



**Universitat de les
Illes Balears**

**Diversidad e importancia ecológica del grupo
Roseobacter en aguas costeras sometidas a
impacto antropogénico**

**TESIS DOCTORAL
Juana María Piña Villalonga**

Directores:

Balbina Nogales Fernández

Rafael Bosch Zaragoza

Departamento de Biología.

Universitat de les Illes Balears

Palma de Mallorca. Septiembre 2012



**Universitat de les
Illes Balears**

**Diversidad e importancia ecológica del grupo
Roseobacter en aguas costeras sometidas a
impacto antropogénico**

Tesis doctoral presentada por Juana María Piña Villalonga para optar al título de Doctora en el programa Microbiología Ambiental y Biotecnología, bajo la dirección de los Drs. Balbina Nogales Fernández y Rafael Bosch Zaragoza.

Vº Bº Directores Tesis

La doctoranda

Dra. Balbina Nogales

Dr. Rafael Bosch

Juana M^a Piña

Palma de Mallorca. Septiembre 2012

Agradecimientos

Han pasado algo más de seis años desde que llegue al laboratorio de Microbiología como alumna colaboradora. Llegué con ganas de aprender y de descubrir cómo era “el mundo de la investigación”. A lo largo de todo este tiempo he tenido el placer de coincidir con mucha gente a la que ahora me gustaría agradecer todo lo que han hecho por mí, que ha sido mucho.

En primer lugar me gustaría dirigirme a mis jefes y agradecerles la gran oportunidad que me han brindado. Gracias Balbina por abrirme las puertas del laboratorio, por todo lo que me has enseñado a lo largo de estos años, por tu paciencia, tus consejos, por tu apoyo y por confiar en mí incluso en los momentos en que ni yo lo hacía. A ti, Rafa, agradecerte la ayuda, los consejos, las buenas ideas y ese gran optimismo tuyo, que hace que las cosas no parezcan tan difíciles. Gracias a los dos, ha sido un placer aprender de vosotros.

A Jean quiero agradecerle la oportunidad de realizar una estancia en su laboratorio, todos los conocimientos adquiridos allí y el tiempo que dedicó a enseñarme. También me gustaría destacar su hospitalidad y la de su familia que hizo la estancia en el extranjero más agradable.

Al resto de jefes, Jorge, Elena y Toni, gracias por no haber dejado de enseñarme cosas desde la carrera hasta día de hoy.

A mis compañeros ha sido un placer trabajar con vosotros y me alegra poder decir que a algunos os considero también mis amigos. Si me remonto a cuando llegué al laboratorio, Mar fuiste la que guió mis primeros pasos y me enseñaste cuando aún era una alumna colaboradora. Joseph y Mariana, mis compis, que me enseñaron y aconsejaron al principio de esta

Agradecimientos

aventura. Joseph y Mar que fuiste los mejores anfitriones en tierras galas haciendo que me sintiera menos lejos de casa, muchísimas gracias. A ti Mariana mi compañera de mesa y de viaje, tú también eres mi prefe, por muy lejos que estés, *Saps que vull dir?*

Marga gracias por facilitarme la llegada al laboratorio siendo tan buena anfitriona con los nuevos, por tu apoyo y comprensión en los momentos difíciles y por tus buenos consejos.

David, mi compi de *English*, de aventuras por el mundo, mi confesor y amigo. Gracias por nuestras conversaciones, risas (y lloros) que hemos compartido, por escucharme siempre y por todos los buenos momentos vividos.

Arantxa no sé si voy a ser capaz de mostrar todo mi agradecimiento. Gracias por tu inestimable ayuda en esta tesis, por tus consejos, tus bromas que siempre me han arrancado una sonrisa incluso en los peores momentos y me han servido para quitarle hierro a los problemas. A mí querida compañera de pádel que me enseñó a no pegarle con ansia y a no hacer el tiro mariposa. Por todo lo mencionado y mucho más, me resulta imposible *cuantificar* mi agradecimiento ;-), aunque si multiplicamos la eficiencia por el número de Avogadro ($6,022 \times 10^{23}$)....

Bel que llegó al laboratorio como una bocanada de aire fresco, gracias por ser tan buena compañera, por animarme siempre. Tranquila que para mí siempre serás la peque.

Al resto de mis compañeros: Claudia S. por tu ayuda en los muestreos, a Cris, Magda y Claudia P. por los buenos momentos vividos, a Toni Busquets por las charlas, anécdotas y consejos (y pedirte perdón si alguna vez te he "puteado"), y por último, a Lady por enseñarme a ser más paciente.

Mohammed and Farid, it has been a pleasure for me to work with you. I have been very lucky to meet you and I will never forget you and what you taught me.

Me gustaría agradecer a los oficiales de laboratorio Ángel, Xisco y Guillem, porque con su trabajo facilitan el nuestro. También, al personal de los Servicios Científico-Técnicos, en especial a Trinidad y a Rosa por su buena disponibilidad y paciencia, así como a las niñas de Sebastián: Mariette, Laura e Imma.

También agradecer a Arantxa L. y Cifu por salir siempre al rescate ante nuestras llamadas de S.O.S.

Agradecer también a Mateu Bosch, nuestro patrón, que hizo posible algunos de los muestreos de esta tesis y a los alumnos de prácticum y colaboradores que me ayudaron en los muestreos.

Por último, agradecer a mis amigos, en especial a Cati, Miguel y Pico, que me habéis apoyado y animado a seguir adelante.

A mis padres que siempre han confiado en mí, ayudándome en los buenos y en los malos momentos, escuchando mis problemas aunque no entendieran nada de lo que decía, acompañándome al laboratorio a horas intempestivas. También pedir perdón porque habéis tenido que aguantar mi mal humor permanente.

Por último y más importante, nunca podré agradecer suficiente a Sebas todo el apoyo que me ha brindado durante este viaje, tanto a nivel profesional como a nivel personal, siendo mi luz cuando las cosas se ponían negras y mi bastón cuando me flaqueaban mis fuerzas. Perdón por mis momentos de obcecamiento y mal humor. Sin ti no habría podido llegar hasta aquí.

Agradecimientos

Agradecer también a los proyectos CTM2008-02574, FR2009-0106, CTM2011-24886, una ayuda de la Conselleria d'Educació, Cultura i Universitats a grupos competitivos (los dos últimos con co-financiación fondos FEDER) y una beca FPU del Ministerio de Educación, Ciencia, Cultura y Deporte que han aportados los fondos necesarios para la realización de esta tesis.

A mis padres
y a Sebas

ÍNDICE

Introducción	1
1. Los ecosistemas costeros marinos y el impacto humano	3
1.1. Contaminación de ambientes marinos por hidrocarburos	6
2. Comunidades microbianas en ambientes marinos contaminados por hidrocarburos	8
2.1. Ambientes sometidos a contaminación aguda	8
2.2. Ambientes sometidos a contaminación crónica	11
3. Características del clado <i>Roseobacter</i>	15
4. Evidencias de la participación de bacterias del clado <i>Roseobacter</i> en la degradación de hidrocarburos	22
Objetivos	35
Material y métodos	39
1. Toma de muestras	41
1.1. Muestreo de puertos	41
1.2. Muestreo para la elaboración de los microcosmos	43
2. Determinación de la concentración total de hidrocarburos	43
3. Preparación de los microcosmos	44
4. Recuento de procariotas totales e hibridación <i>in situ</i> con sondas fluorescentes (FISH)	46
5. Extracción de ácidos nucleicos totales de muestras de puertos deportivos	47
6. Extracción de ARN total de muestras de microcosmos	48
7. Transcripción inversa de ARN	49
8. Análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción terminales (T-RFLP)	50

9. Clonación y secuenciación	53
10. PCR cuantitativa a tiempo real	55
11. Aislamiento de cepas de <i>Roseobacter</i> e identificación mediante secuenciación de 16S ADNr	58
12. Análisis de los aislados mediante espectrometría de masas MALDI-TOF	59
13. Crecimiento de los aislados con hidrocarburos	62
14. Secuencias genómicas de aislados del clado <i>Roseobacter</i>	64
Resultados y discusión	67
Capítulo 1: Diversidad del clado <i>Roseobacter</i> en aguas de puertos deportivos	69
1. Caracterización de las muestras de agua	71
2. Recuentos microscópicos de procariontes totales y de grupos bacterianos específicos	75
3. Perfiles de T-RFLP de 16S ADNr de la comunidad total en puertos	79
4. Perfiles de T-RFLP de 16S ADNr de <i>Alphaproteobacteria</i> en puertos	86
5. Diversidad y dinámica del grupo <i>Roseobacter</i> en aguas de puertos	91
5.1. Identificación de las poblaciones de <i>Roseobacter</i> presentes en aguas de puertos	91
5.2. Abundancia y dinámica de <i>Roseobacter</i> en aguas de puertos deportivos	102
6. Inferencia de la composición de las comunidades bacterianas en puertos deportivos	114

Capítulo 2: Respuesta del grupo <i>Roseobacter</i> a la contaminación por hidrocarburos y nutrientes	121
1. Cambios en a la abundancia de procariotas totales y de grupos bacterianos específicos	125
2. Cambios de las comunidad bacteriana total en respuesta a los tratamientos	131
3. Cambios en el grupo <i>Roseobacter</i> tras la adición de diesel en respuesta a los tratamientos	138
4. Respuesta de las principales poblaciones bacterianas del bacterioplancton al tratamiento	152
4.1. <i>Gammaproteobacteria</i>	153
4.2. <i>Bacteroidetes</i>	157
4.3. <i>Cyanobacteria</i>	159
4.4. SAR11	161
Capítulo 3: Caracterización de aislados del clado <i>Roseobacter</i>	163
1. Identificación de los aislados en base a la secuenciación del gen del 16S ARNr	165
2. Diferenciación de los aislados por MALDI-TOF	172
3. Estudio genómico de los aislados	181
4. Crecimiento de los aislados del grupo <i>Roseobacter</i> con hidrocarburos como fuente de carbono y energía	191
Discusión general	199
Conclusiones	213
Bibliografía	221
Anexo	245

INTRODUCCIÓN

1. Los ecosistemas costeros marinos y el impacto humano

Las zonas costeras comprenden el área desde el límite de la costa hasta el final de la plataforma continental. Las zonas costeras son poco profundas (<200 m), aumentando la profundidad de forma gradual hasta el final de la plataforma continental. Estos ambientes se encuentran condicionados por factores naturales como la acción de olas y mareas, la radiación solar, las fluctuaciones en la temperatura y salinidad (debidas a la evaporación o aportes de agua dulce), y el aporte de materiales sedimentarios y nutrientes del continente (Tait y Dipper, 1998).

Además de los factores naturales, las costas se encuentran sometidas a un constante impacto antropogénico. La actividad humana causa un importante impacto sobre los ecosistemas marinos, provocando perturbaciones en el medio ambiente tanto de forma directa como indirecta. La contaminación de las zonas costeras provocada por el hombre crece al mismo tiempo que aumentan los usos que hace el hombre de la costa (Crain *et al.*, 2009). El 41% de los océanos se encuentran gravemente afectados por impacto antropogénico, de modo que aquellas regiones menos afectadas, son aquellas en las que el hombre tiene un acceso limitado (Halpern *et al.*, 2008). Las principales actividades que afectan al medio marino se muestran en la tabla I1, e incluyen entre otros, la pesca, la acuicultura, el desarrollo urbanístico, el turismo, el transporte marítimo, la industria, la agricultura, así como la extracción, el transporte y refinado de petróleo (Bernabé y Bernabé-Quet, 2000; Islam y Tanaka, 2004; Halpern *et al.*, 2007; 2008; Nogales *et al.*, 2011).

Las interacciones entre el mar y el continente son fundamentales para el funcionamiento de los ecosistemas costeros. Esto significa que las actividades del hombre en el continente también repercuten al medio marino (Halpern *et al.*, 2008; Crain *et al.*, 2009). Este problema se ve

agravado por el crecimiento rápido de las muchas ciudades costeras, en especial, las de la costa sur del Mediterráneo. Se estima que más del 39% de la población española (15,6 millones de personas) viven en la costa del Mediterráneo [*European Environment Agency* (EEA), 2006]. En zonas cuya actividad económica está basada en el turismo, como la costa del Mediterráneo, y en concreto las Islas Baleares, se añade la presión de una gran afluencia de turistas sobre todo en los meses de verano. Así en 2011, más de 15 millones de turistas visitaron las Islas Baleares, el 69% de los cuales lo hicieron entre los meses de mayo y septiembre (Conselleria de Turisme, INESTUR CITTIB, 2011). Para poner este número en contexto se ha de tener en cuenta que la población residente en las Islas Baleares en el año 2011 era de 1,11 millones de habitantes (datos de Ibestad: Instituto de Estadística de las Islas Baleares).

Como se ha mencionado anteriormente (tabla I1), la contaminación es uno de los riesgos para el ecosistema costero derivado de la actividad humana. Los contaminantes introducidos en el ecosistema costero afectan tanto a la columna de agua como a los sedimentos, actuando estos últimos como reservorios de estas sustancias, de modo que los contaminantes pueden volver a la columna de agua si se resuspenden. El efecto de estas perturbaciones sobre el medio marino es complejo, en parte porque normalmente se produce contaminación simultánea con varios compuestos diferentes y, además, porque los contaminantes pueden tener efectos aditivos, sinérgicos o incluso antagónicos. Esto proporciona una idea de la complejidad de la respuesta del ecosistema a las perturbaciones a las que se ve sometido (Crain *et al.*, 2009). Otro factor importante a tener en cuenta es la magnitud y la escala (desde el punto de vista temporal) del impacto, teniendo en cuenta que en los ecosistemas marinos las consecuencias del impacto no son siempre proporcionales a la cantidad de contaminante que entra en el sistema.

Tabla I1: Resumen de las actividades antropogénicas, contaminantes, impactos y riesgos asociados a éstas. (Extraído de Nogales *et al.*, 2011)

Actividad humana	Contaminantes	Impacto y riesgos asociados
Agricultura	Fertilizantes, pesticidas, antibióticos	Enriquecimiento en nutrientes, eutrofización, hipoxia/anoxia, desarrollo de <i>blooms</i> de algas perjudiciales, toxicidad, bioacumulación, patógenos, dispersión de resistencias a antibióticos
Desarrollo urbano	Desechos domésticos, lodos de depuradora	Enriquecimiento orgánico, eutrofización, patógenos (bacterias y virus), hipoxia/anoxia, desarrollo de <i>blooms</i> de algas perjudiciales, toxicidad por metales pesados, pérdida de servicios y valor recreacional, desperdicios (residuos sólidos)
Industria	Desechos de la industria, contaminantes orgánicos (xenobióticos), metales pesados, radionucleidos	Toxicidad, bioacumulación, incremento de la deposición atmosférica
Transporte marítimo	Hidrocarburos, xenobióticos (compuestos antiincrustantes y metales pesados), aguas de desecho, basura	Toxicidad, bioacumulación, introducción de especies exóticas, patógenos
Extracción y refinamiento de petróleo	Hidrocarburos	Toxicidad, bioacumulación
Combustión de combustibles fósiles	Hidrocarburos, metales pesados, calor, CO ₂	Toxicidad, incremento de la deposición atmosférica, calentamiento
Turismo (incluyendo las actividades náuticas recreativas)	Basura (plástico, colillas), desechos fecales, nutrientes, hidrocarburos, xenobióticos	Pérdida de fauna, acumulación en sedimentos, hipoxia/anoxia, pérdida de servicios y valor recreacional, enriquecimiento en nutrientes, desarrollo de <i>blooms</i> de algas perjudiciales, patógenos
Dragado y carga de sedimentos	Partículas, nutrientes, contaminantes orgánicos, metales pesados	Turbidez, disminución de la penetración de la luz, enriquecimiento en nutrientes, toxicidad y bioacumulación
Acuicultura	Carga orgánica, desechos fecales, antibióticos	Alta carga orgánica, hipoxia/anoxia en sedimentos, patógenos, introducción de especies exóticas, dispersión de resistencias a antibióticos
Pesca	Descarte de peces, patógenos, hidrocarburos, xenobióticos	Destrucción del hábitat, disminución de la cantidad de peces, patógenos, toxicidad, bioacumulación
Urbanismo y deforestación		Erosión, incremento de la escorrentía desde el continente

El impacto de la perturbación depende también de las características del lugar donde ésta se produce, entre las que cabe destacar el efecto de las mareas, hidrología (controlada entre otros por la geografía, el viento o la desembocadura de ríos y torrentes), propiedades ópticas del agua (como la turbidez), la profundidad del agua, condiciones meteorológicas y climáticas, etc. (Cloern, 2001; Paerl, 2006; Cloern y Jassby, 2008).

