas EXDO de clase II y III. Las secuencias C78-08 y C334-17 compartieron un 52 a 68 % de identidad a nivel de aminoácidos con una gentisato 1,2-dioxigenasa (EXDO III) y con la subunidad beta de una protocatecuato 4,5-dioxigenasa (EXDO II), respectivamente. Al igual que varias EXDO II [Kasai et al., 2009, Mampel et al., 2005] la enzima codificada por la secuencia C334-17 podría presentar una estructura multimérica, debido a que la secuencia C334-18 estaría codificando para la subunidad LigA de dioxigenasas LigAB capaces de clivar anillos aromáticos [Pérez-Pantoja et al., 2010b, Sugimoto et al., 1999]. Las enzimas protocatecuato 4,5-dioxigenasa intervienen en la ruptura del anillo aromático del protocatecuato, producto de la hidroxilación y descarboxilación del ftalato durante la degradación de compuestos aromáticos [Kanaly y Harayama, 2010, Mallick et al., 2011]. Sin embargo, la posibilidad de estimar las funciones enzimáticas tanto de las EXDO II como de las EXDO III mediante un análisis por homología de secuencias se ve limitada, debido a que no aún no existe información disponible sobre la estructura y propiedades bioquímicas de las mismas [Fetzner, 2012].

Varias proteobacterias involucradas en la biodegradación de hidrocarburos aromáticos poseen genes codificantes para enzimas EXDO I.3 próximos a genes de enzimas RHO involucradas en el primer paso de la degradación de estos compuestos [Brennerova et al., 2009, Habe et al., 2003, Kasai y Shindo, 2003, Lai et al., 2012, Pinyakong et al., 2003]. Cuatro de los fragmentos clonados presentaron secuencias que podrían codificar para ambas enzimas (M32, C78, C334, C340). Esto explicaría haber identificado en el fragmento M32, aislado a partir de la estrategia molecular de análisis, una secuencia perteneciente a una enzima EXDO, así como también la identificación de secuencias pertenecientes a enzimas RHO en clones detectados mediante ensayos funcionales utilizando catecol como sustrato. Excepto por la secuencia M32-09, el resto de los genes correspondientes a las enzimas EXDO I.3 se encontraron inmediatamente corriente abajo respecto de las secuencias codificantes para enzimas RHO. Tanto las enzimas RHO como las EXDO I.3 pueden intervenir en la vía alta de degradación de HAPs junto con enzimas deshidrogenasas, hidratasa-aldolasas y aldehído deshidrogenasas para dar lugar a la formación de ácido salicílico o derivados de este compuesto [Kanaly y Harayama, 2010, Mallick et al., 2011]. Sólo en el inserto C78 se encontraron secuencias que podrían codificar para la totalidad de estas enzimas. Por lo tanto, los microorganismos que contengan dicho fragmento de ADN en su genoma posiblemente tengan la capacidad de degradar hidrocarburos aromáticos policíclicos hasta compuestos derivados del ácido salicílico. Asimismo, la transcripción de los genes involucrados en esta vía degradativa podría estar altamente regulada, dado que en el inserto C78 se identificó una secuencia codificante para un regulador transcripcional de la familia LysR (C78-15). Generalmente los reguladores pertenecientes a esta familia, tal como ocurre en el fragmento C78, se ubican en la región

inmediatamente corriente arriba del operón blanco [Kouzuma et al., 2006, Schell, 1993]. A su vez, esta secuencia presentó un entorno genómico muy similar a un fragmento de ADN de 16 kb presente en *Sphingomonas* sp. A4. En este microorganismo, el regulador de la familia LysR podría activar la transcripción de los genes correspondientes a la vía alta de degradación de hidrocarburos en presencia de acenafteno [Kouzuma et al., 2006]. Kouzuma y colaboradores sugirieron que, en presencia de este compuesto, el regulador LysR se uniría a una región cercana al promotor ubicado en la región corriente arriba respecto del gen codificante para una ferredoxina (AhrA3), activando así la transcripción de los genes presentes en este operón. Posiblemente los genes del fragmento C78 comprendidos entre las secuencias C78-15 y C78-24 estén regulados por un mecanismo similar.

Los genes codificantes para enzimas EXDO I.2 identificados en los fragmentos C165 y C293 formaron parte de operones cuyos genes podrían estar involucrados en la vía baja de degradación de HAPs iniciada a partir del metaclivaje de catecol. En ambos fragmentos se detectaron la totalidad de los genes necesarios para la degradación de catecol hasta intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Dichos genes mostraron altos porcentajes de identidad a nivel de aminoácidos y una organización similar respecto de genes homólogos identificados en microorganismos pertenecientes a las clases Betaproteobacteria y Alfacaproteobacteria, respectivamente [D'Argenio et al., 2011, Perez-Pantoja et al., 2008, Pinel et al., 2008, Pinyakong et al., 2003]. Estos resultados confirmarían la asignación taxonómica de estos fragmentos. Particularmente, en los fragmentos C165 y C293 se identificaron genes de función desconocida inmediatamente corriente abajo de la secuencia codificante para la enzima catecol-2,3-dioxigenasa. Secuencias codificantes de función desconocida, organizadas de la misma manera, también fueron encontrados en diferentes microorganismos [Arai et al., 2000, Kunze et al., 2009, Perez-Pantoja et al., 2008, Pinel et al., 2008, Zhu et al., 2008]. Aunque el rol que podrían tener estas proteínas aún no ha sido determinado, posiblemente estén involucradas en las etapas siguientes de la degradación de hidroximucónico semialdehído (HMS, producto del metaclivaje del catecol), ya que la mutación de este gen en la cepa *Comamonas testosteroni* TA441 provoca poco crecimiento en fenol y acumulación de HMS [Arai et al., 2000]. En los fragmentos C165 y C293 se detectaron además secuencias que podrían estar involucradas en la regulación transcripcional de los genes degradativos. Si bien en el fragmento C165 se identificó una secuencia con alto porcentaje de identidad a nivel de aminoácidos respecto de un regulador transcripcional LysR de *Acidovorax* sp. JS42, la misma también presentó homología con la proteína AphT de *Comamonas testosteroni* TA441, la cual regula y activa la degradación de HMS cuando es inducido por dicho compuesto [Arai et al., 2000]. Por lo tanto, es posible que la transcripción de la vía baja de degradación se encuentre regulada por un mecanismo similar, aunque es necesario realizar otros ensayos para comprobar esta hipótesis. Respecto de las secuencias reguladoras identificadas en el fragmento C293, se localizaron entre secuencias relacionadas con la transferencia horizontal de genes, sugiriendo que podrían regular unidades transcripcionales

diferentes a las involucradas en la vía baja de degradación de hidrocarburos aromáticos. Asimismo, dado que la secuencia codificante para el regulador de la familia LysR (C293-29) se encuentra dentro de un operón cuyos genes podrían estar vinculados a la degradación de alcanos, posiblemente regule positivamente la transcripción de los genes *alk* presentes en este inserto, tal como ocurre con reguladores de la misma familia que se encuentran próximos a los genes involucrados en la degradación de alcanos [Rojo, 2009].

En cuanto a la secuencia codificante para la enzima gentisato 1,2-dioxigenasa perteneciente al fragmento C78 (posible EXDO de clase III), se localizó dentro de un operón junto con una secuencia codificante para la enzima salicilato 5-hidroxilasa (C78-10, clasificada como RHO C-III $\alpha\beta$) y con el resto de las secuencias que podrían estar involucradas en el metabolismo del ácido salicílico hasta intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos vía gentisato. Dado que en este fragmento se identificaron la totalidad de los genes que podrían estar involucrados tanto en la vía alta como en la vía baja de degradación hidrocarburos aromáticos por gentisato, los microorganismos que contengan este fragmento de ADN en su genoma posiblemente presenten la capacidad de degradar completamente estos compuestos. Por otro lado, a pesar de que en los fragmentos M117, M32, C334, C340 y C342 no se encontraron vías degradativas completas, se identificaron algunos de los genes que podrían intervenir en las mismas. Esto sugiere que dichos genes constituyen sólo una fracción de las vías catabólicas que podría actuar en conjunto con otros genes del mismo genoma pero localizados en un locus distante. La degradación de compuestos aromáticos presentes en el ambiente, a partir de vías degradativas fragmentadas, ha sido observada previamente en cepas aisladas [Kunze et al., 2009, Pinyakong et al., 2003], así como también en otros fragmentos metagenómicos [Sierra-García et al., 2014, Suenaga et al., 2009].

Ciertos genes identificados en los fragmentos clonados que podrían estar involucrados en la biodegradación de hidrocarburos se encontraron flanqueados por secuencias relacionadas con enzimas transposasas e integrasas. Esto sugiere que dichos genes podrían haber sido adquiridos a partir de eventos de transferencia horizontal de ADN, lo cual también fue evidenciado durante la asignación taxonómica de los fragmentos. Específicamente, la región comprendida entre las secuencias involucradas en la transferencia génica en el fragmento C78 podría pertenecer a una proteobacteria de clase alfa. El resto de las secuencias de este inserto parecerían tener un origen diferente, dado que sólo lograron ser clasificadas hasta el nivel taxonómico de *phylum*. Más aún, este fragmento podría pertenecer a una proteobacteria muy divergente de los microorganismos secuenciados hasta el momento, ya que dicha región no presentó homología con fragmentos de genomas conocidos. Ocho secuencias relacionadas con la transferencia de ADN fueron encontradas en la región corriente abajo respecto de una secuencia codificante para la enzima salicilato hidroxilasa presente en el fragmento C78. Una de ellas (78A-24) corresponde a una transposasa trunca, posiblemente inactiva. La repetición de secuencias codifican-

tes para transposasas, o parte de ellas, también ha sido observada en diferentes cepas de *Pseudomonas* y *Sphingomonas* [Habe et al., 2003, Kouzuma et al., 2006], evidenciando rearrreglos de las secuencias adquiridas mediante recombinación homóloga de genes codificantes para transposasas, deleciones de los mismos, o ambos fenómenos a la vez, para dar lugar a la estructura de los operones actuales [Habe et al., 2003]. En el fragmento C293, los genes involucrados en la transferencia horizontal se encontraron en los extremos de los genes *alk*. Estos resultados sugieren que el microorganismo del cual proviene este fragmento probablemente tenga la capacidad de degradar tanto hidrocarburos aromáticos como alifáticos por causa de la transferencia horizontal de genes *alk*. A diferencia del resto de las secuencias del inserto (clasificadas mayormente como Alfabroteobacteria), en esta región se observó mayor proporción de secuencias que sólo pudieron ser clasificadas hasta el *phylum* Proteobacteria. En cuanto al fragmento C342, en uno de sus extremos se encontraron secuencias codificantes para enzimas relaxasas y resolvasas (otras enzimas que pueden estar involucradas en la transferencia horizontal de genes). Sin embargo, entre estas secuencias no se encontraron genes involucrados en la degradación de hidrocarburos, sino secuencias o fragmentos de secuencias codificantes sin función conocida, las cuales fueron anotadas como proteínas hipotéticas.