1.1. Contaminación de ambientes marinos por hidrocarburos

Entre los contaminantes principales de los ecosistemas marinos se encuentran los hidrocarburos. A pesar de la percepción que impera en nuestra sociedad, las principales fuentes de contaminación por hidrocarburos en el océano no son los vertidos accidentales, sino que se centran en las filtraciones naturales así como en el tráfico marítimo, vertidos ilegales y deposición atmosférica (*Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection*, 2007). Así, la figura I1 muestra las principales fuentes de entrada de crudo en el medio marino y el aporte medio de cada una de ellas.

Las imágenes de vigilancia aérea o de satélite obtenidas de la superficie del mar (Ferraro *et al.*, 2009) permiten detectar este tipo de contaminación (Figura I2). Gracias a ellas, se estima que al menos se producen 3000 descargas ilegales en mares europeos cada año, que coinciden con las principales rutas marítimas. A pesar de ser descargas de pequeñas cantidades de hidrocarburos, su elevada frecuencia supone, al ser consideradas en conjunto, un evento de contaminación del mismo orden de magnitud que el atribuible a un vertido accidental (EEA, 2010).

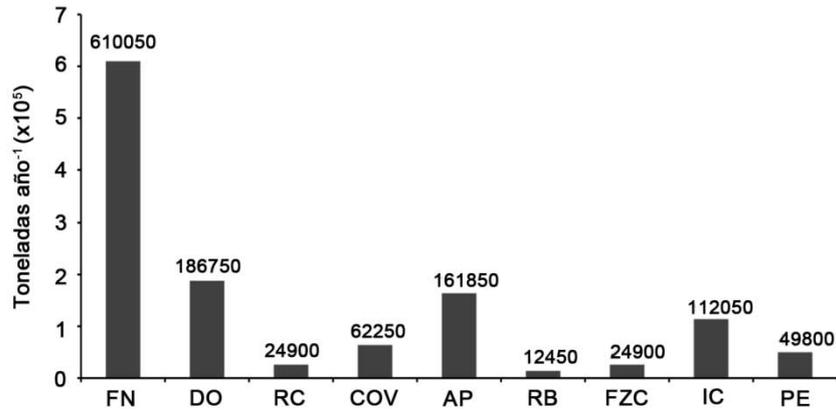


Figura I1: Promedio de entradas anuales de petróleo en el mar procedente de los buques y otras actividades marítimas (datos extraídos de *Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection*, 2007). Las abreviaciones indican: FN, filtraciones naturales; DO, descargas operacionales, RC, relacionadas con la carga; COV, compuestos orgánicos volátiles; AP, accidentes de petroleros; RB, recirculación de barcos; FZC, fuera de zonas costeras; IC, instalaciones costeras; PE, pequeñas embarcaciones.

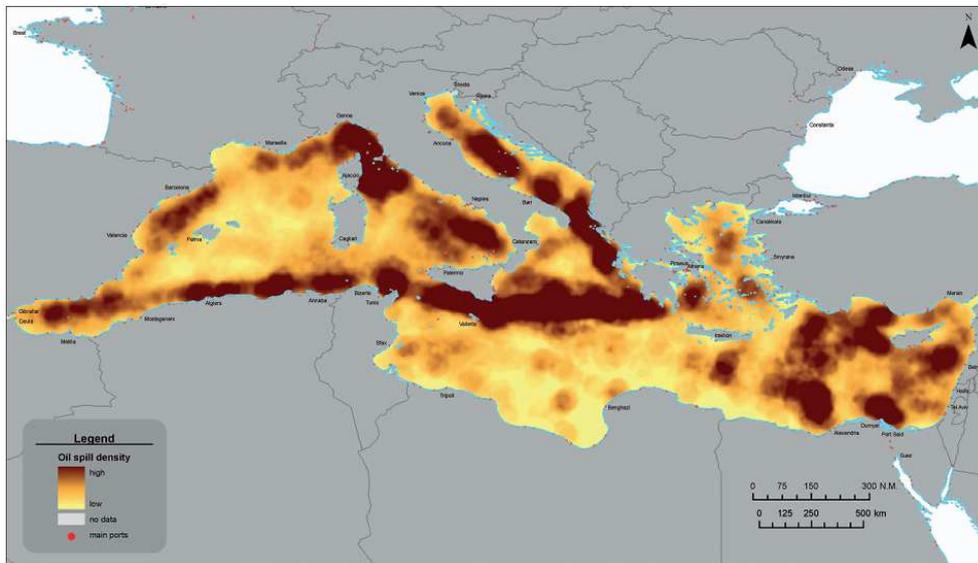


Figura I2: Densidad de vertidos de crudo en el mar Mediterráneo en el periodo 1990-2004 (extraído de Ferraro *et al.*, 2009).

Así, por ejemplo, en el Mediterráneo, se vertieron 80.000 toneladas de crudo entre 1990 y 2005 como consecuencia de accidentes de petroleros, mientras que, en este mismo periodo, se vertieron anualmente 250.000 toneladas de crudo debido a descargas operacionales - lavado de los tanques, deslastrado, descargas de combustible, etc (EEA, 2006).

2. Comunidades microbianas en ambientes marinos contaminados por hidrocarburos

2.1. Ambientes sometidos a contaminación aguda

Se han realizado numerosos estudios para determinar el efecto de la contaminación por hidrocarburos sobre la diversidad y el funcionamiento de las comunidades microbianas marinas. En la mayoría de los casos se ha analizado el efecto de vertidos simulados (como ejemplo de contaminación aguda en muestras sin historial previo de contaminación) y la respuesta microbiana frente a ensayos de biorremediación, que implican normalmente la adición de nutrientes (revisado en Head *et al.*, 2006; Yakimov *et al.*, 2007; Brooijmans *et al.*, 2009). En estos casos, se observa en general una disminución en la diversidad microbiana a corto plazo debido a la desaparición de determinados grupos de microorganismos (como arqueas y cianobacterias) y a la selección de bacterias especializadas en la degradación de hidrocarburos, las cuales se convierten en predominantes en las condiciones de estos ensayos (Head *et al.*, 2006; Yakimov *et al.*, 2007).

La eficiencia de la degradación microbiana de hidrocarburos en las zonas costeras se encuentra determinada por múltiples factores como el tipo de hidrocarburo, las condiciones ambientales (temperatura, pH, oxígeno disuelto, mezcla del agua por acción de las olas, etc.), y la concentración de nutrientes (Brooijmans *et al.*, 2009). Todos estos factores

influyen en la selección de la composición de la comunidad microbiana que lleva a cabo el proceso de biodegradación (Berthe-Corti y Bruns, 1999; Kasai *et al.*, 2002; Röling *et al.*, 2002; Yakimov *et al.*, 2005).

Se conocen varios géneros de bacterias marinas degradadoras de hidrocarburos, principalmente pertenecientes a la clase *Gammaproteobacteria* (figura I3). Algunas de estas bacterias están altamente especializadas en la degradación de hidrocarburos, como es el caso de las bacterias marinas degradadoras obligadas de hidrocarburos (OHCB) que incluyen los géneros *Alcanivorax*, *Thalassolituus*, *Cycloclasticus*, *Oleiphilus* y *Oleispira* (Yakimov *et al.*, 2007). Otros géneros (*Marinobacter* y *Neptunomonas*) son más generalistas puesto que son capaces de utilizar otras fuentes de carbono (Gauthier *et al.*, 1992; Hedlund *et al.*, 1999; Yakimov *et al.*, 2007).

En los experimentos de vertidos simulados se ha demostrado que tras la contaminación por petróleo o componentes de éste, se produce un rápido crecimiento de bacterias del grupo OHCB que, o bien estaban presentes en la comunidad microbiana en niveles bajos o eran indetectables antes de la contaminación. El tipo de OHCB que prolifera frente a un episodio de contaminación depende de la temperatura, del tipo de hidrocarburo (p.e. crudo, hidrocarburos alifáticos con o sin ramificaciones, aromáticos) y de si se adicionan nutrientes conjuntamente (Head *et al.*, 2006; Berthe-Corti y Nachtkamp, 2010). En el ambiente marino, la concentración de nutrientes, especialmente nitrógeno y fósforo, es insuficiente para satisfacer los requisitos microbianos, sobre todo después de un incremento en la concentración de hidrocarburos por un vertido. Por ello, se añade nitrógeno y fósforo para estimular el crecimiento de microorganismos degradadores y aumentar la tasa de biodegradación (Harayama *et al.*, 2004; Cappello *et al.*, 2007).

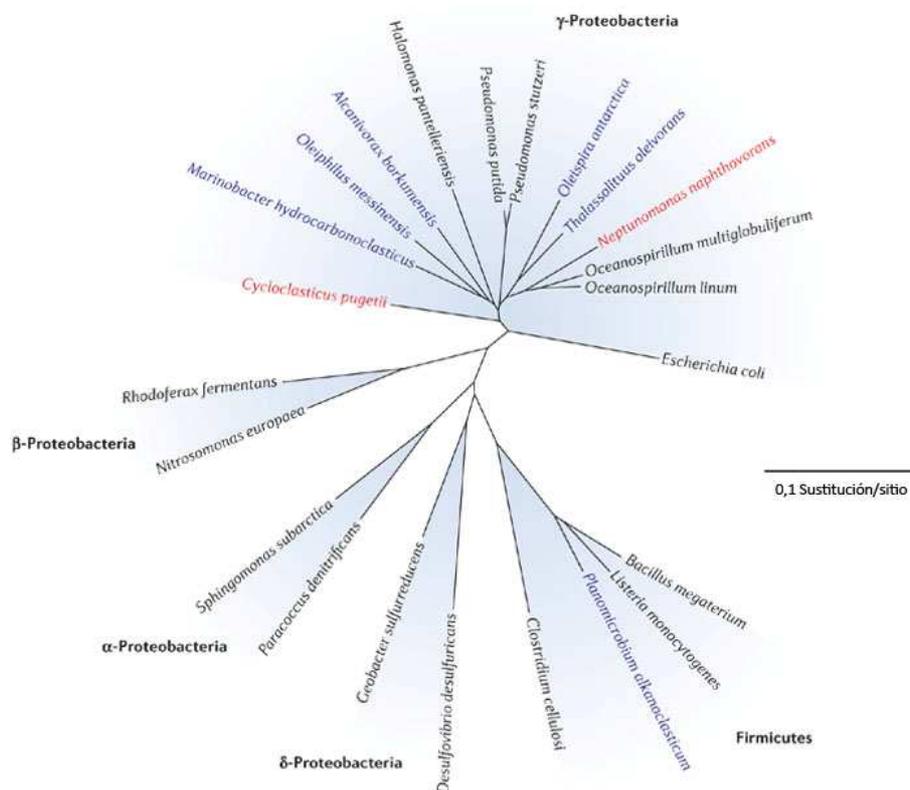


Figura I3: Árbol filogenético de la diversidad de bacterias aeróbicas degradadoras de hidrocarburos. Los organismos marcados en azul pueden degradar hidrocarburos saturados, en rojo los que degradan hidrocarburos poliaromáticos (extraído de Head *et al.*, 2006).

La proliferación de OHCB, y otras bacterias degradadoras como por ejemplo *Marinobacter*, conlleva una rápida degradación de hidrocarburos, que se suele ver acelerada por la adición de nutrientes limitantes (Yakimov *et al.*, 2007; Coulon *et al.*, 2007; McKew *et al.*, 2007a). Además, se ha demostrado que hidrocarburos de diferentes tipos ejercen una presión selectiva sobre especies bacterianas de determinados géneros. Así, la presencia de hidrocarburos alifáticos favorece la proliferación de bacterias del género *Alcanivorax*, mientras que *Cycloclasticus* se ve favorecido por la

adición de hidrocarburos poliaromáticos (Head *et al.*, 2006; McKew *et al.*, 2007a; McKew *et al.*, 2007b).

2.2. Ambientes sometidos a contaminación crónica

A diferencia de lo que ocurre en los episodios agudos de contaminación, la diversidad microbiana es alta en ambientes crónicamente contaminados, como por ejemplo, zonas próximas a refinerías de crudo o donde se realizan actividades náuticas o marítimas como los puertos (Nogales, 2010). En general, los estudios de diversidad realizados en ambientes contaminados crónicamente han mostrado que las bacterias marinas típicas degradadoras de hidrocarburos no son las más abundantes en estos ambientes, sino que serían componentes minoritarios (Berthe-Corti y Nachtkamp, 2010; Nogales, 2010). Por ejemplo, no se detectaron secuencias de 16S ADNr de *Alcanivorax* en genotecas de mesocosmos preparados con agua del puerto Messina. Sin embargo este género bacteriano se convirtió en predominante pasados 15 días desde la adición de petróleo y nutrientes a mesocosmos preparados con este agua (Cappello *et al.*, 2007). Del mismo modo, en un estudio de diversidad realizado en la zona de Cala Penyes Rotges (Mallorca), no se detectó la presencia de *Alcanivorax* en el agua del puerto mediante técnicas moleculares, aunque se obtuvieron aislados relacionados con *Alcanivorax borkumensis* (Nogales *et al.*, 2007). Si las bacterias marinas típicas degradadoras de hidrocarburos no son las más abundantes en ambientes contaminados crónicamente cabe preguntarse cuáles son las bacterias predominantes en estos ambientes.

Varios estudios realizados en ambientes crónicamente contaminados por hidrocarburos han demostrado que el número de procariontes totales de estos ambientes es mayor (alrededor de 10^6 células ml^{-1}) en comparación a las aguas costeras próximas (Schauer *et al.*, 2000;

Nogales *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007), debido al enriquecimiento en nutrientes. Pero además, la composición de las comunidades bacterianas de ambientes crónicamente contaminados es distinta de las comunidades de las zonas adyacentes (Nogales *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007). Los índices de diversidad calculados a partir de los perfiles electroforéticos basados en el 16S ARNr o de genotecas indican normalmente que la diversidad bacteriana en aguas de puertos es mayor (Schauer *et al.*, 2000; Nogales *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007; Aguiló-Ferretjans *et al.*, 2008), aunque en ocasiones se ha observado lo contrario, como por ejemplo en el puerto de Messina (Denaro *et al.*, 2005).

El estudio comparativo de comunidades bacterianas presentes en aguas con diferente grado de contaminación por hidrocarburos más completo realizado hasta el momento fue el publicado por Nogales y colaboradores (2007). El estudio se realizó en un puerto deportivo de la Isla de Mallorca (Puerto Adriano, Calvià) tomando muestras durante 14 meses en diferentes puntos del puerto, la playa adyacente y en un cuadrante que cubría la bahía donde se encuentra el puerto (la muestra tomada en la zona más alejada se consideró limpia de contaminantes). La diversidad bacteriana se analizó por la técnica de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción terminales (T-RLFP) basado en 16S ADNr y se elaboraron genotecas del mismo gen. Mediante el análisis de los perfiles de T-RFLP se observó la existencia de una dinámica temporal de las comunidades. De este modo, las comunidades bacterianas de las muestras tomadas en la playa y en el puerto en los meses de verano (cuando se produce un mayor impacto antropogénico) eran más similares entre ellas que con las muestras de las zonas más alejadas de la bahía; mientras que en invierno (cuando la actividad náutica es reducida) las muestras de playa eran más similares a las de la bahía. En este estudio, las diferencias en la composición de las comunidades bacterianas pudieron

asociarse al grado de oligotrofia del agua. Así, la abundancia de grupos típicos de ambientes oligotróficos como SAR11, disminuía en las zonas de influencia del puerto. En cambio, en el puerto predominaban bacterias marinas típicas de ambientes mesotróficos como por ejemplo *Bacteroidetes*, gammaproteobacterias marinas oligotróficas (OMG) o *Roseobacter*. El clado de *Roseobacter* fue detectado como el más abundante en las muestras de puerto, aunque su abundancia fue irregular durante los catorce meses de muestreo. Además, se encontraron dos fragmentos de restricción terminales (T-RFs) identificativos de dos poblaciones de este grupo, que presentaban una distribución espacial opuesta (Figura I4).