Si bien fue posible detectar posibles eventos de transferencia horizontal de genes en los fragmentos clonados, no se detectaron diferencias en la composición de nucleótidos indicativas de tal fenómeno (resultados no mostrados). El programa SeqWord Genomic Island Sniffer (www.bi.up.ac.za/SeqWord), utilizado para el análisis de la composición de nucleótidos, permite identificar regiones de ADN transferidas de un organismo a otro en base a parámetros estadísticos relacionados con el uso de oligonucleótidos [Ganesan et al., 2008, Reva y Tümmler, 2005]. Sin embargo, los métodos composicionales fallan cuando la composición nucleotídica de los genes transferidos es similar a la del huésped. Este hecho sucede frecuentemente cuando se produce un "perfeccionamiento" de los nucleótidos de la secuencia insertada durante los procesos de replicación y reparación del huésped [Tamames y Moya, 2008], o cuando se transfiere ADN entre organismos muy relacionados. Además, a pesar de que el programa SeqWord Genomic Island Sniffer permite ajustar los parámetros necesarios a fin de analizar diferentes tamaños de secuencias, esta clase de programas están diseñados para encontrar islas genómicas en genomas completos o casi completos. Por lo tanto, muchas veces no resultan adecuados para el análisis de fragmentos de menor longitud (Oleg Reva, comunicación personal).

Los resultados obtenidos en este capítulo no sólo demuestran el alto potencial que poseen los microorganismos presentes en sedimentos intermareales de Bahía Ushuaia para biodegradar diferentes sustratos aromáticos, sino también la posibilidad de llevar a cabo estos procesos mediante diversas vías catabólicas guiadas por las enzimas RHO y EXDO detectadas en este trabajo. Asimismo, la presencia de genes degradativos adquiridos a partir de eventos de transferencia horizontal podría indicar que dichos microorganismos han desarrollado mecanismos de adaptación a este ambiente a través de

procesos evolutivos moldeados por intercambios y rearrreglos de ADN. El sitio de estudio, además de verse afectado por la contaminación con hidrocarburos, presenta altos niveles de radiación UV-B. Las secuencias codificantes para una nucleosil tetrafosfatasa (M117-15) y un sensor proteico con dominio PAS (C334-01) identificadas en los fragmentos analizados sugieren que estas proteobacterias con capacidad para degradar HAPs también podrían contar con otros mecanismos adaptativos, dado que son dos proteínas involucradas en la transducción de señales en respuesta a la exposición de rayos UV y al estrés oxidativo [Monds et al., 2010, Sabirova et al., 2008, Taylor y Zhulin, 1999]. A su vez, las proteínas con dominio PAS pueden tener la capacidad de unir HAPs para desencadenar la transcripción de enzimas involucradas en el metabolismo de estos compuestos [Hankinson, 1995].

Capítulo 6

DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

Los aspectos genéticos y bioquímicos relacionados con la degradación aeróbica de HAPs han sido estudiados principalmente a partir del aislamiento y caracterización de microorganismos que presentan la capacidad de crecer a expensas de estos compuestos [Haritash y Kaushik, 2009]. No obstante, el conocimiento sobre la diversidad y capacidad degradativa de los microorganismos presentes en el ambiente marino, especialmente de aquellos que se encuentran en las costas de América del Sur, es limitado dada la dificultad de reproducir en el laboratorio las condiciones para su crecimiento [Lanfranconi y Alvarez, 2014]. En el presente trabajo se emplearon diferentes estrategias independientes del cultivo de microorganismos con el fin de estudiar las poblaciones microbianas capaces de degradar HAPs que habitan los sedimentos intermareales de Bahía Ushuaia, complementando de esta manera la información existente hasta el momento. A partir del análisis de fragmentos de amplificación provenientes de genes codificantes para la subunidad alfa de enzimas dioxigenasas, se detectaron variantes génicas descritas previamente en este sitio, así como también dos variantes génicas novedosas. Asimismo, el diseño y optimización de un ensayo de qPCR que tiene como blanco una de estas variantes génicas novedosas permitió evaluar la abundancia relativa del mismo en sedimentos intermareales de Bahía Ushuaia. Ambas metodologías permitieron incrementar nuestro conocimiento sobre la presencia y abundancia de microorganismos con capacidad para degradar HAPs en dichos sedimentos. Sin embargo, el análisis de los genes codificantes para enzimas dioxigenasas, y de otros genes que también podrían participar en los procesos biodegradativos, pudo ser realizado únicamente a partir de la construcción de una biblioteca metagenómica en fósmidos. Mediante esta herramienta se lograron identificar 20 genes codificantes para la subunidad α y 18 genes codificantes para la subunidad β de enzimas RHO. Además, se detectaron genes que podrían codificar para proteínas del sistema transportador de electrones de algunas de estas RHO. No obstante, cada una de las metodologías utilizadas en la presente Tesis Doctoral brindaron información complementaria, dado que otras variantes génicas identificadas en sedimentos intermareales de Bahía Ushuaia mediante el análisis de productos de amplificación (este trabajo, [Lozada et al., 2008]), como por ejemplo las variantes E y U, no fueron

detectadas en la biblioteca metagenómica. Posiblemente, dichos genes se encuentren en baja abundancia. Esto, sumado a que probablemente la biblioteca metagenómica represente una fracción de los microorganismos que podrían encontrarse en OR07, explicaría el hecho de no haber identificado las variantes E y U en la biblioteca metagenómica.

De los genes codificantes para la subunidad α de enzimas RHO identificados en este trabajo, aquel correspondiente a la variante génica T fue el único que logró ser detectado y caracterizado mediante las tres metodologías utilizadas. Si bien cada una de ellas brindó información parcial sobre los microorganismos que contienen esta variante génica, en conjunto permitieron estimar su dinámica poblacional, conocer un fragmento del genoma de dicho microorganismo y realizar estudios más detallados sobre su potencial capacidad degradativa, así como también de su taxonomía. La enzima codificada por la variante génica T pertenece a la clase funcional A de enzimas RHO, cuyos potenciales sustratos incluyen varios hidrocarburos aromáticos, como por ejemplo HAPs y alquilbencenos. Estudios posteriores a esta Tesis, sobre la predicción de su estructura proteica a partir de modelos tridimensionales, sugieren que el sitio activo de esta enzima presenta la forma y tamaño suficiente como para contener HAPs de bajo peso molecular como por ejemplo fenantreno (M. Musumeci, comunicación personal). En el fragmento metagenómico que contiene a la variante génica T (M117), posiblemente proveniente de una gamaproteobacteria, también se identificaron otros cinco genes codificantes para la subunidad α de enzimas RHO, dos de ellas clasificadas como de clase A. A diferencia de la enzima RHO correspondiente a la variante T, el modelado de la estructura de estas dos enzimas mostró que el sitio activo tendría una dimensión adecuada para catalizar la oxidación de pireno, además de fenantreno. Por otro lado, la abundancia de la variante génica T en sedimentos intermareales cercanos a Planta Orión se mantuvo prácticamente constante a lo largo de un período de cuatro años, sugiriendo que las poblaciones bacterianas que contienen esta variante podrían ser miembros estables de la comunidad microbiana. La variante génica T también fue detectada en sedimentos crónicamente contaminados de Caleta Córdova (M. Lozada, comunicación personal), lo cual indicaría que estas poblaciones se encuentran distribuidas a lo largo de la costa Patagónica. Más aún, la abundancia de este gen se vio incrementada cuando a sedimentos de Planta Orión y Caleta Córdova se adicionó petróleo crudo, fenantreno o pireno en sistemas experimentales (M. Lozada, comunicación personal), por lo que las poblaciones conteniendo la variante génica T podrían tener un rol relevante en la degradación de HAPs tanto en ambientes templados como subantárticos de la costa Patagónica.

Otro fragmento de la biblioteca metagenómica que reveló un alto potencial degradativo en miembros de la comunidad microbiana del sitio Planta Orión fue el fragmento C334. Sorprendentemente, este fragmento identificado por su capacidad de degradar catecol mediante actividad de la enzima EXDO, presentó siete pares de genes correspondientes a las subunidades α y β de enzimas RHOs. Estas enzimas fueron clasificadas como pertenecientes a tres distintas clases funcionales, lo cual mues-

tra la diversidad de sustratos aromáticos que podrían hidroxilar estas enzimas. Cuatro de las RHOs codificadas en el fragmento C334 correspondieron a enzimas RHOs de clase A. Dos de ellas, C334-10 y C334-20, presentaron altos porcentajes de identidad respecto a dos variantes identificadas previamente en sedimentos intermareales de Bahía Ushuaia, denominadas J y B [Lozada et al., 2008, Marcos et al., 2009]. Este resultado fue inesperado, dado que dichas variantes se encuentran relacionadas con oxigenasas de bacterias Gram positivas y Gram negativas, respectivamente. Por lo tanto, la estrategia metagenómica no sólo permitió conocer la secuencia completa de las variantes génicas J y B, sino también que las mismas podrían formar parte de un mismo genoma. Estudios previos estimaron la abundancia de la variante génica B en sedimentos de la costa Patagónica [Marcos et al., 2012]. Las poblaciones bacterianas que contienen dicha variante parecen ser miembros estables de la comunidad presente en sedimentos subantárticos, sin embargo en sedimentos de ambientes templados la variante génica B presentó menor abundancia [Marcos et al., 2012]. Para evaluar si la estimación de la abundancia de la variante B se incluyó al gen C334-20, se analizó su nivel de conservación respecto de las secuencias de los cebadores utilizados en el ensayo de qPCR (resultados no mostrados). Sólo 7 de las 44 bases de los cebadores fueron diferentes a la secuencia C334-20. Esto sugiere que si bien los ensayos de qPCR que tienen como gen blanco a la variante B podrían detectar al gen C334-20, probablemente este ensayo subestime su abundancia, debido a que dos de las bases que no coincidieron con el cebador reverso se encontraron dentro de los últimos 5 nucleótidos del extremo 3' de este cebador. Por lo tanto, los microorganismos que contienen el fragmento C334, los cuales pertenecerían al *phylum* Proteobacteria, también podrían ser miembros relevantes de la comunidad degradadora HAPs, autóctona de estos sedimentos. Asimismo, la información obtenida hasta el momento sugiere que los microorganismos que contienen el fragmento C334 en su genoma estarían restringidos a ambientes costeros fríos, al contrario de lo que sucedería con las bacterias que poseen el fragmento M117.

Varios estudios han sugerido diferentes ventajas que otorgarían a los microorganismos la presencia de varios genes degradativos con funciones similares. Por ejemplo, las enzimas codificadas por estos genes pueden diferir en la especificidad de sustrato, brindando a la bacteria correspondiente la capacidad de degradar un mayor rango de compuestos [Pérez-Pantoja et al., 2010a]. A su vez, podrían ser expresados en diferentes condiciones ambientales, conservando así las funciones catabólicas ante cambios de temperatura, fuentes de carbono, salinidad o presión de oxígeno [Kim et al., 2009, Pérez-Pantoja et al., 2003, Sanchez-Perez et al., 2008, Seto et al., 1995]. Los microorganismos conteniendo los fragmentos M117 y C334 también podrían presentar algunas de estas características. No obstante, sólo se cuenta con un fragmento de los genomas de estos microorganismos, y por lo tanto se desconoce el número total de genes de oxigenasas que éstos presentan. Si bien es posible encontrar a estos genes agrupados dentro del genoma de bacterias con alto potencial degradativo, los mismos pueden también ubicarse en distintos sitios dentro del cromosoma o incluso codificados en plásmidos [Lai et al., 2012,

Stolz, 2014]. Además, resulta necesario realizar ensayos de expresión de estas enzimas para evaluar su rango de sustratos y su respuesta ante diferentes factores ambientales. En el fragmento C334, además de identificar secuencias codificantes para la subunidad α y β de RHO, se detectaron secuencias codificantes para una ferredoxina y una reductasa, por lo cual la expresión de estas enzimas podría realizarse utilizando un sistema transportador de electrones propio del microorganismo del cual proviene este fragmento. Por otra parte, la identificación de varios genes codificantes para la subunidad α del componente catalítico de RHOs de clase A (los cuales constituyen potenciales genes biomarcadores) que se encuentran en un mismo fragmento de ADN, y que poseen función similar, es de importancia para el diseño de ensayos que permitan estimar la abundancia de las poblaciones bacterianas degradadoras de HAPs. El análisis de diferentes genes biomarcadores que pertenecen a un único microorganismo podría sobreestimar las poblaciones bacterianas con capacidad de degradar estos compuestos.