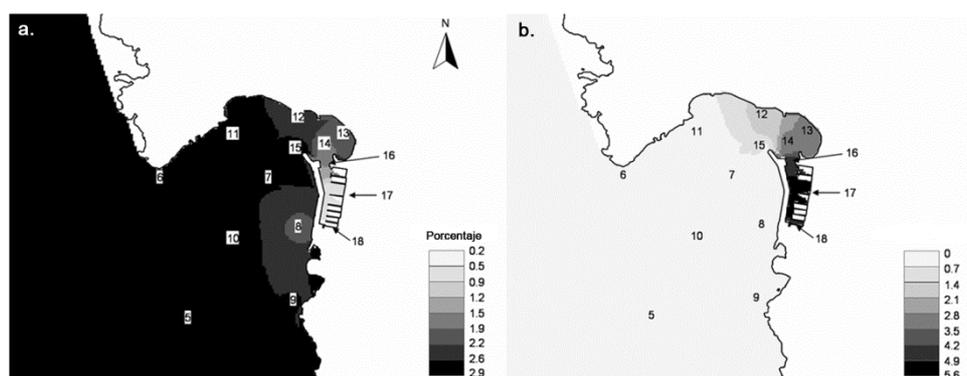


Figura I4: Abundancia relativa de dos T-RFs identificativos del clado *Roseobacter*. Se representa la abundancia del T-RF 5'-A213,2 (a) y el T-RF 5'-A213,8 (b) sobre la superficie muestreada en Puerto Adriano y la bahía Cala Penyes Rotges (extraído de Nogales *et al.*, 2007).

Una de las poblaciones se detectó principalmente en las muestras que estaban fuera de la influencia del puerto, mientras que la segunda era abundante en el interior del puerto y estaba presente también en su zona de influencia (Nogales *et al.*, 2007; Aguiló-Ferretjans *et al.*, 2008). Esto indicaría la presencia en el ambiente de diferentes poblaciones

pertenecientes al clado *Roseobacter*, con diferente capacidad de proliferación en ambientes contaminados o prístinos.

En un estudio preliminar puntual se analizaron las comunidades bacterianas de 17 puertos deportivos de la Isla de Mallorca en enero de 2002 y se concluyó que el clado *Roseobacter* era el grupo predominante en la mayoría de ellos como muestra la figura I5 (Aguiló-Ferretjans, 2009).

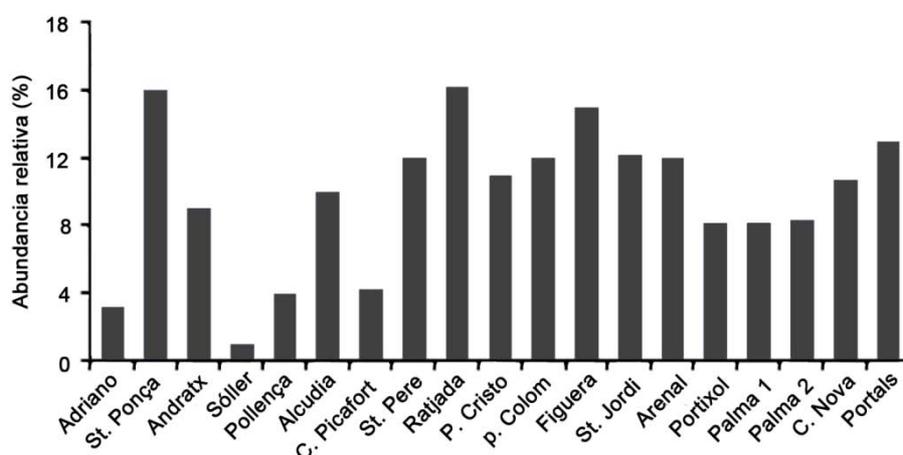


Figura I5: Abundancia relativa de un T-RF identificativo del clado *Roseobacter* (extraído de Aguiló-Ferretjans, 2009).

La presencia de este grupo bacteriano también ha sido detectada en otros estudios de diversidad realizados en este tipo de ambientes, como es el caso del puerto de Xiamen en China (Ma *et al.* 2009), el puerto Victoria en Hong Kong (Zhang *et al.*, 2007), e incluso se han obtenido aislados del puerto de Semarang (Harwati *et al.*, 2007). Aunque el clado *Roseobacter* es importante en ambientes marinos, principalmente costeros, y sus miembros tienen características muy interesantes (ver apartado 3), no se conoce en profundidad la diversidad del grupo *Roseobacter* en ambientes contaminados crónicamente, ni su abundancia y papel en la ecología de ambientes sometidos a impacto antropogénico.

3. Características del clado *Roseobacter*

El clado *Roseobacter* es un grupo filogenéticamente coherente que pertenece a la familia *Rhodobacteraceae* de la clase *Alphaproteobacteria*. Es un grupo muy heterogéneo desde el punto de vista fenotípico como se muestra a continuación. La mayoría son bacterias heterotrófas pero también tienen capacidad para obtener energía por litheterotrofia y hay bacterias de este grupo capaces de realizar fototrofia anoxigénica aeróbica (Buchan *et al.*, 2005; Wagner-Döbler y Biebl, 2006; Moran y Miller, 2007). Hasta este momento, se han descrito 143 especies agrupadas en 60 géneros, que se han aislado principalmente de ambientes marinos o hipersalinos. Además, el clado *Roseobacter* se ha detectado mediante métodos moleculares en prácticamente todos los ambientes marinos estudiados, que incluyen muestras de sedimentos, hielo marino, *biofilms*, nieve marina, corales o fitoplancton, además de muestras de agua (Buchan *et al.*, 2005; Wagner-Döbler y Biebl, 2006). La figura I6 muestra el número de clones o aislados del clado *Roseobacter* obtenidos de diferentes ambientes (Buchan *et al.*, 2005).

Estudios moleculares basados en el gen del 16S ARNr mostraron que este grupo representa más del 20% de la comunidad de bacterioplancton en zonas costeras y un 15% en zonas oceánicas (Buchan *et al.*, 2005). Estos autores realizaron un análisis filogenético profundo basado en el gen del 16S ADNr tanto de clones como de las especies descritas hasta ese momento, identificando los subgrupos más importantes dentro del clado, e intentaron relacionar estos subgrupos con el ambiente en el que habían sido detectados y/o aislados.

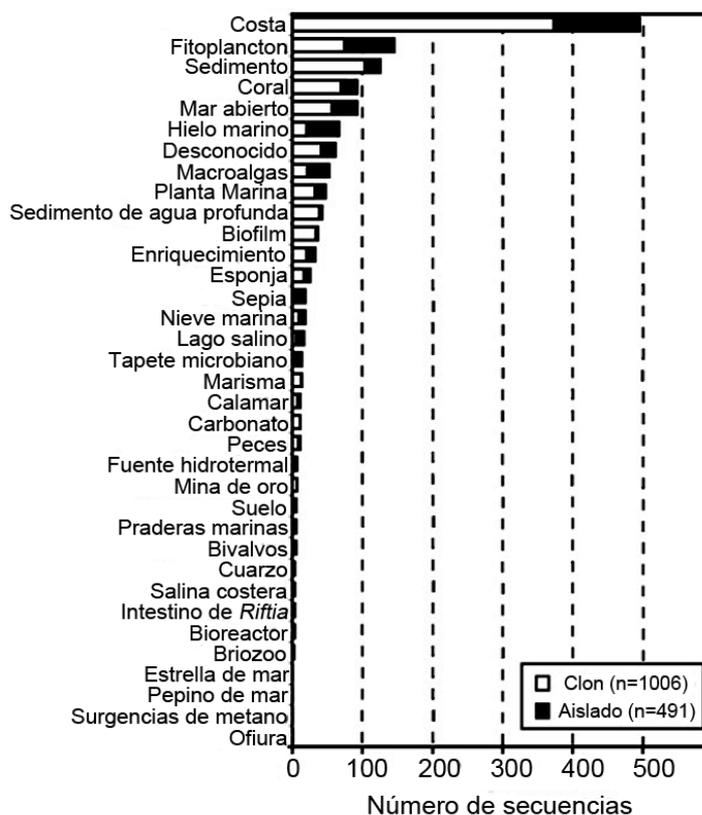


Figura I6: Se indica el tipo (clon o aislado) y origen (ambiente muestreado) de las secuencias del gen del 16S ADNr de *Roseobacter* (extraído de Buchan *et al.*, 2005).

Obtuvieron 67 subgrupos de los cuales el 42 contenían secuencias de aislados y de clones, 23 sólo secuencias de aislados y 2 sólo clones. Los grupos principales parecían estar estrechamente relacionados con el ambiente del que habían sido obtenidos, por ejemplo, los miembros del grupo AS-21 se han aislado en su mayoría de la costa. Sin embargo, la variabilidad evidente dentro de esos grupos sugería que la secuencia del 16S ADNr por sí sola no era un indicador fiable que permitiese relacionar con el nicho ecológico, y por tanto, no permitía la clasificación desde el punto de vista funcional. Además, estos autores observaron que la filogenia del clado basada en secuencias de 16S ADNr era problemática y

poco robusta debido a la inestabilidad de las ramas del árbol filogenético (Buchan *et al.*, 2005; Brinkhoff *et al.*, 2008). Asimismo, sólo 5 de los 60 géneros descritos hasta el momento están representados por 5 o más especies descritas y más de la mitad de los géneros están representados por una sola especie válidamente descrita. Además, se han dado casos en los que especies distintas presentaban valores de similitud de secuencia del 16S ARNr del 99% (p.e. *Phaeobacter inhibens* o *Maribius salinus*) estando adscritas, incluso, a géneros distintos. Todo esto contribuye a la inestabilidad de la filogenia de este grupo y de la topología de los árboles de 16S ARNr.

Las bacterias del clado de *Roseobacter* tienen un estilo de vida generalista (Moran *et al.*, 2004, Moran *et al.*, 2007) y una gran versatilidad metabólica, siendo capaces de utilizar recursos variados y de responder a incrementos en la concentración de nutrientes. Estas características explican su abundancia en las zonas costeras, así como su asociación a *blooms* de algas (Buchan *et al.*, 2005). Se han descrito dinámicas temporales que muestran que el clado *Roseobacter* es más abundante cuando hay mayor disponibilidad de nutrientes como se observó en la bahía Franklin, del Ártico (Alonso-Sáez *et al.*, 2008) y la bahía de Blanes, en el Mediterráneo Occidental (Alonso-Sáez *et al.*, 2007).

A diferencia de otras alphaproteobacterias marinas (p.e. SAR11), los miembros del clado *Roseobacter* son fácilmente cultivables lo que los convierte en modelos excelentes para el estudio de la ecología y fisiología de bacterias marinas generalistas. Gracias a esto se dispone de mucha información procedente de la secuenciación de genomas que ayuda a entender el metabolismo de las bacterias de este grupo y su relevancia para el funcionamiento del ecosistema marino. Hasta el momento se ha publicado la descripción de ocho genomas completos de bacterias

pertenecientes al clado *Roseobacter*: *Ruegeria pomeroyi* DSS-3 (Moran *et al.*, 2004), *Roseobacter denitrificans* Och 114 (Swingley *et al.*, 2007), *Dinoroseobacter shibae* DFL 12 (Wagner-Döbler *et al.*, 2010); *Ketogulonicigenium vulgare* Y25 (Xion *et al.*, 2011), *Ketogulonicigenium vulgare* WSH-001 (Liu *et al.*, 2011), *Roseobacter litoralis* Och 149 (Kalhoefer *et al.*, 2011), *Jannaschia* sp. CCS1 y *Ruegeria* sp. TM1040 (Moran *et al.*, 2007) y un total de 36 genomas están en estado de boceto (*National Center for Biotechnology Information*, NCBI: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/MICROBES/microbial_taxtree.html). Entre éstos se encuentra el genoma de *Citricella aesturii* 357, bacteria aislada de la arena de una playa contaminada con petróleo del Prestige, cuyo genoma ha sido secuenciado y publicado recientemente por nuestro grupo (Suárez-Suárez *et al.*, 2012). Los genomas de *Roseobacter* secuenciados hasta el momento muestran la gran versatilidad de mecanismos para la obtención de energía y carbono que tienen estas bacterias. A continuación, se describen algunas de las características fisiológicas de este grupo microbiano.

Algunos miembros del clado *Roseobacter* tienen bacterioclorofila *a*, lo que les permite captar energía del sol mediante fototrofia anoxigénica aeróbica, AAnP (Buchan *et al.*, 2005; Wagner-Döbler y Biebl, 2006; Brinkhoff *et al.*, 2008). Esta estrategia metabólica se conoce como fotoheterotrofia, que significa que la luz del sol puede aportar energía a los organismos aunque éstos siguen requiriendo materia orgánica como fuente de carbono (Tang *et al.*, 2009). Se ha dicho que el proceso de AAnP no se encuentra directamente ligado a la fijación de CO₂ porque no se ha detectado la presencia de genes para el ciclo del Calvin, ni de su enzima clave, la RuBisCO (a excepción de *Pelagibaca bermudensis*), en los genomas de miembros del clado *Roseobacter* estudiados hasta el momento (Wagner-Döbler y Biebl, 2006). Así, *Roseobacter denitrificans*

Och 114 puede fijar CO₂ (con independencia de la luz) mediante vías anapleróticas pero no puede crecer con una fuente de carbono inorgánico como CO₂ o bicarbonato (Swingley *et al.*, 2007; Tang *et al.*, 2009).

Otro rasgo metabólico que encontramos en las bacterias de este grupo es la capacidad de oxidación de monóxido de carbono, un compuesto que se produce cuando la luz del sol oxida la materia orgánica disuelta. Esta capacidad se ha descrito en la mayoría de los miembros del grupo (Newton *et al.*, 2010). La oxidación de CO, así como la AAnP, son dos mecanismos por medio de los cuales estas bacterias heterótrofas pueden obtener energía a partir de compuestos inorgánicos o la luz solar, respectivamente, lo que representa una adaptación al ecosistema marino, considerado en general como oligotrófico (Wagner-Döbler y Biebl, 2006). Estos procesos afectan a la eficiencia con la que el carbono orgánico es incorporado a la cadena trófica, así como, a la producción y liberación de gases importantes (CO y CO₂) desde el punto de vista climático (figura I7) (Moran y Miller, 2007).