Además de genes codificantes para enzimas RHO de clase A, el análisis de la biblioteca metagenómica permitió identificar diversas secuencias correspondientes a enzimas RHO de clase B y C en la mayoría de los fragmentos clonados. La rápida evolución que has sufrido las enzimas RHO ha permitido definir cuatro clases de estas enzimas en base a análisis filogenéticos que reflejan diferencias en el sitio de oxidación y en la estructura de sus sustratos [Chakraborty et al., 2012]. A diferencia de las RHO de clase A, los potenciales sustratos de las enzimas RHO de clase B y C detectadas en el presente trabajo incluyeron compuestos como benzoatos (y/o toluatos) y salicilatos (o derivados), respectivamente. Dado que dichos compuestos pueden ser intermediarios de las rutas degradativas de HAPs, la acción de las enzimas RHO de clase B y C-IV $\alpha\beta$ identificadas en los microorganismos que habitan los sedimentos intermareales de Bahía Ushuaia podrían dar lugar a intermediarios derivados del catecol (sustratos de enzimas EXDO o INDO), por lo que posiblemente sean de importancia durante la degradación de HAPs en este sitio. El fragmento C78 fue el único que presentó dos secuencias codificantes para enzimas RHO de clase C de diferentes tipos (C-III $\alpha\beta$ y C-IV $\alpha\beta$). Las RHO C-III $\alpha\beta$ también poseen como sustrato al salicilato, pero generan gentisato como producto de reacción, el cual puede ser degradado por otra vía diferente a la utilizada en la degradación de compuestos derivados de catecol [Mallick et al., 2011]. Si bien la función de estas dos enzimas RHO de clase C aún no fue comprobada, representan un claro ejemplo del potencial que tendrían estas enzimas para guiar diferentes rutas degradativas en los microorganismos que contienen el fragmento C78 en su genoma. La detección de secuencias codificantes para enzimas RHO pertenecientes a una misma clase, tanto en un fragmento en particular como en diferentes fragmentos, evidenció una alta redundancia funcional en los individuos que componen la comunidad microbiana, así como también en la comunidad en su conjunto. Dado que además se observó redundancia en las tres clases de RHO identificadas (A, B y C), los microorganismos de los sedimentos intermareales de Planta Orión podrían estar altamente especializados en la degradación de HAPs. No obstante, es necesario realizar otros estudios a fin de

validar esta hipótesis.

Los genes codificantes para enzimas capaces de clivar el anillo aromático durante la degradación de HAPs también son utilizados frecuentemente como biomarcadores funcionales para detectar poblaciones capaces de degradar estos compuestos [Hendrickx et al., 2006, Sipilä et al., 2008]. En la biblioteca metagenómica se identificaron siete secuencias codificantes para enzimas EXDO en siete fragmentos de ADN metagenómico diferentes, las cuales podrían ser evaluadas en un futuro como posibles biomarcadores funcionales de las poblaciones presentes en sedimentos intermareales de Bahía Ushuaia. Dichas secuencias mostraron baja similitud entre sí y se clasificaron en EXDO I.3 (capaces de participar en la vía alta de degradación de HAPs) y EXDO I.2 (involucradas en la vía baja de degradación de estos compuestos). En general, las secuencias pertenecientes a EXDO I.3 fueron detectadas en fragmentos metagenómicos que también presentaron secuencias codificantes para RHOs de clase A, en concordancia con otros estudios en los que se analizaron fragmentos del genoma de microorganismos capaces de crecer a expensas de HAPs [Kasai y Shindo, 2003, Kouzuma et al., 2006]. Más aún, en el fragmento C78 no sólo se identificaron ambas secuencias, sino también el resto de las secuencias codificantes para la totalidad de las enzimas involucradas en la vía alta de degradación de HAPs (Figura 6.1). En este fragmento, se observó además, dentro de un mismo operón, una secuencia que podría codificar para una enzima gentisato 1,2-dioxigenasa (C78-08, posible EXDO III) junto con secuencias codificantes que estarían involucradas en la degradación de gentisato hasta compuestos intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbóxicos. Por lo tanto, la expresión de estos genes en el microorganismo que contiene el fragmento C78, podría brindarle la capacidad de degradar HAPs completamente a través de la vía degradativa que involucra al gentisato como intermediario de reacción (Figura 6.1). Por otro lado, las dos EXDO I.2 fueron identificadas en fragmentos del metagenoma que podrían provenir de microorganismos pertenecientes a las clases *Alfaproteobacteria* y *Betaproteobacteria*. Cada una de ellas formó parte de un operón conteniendo la totalidad de los genes codificantes para una vía baja de degradación diferente a la observada en el fragmento C78. En lugar de gentisato, la vía degradativa en la que estarían involucradas las EXDO I.2, utiliza catecol como intermediario de reacción para dar lugar a compuestos que pueden ingresar al ciclo de los ácidos tricarbóxicos. La presencia de rutas degradativas alternativas para el catabolismo de compuestos aromáticos ha sido documentada en varios organismos aislados [Pérez-Pantoja et al., 2010a]. Sin embargo, hasta nuestro conocimiento, este es el primer trabajo que permitió identificar (a nivel metagenómico) las vías degradativas que podrían utilizar las poblaciones bacterianas autóctonas de sedimentos intermareales de ambientes fríos crónicamente contaminados con hidrocarburos.

En fragmentos del genoma de los microorganismos estudiados en la presente Tesis Doctoral, se observaron genes degradativos flanqueados por secuencias (o fragmentos de secuencias) codificantes para enzimas transposasas o integrasas, lo cual sugiere una adaptación de las poblaciones degradadoras

mediada, al menos en parte, por eventos de transferencia horizontal. Los hidrocarburos pueden ejercer cierta presión de selección en los microorganismos ambientales [Chakraborty et al., 2012, Mallick et al., 2011], si bien la evolución del material genético requiere de un largo período de tiempo para que los microorganismos adquieran la capacidad de degradar estos compuestos. El intercambio de material genético entre los miembros de una comunidad microbiana permite la adaptación de los microorganismos a los ambientes contaminados en un corto período de tiempo en términos evolutivos [Chakraborty et al., 2012], brindando nuevas capacidades metabólicas a los microorganismos que adquieren estos genes e incrementando así el potencial degradativo de la comunidad.

Este trabajo de Tesis Doctoral ha permitido incrementar el conocimiento sobre la identidad y los diferentes mecanismos degradativos que podrían utilizar las poblaciones bacterianas de ambientes costeros subantárticos con capacidad para degradar HAPs. Se identificaron numerosos genes que podrían codificar enzimas involucradas en el catabolismo de estos compuestos. No obstante, dado que sólo se analizaron menos de 300 kb del metagenoma de la comunidad microbiana de la muestra OR07, aún queda mucho por conocer acerca de otros genes y rutas catabólicas empleadas por las poblaciones degradadoras de este sitio. Actualmente, se está llevando a cabo la secuenciación de la totalidad de los clones de la biblioteca metagenómica construida en el presente trabajo. Desde el punto de vista metodológico, esta estrategia es superior a la secuenciación al azar del metagenoma. Si bien la cobertura de análisis es menor, permite un mejor ensamblado de las secuencias obtenidas, y por lo tanto contar con secuencias completas de genes y operones. Desde el punto de vista ecológico, la información obtenida permitirá el estudio de las rutas degradativas en general, incluyendo aquellas involucradas tanto en el catabolismo de hidrocarburos aromáticos como alifáticos. Más aún, no sólo será de importancia en la detección de potenciales genes biomarcadores, sino también de genes codificantes para enzimas de relevancia biotecnológica (como por ejemplo alcano monooxigenasas, alginato liasas, fucoidasas, etc.). Por otro lado, se están comenzando a expresar de forma heteróloga parte de las enzimas RHO identificadas en la presente Tesis. Esto permitirá estudiar en detalle las propiedades bioquímicas de dichas enzimas, así como también los sustratos que podrían oxidar.