Otra característica interesante de los miembros del clado *Roseobacter* es su capacidad para utilizar dimetil-sulfonilpropionato (DMSP). Bacterias de este grupo son las únicas bacterias conocidas hasta el momento que poseen la vía de degradación y la de demetilación/detirolación del dimetil-sulfonipropionato (DMSP), a veces incluso en el mismo organismo, como es el caso de *Ruegeria pomeroyi* DSS-3 (Moran *et al.*, 2003). El DMSP es un compuesto que es producido en grandes cantidades como osmoprotector por parte de micro- y macroalgas y plantas halófitas. Éste puede ser liberado al océano por muerte celular o exudados y es, probablemente, la mayor fuente de azufre y carbono para las bacterias marinas

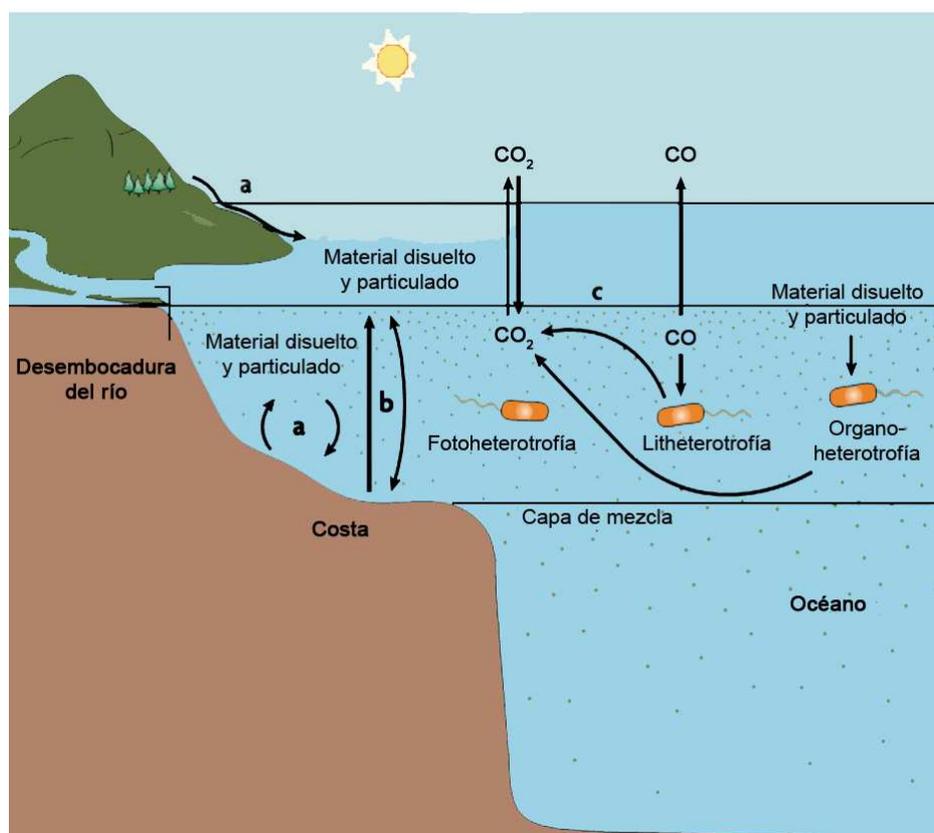


Figura 17: Metabolismo bacteriano ligado a la luz en ambientes costeros. Los aportes de los sistemas terrestres y de los sedimentos del fondo provocan que las concentraciones de materia orgánica de las zonas costeras sean mayores que las del mar abierto. Estos aportes de materia orgánica determinan la penetración de la luz (en especial del rango del ultravioleta, entre 280-315 nm) y el carbono orgánico disuelto (DOC) disponible (a). El intercambio de gases entre el océano y la atmósfera afecta a una importante porción de la columna de agua debido a procesos de mezcla (b). Los aportes de carbono y las propiedades ópticas del agua superficial determinan la generación de energía a partir de carbono orgánico disuelto, DOC (por organotrofia), fotodegradación inorgánica de productos similares al CO (por litotrofia) o captación de energía de la luz (por fototrofia) (c). La energía generada por organotrofia y la oxidación del CO da lugar a la formación de CO_2 , pero no la energía obtenida por fototrofia. La importancia relativa de estos procesos tiene implicaciones en la eficiencia con la que el carbono orgánico es incorporado en la cadena trófica y en la formación y liberación de gases importantes desde el punto de vista climático, CO_2 y CO (extraído de Moran y Miller, 2007).

Uno de los productos generados durante la degradación del DMSP es el dimetilsulfuro (DMS), que está presente de forma universal en el océano y es emitido a la atmosfera. Allí, actúa como núcleo de condensación en la formación de nubes y contribuye a contrarrestar el calentamiento global. De nuevo queda patente el importante papel que juega este grupo en los ciclos globales del carbono y del azufre, así como la influencia que ejerce sobre el clima (Buchan *et al.*, 2005; Wagner-Döbler y Biebl, 2006; Moran y Miller, 2007).

Algunos miembros del clado *Roseobacter* establecen relaciones simbióticas con organismos marinos eucariotas. Así, *Dinoroseobacter shibae* DFL 12 se aisló del dinoflagelado *Prorocentrum lima* con el que puede mantener una relación de simbiosis (Biebl *et al.*, 2005). Este dinoflagelado puede cultivarse de forma axénica (cultivos libres de bacterias) en medio mineral suplementado con tiamina (B₁), cobalamina (B₁₂) y biotina (B₇) o vitamina H. El estudio del genoma de *D. shibae* mostró la capacidad de esta bacteria de producir dos de estas vitaminas (B₁ y B₁₂) y proporcionárselas a su hospedador, mientras que el dinoflagelado por su parte proporciona productos de la fotosíntesis a la bacteria (Wagner-Döbler *et al.*, 2010). También se han descrito ejemplos de relaciones antagónicas con metazoos. Por ejemplo, *Roseovarius crassostreae* CV919-312 se describió como la causa aparente de la enfermedad juvenil de la ostra, *Crassostrea virginica* (Boettcher *et al.*, 2005). Seyedsayamdost y colaboradores (2011) propusieron que la interacción entre *Phaeobacter gallaeciensis* y el alga *Emiliania huxleyi* tenía dos fases. En la primera fase (mientras el alga es joven) mantienen una relación mutualista en la que la bacteria produce antibióticos, que protegen al alga de posibles infecciones, y ácido fenilacético que promueve el crecimiento del alga. En la segunda fase, cuando la densidad del alga es elevada o se encuentra en senescencia, *P. gallaeciensis* produce toxinas

que matan el alga. Este cambio de mutualismo a patogénesis permite a la bacteria disociarse del alga vieja y buscar nuevos hospedadores.

Otra característica interesante de las bacterias de este grupo es que pueden producir antibióticos o metabolitos secundarios bioactivos, que pueden estar involucrados en los efectos patogénicos o probióticos (Wagner-Döbler y Biebl, 2006; Seyedsayamdost *et al.*, 2011). Por último, de su capacidad de degradación de compuestos aromáticos se hablará en el siguiente apartado.

4. Evidencias de la participación de bacterias del clado *Roseobacter* en la degradación de hidrocarburos

Existen varias evidencias que relacionan a bacterias del clado *Roseobacter* con la contaminación, y posible degradación de hidrocarburos. En un trabajo dedicado al estudio de bacterias degradadoras de lignina, Buchan y colaboradores (2000) analizaron seis cepas del clado *Roseobacter* de aguas y sedimentos de estuarios y de la costa sureste de Estados Unidos. Cinco de estos aislados se obtuvieron bajo presión selectiva, mediante enriquecimientos en lignina y monómeros aromáticos, mientras que, el sexto se aisló en un medio pobre en nutrientes y no selectivo (González y Moran, 1997; González *et al.*, 1997). Se comprobó la capacidad de esos aislados de crecer con compuestos aromáticos: antranilato, benzoato, salicilato, vanillato, ferulato, protocatecuato, coumarato y p-hidroxibenzoato. Todos los aislados mostraron capacidad de crecer con al menos dos de los ocho sustratos probados. Además, se demostró la presencia de la vía β -cetoadipato en todos los aislados analizados, por lo que los autores sugirieron que la degradación de compuestos aromáticos era una habilidad generalizada dentro del clado *Roseobacter*.

Brito y colaboradores (2006) aislaron 8 cepas de *Roseobacter* de sedimentos de un manglar en Brasil (bahía de Guanabara), utilizando agua de mar artificial suplementada con pireno, naftaleno o fluorantreno como únicas fuentes de carbono. Todas estas cepas fueron capaces de transformar estos hidrocarburos poliaromáticos en cultivo puro, con diferentes niveles de capacidad (entre el 10-100%). Posteriormente, Harwati y colaboradores (2007) obtuvieron 89 aislados del clado *Roseobacter* de aguas procedentes del puerto Semarang y demostraron la capacidad de 40 de ellos para degradar componentes del crudo (n-alcános, alquilnaftalenos, alquilfenantrenos, alquilfluorenos y alquildibenzotiofenos). De estos 40 aislados, se les pudo asignar un género a 39 de ellos [*Maribius* (6), *Loktanella* (9), *Roseivivax* (4), *Salipiger* (7), *Roseovarius* (11) y *Jannaschia* (2)]. La otra cepa restante pertenecía a un género nuevo y fue descrita como *Tropicibacter naphthalenivorans*, bacteria capaz de degradar hidrocarburos aromáticos policíclicos (Harwati *et al.*, 2009). Por último, la especie tipo *Wenxinia marina* fue aislada de sedimentos de un yacimiento petrolífero, aunque no se ha estudiado su capacidad para degradar hidrocarburos (Ying *et al.*, 2007). Cabe destacar que en ninguno de estos trabajos se han descrito genética o bioquímicamente las rutas de degradación de hidrocarburos.

Por otra parte, en varios estudios de diversidad microbiana se ha detectado la presencia de miembros del clado *Roseobacter* en ambientes contaminados con hidrocarburos, como son Puerto Adriano, en la isla de Mallorca (Nogales *et al.*, 2007), Puerto Victoria, en Hong Kong (Zhang *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2009) y Puerto Xiamen, en Singapur (Ma *et al.*, 2009). También se ha visto que son uno de los grupos presentes en experimentos de degradación de hidrocarburos (tabla I2).

Tabla I2: Presencia de *Roseobacter* en comunidades bacterianas expuestas a hidrocarburos (Modificado de Buchan y González, 2010)

Origen muestra	Tratamiento ^a	Método ^b	Abundancia de <i>Roseobacter</i>	Referencia
Mar del Norte, agua superficial	Crudo	Genoteca	>85%	Brakstad <i>et al.</i> (2005)
Golfo de Alaska, sedimentos contaminados con crudo	Crudo	Genoteca	20%	Chang <i>et al.</i> (2000)
Estuario del Támesis, Reino Unido, agua superficial	Crudo	Genoteca	15%	Coulon <i>et al.</i> (2007)
Bahía Heita, Japón, agua superficial	Hexadecano	DGGE	n.d. ^c	Hara <i>et al.</i> (2003)
Etang de Berre, Francia, tapetes microbianos contaminados con crudo	Ninguno	Genoteca	15%	Hernández-Raquet <i>et al.</i> (2006)
Etang de Berre, Francia tapetes microbianos contaminados con crudo	Benzotiofeno	DGGE	n.d. ^c	Hernández-Rquet <i>et al.</i> (2006)
Estuario del Támesis, Reino Unido, agua superficial	Decano	Genoteca	15%	McKew <i>et al.</i> (2007a)
Estuario del Támesis, Reino Unido, agua superficial	Hexadecano	Genoteca	21%	McKew <i>et al.</i> (2007a)
Estuario del Támesis, Reino Unido, agua superficial	Mezcla de alcanos	Genoteca	23%	McKew <i>et al.</i> (2007a)
Estuario del Támesis, Reino Unido, agua superficial	Crudo	Genoteca	3%	McKew <i>et al.</i> (2007a)
Sub-Antártico, agua superficial	Crudo	Genoteca	45%	Prabakaran <i>et al.</i> (2007)

^a Enriquecimientos.

^b Genotecas y DGGE basados en el gen del 16S ARNr.

^c n.d.= no determinado. No se determinó la representación, pero era la banda aparentemente más abundante en el análisis de DGGE.

En un estudio de biodegradación realizado en aguas adyacentes a una plataforma petrolífera se observó un incremento en la abundancia relativa de secuencias de 16S ARNr de *Roseobacter* del 21 al 89%. En concreto, se observó un incremento en el número de secuencias de los géneros *Sulfitobacter* y *Roseobacter* que no eran dominantes en los primeros estadios de biodegradación (Brakstad *et al.*, 2005). Otros estudios basados en técnicas independientes de cultivo sugieren que el clado *Roseobacter* puede verse estimulado en respuesta al tratamiento con hidrocarburos (tabla I2). El alcance de la respuesta y qué miembros en concreto del grupo responden a la adición de hidrocarburos depende de muchos factores, incluyendo la composición de la comunidad original, el tipo y la concentración del compuesto y las condiciones físico-químicas del sistema (Buchan y González, 2010). Coulon y colaboradores (2007) prepararon microcosmos que fueron suplementados con crudo con y sin adición simultánea de nitrógeno y/o fósforo y fueron incubados a 4 y 20°C. Observaron que el grupo *Roseobacter* era uno de los más abundantes en los microcosmos tratados con crudo a cualquiera de las dos temperaturas y su abundancia se mantenía relativamente constante a lo largo de todo el experimento.

Tal y como muestra la tabla I2, la mayoría de estudios de comunidades bacterianas expuestas a hidrocarburos, muestran una respuesta positiva del clado *Roseobacter* al tratamiento, aunque no se conocen con exactitud los sustratos y la condiciones ambientales que favorecen esa respuesta (Brakstad *et al.*, 2005; Coulon *et al.*, 2007; McKew *et al.*, 2007a). Un ejemplo ilustrativo de la respuesta del clado *Roseobacter* a la adición de hidrocarburos la tenemos en un experimento de microcosmos de contaminación artificial en el laboratorio con agua procedente de zonas costeras oligotróficas de la Isla de Mallorca. En este experimento se pretendía reproducir los eventos de contaminación

provocados por la explotación de las zonas costeras. A diferencia de los experimentos que se muestran en la tabla I2, estos microcosmos se trataron con concentraciones bajas (30 mg l⁻¹) de un hidrocarburo refinado, diesel, sin fertilización y en dos épocas diferentes: verano e invierno (Lanfranconi *et al.*, 2010). La adición de diesel provocó importantes cambios en la composición de la comunidad bacteriana de las aguas oligotróficas utilizadas en el experimento (figura I8).

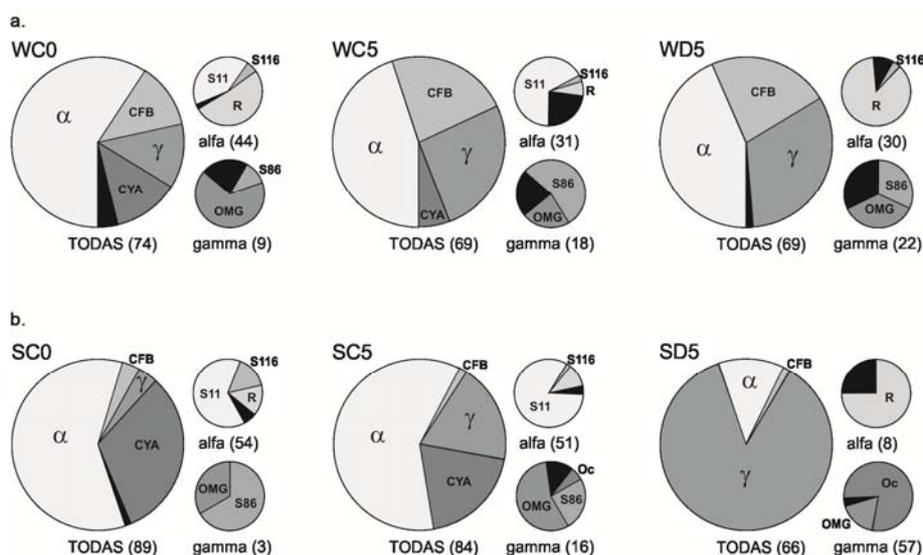


Figura I8: Composición de las genotecas de 16S ARNr de microcosmos control y tratados con diesel. Microcosmos preparados en invierno (a); los de verano (b). C0: genotecas preparadas de los microcosmos control al principio del experimento. C5 y D5: genotecas de los microcosmos control y tratados con diesel, respectivamente, a las 65 horas desde el inicio del experimento. Los números en paréntesis indican la abundancia de secuencias de cada uno de los grupos filogenéticos. Los rótulos indican: α , *Alphaproteobacteria*; γ , *Gammaproteobacteria*; CFB, *Bacteroidetes*; CYA, *Cyanobacteria*; S11, SAR11 group; S116, SAR116 group; R, clado *Roseobacter*; S86, SAR86; OMG, *Gammaproteobacteria* oligotróficas marinas; Oc, *Oceanospirillaceae*. Los otros grupos filogenéticos no especificados aparecen en negro. (Modificado de Lanfranconi *et al.*, 2010).