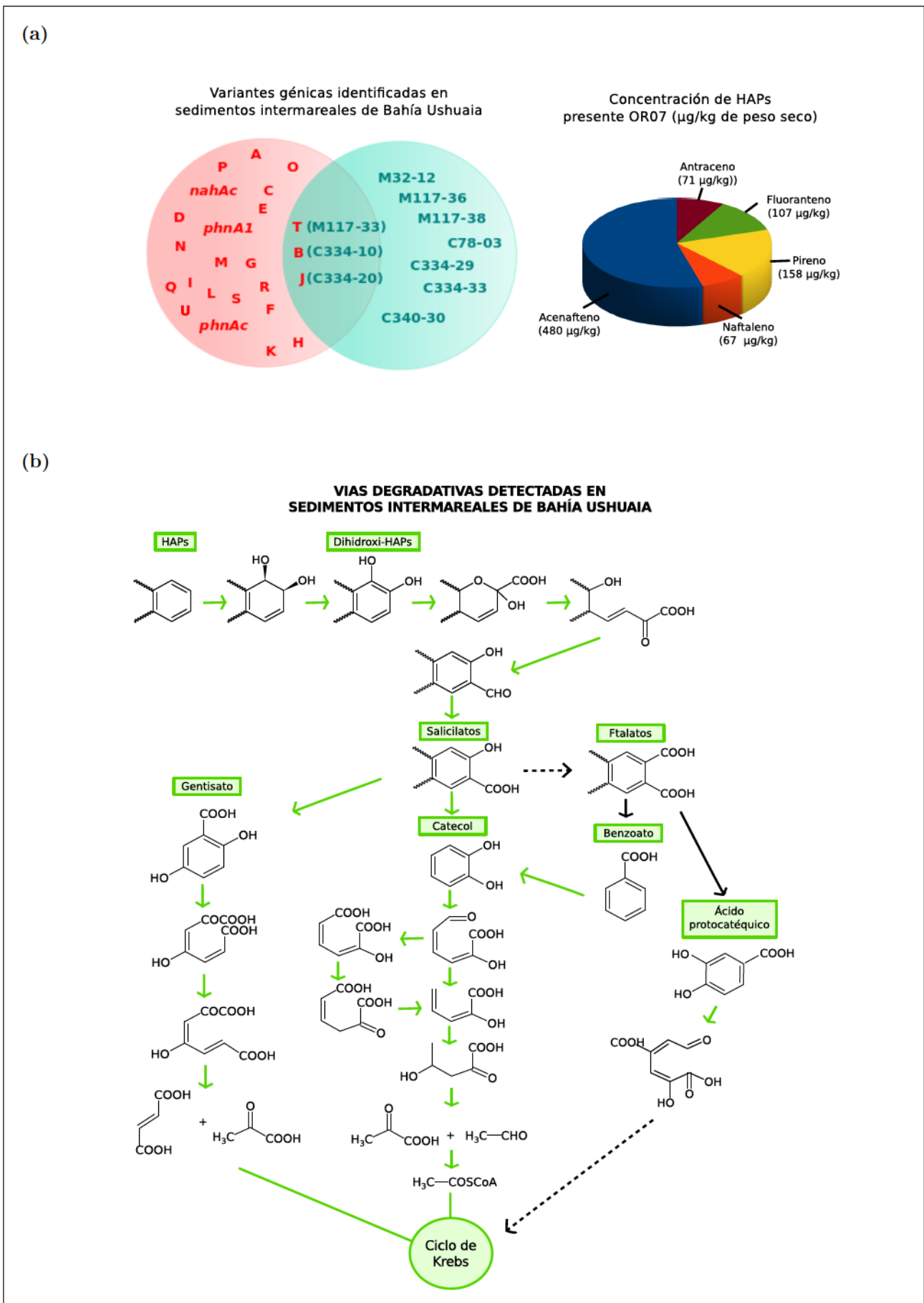


Figura 6.1: Potencial degradativo de la comunidad microbiana presente en sedimentos intermareales de Bahía Ushuaia. a) Genes (o fragmentos de genes) codificantes para la subunidad α de enzimas oxigenasas con sitio Rieske identificadas en sedimentos cercanos a Planta Orión y concentración de hidrocarburos en la muestra OR07 [Marcos et al., 2012]. En rojo, variantes génicas detectadas mediante reacciones de amplificación; verde, genes de RHOs de clase A identificados en la biblioteca metagenómica. La intersección indica las variantes génicas detectadas con ambos métodos (los genes de la biblioteca que presentaron alto porcentaje de identidad con las variantes génicas correspondientes, se muestran entre paréntesis). b) Relación entre las diferentes vías degradativas de HAPs. Flechas en verde, reacciones en las que podrían estar involucrados los genes identificados en la biblioteca metagenómica. Las flechas negras indican reacciones en las que no se identificó el gen o los genes (flechas negras punteadas) correspondientes.

6.1. Conclusiones

- I. Las diferentes metodologías independientes del cultivo de microorganismos utilizadas en este trabajo fueron complementarias. A partir de las mismas fue posible realizar análisis desde un punto de vista tanto ecológico como molecular sobre la capacidad para degradar HAPs que poseen los microorganismos autóctonos de los sedimentos intermareales de Bahía Ushuaia.
- II. Los fragmentos de ADN identificados en la biblioteca metagenómica pertenecerían a diferentes microorganismos del *phylum* Proteobacteria. Dos de estos fragmentos presentaron genes biomarcadores que también fueron identificados mediante reacciones de amplificación. El análisis cuantitativo de dichos genes biomarcadores a lo largo de una serie temporal, sugiere que los microorganismos que los contienen pertenecen a miembros estables de la comunidad bacteriana.
- III. En los dos fragmentos metagenómicos que presentaron los genes correspondientes a las variantes T y B, respectivamente, también se observó un alto número de secuencias codificantes para las subunidades α y β de enzimas RHO. Por lo tanto, miembros estables de la comunidad microbiana podrían estar altamente especializados en la degradación de compuestos aromáticos.
- IV. El análisis de la diversidad de genes claves de las rutas degradativas evidenció una alta redundancia funcional en la comunidad degradadora de HAPs. Alternativamente, dicha diversidad podría estar reflejando que los diferentes miembros de la comunidad microbiana poseen la capacidad de degradar diversos HAPs.
- V. La presencia de genes codificantes para enzimas de la vía alta de degradación de HAPs y para enzimas de las vías de degradación por gentisato y catecol como intermediarios de reacción, no sólo sugiere que las poblaciones degradadoras de los sedimentos intermareales de Bahía Ushuaia presentan una alta capacidad para degradar HAPs, sino que también utilizan diferentes mecanismos para el metabolismo de estos compuestos.
- VI. Entre los genes degradativos identificados en el presente trabajo, aquellos codificantes para enzimas RHO de clase A y enzimas EXDO representan potenciales marcadores funcionales para el estudio de la abundancia y dinámica de poblaciones bacterianas con capacidad de degradar HAPs.

Bibliografía

- (2012). Multiplicity of genes for aromatic ring-hydroxylating dioxygenases in *Mycobacterium* isolate KMS and their regulation, author=Zhang, Chun and Anderson, Anne J. *Biodegradation*, 23(4):585–596.
- Abed, R. M. (2009). Nucleic acid-based techniques for studying diversity and activity of bacterial communities in oil-contaminated sediments. In *Contaminated Sediments*, pages 97–160. Springer.
- Adams, E. E., Peterson, C. H., Anderson, S. S., Cherr, G. N., Ambrose, R. F., Anghera, S., et al. (2012). A tale of two spills: Novel science and policy implications of an emerging new oil spill model.
- Alfreider, A. y Vogt, C. (2007). Bacterial diversity and aerobic biodegradation potential in a BTEX-contaminated aquifer. *Water, Air, and Soil Pollution*, 183(1-4):415–426.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., y Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3):403–410.
- Angelova, M., Kalajdziski, S., y Kocarev, L. (2010). Computational methods for gene finding in prokaryotes. *ICT Innovations*, pages 11–20.
- Arai, H., Ohishi, T., Chang, M. Y., y Kudo, T. (2000). Arrangement and regulation of the genes for meta-pathway enzymes required for degradation of phenol in *Comamonas testosteroni* TA441. *Microbiology*, 146(7):1707–1715.
- Arfsten, D. P., Schaeffer, D. J., y Mulveny, D. C. (1996). The effects of near ultraviolet radiation on the toxic effects of polycyclic aromatic hydrocarbons in animals and plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 33(1):1–24.
- Aylward, F. O., McDonald, B. R., Adams, S. M., Valenzuela, A., Schmidt, R. A., Goodwin, L. A., Woyke, T., Currie, C. R., Suen, G., y Poulsen, M. (2013). Comparison of 26 sphingomonad genomes reveals diverse environmental adaptations and biodegradative capabilities. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(12):3724–3733.

- Aziz, R. K., Bartels, D., Best, A. A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R. A., Formsmá, K., Gerdes, S., Glass, E. M., Kubal, M., et al. (2008). The rast server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics*, 9(1):75.
- Batie, C., Ballou, D., y Correll, C. (1991). Phthalate dioxygenase reductase and related flavin-iron-sulfur containing electron transferases. *Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes*, 3:543–556.
- Beller, H. et al. (2002). A real-time polymerase chain reaction method for monitoring anaerobic, hydrocarbon-degrading bacteria based on a catabolic gene. *Environmental Science & Technology*, 925:3977–3984.
- Berthe-Corti, L. et al. (2010). Bacterial communities in hydrocarbon-contaminated marine coastal environments. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, pages 2349–2359.
- Boersma, P. (1997). Magellanic penguins decline in south atlantic. *Penguin Conservation*, 10(1):2–6.
- Bohorquez, L. C., Delgado-Serrano, L., López, G., Osorio-Forero, C., Klepac-Ceraj, V., Kolter, R., Junca, H., et al. (2012). In-depth characterization via complementing culture-independent approaches of the microbial community in an acidic hot spring of the Colombian Andes. *Microbial Ecology*, 63(1):103–115.
- Brennerova, M. V., Josefiova, J., Brenner, V., Pieper, D. H., y Junca, H. (2009). Metagenomics reveals diversity and abundance of meta-cleavage pathways in microbial communities from soil highly contaminated with jet fuel under air-sparging bioremediation. *Environmental Microbiology*, 11(9):2216–27.
- Brown, C. T. y Tiedje, J. M. (2011). Metagenomics: the paths forward. *Handbook of Molecular Microbial Ecology II: Metagenomics in Different Habitats*, pages 579–588.
- Bustin, S. (2004). Primers and probes. *A-Z of quantitative PCR*, pages 279–328.
- Bustin, S. a., Benes, V., Garson, J. a., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., et al. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical*, 55(4):611–22.
- Cappello, S. et al. (2010). *Oleiphilus*. In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, pages 1749–1754. Springer.
- Capyk, J. K. y Eltis, L. D. (2012). Phylogenetic analysis reveals the surprising diversity of an oxygenase class. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 17(3):425–36.
- Carls, M., Rice, S., y Hose, J. (1999). Sensitivity of fish embryos to weathered crude oil: Part I. Lowlevel exposure during incubation causes malformations, genetic damage, and mortality in larval pacific. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18(3):481–493.

- Carredano, E., Karlsson, A., Kauppi, B., Choudhury, D., Parales, R. E., Parales, J. V., Lee, K., Gibson, D. T., Eklund, H., y Ramaswamy, S. (2000). Substrate binding site of naphthalene 1, 2-dioxygenase: functional implications of indole binding. *Journal of Molecular Biology*, 296(2):701–712.
- Carrigg, C., Rice, O., Kavanagh, S., Collins, G., y OFlaherty, V. (2007). Dna extraction method affects microbial community profiles from soils and sediment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77(4):955–964.
- Cébron, A., Norini, M.-P., Beguiristain, T., y Leyval, C. (2008). Real-Time PCR quantification of PAH-ring hydroxylating dioxygenase (PAH-RHDalpha) genes from Gram positive and Gram negative bacteria in soil and sediment samples. *Journal of microbiological methods*, 73(2):148–59.
- Chakraborty, J., Ghosal, D., Dutta, A., y Dutta, T. K. (2012). An insight into the origin and functional evolution of bacterial aromatic ring-hydroxylating oxygenases. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 30(4):419–436.
- Chakraborty, J., Jana, T., Saha, S., y Dutta, T. K. (2014). Ring-hydroxylating oxygenase database: a database of bacterial aromatic ring-hydroxylating oxygenases in the management of bioremediation and biocatalysis of aromatic compounds. *Environmental Microbiology Reports*, 6(5):519–523.
- Chenna, R., Sugawara, H., Koike, T., Lopez, R., Gibson, T. J., Higgins, D. G., y Thompson, J. D. (2003). Multiple sequence alignment with the clustal series of programs. *Nucleic Acids Research*, 31(13):3497–3500.
- Cho, J.-C. y Giovannoni, S. J. (2004). Cultivation and growth characteristics of a diverse group of oligotrophic marine gammaproteobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(1):432–440.
- Commendatore, M. G. y Esteves, J. L. (2007). An assessment of oil pollution in the coastal zone of Patagonia, Argentina. *Environmental Management*, 40(5):814–821.
- Commendatore, M. G., Nievas, M. L., Amin, O., y 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*, 74:20–31.
- Coulon, F., McKew, B. a., Osborn, a. M., McGenity, T. J., y Timmis, K. N. (2007). Effects of temperature and biostimulation on oil-degrading microbial communities in temperate estuarine waters. *Environmental Microbiology*, 9(1):177–86.
- Cui, Z., Xu, G., Li, Q., Gao, W., y Zheng, L. (2013). Genome sequence of the pyrene-and fluoranthene-degrading bacterium *Cycloclasticus* sp. strain PY97M. *Genome Announcements*, 1(4):e00536–13.
- Daniel, R. (2005). The metagenomics of soil. *Nature reviews. Microbiology*, 3(6):470–8.

- D'Argenio, V., Petrillo, M., Cantiello, P., Naso, B., Cozzuto, L., Notomista, E., Paoella, G., Di Donato, A., y Salvatore, F. (2011). De novo sequencing and assembly of the whole genome of *Novosphingobium* sp. strain PP1Y. *Journal of Bacteriology*, 193(16):4296–4296.
- Das, N. y Chandran, P. (2011). Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *Biotechnology Research International*.
- De la Huz, R., Lastra, M., Junoy, J., Castellanos, C., y Vieitez, J. (2005). Biological impacts of oil pollution and cleaning in the intertidal zone of exposed sandy beaches: preliminary study of the prestige oil spill. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 65(1):19–29.
- Delmont, T. O., Robe, P., Clark, I., Simonet, P., y Vogel, T. M. (2011). Metagenomic comparison of direct and indirect soil DNA extraction approaches. *Journal of Microbiological Methods*, 86(3):397–400.
- Desai, C. y Madamwar, D. (2007). Extraction of inhibitor-free metagenomic DNA from polluted sediments, compatible with molecular diversity analysis using adsorption and ion-exchange treatments. *Bioresource Technology*, 98(4):761–8.
- Di Bella, J. M., Bao, Y., Gloor, G. B., Burton, J. P., y Reid, G. (2013). High throughput sequencing methods and analysis for microbiome research. *Journal of Microbiological Methods*, 95(3):401–14.
- Diaz, S., Camilión, C., Deferrari, G., Fuenzalida, H., Armstrong, R., Booth, C., et al. (2006). Ozone and UV radiation over southern South America: Climatology and anomalies. *Photochemistry and Photobiology*, 82(4):834–843.
- Dinsdale, E. A., Edwards, R. A., Hall, D., Angly, F., et al. (2008). Functional metagenomic profiling of nine biomes. *Nature*, 452(7187):629–632.
- Dionisi, H. M., Lozada, M., Marcos, M. S., Di Marzio, W. D., y Loviso, C. L. (2011). Aromatic hydrocarbon degradation genes from chronically polluted subantarctic marine sediments. *Handbook of Molecular Microbial Ecology II: Metagenomics in Different Habitats*, pages 461–473.
- Dunwell, J. M., Purvis, A., y Khuri, S. (2004). Cupins: the most functionally diverse protein superfamily? *Phytochemistry*, 65(1):7–17.
- Duran, R. (2010). *Marinobacter*. In *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*, pages 1725–1735. Springer.
- Edwards, R. a., Rodriguez-Brito, B., Wegley, L., Haynes, M., Breitbart, M., Peterson, D. M., Saar, M. O., Alexander, S., Alexander, E. C., y Rohwer, F. (2006). Using pyrosequencing to shed light on deep mine microbial ecology. *BMC Genomics*, 7:57.

- Eltis, L. y Bolin, J. (1996). Evolutionary relationships among extradiol dioxygenases. *Journal of Bacteriology*, 178(20):5930–5937.
- Ensley, B. D., Ratzkin, B. J., Osslund, T. D., Simon, M. J., Wackett, L. P., y Gibson, D. T. (1983). Expression of naphthalene oxidation genes in *Escherichia coli* results in the biosynthesis of indigo. *Science*, 222(4620):167–169.
- Esteves, J., Commendatore, M., Nievas, M., Paletto, V. M., y Amín, O. (2006). Hydrocarbon pollution in coastal sediments of Tierra del Fuego Islands, Patagonia Argentina. *Marine Pollution Bulletin*, 52(5):582–590.
- Fahy, A., Ball, A., Lethbridge, G., Timmis, K., y McGenity, T. (2008). Isolation of alkali-tolerant benzene-degrading bacteria from a contaminated aquifer. *Letters in Applied Microbiology*, 47(1):60–66.
- Farrington, J. W. (2014a). Oil Pollution in the Marine Environment II: Fates and Effects of Oil Spills. *Environment: Science and Policy for Sustainable Development*, 56(4):16–31.
- Farrington, J. W. (2014b). Oil pollution in the marine environment iii: Fates and effects of chronic oil inputs. *Environment: Science and Policy for Sustainable Development*, 56(5):12–25.
- Ferrer, M., Belouqui, A., Timmis, K. N., y Golyshin, P. N. (2009). Metagenomics for mining new genetic resources of microbial communities. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 16(1-2):109–23.
- Ferrer, M., Golyshina, O. V., Chernikova, T. N., Khachane, A. N., Martins Dos Santos, V. a. P., Yakimov, M. M., Timmis, K. N., y Golyshin, P. N. (2005). Microbial enzymes mined from the Urania deep-sea hypersaline anoxic basin. *Chemistry & Biology*, 12(8):895–904.
- Ferris, M., Muyzer, G., y Ward, D. (1996). Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16s rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(2):340–346.
- Fetzner, S. (2012). Ring-cleaving dioxygenases with a cupin fold. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(8):2505–2514.
- Fierer, N. y Jackson, J. (2005). Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays. *Applied and Environmental Microbiology*, 71.
- Fortin, N., Beaumier, D., Lee, K., y Greer, C. W. (2004). Soil washing improves the recovery of total community DNA from polluted and high organic content sediments. *Journal of Microbiological Methods*, 56(2):181–191.

- Frederick, J., Diaz, S., Smolskaia, I., Esposito, W., Lucas, T., y Booth, C. (1994). Ultraviolet solar radiation in the high latitudes of South America. *Photochemistry and Photobiology*, 60(4):356–362.
- Gabor, E. M., de Vries, E. J., y Janssen, D. B. (2003). Efficient recovery of environmental DNA for expression cloning by indirect extraction methods. *FEMS Microbiology Ecology*, 44(2):153–63.
- Gallego, S., Vila, J., Tauler, M., Nieto, J. M., Breugelmans, P., Springael, D., y Grifoll, M. (2014). Community structure and PAH ring-hydroxylating dioxygenase genes of a marine pyrene-degrading microbial consortium. *Biodegradation*, 25(4):543–56.
- Gan, H. M., Hudson, A. O., Rahman, A. Y. A., Chan, K. G., y Savka, M. A. (2013). Comparative genomic analysis of six bacteria belonging to the genus *Novosphingobium*: insights into marine adaptation, cell-cell signaling and bioremediation. *BMC Genomics*, 14(1):431.
- Ganesan, H., Rakitianskaia, A. S., Davenport, C. F., Tümmeler, B., y Reva, O. N. (2008). The seqword genome browser: an online tool for the identification and visualization of atypical regions of bacterial genomes through oligonucleotide usage. *BMC Bioinformatics*, 9(1):333.
- Gerlt, J. A. y Babbitt, P. C. (2001). Divergent evolution of enzymatic function: mechanistically diverse superfamilies and functionally distinct suprafamilies. *Annual Review of Biochemistry*, 70(1):209–246.
- Gibson, D. T. y Parales, R. E. (2000). Aromatic hydrocarbon dioxygenases in environmental biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 11(3):236–243.
- Grimm, A. C. y Harwood, C. S. (1999). NahY, a catabolic plasmid-encoded receptor required for chemotaxis of *Pseudomonas putida* to the aromatic hydrocarbon naphthalene. *Journal of Bacteriology*, 181(10):3310–3316.
- Guibert, L. M., Loviso, C. L., Marcos, M. S., Commendatore, M. G., Dionisi, H. M., y Lozada, M. (2012). Alkane biodegradation genes from chronically polluted subantarctic coastal sediments and their shifts in response to oil exposure. *Microbial Ecology*, 64(3):605–16.
- Gutierrez, T., Green, D., Nichols, P., Whitman, W., Semple, K., y Aiken, M. (2013). *Polycyclovorans algicola* gen nov, sp nov, an aromatic- hydrocarbon-degrading marine bacterium found associated with laboratory cultures of marine phytoplankton. *Applied Environmental Microbiology*, 79:205–214.
- Habe, H. et al. (2003). Genetics of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in diverse aerobic bacteria. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 67(2):225–43.
- Haddock, J. (2010). Aerobic degradation of aromatic hydrocarbons: enzyme structures and catalytic mechanisms. In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, pages 1057–1069. Springer.

- Hall, C., Tharakan, P., y Hallock, J. (2003). Hydrocarbons and the evolution of human culture. *Nature*, 426(November).
- Handelsman, J. (2004). Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(4):669–685.
- Hankinson, O. (1995). The aryl hydrocarbon receptor complex. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 35(1):307–340.
- Harayama, S. y Kishira, H. (1999). Petroleum biodegradation in marine environments. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 1:63–70.
- Haritash, a. K. y Kaushik, C. P. (2009). Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Journal of Hazardous Materials*, 169(1-3):1–15.
- Harwati, T. U., Kasai, Y., Kodama, Y., Susilaningih, D., y Watanabe, K. (2007). Characterization of diverse hydrocarbon-degrading bacteria isolated from indonesian seawater. *Microbes and Environments*, 22(4):412.
- Heath, C., Hu, X. P., Cary, S. C., y Cowan, D. (2009). Identification of a novel alkaliphilic esterase active at low temperatures by screening a metagenomic library from antarctic desert soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(13):4657–9.
- Hedlund, B. y Costa, K. (2010). *Neptunomonas*. In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, pages 1773–1779. Springer.
- Heintz, R. A. (2007). Chronic exposure to polynuclear aromatic hydrocarbons in natal habitats leads to decreased equilibrium size, growth, and stability of pink salmon populations. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 3(3):351–363.
- Hemmerich, C., Hughes, A., Ruan, Y., Buechlein, A., Qiu, J., y Fox, G. (2010). Map-reduce expansion of the ISGA genomic analysis web server. *IEEE CloudCom*.
- Hendrickx, B., Junca, H., Vosahlova, J., Lindner, A., Rüegg, I., Bucheli-Witschel, M., Faber, F., Egli, T., Mau, M., Schlömann, M., et al. (2006). Alternative primer sets for PCR detection of genotypes involved in bacterial aerobic BTEX degradation: distribution of the genes in BTEX degrading isolates and in subsurface soils of a BTEX contaminated industrial site. *Journal of Microbiological Methods*, 64(2):250–265.
- Hristova, K., Lutenegger, C., y Scow, K. (2001). Detection and quantification of methyl tert-butyl ether degrading strain PM1 by real time TaqMan PCR. *Applied Environmental Microbiology*, 67:5154–5160.

- Huson, D. H., Auch, A. F., Qi, J., y Schuster, S. C. (2007). Megan analysis of metagenomic data. *Genome Research*, 17(3):377–386.
- Huson, D. H. y Mitra, S. (2012). Introduction to the analysis of environmental sequences: metagenomics with megan. In *Evolutionary Genomics*, pages 415–429. Springer.
- International Tanker Owners Pollution Federation (2014). Fate of marine oil spills. *Technical information paper*.
- Iwai, S., Johnson, T. a., Chai, B., Hashsham, S. a., y Tiedje, J. M. (2011). Comparison of the specificities and efficacies of primers for aromatic dioxygenase gene analysis of environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(11):3551–7.
- Jiang, H. y Parales, R. (1996). Site-directed mutagenesis of conserved amino acids in the alpha subunit of toluene dioxygenase: potential mononuclear non-heme iron coordination sites. *Journal of Bacteriology*, 178(11):3133–3139.
- Jones, P., Binns, D., Chang, H.-Y., Fraser, M., Li, W., et al. (2014). Interproscan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics*, 30(9):1236–1240.
- Junca, H. et al. (2010). Functional marker gene assays for hydrocarbon degrading microbial communities: aerobic. In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, pages 4289–4312. Springer.
- Junca, H., Plumeier, I., Hecht, H.-J., y Pieper, D. H. (2004). Difference in kinetic behaviour of catechol 2,3-dioxygenase variants from a polluted environment. *Microbiology*, 150(12):4181–7.
- Kanagawa, T. (2003). Bias and artifacts in multitemplate polymerase chain reactions (PCR). *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 96(4):317–323.
- Kanaly, R. a. y Harayama, S. (2010). Advances in the field of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation by bacteria. *Microbial Biotechnology*, 3(2):136–64.
- Kanehisa, M., Goto, S., Sato, Y., Kawashima, M., Furumichi, M., y Tanabe, M. (2014). Data, information, knowledge and principle: back to metabolism in kegg. *Nucleic Acids Research*, 42(1):199–205.
- Kasai, D., Fujinami, T., Abe, T., Mase, K., Katayama, Y., Fukuda, M., y Masai, E. (2009). Uncovering the protocatechuate 2, 3-cleavage pathway genes. *Journal of Bacteriology*, 191(21):6758–6768.
- Kasai, Y. y Shindo, K. (2003). Molecular characterization and substrate preference of a polycyclic aromatic hydrocarbon dioxygenase from *Cycloclasticus* sp. strain A5. *Applied and Environmental Microbiology*, 69:6688–6697.