Entre estas variaciones, se observó una proliferación significativa del clado *Roseobacter* en los microcosmos tratados con diesel respecto a los microcosmos control en los dos experimentos realizados. El tratamiento con diesel seleccionó determinados filotipos del grupo (que podríamos hipotetizar como potenciales degradadores de hidrocarburos) y causó la desaparición de otros filotipos de este grupo (que podríamos hipotetizar como posibles bacterias sensibles a la toxicidad del diesel).

McKew y colaboradores (2007a) obtuvieron resultados similares en un experimento de microcosmos preparados con agua tomada del estuario del Támesis (UK) cerca de una refinería de petróleo. Los microcosmos se trataron separada y conjuntamente (concentración final 0,1% p/v) con n-alcános (decano, dodecano, tetradecano, hexadecano, octadecano, eicosano, docosano, tetracosano, hexacosano, octacosano, triacontano y dotriacontano), un alcáno ramificado (pristano) o hidrocarburos poliaromáticos (naftaleno, 1-metilnaftaleno, 1,3-dimetilnaftaleno, fluoreno, fenantreno y pireno). Todos los microcosmos fueron suplementados con nutrientes (20 mg l⁻¹ NH₄NO₃ y 10 mg l⁻¹ KH₂PO₄). Estos autores también observaron que algunas poblaciones de *Roseobacter* podrían ser estimuladas por alcános pero inhibidas por algunos componentes del crudo, como los hidrocarburos poliaromáticos. De modo, que los clones de *Roseobacter* en los microcosmos tratados con crudo suponían solo el 3%, comparado con el 16%, 21% y 23% de los microcosmos tratados con decano, hexadecano y la mezcla de alcános. Esto nos indica que la respuesta de las bacterias del clado *Roseobacter* no es homogénea y que, mientras algunos miembros del grupo podrían verse beneficiados por la presencia de hidrocarburos, otros se verían perjudicados por la presencia de estos contaminantes. Por lo tanto, para poder valorar el efecto de la contaminación por hidrocarburos en ambientes marinos es importante

identificar las bacterias de este grupo que responden positiva o negativamente a la contaminación por hidrocarburos.

Por lo que respecta a las posibles rutas de degradación de hidrocarburos en *Roseobacter*, la primera, y hasta el momento, única vía de degradación de hidrocarburos aromáticos descrita es la vía del β -cetoadipato como se ha mencionado anteriormente (Buchan *et al.*, 2000). En ese trabajo, además de estudiar la capacidad de seis aislados de crecer con compuestos aromáticos, también se estudió la actividad de la protocatecuato 3,4-dioxigenasa. Así, los extractos celulares de cuatro de las cepas estudiadas mostraron actividad de este enzima al crecerlas con p-hidroxibenzoato. La utilización de sondas y amplificación por PCR permitió la detección del correspondiente gen (*pcaH*) en los seis aislados. Además, también se identificaron los genes de la ruta y su organización en el genoma en dos de los aislados estudiados (*Sagittula stellata* E-37 y el aislado Y3F, tal como muestra la figura I9).

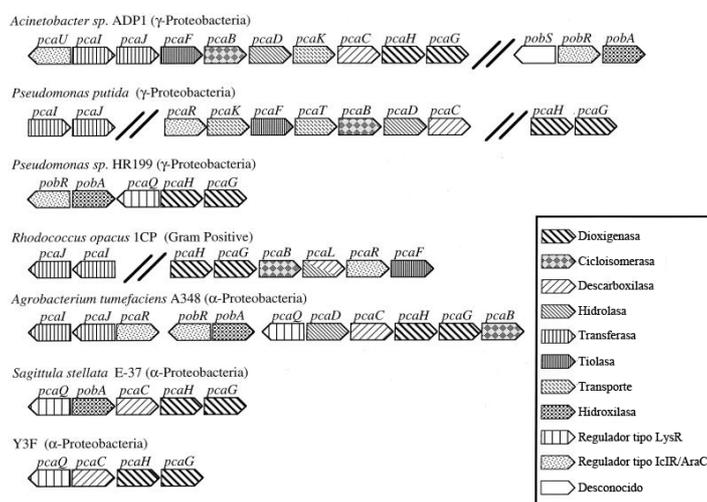


Figura I9: Organización de los genes del metabolismo del protocatecuato en diferentes bacterias, incluyendo los aislados del clado *Roseobacter*. Las flechas indican la dirección de la transcripción. Las líneas dobles en negrita indican genes separados por <10kbp (extraído de Buchan *et al.*, 2000).

Posteriormente, el análisis de las secuencias genómicas de bacterias del clado *Roseobacter* ha llevado a la proposición, basada en la comparación con secuencias homólogas de las bases de datos, de que el grupo *Roseobacter* presentaría hasta seis rutas catabólicas para la degradación aeróbica de compuestos monoaromáticos (Moran *et al.*, 2007; Newton *et al.*, 2010; Buchan y González, 2010). Tal como se muestra en la figura I10 se han propuesto las rutas de degradación de benzoato, fenilacetato, homoprotocatecuato, homogentisato, gentisato y protocatecuato.

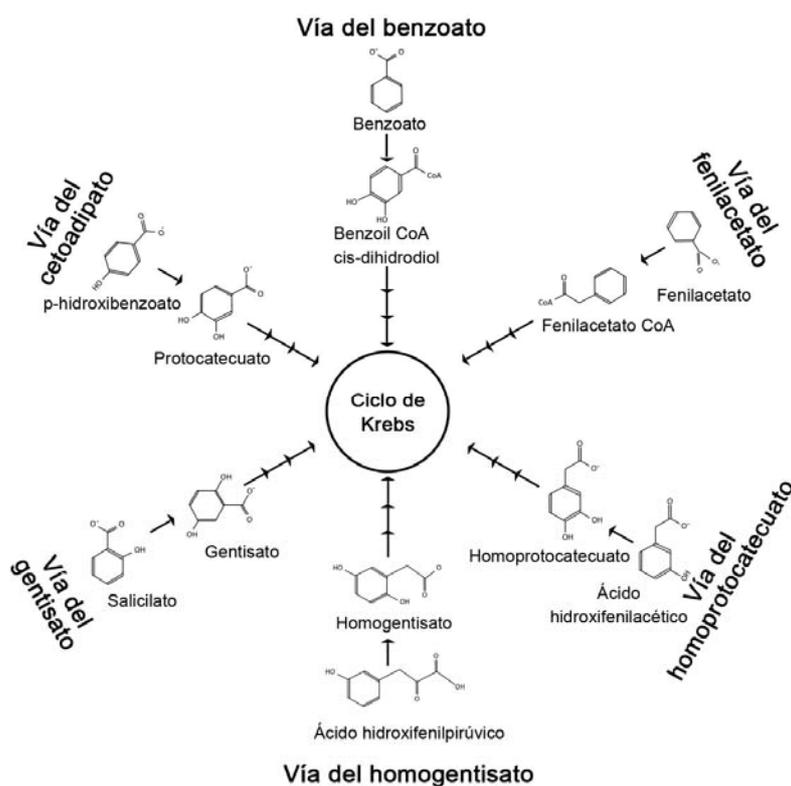


Figura I10: Seis vías de degradación de compuestos aromáticos propuestas en genomas de *Roseobacter* (modificado de Moran *et al.*, 2007).

La tabla I3 resume las vías de degradación encontradas en genomas de *Roseobacter* secuenciados, en base a la detección de secuencias de genes clave de cada una de ellas. Los miembros heterótrofos del grupo (es decir, aquéllos que no tienen genes para AAnP) tienden a presentar más genes de estas vías de degradación (Newton *et al.*, 2010). La rama del protocatecuato de la vía del β -cetodipato se ha detectado en la mayoría de los genomas de *Roseobacter* (75%), al igual que la del homogentisato (69%). La ruta del homoprotocatecuato se ha detectado en el 45% de los genomas, la del ácido fenilacético en el 56% y la del gentisato y benzoato en el 16%. La diversidad y prevalencia de vías de degradación de compuestos aromáticos es relevante tanto a nivel de grupo como en determinadas cepas. *Sagittula stellata* E-37, *Jannaschia* sp. CCS1, *Ruegeria pomeroyi* DSS-3 y *Roseobacter* sp. GAI101 presentan todas las vías de degradación estudiadas por Newton y colaboradores (2010). Además, también se detectaron genes que presentaban homología con hidroxilasas de alcanos en estas cuatro cepas. Por otra parte, no se ha encontrado en los 31 genomas estudiados ninguna dioxigenasa de las ampliamente caracterizadas hasta el momento (p.e. aquéllas implicadas en la degradación de naftaleno y fenantreno), aunque sí se han encontrado genes putativos con zonas de secuencia propias de dioxigenasas. Esto indicaría que las bacterias de este grupo utilizarían vías nuevas o poco estudiadas para la degradación de compuestos aromáticos (Buchan y González, 2010).

Es importante tener presente que, a pesar de la información que proporciona la secuencia de los genomas, para la mayoría de las cepas que se muestran en la tabla I3 no se ha analizado de forma sistemática su capacidad para utilizar hidrocarburos aromáticos.

Tabla I3: Vías de degradación de hidrocarburos y compuestos relacionados predichas en genomas secuenciados del clado *Roseobacter*. (Modificado de Newton *et al.*, 2010).

Cepa	Vías identificadas ^o					
	Proto	Gent	Benz	Hprot	Fenil	Hgent
<i>Phaeobacter gallaeciensis</i> BS107	+			+	+	+
<i>Phaeobacter gallaeciensis</i> 2.10	+			+	+	+
<i>Roseobacter</i> sp. MED193	+			+	+	+
<i>Roseobacter</i> sp. SK209–2–6	+			+	+	+
<i>Ruegeria pomeroyi</i> DSS-3	+	+	+	+	+	+
<i>Ruegeria</i> sp. TM1040	+			+	+	+
<i>Ruegeria</i> sp. R11	+			+	+	+
<i>Rhodobacterales bacterium</i> Y41	+			+	+	+
<i>Sulfitobacter</i> sp. EE-36	+				+	+
<i>Sulfitobacter</i> sp. NAS-14.1	+				+	+
<i>Roseobacter</i> sp. GAI101	+	+	+	+	+	+
<i>Oceanibulbus indoliflex</i> HEL-45					+	+
<i>Roseobacter denitrificans</i> OCh 114 ^b	+					+
<i>Roseobacter litoralis</i> OCh 149 ^b	+					+
<i>Rhodobacterales bacterium</i> HTCC2083 ^b				+	+	+
<i>Roseovarius</i> sp. TM1035 ^b	+					
<i>Roseovarius</i> sp. 217 ^b	+					
<i>Roseobacter</i> sp. Azwk-3b ^b						
<i>Roseovarius nubinhibens</i> ISM	+					
<i>Pelagibaca bermudensis</i> HTCC2601	+					+
<i>Sagittula stellata</i> E-37	+	+	+	+	+	+
<i>Oceanicola batsensis</i> HTCC2597	+					+
<i>Loktanella vestfoldensis</i> SKA53 ^b	+					
<i>Roseobacter</i> sp. CCS2 ^b	+					
<i>Octadecabacter arcticus</i> 238						
<i>Octadecabacter antarcticus</i> 307						
<i>Oceanicola granulosus</i> HTCC2516						
<i>Dinoroseobacter shibae</i> DFL12 ^b	+				+	+
<i>Jannaschia</i> sp. CCS1 ^b	+	+	+	+	+	+
<i>Maritimibacter alkaliphilus</i> HTCC2654		+	+	+	+	+
<i>Rhodobacterales bacterium</i> HTCC2150	+			+	+	+

^aAbreviaciones de los compuestos: Proto: Protocatecuato; Gent: gentisato; Benz: Benzoato; Hprot: homoprotocatecuato; Fenil: ácido fenilacético; Hgent: Homogentisato. ^b Presentan genes para AAnP.

La excepción son *Sagitulla stellata* E-37 y *Sulfitobacter* sp. EE-36 para los que se comprobó la capacidad de crecer con protocatecuato y otros compuestos intermediarios de la degradación de la lignina que son degradados también por medio de la vía β -cetoadipato. *S. stellata* era capaz de crecer con antranilato, ferulato, protocatecuato, cumarato y p-hidroxibenzoato; mientras que *Sulfitobacter* sp. EE-36 crecía con los mismos compuestos, además de benzoato, salicilato y vanillato (Buchan *et al.*, 2000). Como ya se ha comentado antes, se han detectado en estas cepas las vías de degradación del benzoato, fenilacetato, homoprotocatecuato, homogentisato, gentisato y protocatecuato (Newton *et al.*, 2010). Para el resto de los aislados descritos como degradables (Brito *et al.*, 2006; Harwati *et al.*, 2007; Harwati *et al.*, 2009) no se dispone de información sobre la secuencia de sus genomas. Por tanto, se necesita un análisis más exhaustivo de las rutas de degradación de hidrocarburos para comprender mejor el papel de este grupo en ambientes contaminados por hidrocarburos.

Hasta el momento se ha demostrado que el clado *Roseobacter* es predominante en ambientes contaminados crónicamente, y que las poblaciones presentes en estos ambientes son distintas a las que habitan aguas limpias. Esto podría estar relacionado con la presencia de hidrocarburos en el medio, ya que existen indicios de que determinadas poblaciones del clado *Roseobacter* responden positivamente a la presencia de hidrocarburos, mientras que otras se ven perjudicadas. La secuenciación de genomas ha permitido la detección de posibles vías de degradación de compuestos aromáticos presentes en los genomas de miembros del clado *Roseobacter*. La prevalencia de algunas de ellas dentro del grupo sería elevada (p.e. la vía del β -cetoadipato y del homogentisato), mientras que otras no tendrían una distribución tan amplia (p.e. la del benzoato y gentisato). Sin embargo, a día de hoy no se

conocen las poblaciones que proliferan en ambientes contaminados, aunque se podría hipotetizar que se trata de poblaciones como mínimo adaptadas a tolerar la presencia de hidrocarburos. Para dar respuesta a esta pregunta se ha realizado este estudio, basado en técnicas independientes de cultivo, en siete puertos deportivos de la Isla de Mallorca, cuyos resultados se presentan en el primer capítulo. Tampoco se conoce cómo responden las poblaciones del clado *Roseobacter*, frente a un episodio de contaminación por hidrocarburos que pretende mimetizar las condiciones que pueden darse fácilmente en puertos o como consecuencia del uso recreativo de la costa (hidrocarburos refinados en bajas concentraciones y con presencia de nutrientes). Ya se tienen algunos datos acerca de la respuesta a nivel global de la comunidad microbiana frente a la contaminación por diesel (Lanfranconi *et al.*, 2010), pero en el capítulo segundo esto se completa con un estudio centrado en analizar la respuesta del clado *Roseobacter*. Por último, en el tercer capítulo se analizan las capacidades catabólicas de aislados del grupo procedentes de aguas crónicamente contaminadas, para dilucidar el posible papel de este grupo en el metabolismo de hidrocarburos en este tipo de ambientes.

OBJETIVOS

Los objetivos que se plantearon para el desarrollo de esta tesis doctoral son:

1. Analizar la diversidad de bacterias del clado *Roseobacter* presentes en aguas superficiales de puertos deportivos de Mallorca mediante métodos independientes de cultivo, así como evaluar la importancia relativa de diferentes poblaciones del clado de *Roseobacter* en dichas muestras sometidas a contaminación crónica de hidrocarburos.

2. Analizar de la respuesta a corto plazo de bacterias del clado *Roseobacter* presentes en aguas costeras oligotróficas prístinas en experimentos de laboratorio que simulan eventos de contaminación habituales en el uso cotidiano del ambiente costero.

3. Generar una colección de aislados de bacterias del clado *Roseobacter* procedentes de puertos deportivos, así como analizar su capacidad de crecimiento a expensas de hidrocarburos y la diversidad de genes degradadores que presentan.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Toma de muestras

La descripción de la toma de muestras se dividirá en dos partes, una que corresponde a las muestras del estudio de diversidad del grupo *Roseobacter* en puertos de Mallorca (ver apartado 1.1), y la segunda que corresponde a la toma de muestras para la realización de los experimentos de microcosmos (ver apartado 1.2).