- Kasuga, I., Nakajima, F., y Furumai, H. (2007). Diversity of catechol 2, 3-dioxygenase genes of bacteria responding to dissolved organic matter derived from different sources in a eutrophic lake. *FEMS Microbiology Ecology*, 61(3):449–458.
- Kasuga, K., Nojiri, H., Yamane, H., y Omori, T. (1997). Genes of enzymes involved in the biodegradation of carbazole, dibenzofuran, fluorene, and dibenzo-p-dioxin by bacteria. *Water Science and Technology*, 36(10):9–16.
- Kaupii, B., Lee, K., Carredano, E., y Parales, R. (1998). Structure of an aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase-naphthalene 1,2-dioxygenase. *Structure*, 6:571–586.
- Kavanagh, I., Jones, G., y Nayab, S. N. (2011). Significance of controls and standard curves in pcr. In *PCR Troubleshooting and Optimization: The Essential Guide*, pages 67–78. Horizon Scientific Press Norfolk, UK.
- Kazy, S. K., Monier, A. L., y Alvarez, P. J. (2010). Assessing the correlation between anaerobic toluene degradation activity and bssA concentrations in hydrocarbon-contaminated aquifer material. *Biodegradation*, 21(5):793–800.
- Kertesz, M. y Kawasaki, A. (2010). Hydrocarbon-degrading sphingomonads: Sphingomonas, sphingobium, novosphingobium, and sphingopyxis. In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, pages 1693–1705. Springer.
- Kim, S.-J., Kweon, O., y Cerniglia, C. E. (2009). Proteomic applications to elucidate bacterial aromatic hydrocarbon metabolic pathways. *Current Opinion in Microbiology*, 12(3):301–309.
- Kim, S.-J., Kweon, O., Jones, R. C., Edmondson, R. D., y Cerniglia, C. E. (2008). Genomic analysis of polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *Biodegradation*, 19(6):859–881.
- Kim, S.-J., Kweon, O., Jones, R. C., Freeman, J. P., Edmondson, R. D., y Cerniglia, C. E. (2007). Complete and integrated pyrene degradation pathway in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 based on systems biology. *Journal of Bacteriology*, 189(2):464–72.
- Kim, S.-J. y Kwon, K. (2010). Marine, hydrocarbon-degrading Alphaproteobacteria. In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, pages 1707–1714. Springer.
- Klappenbach, J. A., Dunbar, J. M., y Schmidt, T. M. (2000). rRNA operon copy number reflects ecological strategies of bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(4):1328–1333.
- Kostka, J. E., Prakash, O., Overholt, W. A., Green, S. J., Freyer, G., Canion, A., Delgadio, J., Norton, N., Hazen, T. C., y Huettel, M. (2011). Hydrocarbon-degrading bacteria and the bacterial

- community response in Gulf of Mexico beach sands impacted by the Deepwater Horizon oil spill. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(22):7962–7974.
- Kostka, J. E., Teske, A. P., Joye, S. B., y Head, I. M. (2014). The metabolic pathways and environmental controls of hydrocarbon biodegradation in marine ecosystems. *Frontiers in Microbiology*, 5.
- Kouzuma, A., Pinyakong, O., Nojiri, H., Omori, T., Yamane, H., y Habe, H. (2006). Functional and transcriptional analyses of the initial oxygenase genes for acenaphthene degradation from *Sphingomonas* sp. strain A4. *Microbiology*, 152(8):2455–2467.
- Krause, L., Diaz, N. N., Goesmann, A., Kelley, S., Nattkemper, T. W., Rohwer, F., Edwards, R. A., y Stoye, J. (2008). Phylogenetic classification of short environmental DNA fragments. *Nucleic Acids Research*, 36(7):2230–2239.
- Kunin, V., Engelbrektson, A., Ochman, H., y Hugenholtz, P. (2010). Wrinkles in the rare biosphere: pyrosequencing errors can lead to artificial inflation of diversity estimates. *Environmental Microbiology*, 12(1):118–123.
- Kunze, M., Zerlin, K. F., Retzlaff, A., Pohl, J. O., Schmidt, E., Janssen, D. B., Vilchez-Vargas, R., Pieper, D. H., y Reineke, W. (2009). Degradation of chloroaromatics by *Pseudomonas putida* GJ31: assembled route for chlorobenzene degradation encoded by clusters on plasmid pKW1 and the chromosome. *Microbiology*, 155(12):4069–4083.
- Kweon, O., Kim, S.-J., Baek, S., Chae, J.-C., Adjei, M. D., Baek, D.-H., Kim, Y.-C., y Cerniglia, C. E. (2008). A new classification system for bacterial rieske non-heme iron aromatic ring-hydroxylating oxygenases. *BMC Biochemistry*, 9(1):11.
- Kweon, O., Kim, S.-J., Jones, R. C., Freeman, J. P., Adjei, M. D., Edmondson, R. D., y Cerniglia, C. E. (2007). A polyomic approach to elucidate the fluoranthene-degradative pathway in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *Journal of Bacteriology*, 189(13):4635–47.
- Lai, Q., Li, W., Wang, B., Yu, Z., y Shao, Z. (2012). Complete genome sequence of the pyrene-degrading bacterium *Cycloclasticus* sp. strain P1. *Journal of Bacteriology*, 194(23).
- Lalucat, J., Bennisar, A., Bosch, R., García-Valdés, E., y Palleroni, N. J. (2006). Biology of *Pseudomonas stutzeri*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(2):510–547.
- Lane, D. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, pages 125–175.

- Lanfranconi, M. P. y Alvarez, H. M. (2014). Molecular markers in hydrocarbon degradation: State of the art and prospective in south america. In *Bioremediation in Latin America*, pages 193–208. Springer.
- Lee, Z. M.-P., Bussema, C., y Schmidt, T. M. (2009). rrnDB: documenting the number of rRNA and tRNA genes in bacteria and archaea. *Nucleic Acids Research*, 37(suppl 1):D489–D493.
- Levengood, J. M. y Schaeffer, D. J. (2011). Polycyclic aromatic hydrocarbons in fish and crayfish from the Calumet region of southwestern Lake Michigan. *Ecotoxicology*, 20(6):1411–1421.
- Liu, D., Pan, L., Li, Z., Cai, Y., y Miao, J. (2014). Metabolites analysis, metabolic enzyme activities and bioaccumulation in the clam *Ruditapes philippinarum* exposed to benzo[a]pyrene. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 107:251–9.
- Liu, Z., Liu, J., Zhu, Q., y Wu, W. (2012). The weathering of oil after the deepwater horizon oil spill: insights from the chemical composition of the oil from the sea surface, salt marshes and sediments. *Environmental Research Letters*, 7(3).
- Lozada, M., Marcos, M., Commendatore, M., Gil, M., y Dionisi, M. (2014). The bacterial community structure of hydrocarbon-polluted intertidal sediments as the basis for the definition of an ecological index of hydrocarbon exposure. *Microbes Environ*, 29:269–276.
- Lozada, M., Riva Mercadal, J. P., Guerrero, L. D., Di Marzio, W. D., Ferrero, M. a., y Dionisi, H. M. (2008). Novel aromatic ring-hydroxylating dioxygenase genes from coastal marine sediments of Patagonia. *BMC Microbiology*, 8:50.
- Luna, G. M., DellAnno, A., y Danovaro, R. (2006). Dna extraction procedure: a critical issue for bacterial diversity assessment in marine sediments. *Environmental Microbiology*, 8(2):308–320.
- Luo, Y. R., Kang, S. G., Kim, S.-J., Kim, M.-R., Li, N., Lee, J.-H., y Kwon, K. K. (2012). Genome sequence of benzo(a)pyrene-degrading bacterium *Novosphingobium pentaromativorans* US6-1. *Journal of Bacteriology*, 194(4):907.
- Lyu, Y., Zheng, W., Zheng, T., y Tian, Y. (2014). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Novosphingobium pentaromativorans* US6-1. *PloS One*, 9(7).
- Mallick, S., Chakraborty, J., y Dutta, T. K. (2011). Role of oxygenases in guiding diverse metabolic pathways in the bacterial degradation of low-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons: A review. *Critical Reviews in Microbiology*, 37(1):64–90.
- Mampel, J., Providenti, M. A., y Cook, A. M. (2005). Protocatechuate 4, 5-dioxygenase from *Comamonas testosteroni* T-2: biochemical and molecular properties of a new subgroup within class III of extradiol dioxygenases. *Archives of Microbiology*, 183(2):130–139.

- Maneerat, S. y Phetrong, K. (2007). Isolation of biosurfactant-producing marine bacteria and characteristics of selected biosurfactant. *J Sci Technol*, 29(3):781–791.
- Marcos, M. S., Lozada, M., Di Marzio, W. D., y Dionisi, H. M. (2012). Abundance, dynamics, and biogeographic distribution of seven polycyclic aromatic hydrocarbon dioxygenase gene variants in coastal sediments of Patagonia. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(5):1589–92.
- Marcos, M. S., Lozada, M., y Dionisi, H. M. (2009). Aromatic hydrocarbon degradation genes from chronically polluted Subantarctic marine sediments. *Letters in Applied Microbiology*, 49(5):602–8.
- Margulies, M., Egholm, M., Altman, W. E., Attiya, S., Bader, J. S., Bembem, L. a., et al. (2005). Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*, 437(7057):376–80.
- Marshall, A. y Rodgers, R. (2004). Petroleomics: The next grand challenge for chemical analysis. *Accounts of Chemical Research*, 37:53–59.
- McDonald, B. y Chapman, P. (2002). PAH phototoxicity an ecologically irrelevant phenomenon? *Marine Pollution Bulletin*, 44:1321–1326.
- McGenity, T. J., Folwell, B. D., McKew, B. a., y Sanni, G. O. (2012). Marine crude-oil biodegradation: a central role for interspecies interactions. *Aquatic Biosystems*, 8(1):10.
- McKenna, A. M., Williams, J. T., Putman, J. C., Aeppli, C. M., et al. (2014). Biodegradation at the seafloor: Ultrahigh resolution FT-ICR mass spectral characterization of natural petroleum seeps. In *International Oil Spill Conference Proceedings*, volume 2014, pages 2083–2097. American Petroleum Institute.
- McKew, B. a., Coulon, F., Osborn, a. M., Timmis, K. N., y McGenity, T. J. (2007). Determining the identity and roles of oil-metabolizing marine bacteria from the Thames estuary, UK. *Environmental Microbiology*, 9(1):165–76.
- Mestdagh, P., Feys, T., Bernard, N., Guenther, S., Chen, C., Speleman, F., y Vandesompele, J. (2008). High-throughput stem-loop RT-qPCR miRNA expression profiling using minute amounts of input RNA. *Nucleic Acids Research*, 36(21).
- Monds, R. D., Newell, P. D., Wagner, J. C., Schwartzman, J. A., Lu, W., Rabinowitz, J. D., y O’Toole, G. A. (2010). Di-adenosine tetraphosphate (Ap₄A) metabolism impacts biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* via modulation of c-di-GMP-dependent pathways. *Journal of Bacteriology*, 192(12):3011–3023.
- Muangchinda, C., Chavanich, S., Viyakarn, V., Watanabe, K., Imura, S., Vangnai, A., y Pinyakong, O. (2014). Abundance and diversity of functional genes involved in the degradation of aromatic