1.1. Muestreo de puertos

Se seleccionaron siete puertos deportivos alrededor de la Isla de Mallorca: Palma, Adriano, Andratx, Sóller, Alcudia, Cala Ratjada y Cala Figuera (figura M1). Estos puertos están abiertos a masas de agua diferentes (López-Jurado *et al.*, 2008) y tienen diferente capacidad y usos (tabla M1). Se tomaron muestras de forma periódica desde 2008 a 2010: en septiembre de 2008; marzo, julio, octubre y noviembre de 2009; marzo y mayo de 2010 (muestreos= 7, muestras=49).

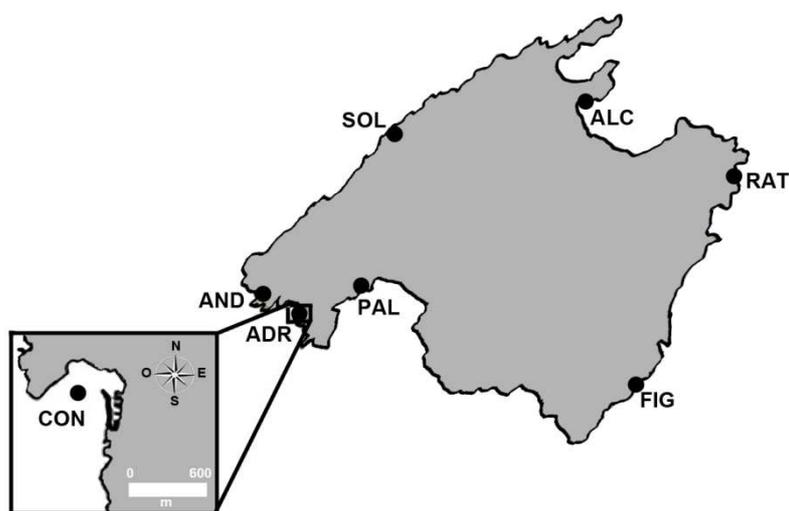


Figura M1: Localización de los puntos de muestreo en la Isla de Mallorca. Puertos: Palma (PAL), Adriano (ADR), Andratx (AND), Sóller (SOL), Alcudia (ALC), Cala Ratjada (RAT), Cala Figuera (FIG). Muestra control (CON).

Material y métodos

En dos ocasiones (septiembre 2008 y marzo 2009), se tomaron también muestras de agua prístina de la bahía Cala Penyes Rotges, aproximadamente a 1 km de Puerto Adriano, consideradas como muestras control según resultados de investigaciones previas (Nogales *et al.*, 2007). En todos los casos las muestras se tomaron como mínimo después de tres días de mar en calma y de ausencia de precipitaciones. Las muestras de puerto se cogieron desde pantalanes localizados en la zona más interna. Para el análisis de diversidad, las muestras de agua se tomaron de la superficie (aproximadamente 2-3 centímetros superiores) con garrafas de plástico, previamente lavadas con HCl 0,1 N y agua destilada. Las muestras se transportaron inmediatamente al laboratorio y se procesaron en un tiempo no superior a 3h.

Tabla M1: Localización y características de los puertos estudiados.

Puerto	Coordenadas		Nº Amarres	Tipo de actividad ^a
	Longitud (N)	Longitud (S)		
Palma	39° 34' 03"	2° 38' 36"	2840	R, T,G, M, P
Adriano	39° 29' 16"	2° 28' 40"	482	R
Andratx	39° 32' 41"	2° 23' 14"	175	R,G,P
Sóller	39° 47' 50"	2° 41' 40"	530	R,G,P
Alcudia	39° 50' 21"	3° 08' 00"	101	R, T,G, M, P
Ratjada	39° 42' 40"	3° 27' 48"	130	R, T,G, P
Figuera	39° 22' 09"	3° 13' 26"	109	R, G, P
Control	39° 29' 05"	2° 28' 16"	n.a	n.a

^aTipo de actividad: R: Náutica recreativa, T: Transporte de pasajeros, G: Golondrinas, M: Transporte de mercancías, P: Pesca comercial, n.a: no aplicable (Información extraída de Conselleria de Turisme, INESTUR CITTIB, 2011).

Las muestras para la extracción de hidrocarburos, se tomaron en botellas de vidrio de 1 l previamente lavadas con acetona, diclorometano y hexano. En las muestras de agua se midieron diferentes parámetros, como la temperatura *in situ*, el pH, la conductividad y la concentración de clorofila *a* en base al método descrito previamente (Nogales *et al.*, 2007).

1.2. Muestreo para la elaboración de los microcosmos

Los microcosmos que se detallan en el apartado 3 se prepararon con agua prístina tomada en la misma localización de la que se cogieron las muestras control del apartado 1.1 (Cala Penyes Rotges). Se realizaron dos experimentos sucesivos, que se elaboraron con agua recogida en el mes de marzo de 2011, con 15 días de intervalo entre los muestreos. En cada ocasión se recogieron aproximadamente 100 litros de agua superficial en las mismas condiciones explicadas anteriormente. Las muestras se transportaron inmediatamente al laboratorio para la preparación de los microcosmos.

2. Determinación de la concentración total de hidrocarburos

Las muestras de agua para la extracción de hidrocarburos totales se acidificaron al llegar al laboratorio (pH 2). La extracción se llevó a cabo con hexano en base a la norma ISO:9377-2:2000. Los extractos se trataron con sulfato de sodio anhidro para eliminar restos acuosos, se eluyeron por columnas de Florisil (Sigma) para eliminar impurezas y se concentraron en un rotavapor R-210 (BUCHI) operando a una temperatura de 51°C y una presión de 338 mbar. Por último, se ajustó el volumen de los extractos mediante una corriente de nitrógeno o añadiendo hexano. Los hidrocarburos totales se cuantificaron con un cromatógrafo de gases Agilent 6890N conectado a un espectrómetro de masas Agilent 5975. Los espectros de masas se obtuvieron utilizando métodos de impacto electrónico. El cromatógrafo de gases estaba equipado con una columna Agilent 190915-43 (0,25 mm x 30 m x 0,25 µm). Se utilizó un flujo de helio de 1,9 ml min⁻¹ como gas portador, con entrada *splitless*. La temperatura de la columna fue de 80°C durante 1 min; a continuación se programó una

rampa de 80 a 300°C con incrementos de temperatura de 6°C min⁻¹ y finalmente se mantuvo la temperatura a 300°C durante 20 min. Las temperaturas del puerto de inyección y de la fuente de iones fueron de 300 y 250°C, respectivamente. Para la cuantificación de los hidrocarburos se utilizó el Standard BAM-K010 para diesel y aceite lubricante (Bundesanstalt für Materialforschung und prüfung, BAM, Alemania).

3. Preparación de los microcosmos

La preparación de los microcosmos se realizó como describieron previamente Lanfranconi y colaboradores (2010). Brevemente, se llenaron cuatro tanques de plástico con 44 l de agua de mar. Los tanques se cubrieron con tapas de metacrilato y se colocaron bombas de acuario (Eheim Air pump 400) que expulsaban aire filtrado (filtro de jeringa de 0,2 µm, Nalgene) para mantener la oxigenación. Los microcosmos se incubaron con luz natural a una temperatura ambiente controlada de 16°C, aproximadamente la temperatura ambiental en el momento del muestreo (14°C). Después de dos horas de estabilización de los microcosmos, se tomó la primera muestra (T₀). En este momento, se aplicó el tratamiento a cada uno de los microcosmos, que consistió en la adición de bajas concentraciones de diesel con o sin adición simultánea de una fuente de nitrógeno o de fósforo. Así, uno de los microcosmos se trató con 30 mg l⁻¹ de diesel, el segundo con 30 mg l⁻¹ de diesel y 7,89 mg l⁻¹ NaNO₃, el tercero con 30 mg l⁻¹ de diesel y 1,2 mg l⁻¹ Na₂HPO₄, y el cuarto no fue tratado y se consideró el microcosmos control. Para compensar posibles pérdidas de diesel por evaporación y adhesión a las paredes de los tanques, los microcosmos se trataron a diario con un tercio de la cantidad inicial, siguiendo el protocolo descrito previamente (Lanfranconi *et al.*, 2010). Se tomaron muestras de agua de cada uno de los microcosmos tras 3, 17, 27, 41, 65 y 89 h de incubación (figura M2). Como se ha indicado en

el apartado 1.2 el experimento se realizó por duplicado, en dos incubaciones sucesivas, con muestras de agua tomadas con un intervalo de 15 días.

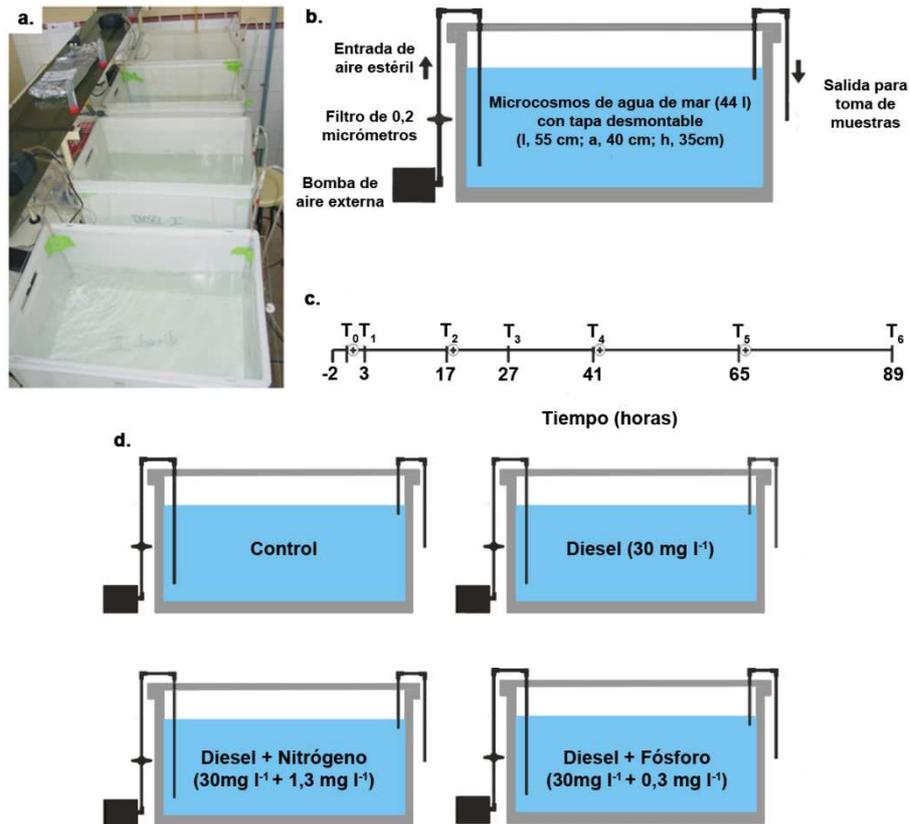


Figura M2. Fotografía de los microcosmos (a), visión esquemática del diseño de los microcosmos (b), esquema de los tiempos de toma de muestras (c), esquema de los diferentes tratamientos (d) (modificada de Lanfranconi *et al.*, 2010).

Debido a que dos de los microcosmos se trataron con nutrientes además de con diesel se determinó si el bacterioplancton de las muestras de agua tomadas para preparar los microcosmos sufría algún tipo de limitación por nutrientes inorgánicos (nitrógeno y/o fósforo) en el momento del muestreo. Para ello se analizó el efecto a corto plazo de la adición de

estos dos nutrientes en el incremento del número de procariontes totales. Se prepararon seis botellas estériles con 400 ml de agua. Dos botellas fueron suplementadas con NaNO_3 a una concentración final de $16 \mu\text{M}$, a dos botellas se adicionó NaH_2PO_4 a una concentración final de $1 \mu\text{M}$, y las dos botellas restantes no se trataron y se consideraron muestras control. Se incubaron las botellas en las mismas condiciones que los microcosmos (incubación con luz natural y a 16°C) durante 24 h. Pasado este tiempo, se tomaron muestras para hacer recuentos de procariontes totales mediante tinción con DAPI. El tratamiento de las muestras se explica en el siguiente apartado.

4. Recuento de procariontes totales e hibridación *in situ* con sondas fluorescentes (FISH)

Tanto en las muestras tomadas de puertos deportivos como en las muestras procedentes de microcosmos se realizaron recuentos de procariontes totales mediante microscopía de epifluorescencia y tinción con DAPI (4',6'-diamidino-2-fenilindol). Además se cuantificó la abundancia de determinados grupos bacterianos mediante hibridación *in situ* con sondas fluorescentes específicas. Para ello las muestras de agua fueron fijadas *in situ* con formaldehído al 4% (v/v, concentración final) a 4°C durante 16 h. Pasado este tiempo, las muestras se filtraron a través de filtros de policarbonato con un tamaño de poro de $0,2 \mu\text{m}$ (Millipore). Estos filtros se lavaron dos veces tampón fosfato salino (PBS) (Sambrook *et al.*, 2001). La tinción con DAPI se realizó según el procedimiento descrito por Glöckner *et al.* (1996).

La hibridación *in situ* se realizó con las sondas que se muestran en la tabla M2. Las sondas se sintetizaron con el fluorocromo Cy3 en el extremo 5' (Interactiva Biotechnologie y Thermo Scientific).

Tabla M2: Sondas empleadas en experimentos de hibridación *in situ* con sondas fluorescentes.

Sonda	Secuencia 5'-3'	Especificidad	Referencia
EUB338 (I)	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	<i>Bacteria</i>	Amann <i>et al.</i> , 1990
EUB338 (II)	GCAGCCACCCGTAGGTGT	<i>Bacteria</i>	Daims <i>et al.</i> , 1999
EUB338 (III)	GCTGCCACCCGTAGGTGT	<i>Bacteria</i>	Daims <i>et al.</i> , 1999
ROSEO536R	CAACGCTAACCCCTCCG	<i>Roseobacter</i>	Brinkmeyer <i>et al.</i> , 2000
Gam42a	GCCTTCCCACATCGTTT	<i>Gammaproteobacteria</i>	Manz <i>et al.</i> , 1992
Competidor ^a	GCCTTCCCACACTCGTTT	<i>Betaproteobacteria</i>	

^aCompetidor sin marcaje.

Para las hibridaciones se siguió el procedimiento descrito por Glöckner *et al.* (1996). Por cada muestra se contaron entre 500 y 1000 células teñidas con DAPI. Para los recuentos se utilizó un microscopio de epifluorescencia Axiophot (Zeiss).

5. Extracción de ácidos nucleicos totales de muestras de puertos deportivos

La extracción de ácidos nucleicos se realizó a partir de la biomasa de células recogida en filtros de fluoruro de polivinilideno de 0,22 µm de tamaño poro (Millipore). Las muestras de agua (2 l) habían sido previamente filtradas a través de filtros de fluoruro de polivinilideno de 5 µm de tamaño de poro. Desde el momento de la filtración hasta la extracción de ácidos nucleicos los filtros se conservaron a -80°C. El protocolo de extracción que se siguió fue el descrito anteriormente por Nogales *et al.* (2007), que consistía en un paso de lisis enzimática (tratamiento con lisozima y proteinasa K), métodos químicos (tratamiento con SDS) y físicos (ciclos de congelación con nitrógeno líquido y descongelación a 65°C). Los extractos se trataron con bromuro de hexadecilmetilamonio (CTAB) y se purificaron mediante extracción con disolventes orgánicos. Finalmente, se precipitaron los ácidos nucleicos con

isopropanol. Se comprobó el estado de los extractos resultantes mediante electroforesis en un gel de agarosa 1% p/v, en tampón TAE (Sambrook *et al.*, 2001), tinción con bromuro de etidio ($0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$) y observación con luz ultravioleta en un captador de imágenes Gel Doc RX+ (Bio-Rad). Los extractos se cuantificaron con un espectrofotómetro Nanodrop 2000c (Thermo Scientific).

6. Extracción de ARN total de muestras de microcosmos

Con el fin de poder realizar comparaciones de los resultados obtenidos en esta tesis con los experimentos realizados por Lanfranconi y colaboradores (2010), se utilizó la metodología empleada por estos autores, que estaba basada en el análisis de ARN. La extracción de ARN se realizó a partir de la biomasa de células recogida de la manera que se detalla en el apartado anterior. Los filtros para la extracción de ARN se congelaron inmediatamente sumergiéndolos en nitrógeno líquido, y se conservaron a -80°C . El método de extracción usado fue el de Nogales *et al.* (2002) que fue posteriormente modificado por Lanfranconi *et al.* (2010) para su uso con muestras de agua. Para la extracción de ARN todos los reactivos se prepararon con agua Milli-Q (Millipore) tratada con dietilpirocarbonato, DEPC (Sigma-Aldrich) y posteriormente autoclavada. El protocolo de extracción seguía los mismos pasos descritos en el apartado anterior, lisis enzimática, química y física, seguidos de una purificación con CTAB y una extracción con disolventes orgánicos. La precipitación de los ácidos nucleicos se hizo con isopropanol y MgCl_2 10 mM. El *pellet* fue resuspendido en agua Milli-Q tratada con DEPC y autoclavada. Se determinó el estado y la concentración del extracto mediante electroforesis y espectrometría como se ha descrito en el apartado anterior.

Para eliminar el ADN de los extractos se tomaron alícuotas y se trataron con ADNasa I libre de ARNasa (Roche Applied Science) a 37°C durante 90 min en Tris-HCl 40 mM, NaCl 10 mM, MgCl₂ 6 mM, CaCl₂ 1 mM, pH 7,9; seguido de un proceso de inactivación de la ADNasa de 5 min a 75°C. Los extractos de ARN se cuantificaron con un espectrofotómetro Nanodrop 2000c (Thermo Scientific). Para confirmar que se había eliminado el ADN de los extractos de ARN, se realizó una amplificación por PCR (ver procedimiento en el apartado 8) de 16S ARN de las muestras, sin realizar una reacción de transcripción inversa previa, de modo que no se esperaba amplificación si se había eliminado por completo el ADN. Los extractos de ARN no se utilizaron hasta confirmar que no había contaminación por ADN.

7. Transcripción inversa de ARN

Las reacciones de transcripción inversa se realizaron con el enzima Superscript III (Invitrogen) siguiendo las instrucciones suministradas por el fabricante. La mezcla de reactivos para la reacción contenía Tris-HCl 50 mM (pH 8.3), KCl 75 mM, MgCl₂ 3 mM, ditiotretitol 10 mM, desoxinucleotidos trifosfato (dNTPs) 500 µM de cada uno (Roche Applied Science), cebadores al azar 250 ng (Life Technologies) 70 ng, 4 µg ARN total, y 200 U de transcriptasa inversa Superscript III. La mezcla de cebadores, ARN y dNTPs se incubó a 65°C durante 5 min. A continuación, se añadió el enzima y el resto de componentes de la reacción y se incubó a 25°C durante 5 min, 50°C 50 min y 70°C 15 min. Los productos se conservaron a -20°C hasta su utilización en experimentos posteriores.

8. Análisis de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción terminales (T-RFLP)

Para analizar la diversidad bacteriana de las muestras, se amplificó 16S ADNr, a partir de ADN total en el caso de muestras de puertos deportivos, y a partir de cADN en el caso de muestras de microcosmos. Para analizar la diversidad bacteriana total en puertos se utilizaron los cebadores universales 27f (Lane, 1991) y 1389r (Osborn *et al.*, 2000) y en microcosmos el 27f y el 907r (Muyzer *et al.*, 1998) (tabla M3). Para la amplificación de bacterias de la clase *Alphaproteobacteria* se usaron como cebadores dos oligonucleótidos, previamente descritos como sondas: ALF1b (Manz *et al.*, 1992) y ALF968 (Neef, 1997). Los cebadores se marcaron en el extremo 5' con los fluorocromos 6-FAM (cebadores *forward*) y HEX (cebadores *reverse*).

Las reacciones de PCR contenían el tampón de reacción [Tris-HCl 10 mM (pH 9,0), KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM], dNTPs (Roche Applied Science) 100 µM, cebadores a 0,4 µM, 1,5 U de *Taq* polimerasa (GE Healthcare) y albúmina sérica bovina, BSA (Sigma Aldrich) a una concentración final de 0,01% (p/v). Las condiciones de PCR con cebadores universales fueron: 94°C 5 min, seguido de 30 ciclos a 94°C 1 min, 55°C 1 min y 72°C 2 min (Nogales *et al.*, 2007). Para la amplificación con cebadores específicos de *Alphaproteobacteria* se realizaron las siguientes modificaciones en los ciclos de amplificación: la temperatura de anillamiento fue de 50°C y se realizó una elongación a 72°C durante 1 min 30s. Todas las reacciones se realizaron en un termociclador personal Mastercycler (Eppendorf).

Tabla M3: Cebadores utilizados en este estudio para la amplificación de 16S ARN mediante PCR convencional.

Cebador	Secuencia (5'-3')	Pos <i>E. coli</i> ^b	Especificidad	Referencia
27f	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	8-27	<i>Bacteria</i>	Lane, 1991
1389r	ACGGGCGGTGTGTACAAG	1389-1407	<i>Bacteria</i>	Osborn <i>et al.</i> , 2000
1492r	TACGGYTACCTTGTACGACTT	1472-1493	<i>Bacteria</i>	Lane, 1991
907r	CCGTCAATTCMTTGTAGTTT	907-926	<i>Bacteria</i>	Muyzer <i>et al.</i> , 1998
ALF1bf ^a	CTGGCTCAGARCGAACG	19-35	<i>Alphaproteobacteria</i>	Manz <i>et al.</i> , 1992
ALF968r ^a	GGTAAGGTTCTGCGCGTT	968-985	<i>Alphaproteobacteria</i>	Neef, 1997
Grb ^a	GTCAGTATCGAGCCAGTRAG	645-664	<i>Rhodobacteraceae</i>	Giuliano <i>et al.</i> , 1999

^a Sondas utilizadas en este estudio como cebadores. ^b Posición en *E. coli*.

Los productos de PCR obtenidos se purificaron usando el kit PureLink PCR Purification kit (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos obtenidos con cebadores universales (10 µl) se digirieron con 15 U de las enzimas *AluI* and *HhaI* (New England Biolabs) por separado a 37°C durante 3 h. En el caso de los productos obtenidos con cebadores para *Alphaproteobacteria*, se realizó una tercera digestión con el enzima *HaeIII* en las mismas condiciones especificadas anteriormente. Los productos digeridos se mezclaron con el estándar de peso molecular ROX-GeneScan-500 (Applied Biosystems) y se desnaturalizaron en formamida a 96°C durante 5 min. Para su separación electroforética se cargaron en un analizador genético ABI 3130 (Applied Biosystems) operado por el personal de los Servicios Científico-Técnicos de la UIB usando capilares de 36 cm de longitud y polímero POP-7 (Applied Biosystems). La electroforesis se hizo a 15 kV, 35–45 mA, durante 30 min a 60 °C. La potencia de láser fue de 15 mW. La inyección de muestra se realizó durante 10 s a un voltaje de 7 kV. Todas las muestras

se corrieron por duplicado. Los patrones electroforéticos se analizaron con el programa Peak Scanner v.1.0 (Applied Biosystems) tomando como umbral 50 unidades de fluorescencia para la detección de picos electroforéticos.

Los perfiles se revisaron para descartar la presencia de artefactos y determinaciones incorrectas de picos. Se realizó una estandarización de la fluorescencia de los picos como describieron anteriormente Fahy y colaboradores (2005). A continuación, se alinearon los picos homólogos de los duplicados con el programa T-Align (Smith *et al.*, 2005) para generar un perfil consenso para cada muestra. Los picos que aparecían en una sola réplica fueron excluidos del análisis. Los diferentes perfiles consenso se compararon para generar un perfil comparativo de todas las muestras, en el que aparecían todos los fragmentos de restricción terminales (T-RFs) observados y su abundancia relativa en las muestras analizadas (Smith *et al.*, 2005). Finalmente, se obtuvo un archivo que contenía los T-RFs generados para cada muestra, de los extremos 5' y el 3'.

La comparación de los perfiles de T-RFLP se llevó a cabo con el programa PAST-Paleontological Statistics v 1.75b. (Hammer *et al.*, 2001). Los dendrogramas se calcularon mediante el método de análisis de agrupación jerárquica usando *Unweighted Pair-Group Moving Average* (UPGMA) (Sneath y Sokal, 1973) y las matrices de distancia se calcularon utilizando el coeficiente de Bray-Curtis (Bray y Curtis, 1957). El mismo programa se utilizó para calcular el análisis de componentes principales (PCA), así como, el análisis *Non-metric Multidimensional Scaling* que también se realizó en base al coeficiente de Bray-Curtis.

9. Clonación y secuenciación

Con el fin de identificar las bacterias pertenecientes al clado *Roseobacter* en muestras de agua de puertos deportivos y en las muestras de microcosmos se utilizó una estrategia de clonación y secuenciación de amplicones de 16S ADNr. En el caso del estudio en puertos deportivos se prepararon genotecas a partir del ADN total extraído de las muestras de agua tomadas en septiembre de 2008 y marzo de 2009 en los siete puertos estudiados. En el caso de los experimentos de microcosmos las genotecas se realizaron a partir de ARN total obtenido de muestras tomadas tras 65 h de incubación (T5), con el fin de comparar con los resultados del estudio de Lanfranconi y colaboradores (2010). Se amplificó 16S ADNr (puertos deportivos) o 16S cADNr (microcosmos) del mismo modo que se explica en el apartado 8 con cebadores específicos para *Alphaproteobacteria* (ALF1bf y ALF968r), clase a la que pertenece el clado *Roseobacter*. Los productos se clonaron en el plásmido pCR2.1-TOPO usando el kit TOPO TA cloning (Invitrogen) y células competentes *E. coli* DH5-T1^R (Invitrogen). Se seleccionaron los clones según las indicaciones del fabricante en placas de Luria base (Cultimed, Panreac) que contenían 50 mg ml⁻¹ de ampicilina y 40 mg ml⁻¹ de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido). Los insertos se amplificaron por PCR con cebadores del vector y seleccionaron los clones con el inserto del tamaño esperado (unos 950 pb). A continuación se realizó una segunda selección de los clones amplificando de nuevo los insertos con cebadores específicos de *Roseobacter* (tabla M3): ROSEO536R (Brinkmeyer *et al.*, 2000) y Grb (Giuliano *et al.*, 1999) para seleccionar aquéllos que pudiesen pertenecer al clado *Roseobacter*. Los clones cuyos amplificados tenían el tamaño esperado (aproximadamente 128 pb) fueron secuenciados. Los amplificados completos del inserto de los clones seleccionados (utilizando los cebadores del vector) se purificaron con el kit Montage Purification

(Millipore) y MultiScreen HTS PCR Plates (Millipore). Las secuencias se obtuvieron usando los cebadores del vector y el kit de secuenciación BigDye terminator cycle sequencing kit v3.1 (Applied Biosystems), siguiendo las instrucciones del fabricante. La separación electroforética se realizó en un analizador genético ABI 3130 (Applied Biosystems) operado por técnicos de los Servicios Científico-Técnicos de la UIB.

Las secuencias de 16S ADNr (unos 750 pb de media) se compararon con la base de datos del *European Bioinformatics Institute* (EBI) usando los programas FASTA (Pearson and Lipman, 1988) y BLAST (Altschul *et al.*, 1990). Se analizaron las secuencias para detectar posibles quimeras con los programas Mallard y Pintail (Ashelford *et al.*, 2005; 2006). Posteriormente, las secuencias se alinearon con secuencias de referencia de la versión SSU 108 de la base de datos SILVA utilizando el programa de alineamiento SINA (Pruesse *et al.*, 2007). Se incluyeron en el análisis todas las especies tipo de géneros del clado *Roseobacter*. El alineamiento se importó al paquete ARB (Ludwig *et al.*, 2004) para el análisis filogenético. Las distancias derivadas de las disimilitudes entre pares de secuencias se calcularon mediante la corrección de Jukes y Cantor (Jukes y Cantor, 1969). El análisis se limitó a aquellas posiciones con un mínimo de homología del 50% mediante la aplicación de un filtro específico para el clado *Roseobacter* calculado con el paquete ARB a partir del alineamiento de referencia de secuencias pertenecientes al grupo. Las secuencias de todas los clones obtenidos en este estudio se agruparon en filotipos calculados al 97% y 99% de similitud utilizando el programa mothur (Schloss *et al.*, 2009). Los árboles filogenéticos se calcularon utilizando el método de distancia *neighbour-joining* (Saitou y Nei, 1987) con secuencias completas de referencia de 16S ADNr del clado *Roseobacter*. Las secuencias de los clones representantes de cada filotipo se añadieron a

los árboles filogenéticos utilizando la herramienta de parsimonia del paquete ARB.

También se generaron genotecas de los tiempos 65 h (T5) de los microcosmos tratados con diesel y fósforo amplificando el cADN con cebadores universales (27f y 907r). Las condiciones de PCR fueron las mismas que las explicadas en el apartado 8, modificando la temperatura de anillamiento a 52°C. El protocolo de clonación seguido fue el explicado en este mismo apartado. El tamaño medio de las secuencias obtenidas fue de 800 pb.

Las secuencias obtenidas en este trabajo se enviaron a la base de datos de secuencias EBI. No se enviaron secuencias idénticas, sino que se agruparon las secuencias que eran 100% iguales y se mandó una única secuencia representante. A las secuencias de 16S ADNr de puertos se le asignaron los números de acceso HE981231–HE981622 (tabla A1 del anexo), a y las de microcosmos los números de acceso HE981623–HE981719 (tabla A2 del anexo).

Por otra parte, los clones representantes de los filotipos de *Roseobacter* más abundantes y los clones obtenidos de *Gammaproteobacteria* se analizaron mediante T-RFLP, con el fin de determinar los T-RFs que identificaban a cada uno de ellos y así poder detectar su presencia y abundancia relativa en los perfiles ambientales.

10. PCR cuantitativa a tiempo real

Para la cuantificación mediante PCR cuantitativa de los dos filotipos mayoritarios (filotipos 2 y 6) detectados en las muestras de agua de puertos (ver capítulo 1 de resultados) se diseñaron cebadores específicos. Para ello se usaron las secuencias 16S ADNr de los clones pertenecientes a estos filotipos. Se seleccionaron un total de 8 clones de cada uno de los

dos filotipos, así como, 5 y 6 clones de filotipos cercanos filogenéticamente a los filotipos 2 y 6 respectivamente. No se seleccionó un mayor número de clones de los filotipos, ya que las secuencias pertenecientes a un mismo filotipo eran similares en un 99% de similitud. Los cebadores se diseñaron en aquellas regiones de la secuencia que permitían la discriminación de cada uno de los filotipos, es decir, regiones 100% iguales en las secuencias pertenecientes a un mismo filotipo, pero que presentaban diferencias con el resto de secuencias. El cebador *forward* fue el mismo para los dos filotipos y la especificidad estuvo determinada por el cebador *reverse*. Se comprobó con el paquete ARB que la secuencia de los cebadores diseñados la encontrábamos en todos los clones de cada uno de los filotipos. Para comprobar la especificidad y calidad de los cebadores se utilizó el programa AmplifX v1.5.4 (Nicolas Jullien, <http://ifrjr.nord.univ-mrs.fr/AmplifX-Home-page>). Además, la secuencia de los cebadores se comparó con la base de datos EBI usando el programa BLAST y se comprobó que los dos cebadores de cada pareja no hibridaban con las secuencias que no perteneciesen al filotipo. Para asegurar la especificidad de los cebadores se optimizaron las condiciones de PCR (temperaturas de hibridación y tiempos) mediante PCR convencional. También se comprobó que no se producía amplificación cruzada, así como la concentración óptima de cebadores por qPCR, es decir, la concentración a la cual se obtenía la mayor eficiencia en la PCR. La tabla M4 muestra las condiciones de qPCR optimizadas para cada pareja de cebadores.