- hydrocarbons in Antarctic soils and sediments around Syowa Station. *Environmental Science and Pollution Research*, pages 1–11.
- Myers, E. W., Sutton, G. G., Delcher, A. L., Dew, I. M., Fasulo, D. P., Flanigan, M. J., Kravitz, S. A., Mobarry, C. M., Reinert, K. H., Remington, K. A., et al. (2000). A whole-genome assembly of *Drosophila*. *Science*, 287(5461):2196–2204.
- Nam, J. W., Nojiri, H., Yoshida, T., Habe, H., Yamane, H., y Omori, T. (2001). New classification system for oxygenase components involved in ring-hydroxylating oxygenations. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 65(2):254–63.
- Namiki, T., Hachiya, T., Tanaka, H., y Sakakibara, Y. (2012). MetaVelvet: an extension of Velvet assembler to de novo metagenome assembly from short sequence reads. *Nucleic Acids Research*, 40(20).
- Neufeld, J. D., Chen, Y., Dumont, M. G., y Murrell, J. C. (2008). Marine methylotrophs revealed by stable-isotope probing, multiple displacement amplification and metagenomics. *Environmental microbiology*, 10(6):1526–35.
- Niepceron, M., Portet-Koltalo, F., Merlin, C., Motelay-Massei, A., Barray, S., y Bodilis, J. (2010). Both *Cycloclasticus* spp. and *Pseudomonas* spp. as PAH-degrading bacteria in the Seine estuary (France). *FEMS Microbiology Ecology*, 71(1):137–47.
- Nievas, M. L. y Esteves, J. L. (2007). Relevamiento de actividades relacionadas con la explotación de petróleo en zona costera patagónica y datos preliminares sobre residuos de hidrocarburos en puertos. *Fundación Patagonia Natural, Puerto Madryn*.
- Ono, A., Miyazaki, R., Sota, M., Ohtsubo, Y., Nagata, Y., y Tsuda, M. (2007). Isolation and characterization of naphthalene-catabolic genes and plasmids from oil-contaminated soil by using two cultivation-independent approaches. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(2):501–510.
- Palatinszky, M., Nikolausz, M., Sváb, D., y Márialigeti, K. (2011). Preferential ligation during TA-cloning of multitemplate PCR products—a factor causing bias in microbial community structure analysis. *Journal of Microbiological Methods*, 85(2):131–6.
- Pallejà, A., Harrington, E. D., y Bork, P. (2008). Large gene overlaps in prokaryotic genomes: result of functional constraints or mispredictions? *BMC Genomics*, 9(1):335.
- Parachin, N. S. y Gorwa-Grauslund, M. F. (2011). Isolation of xylose isomerases by sequence- and function-based screening from a soil metagenomic library. *Biotechnology for Biofuels*, 4(1):9.
- Parales, R. (2010). Hydrocarbon degradation by betaproteobacteria. In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, pages 1715–1724. Springer.

- Parales, R. E., Lee, K., Resnick, S. M., Jiang, H., Lessner, D. J., y Gibson, D. T. (2000). Substrate specificity of naphthalene dioxygenase: effect of specific amino acids at the active site of the enzyme. *Journal of Bacteriology*, 182(6):1641–1649.
- Patil, K. R., Roune, L., y McHardy, A. C. (2012). The PhyloPythiaS web server for taxonomic assignment of metagenome sequences. *PloS One*, 7(6):e38581.
- Peng, R.-H., Xiong, A.-S., Xue, Y., Fu, X.-Y., Gao, F., Zhao, W., Tian, Y.-S., y Yao, Q.-H. (2008). Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(6):927–55.
- Perez-Pantoja, D., De la Iglesia, R., Pieper, D. H., y González, B. (2008). Metabolic reconstruction of aromatic compounds degradation from the genome of the amazing pollutant-degrading bacterium *Cupriavidus necator* JMP134. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(5):736–794.
- Pérez-Pantoja, D., Donoso, R., Junca, H., González, B., y Pieper, D. (2010a). Phylogenomics of aerobic bacterial degradation of aromatics. In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, pages 1355–1397. Springer.
- Pérez-Pantoja, D., González, B., y Pieper, D. (2010b). Aerobic degradation of aromatic hydrocarbons. In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, pages 799–837. Springer.
- Pérez-Pantoja, D., Ledger, T., Pieper, D., y Gonzalez, B. (2003). Efficient turnover of chlorocatechols is essential for growth of *Ralstonia eutropha* JMP134 (pJP4) in 3-chlorobenzoic acid. *Journal of Bacteriology*, 185(5):1534–1542.
- Pieper, D., González, B., Cámara, B., Pérez-Pantoja, D., y Reineke, W. (2010). Aerobic degradation of chloroaromatics. In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, pages 839–864. Springer.
- Pilloni, G., Granitsiotis, M. S., Engel, M., y Lueders, T. (2012). Testing the limits of 454 pyrotag sequencing: reproducibility, quantitative assessment and comparison to T-RFLP fingerprinting of aquifer microbes. *PloS One*, 7(7).
- Pinel, N., Davidson, S. K., y Stahl, D. A. (2008). *Verminephrobacter eiseniae* gen. nov., sp. nov., a nephridial symbiont of the earthworm *Eisenia foetida* (Savigny). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(9):2147–2157.
- Pini, F., Grossi, C., Nereo, S., Michaud, L., Giudice, A. L., Bruni, V., Baldi, F., y Fani, R. (2007). Molecular and physiological characterisation of psychrotrophic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from Terra Nova Bay (Antarctica). *European Journal of Soil Biology*, 43(5):368–379.
- Pinyakong, O., Habe, H., Kouzuma, A., Nojiri, H., Yamane, H., y Omori, T. (2004). Isolation and characterization of genes encoding polycyclic aromatic hydrocarbon dioxygenase from acenaphthene

- and acenaphthylene degrading *Sphingomonas* sp. strain A4. *FEMS Microbiology Letters*, 238(2):297–305.
- Pinyakong, O., Habe, H., y Omori, T. (2003). The unique aromatic catabolic genes in sphingomonads degrading polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Journal of Applied Microbiology*, 49:1–19.
- Pinyakong, O., Tiangda, K., Iwata, K., y Omori, T. (2012). Isolation of novel phenanthrene-degrading bacteria from seawater and the influence of its physical factors on the degradation of phenanthrene. *Science Asia*, 38:36–43.
- Powell, S. M., Ferguson, S. H., Bowman, J. P., y Snape, I. (2006). Using real-time PCR to assess changes in the hydrocarbon-degrading microbial community in Antarctic soil during bioremediation. *Microbial Ecology*, 52(3):523–32.
- Prince, R., Gramain, A., y McGenity, T. (2010). Prokaryotic hydrocarbon degraders. In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, pages 1669–1692. Springer.
- Rayu, S., Karpouzias, D., y Singh, B. (2012). Emerging technologies in biorremediation: constraints and opportunities. *Biodegradation*, 23:917–926.
- Renner, R. (1999). EPA to strengthen persistent, bioaccumulative, and toxic pollutant controlsmercury first to be targeted. *Environmental Science & Technology*, 33(3).
- Reva, O. N. y Tümmeler, B. (2005). Differentiation of regions with atypical oligonucleotide composition in bacterial genomes. *BMC Bioinformatics*, 6(1):251.
- Reysenbach, A. y Giver, L. (1992). Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(10):3417–3419.
- Riesenfeld, C. S., Schloss, P. D., y Handelsman, J. (2004). Metagenomics: genomic analysis of microbial communities. *Annu. Rev. Genet.*, 38:525–552.
- Rojo, F. (2009). Degradation of alkanes by bacteria. *Environmental Microbiology*, 11(10):2477–2490.
- Romine, M. y Stillwell, L. (1999). Complete sequence of a 184-kilobase catabolic plasmid from *Sphingomonas aromaticivorans* F199. *Journal of Bacteriology*, 181(5):1585–1602.
- Roose-Amsaleg, C., Garnier-Sillam, E., y Harry, M. (2001). Extraction and purification of microbial dna from soil and sediment samples. *Applied Soil Ecology*, 18(1):47–60.
- Rusch, D. B., Halpern, A. L., Sutton, G., Heidelberg, K. B., Williamson, S., et al. (2007). The Sorcerer II global ocean sampling expedition: northwest Atlantic through eastern tropical Pacific. *PLoS Biology*, 5(3).

- Sabehi, G., Loy, A., Jung, K.-H., Partha, R., Spudich, J. L., Isaacson, T., Hirschberg, J., Wagner, M., y Bèjà, O. (2005). New insights into metabolic properties of marine bacteria encoding proteorhodopsins. *PLoS Biology*, 3(8).
- Sabirova, J. S., Chernikova, T. N., Timmis, K. N., y Golyshin, P. N. (2008). Niche-specificity factors of a marine oil-degrading bacterium *Alcanivorax borkumensis* SK2. *FEMS Microbiology Letters*, 285(1):89–96.
- Sambrook, J. y Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2001.
- Sanchez-Perez, G., Mira, A., Nyiró, G., Pašić, L., y Rodriguez-Valera, F. (2008). Adapting to environmental changes using specialized paralogs. *Trends in Genetics*, 24(4):154–158.
- Sanger, F. y Coulson, A. R. (1975). A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology*, 94(3):441–448.
- Sargian, P., Mas, S., Pelletier, É., y Demers, S. (2007). Multiple stressors on an Antarctic microplankton assemblage: water soluble crude oil and enhanced UVBR level at Ushuaia (Argentina). *Polar Biology*, 30(7):829–841.
- Schell, M. A. (1993). Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. *Annual Reviews in Microbiology*, 47(1):597–626.
- Schwarz, J. (1978). El caso metula. *Instituto de Publicaciones Navales*.
- Seto, M., Masai, E., Ida, M., Hatta, T., Kimbara, K., Fukuda, M., y Yano, K. (1995). Multiple Polychlorinated Biphenyl Transformation Systems in the Gram-Positive Bacterium *Rhodococcus* sp. strain RHA1. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(12):4510–4513.
- Shendure, J. y Ji, H. (2008). Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology*, 26(10):1135–45.
- Shendure, J., Porreca, G. J., Reppas, N. B., Lin, X., McCutcheon, J. P., et al. (2005). Accurate multiplex polony sequencing of an evolved bacterial genome. *Science (New York, N. Y.)*, 309(5741):1728–32.
- Shin, W., Pardue, J., y Jackson, W. (2000). Oxygen demand and sulfate reduction in petroleum hydrocarbon contaminated salt marsh soils. *Water Research*, 34(4).
- Shuttleworth, K. y Cerniglia, E. (1995). Environmental aspects of PAH biodegradation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 54:291–302.
- Sierra-García, I. N., Alvarez, J. C., de Vasconcellos, S. P., de Souza, A. P., dos Santos Neto, E. V., y de Oliveira, V. M. (2014). New hydrocarbon degradation pathways in the microbial metagenome from brazilian petroleum reservoirs. *PloS One*, 9(2).

- Silva, C. C., Hayden, H., Sawbridge, T., Mele, P., De Paula, S. O., Silva, L. C., Vidigal, P. M., Vicentini, R., Sousa, M. P., Torres, A. P. R., et al. (2013). Identification of genes and pathways related to phenol degradation in metagenomic libraries from petroleum refinery wastewater. *PLoS One*, 8(4).
- Simon, C. y Daniel, R. (2009). Achievements and new knowledge unraveled by metagenomic approaches. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(2):265–76.
- Simon, C. y Daniel, R. (2011). Metagenomic analyses: past and future trends. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(4):1153–61.
- Singh, J., Behal, A., Singla, N., Joshi, A., Birbian, N., Singh, S., Bali, V., y Batra, N. (2009). Metagenomics: Concept, methodology, ecological inference and recent advances. *Biotechnology Journal*, 4:480–494.
- Singleton, D. R., Hu, J., y Aitken, M. D. (2012). Heterologous expression of polycyclic aromatic hydrocarbon ring-hydroxylating dioxygenase genes from a novel pyrene-degrading betaproteobacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(10):3552–3559.
- Sipilä, T. P., Keskinen, A.-K., Åkerman, M.-L., Fortelius, C., Haahtela, K., y Yrjälä, K. (2008). High aromatic ring-cleavage diversity in birch rhizosphere: PAH treatment-specific changes of IE 3 group extradiol dioxygenases and 16S rRNA bacterial communities in soil. *The ISME Journal*, 2(9):968–981.
- Sipos, R., Székely, A., Révész, S., y Márialigeti, K. (2010). Addressing pcr biases in environmental microbiology studies. In *Bioremediation*, pages 37–58. Springer.
- Smith, C. J., Nedwell, D. B., Dong, L. F., y Osborn, A. M. (2006). Evaluation of quantitative polymerase chain reaction-based approaches for determining gene copy and gene transcript numbers in environmental samples. *Environmental Microbiology*, 8(5):804–815.
- Smith, C. J. y Osborn, A. M. (2009). Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*, 67(1):6–20.
- Solovyev, V. y Salamov, A. (2011). Automatic annotation of microbial genomes and metagenomic sequences. *Metagenomics and its applications in agriculture, biomedicine and environmental studies*, pages 61–78.
- Staley, J. (2010). *Cycloclasticus*: A genus of marine polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacteria. In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, pages 1781–1786. Springer.
- Staley, J. y Konopka, A. (1985). Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annual Reviews in Microbiology*, 39:321–346.

- Steele, H. L., Jaeger, K.-E., Daniel, R., y Streit, W. R. (2009). Advances in recovery of novel biocatalysts from metagenomes. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 16(1-2):25–37.
- Stolz, A. (2014). Degradative plasmids from sphingomonads. *FEMS Microbiology Letters*, 350(1):9–19.
- Suenaga, H. (2012). Targeted metagenomics: a high-resolution metagenomics approach for specific gene clusters in complex microbial communities. *Environmental Microbiology*, 14(1):13–22.
- Suenaga, H., Mizuta, S., y Miyazaki, K. (2009). The molecular basis for adaptive evolution in novel extradiol dioxygenases retrieved from the metagenome. *FEMS Microbiology Ecology*, 69(3):472–80.
- Suenaga, H., Mizuta, S., Miyazaki, K., y Yaoi, K. (2014). Diversity of extradiol dioxygenases in aromatic-degrading microbial community explored using both culture-dependent and culture-independent approaches. *FEMS Microbiology Ecology*, 90(2):367–379.
- Suenaga, H., Ohnuki, T., y Miyazaki, K. (2007). Functional screening of a metagenomic library for genes involved in microbial degradation of aromatic compounds. *Environmental Microbiology*, 9:2289–2297.
- Sugimoto, K., Senda, T., Aoshima, H., Masai, E., Fukuda, M., y Mitsui, Y. (1999). Crystal structure of an aromatic ring opening dioxygenase ligab, a protocatechuate 4, 5-dioxygenase, under aerobic conditions. *Structure*, 7(8):953–965.
- Sundt, R. C., Pampanin, D. M., Grung, M., Baršienė, J., y Ruus, A. (2011). PAH body burden and biomarker responses in mussels (*Mytilus edulis*) exposed to produced water from a North Sea oil field: Laboratory and field assessments. *Marine Pollution Bulletin*, 62(7):1498–1505.
- Suzuki, M. T. et al. (1996). Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(2):625–630.
- Tamames, J. y Moya, A. (2008). Estimating the extent of horizontal gene transfer in metagenomic sequences. *BMC Genomics*, 9(1):136.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., y Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10):2731–2739.
- Tatusov, R. L., Fedorova, N. D., Jackson, J. D., Jacobs, A. R., Kiryutin, B., et al. (2003). The cog database: an updated version includes eukaryotes. *BMC Bioinformatics*, 4(1):41.
- Taupp, M., Lee, S., Hawley, A., Yang, J., y Hallam, S. J. (2009). Large insert environmental genomic library production. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, (31).

- Taylor, B. L. y Zhulin, I. B. (1999). PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(2):479–506.
- Teira, E., Lekunberri, I., Gasol, J. M., Nieto-Cid, M., Alvarez-Salgado, X. A., y Figueiras, F. G. (2007). Dynamics of the hydrocarbon-degrading *Cycloclasticus* bacteria during mesocosm-simulated oil spills. *Environmental Microbiology*, 9(10):2551–62.
- Torsvik, V. y Øvreås, L. (2002). Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, 5(3):240–245.
- Turcatti, G., Romieu, A., Fedurco, M., y Tairi, A.-P. (2008). A new class of cleavable fluorescent nucleotides: synthesis and optimization as reversible terminators for DNA sequencing by synthesis. *Nucleic Acids Research*, 36(4).
- Uchiyama, T. y Miyazaki, K. (2013). Metagenomic screening for aromatic compound-responsive transcriptional regulators. *PloS One*, 8(9).
- U.S. Department of Energy (2008). Strategic Petroleum Reserve Crude Oil Assay Manual 3. *Washington, DC*, (Agosto).
- Vaillancourt, F. H., Bolin, J. T., y Eltis, L. D. (2006). The ins and outs of ring-cleaving dioxygenases. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 41(4):241–67.
- Valasek, M. A. et al. (2005). The power of real-time PCR. *Advances in Physiology Education*, 29(3):151–159.
- van Berkel, W. J. H., Kamerbeek, N. M., y Fraaije, M. W. (2006). Flavoprotein monooxygenases, a diverse class of oxidative biocatalysts. *Journal of Biotechnology*, 124(4):670–89.
- van Elsas, J. y Boersma, F. (2011). A review of molecular methods to study the microbiota of soil and the mycosphere. *European Journal of Soil Biology*, 47(2):77–87.
- Vieites, J. M., Guazzaroni, M.-E., Beloqui, A., Golyshin, P. N., y Ferrer, M. (2010). Molecular methods to study complex microbial communities. In *Metagenomics*, pages 1–37. Springer.
- Vila, J., María Nieto, J., Mertens, J., Springael, D., y Grifoll, M. (2010). Microbial community structure of a heavy fuel oil-degrading marine consortium: linking microbial dynamics with polycyclic aromatic hydrocarbon utilization. *FEMS Microbiology Ecology*, 73(2):349–62.
- Vilchez-Vargas, R., Geffers, R., Suárez-Diez, M., Conte, I., et al. (2013). Analysis of the microbial gene landscape and transcriptome for aromatic pollutants and alkane degradation using a novel internally calibrated microarray system. *Environmental Microbiology*, 15(4):1016–1039.

- Wang, B., Lai, Q., Cui, Z., Tan, T., y Shao, Z. (2008). A pyrene-degrading consortium from deep-sea sediment of the West Pacific and its key member *Cycloclasticus* sp. P1. *Environmental Microbiology*, 10:1948–1963.
- Wang, Y., Leung, H. C., Yiu, S.-M., y Chin, F. Y. (2012). MetaCluster 4.0: a novel binning algorithm for NGS reads and huge number of species. *Journal of Computational Biology*, 19(2):241–249.
- Werlen, C., Kohler, H.-P. E., y van der Meer, J. R. (1996). The broad substrate chlorobenzene dioxygenase and cis-chlorobenzene dihydrodiol dehydrogenase of *Pseudomonas* sp. strain P51 are linked evolutionarily to the enzymes for benzene and toluene degradation. *Journal of Biological Chemistry*, 271(8):4009–4016.
- Wilhelm, J. et al. (2003). Real-time polymerase chain reaction. *Chembiochem*, 4(11):1120–1128.
- Wilkes, H. et al. (2010). Hydrocarbons: an introduction to structure, physico-chemical properties and natural occurrence. In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, pages 1–48. Springer.
- Wilson, I. G. (1997). Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(10):3741.
- Wilson, M., Bakermans, C., y Madsen, E. (1999). In situ, real-time catabolic gene expression: extraction and characterization of naphthalene dioxygenase mRNA transcripts from groundwater. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(1):80–87.
- Witt, G. (2002). Occurrence and transport of polycyclic aromatic hydrocarbons in the water bodies of the Baltic Sea. *Marine Chemistry*, 79:49–66.
- Wongwongsee, W., Chareanpat, P., y Pinyakong, O. (2013). Abilities and genes for PAH biodegradation of bacteria isolated from mangrove sediments from the central of Thailand. *Marine Pollution Bulletin*, 74(1):95–104.
- Wooley, J. C., Godzik, A., y Friedberg, I. (2010). A primer on metagenomics. *PLoS Computational Biology*, 6(2).
- Yakimov, M., Genovese, M., y Denaro, R. (2010). *Thalassolituus*. In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, pages 1765–1772. Springer.
- Yakimov, M. M., Golyshin, P. N., Lang, S., Moore, E. R., Abraham, W.-R., Lünsdorf, H., y Timmis, K. N. (1998). *Alcanivorax borkumensis* gen. nov., sp. nov., a new, hydrocarbon-degrading and surfactant-producing marine bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48(2):339–348.

- Yakimov, M. M., Timmis, K. N., y Golyshin, P. N. (2007). Obligate oil-degrading marine bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(3):257–266.
- Yun, S. H., Choi, C.-W., Lee, S.-Y., Lee, Y. G., Kwon, J., Leem, S. H., Chung, Y. H., Kahng, H.-Y., Kim, S. J., Kwon, K. K., et al. (2014). Proteomic Characterization of Plasmid pLA1 for Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Marine Bacterium, *Novosphingobium pentaromativorans* US6-1. *PLoS One*, 9(3):e90812.
- Zasadowski, A. et al. (2001). Some toxicological aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) effects. *Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny*, 53(1):33–45.
- Zeinali, M., Vossoughi, M., y Ardestani, S. K. (2008). Degradation of phenanthrene and anthracene by *Nocardia otitidiscaviarum* strain TSH1, a moderately thermophilic bacterium. *Journal of Applied Microbiology*, 105(2):398–406.
- Zhou, H. W., Guo, C. L., Wong, Y. S., Fung, N., y Tam, Y. (2006). Genetic diversity of dioxygenase genes in polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from mangrove sediments. *Federation of European Microbiological Societies*, 262:148–157.
- Zhou, J., Bruns, M. A., y Tiedje, J. M. (1996). DNA recovery from soils of diverse composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(2):316–322.
- Zhu, C., Zhang, L., y Zhao, L. (2008). Molecular cloning, genetic organization of gene cluster encoding phenol hydroxylase and catechol 2, 3-dioxygenase in *Alcaligenes faecalis* IS-46. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(9):1687–1695.