Las amplificaciones se realizaron en placas de 96 pocillos (Iberolab) utilizando un equipo LightCycler 480 II termocycler (Roche Applied Science).

Tabla M4: Cebadores y condiciones de reacción utilizados para PCR cuantitativa.

Especificidad	Cebador	Secuencia (5'-3')	Amplificación (pb)	Pos. <i>E. coli</i>	Condiciones PCR
<i>Bacteria</i>	F357 ^a	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG	170	338-357	96°C 3 min, 1 ciclo
	16S5rev ^b	TTACGCGGCTGCTGGCACC		514-533	96°C 15 s, 60°C 1 min, 72°C 15s, 40 ciclos
Filotipo 2	F2	GGGGAATCTTAGACAATGGG	272	359-378	96°C 1 min, 1 ciclo
	R2	ACTAGACTAGCAGTTTTGGAG		635-655	96°C 1 min, 65°C 1 min, 72°C 20s, 40 ciclos
Filotipo 6	F2	GGGGAATCTTAGACAATGGG	471	359-378	96°C 1 min, 1 ciclo
	R6	CACCGACAAGTATACTTGC		836-855	96°C 1 min, 66°C 1 min, 40 ciclos

^aLane *et al.* (1991); ^bOnishchenko y Kiprianova, (2004).

Las reacciones de PCR se prepararon con un volumen final de 10 µl. La mezcla contenía 5 µl de LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche Applied Science) 2X, 0,2 µl de cebadores (concentración final de 200 µM), 1 µl de BSA (0,01% p/v, concentración final) y 2 µl de ADN. Para detectar la formación de artefactos en la PCR, se calculó la curva de fusión monitorizando la fluorescencia de *SYBR green* con una rampa de temperatura de 60 a 95°C con un incremento de 2,2°C/s.

Para la preparación de los estándares de ADN que permitirían la cuantificación se realizó una extracción de plásmido de clones representantes de los filotipos 2 y 6 de las genotecas de 16S ADN_r de puertos deportivos mediante el kit QIAPrep Miniprep (Qiagen). En el caso del filotipo 6, se utilizó directamente el plásmido en las reacciones de PCR. Para la cuantificación del filotipo 2 y para la cuantificación de *Bacteria* se amplificó primero el inserto del plásmido utilizando cebadores del vector. A continuación se procedió a la generación de los estándares deseados utilizando los cebadores convenientes (tabla M4). La razón de seguir este procedimiento fue evitar productos indeseados generados por hibridaciones inespecíficas de los cebadores con el plásmido. En todos los casos, se cuantificó la cantidad de ADN de los estándares mediante un espectrofotómetro Nanodrop 2000c (Thermo Scientific).

La eficiencia de amplificación de cada pareja de cebadores se determinó cuantificando diluciones seriadas de ADN estándar, calculando la regresión lineal basada en los valores de Ct (ciclo en el que la curva de amplificación supera el umbral). La eficiencia de cada pareja de cebadores se calculó a partir de la pendiente de la recta. Se incluyeron controles negativos en todos los ensayos para asegurar que los valores obtenidos para la concentración más baja de ADN no era un artefacto. Los experimentos de PCR de todas las muestras se llevaron a cabo por triplicado.

11. Aislamiento de cepas de *Roseobacter* e identificación mediante secuenciación de 16S ADNr

Para generar una colección de cepas del clado *Roseobacter* aislados de ambientes sometidos a impacto antropogénico, se sembraron todas las muestras tomadas en septiembre de 2008 y marzo de 2009 por triplicado en placas de tres medios de cultivo: agar marino de Zobell (Cultimed, Panreac), medio mineral marino (MMM) (Lanfranconi *et al.*, 2010) suplementado con casaminoácidos (5 mg l^{-1}) como fuente de carbono, y MMM preparado sin fuente de carbono e incubado con vapores de diesel [se añadieron $20 \mu\text{l}$ de diesel esterilizado por filtración con filtros de teflón (Millipore) a la tapa de la placa]. Las placas se incubaron a temperatura ambiente (aprox. 20°C) durante 15 días. Pasado este tiempo se seleccionaron aquellas colonias susceptibles de pertenecer al grupo, en base a la coloración y morfología de las colonias. Se obtuvieron un total de 278 aislados que se conservaron a -80°C . Para seleccionar los aislados que pertenecían al clado *Roseobacter*, se partió de una colonia aislada que se resuspendió en $50 \mu\text{l}$ de agua Milli-Q esteril y se hirvió durante 5 min. A continuación, se centrifugó y se recogió el sobrenadante. Se utilizaron $2 \mu\text{l}$ de ese sobrenadante para la amplificación por PCR del 16S ADNr con los

cebadores específicos para *Roseobacter* como se describe en el apartado 8. De aquellos aislados para los cuales se obtuvo un amplicón del tamaño esperado, se amplificó el gen completo 16S ADNr utilizando los cebadores 27f y 1492r (Tabla M3) para proceder a la secuenciación (ver apartado 9). Las secuencias del gen del 16S ARNr de los aislados se depositaron en la base de datos de secuencias EBI y se les asignaron los números de acceso HE981195–HE981210. En el caso de que dos secuencias fueran 100% iguales se envió únicamente un representante.

12. Análisis de los aislados mediante espectrometría de masas MALDI-TOF

Con el fin de identificar y diferenciar los aislados del clado *Roseobacter* se realizó un análisis mediante la técnica *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight* (MALDI-TOF). Para ello, todos los aislados obtenidos se cultivaron en placas de agar marino a 25°C. En el estudio se incluyeron 20 cepas de referencia procedentes de colecciones de cultivo, 5 cepas aisladas de agua de mar prístina de misma zona que la muestra control (Lanfranconi, comunicación personal) y 3 cepas aisladas de arena cubierta de crudo procedente del accidente del Prestige (Nogales, comunicación personal) (tabla M5).

Para determinar el tiempo óptimo de incubación de las placas de cultivo, y comprobar si la antigüedad del cultivo afectaba al espectro de MALDI-TOF, se obtuvieron los espectros de dos cepas de referencia (*Ruegeria pomeroyi* DSS-3 y *Phaeobacter gallaeciensis* BS107) a diferentes tiempos de incubación (2, 3, 5, 6, 9 y 10 días), así como de cultivos sembrados diferentes días.

Material y métodos

Tabla M5: Cepas incluidas en el análisis por MALDI-TOF.

Cepa	Origen ^a
<i>Roseobacter denitrificans</i> Och 114 ^T	DSM7001
<i>Roseovarius nubinhibens</i> ISM ^T	DMS15170
<i>Roseovarius tolerans</i> EL-172 ^T	DMS11457
<i>Sagittula stellata</i> E-37 ^T	DMS11524
<i>Ruegeria pomeroyi</i> DSS-3 ^T	DMS15171
<i>Jannaschia helgolandensis</i> Hel10 ^T	DMS14858
<i>Loktanella salsilacus</i> R-8904 ^T	DMS16199
<i>Loktanella vestfoldensis</i> R-9477 ^T	DMS16212
<i>Oceanibulbus indoliflex</i> Hel45 ^T	DMS14862
<i>Tranquillimonas alkanivorans</i> A34 ^T	DMS19547
<i>Tropicibacter naphthalenivorans</i> C02 ^T	DMS19561
<i>Citricella thiooxidans</i> CHLG 1 ^T	DMS10146
<i>Oceanicola batsensis</i> HTCC2597 ^T	DMS15984
<i>Ruegeria lacuscaerulensis</i> ITI-1157 ^T	DMS11314
<i>Dinoroseobacter shibae</i> DFL-12 ^T	DMS16493
<i>Phaeobacter gallaeciensis</i> BS107 ^T	DMS17395
<i>Pelagibaca bermudensis</i> HTCC2601 ^T	JCM13377
<i>Roseobacter litoralis</i> Och 149 ^T	CECT5395
<i>Ruegeria algicola</i> FF3 ^T	CECT5396
<i>Roseobacter</i> sp. MED193	CECT7117
V4	Lanfranconi
V6R	Lanfranconi
V8	Lanfranconi
V9	Lanfranconi
V13	Lanfranconi
V329	Nogales
V357	Nogales
V366	Nogales

^a Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares, DMSZ; RIKEN BRC-Japan Collection of Microorganisms, JCM; Colección Española de Cultivos Tipo, CECT; aislados del grupo de investigación (Lanfranconi / Nogales).

Para los análisis de MALDI-TOF se analizaron dos muestras biológicas (duplicados biológicos), y cada uno de ellos se midió dos veces (duplicados técnicos). Las muestra biológicas consistían en una colonia tomada de una placa, resuspendida en 10 µl de una solución al 50%

acetonitrilo/50% agua acidificada con 2,5% de ácido trifluoroacético. Se utilizó como calibrante interno y externo el estándar Protein Calibration Standard I (Bruker Daltonics). Éste contenía insulina (m/z 5734,51 $[M+H]^+$), ubiquitina I (m/z 8565,76 $[M+H]^+$), citocromo C (m/z 12360,97 y 6180,99 para $[M+H]^+$ y $[M+2H]^+$, respectivamente) y mioglobina (m/z 16952,30 y 8476,65 para $[M+H]^+$ y $[M+2H]^+$, respectivamente). Este calibrante comercial se completó con biotín-A-15-E (m/z 1774,9 para $[M+H]^+$) para cubrir un rango de masa/carga (m/z) más bajo. El calibrante se diluyó 1:2 (v/v) en ácido trifluoroacético 0,1% para generar una señal comparable a la intensidad de los picos de la muestra. Se utilizó la matriz ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (HCCA, Bruker Daltonics). La muestra, la matriz y el calibrante se añadieron en la misma proporción (1:1:1, 1 μ l de cada) sobre una placa (Scout MTP) y se dejaron secar completamente. Los espectros se obtuvieron con un instrumento Biflex IV MALDI-TOF (Bruker Daltonics) y el programa Flex (Bruker Daltonics) usando el modo lineal a 19 kV de voltaje de aceleración nominal. Se utilizó un pulso de extracción de iones con un tiempo de retraso de 400 ns para obtener el espectro en el rango de 1700 a 20000 m/z . La frecuencia del láser fue de 5 Hz. Los espectros se obtuvieron por 150 disparos de láser consecutivos después de la calibración externa. La calibración interna permitió la recalibración posterior de los espectros.

El análisis de los datos constó de un primer paso de eliminación de ruido, suprimiendo los picos duplicados de un mismo espectro, es decir aquellos picos con el mismo valor m/z . A continuación, se seleccionaron los biomarcadores en base a la frecuencia de aparición de los picos en los diferentes espectros, escogiendo aquellos con mayor presencia en los espectros. Los valores m/z representativos de cada uno de los biomarcadores se calcularon por iteración (realizando 20 iteraciones) probando diferentes rangos de variación de los valores m/z (1500 ppm,

1000ppm, 500 ppm). Finalmente, se decidió que el rango óptimo de variación era de 400 a 2000 ppm dependiendo del valor m/z, de modo que cuanto mayor fuese el valor m/z, mayor permisividad de variación. Posteriormente, se eliminaron de nuevo, aquellos biomarcadores con valores m/z duplicados, obteniéndose 581 biomarcadores. A continuación, se creó una matriz de presencia/ausencia en la que se indicaba la presencia con 1 o ausencia 0, de cada uno de los biomarcadores en cada una de las muestras y sus réplicas. Además, se identificaron los biomarcadores correspondientes al patrón y fueron eliminados del análisis. En base a esta matriz, se analizó la variabilidad de los biomarcadores, y se eliminaron aquellos que presentaban un factor de variación superior al 30% (conservándose 253 biomarcadores). Se comprobó que la eliminación de esos marcadores no supuso cambios importantes en el posterior análisis. Por último, las réplicas técnicas se juntaron, de tal manera, que si se había identificado un pico en una de las dos réplicas, el pico se consideraba presente. Se utilizó el programa PAST-Paleontological Statistics v 1.75b. (Hammer *et al.*, 2001) para calcular un dendrograma mediante UPGMA y el coeficiente Dice (Dice, 1945) para calcular la matriz de similitud.

Estos análisis se realizaron en colaboración con el grupo de Jean Armengaud en el Departamento de Bioquímica y Toxicología Nuclear, Comisionado de la Energía Atómica-Instituto de Biología Ambiental y Biotecnología-Servicio de Bioquímica y Toxicología Nuclear (CEA-IBEB-SBTN).

13. Crecimiento de los aislados con hidrocarburos

Para evaluar la capacidad de crecimiento de los aislados pertenecientes al clado *Roseobacter* en diferentes hidrocarburos como fuente de carbono y energía se siguieron dos aproximaciones. En primer lugar se sembraron placas de medio MMM (suplementado con extracto de

levadura 5 mg l⁻¹) con los siguientes hidrocarburos aromáticos y alifáticos como fuente de carbono y energía: benzoato, salicilato, gentisato, protocatecuato, p-hidroxibenzoato y mandelato (a una concentración final de 3 mM). También se sembraron placas sin fuente de carbono que fueron incubadas con vapores de naftaleno, vapores de diesel o de hexadecano [estos dos últimos añadiendo 20 µl del compuesto filtrado con filtros de teflón (Millipore) en la tapa de la placa]. Los aislados se sembraron por duplicado y se incubaron durante 3 semanas a temperatura ambiente (aproximadamente 20°C). Los aislados se sembraron también en placas de MMM sin fuente de carbono que se consideraron los cultivos control, donde no se esperaba crecimiento.

En un segundo experimento, se realizaron siembras en MMM líquido con los siguientes hidrocarburos aromáticos: salicilato, gentisato, benzoato, protocatecuato, homogentisato, homoprotocatecuato y fenilacetato (concentración final 3 mM), así como con naftaleno (0,1% p/v, concentración final, disuelto en acetona, que se dejó evaporar antes de añadir el medio de cultivo). Las disoluciones stock de todos estos compuestos se esterilizaron por filtración con filtros de jeringa de 0,2 µm (Nalgene) o filtros de teflón 0,2 µm (Millipore). Se prepararon cultivos de 15 ml a partir de un inóculo crecido en MMM con succinato al 0,2% (p/v) como fuente de carbono durante 48 horas. Se prepararon controles negativos con medio MMM y cada uno de los hidrocarburos pero sin inocular con los diferentes aislados, así como, medio inoculado pero sin fuente de carbono. Los cultivos se incubaron durante 3 semanas a temperatura ambiente y en agitación (140 rpm). Pasado este tiempo se comprobó la presencia de crecimiento en base a la turbidez de los cultivos.

14. Secuencias genómicas de aislados del clado *Roseobacter*

Teniendo en cuenta los resultados de crecimiento en hidrocarburos y el análisis filogenético de los aislados de *Roseobacter* se procedió a la selección de 17 aislados para análisis genómico y comparación con las secuencias de genomas disponibles de bacterias de este grupo. El análisis filogenético de las secuencias de 16S ADNr previo a la selección de los aislados se realizó siguiendo la metodología descrita en el apartado 9. Se construyó un árbol filogenético aplicando el método de distancia *neighbour-joining* con secuencias completas del 16S ADNr de los aislados obtenidos en este estudio y las secuencias de todas las bacterias del grupo *Roseobacter* cuyos genomas estaban disponibles en el momento del análisis. En base al árbol obtenido, se agruparon los 19 aislados en 4 grupos en función de la similitud de las secuencias. En aquellos casos en que dos aislados presentaban una secuencia de 16S ADNr con una similitud superior al 99%, se dejó un solo representante en la selección final. De esta manera se seleccionaron 17 aislados, asignados a 4 grupos diferentes. Con el fin de obtener información genómica del mayor número de aislados posibles con los recursos disponibles se decidió hacer mezclas de ADN genómico de los aislados pertenecientes a un mismo grupo y enviar a secuenciar conjuntamente. Con esta aproximación se pretendía analizar la diversidad de rutas de degradación de hidrocarburos dentro del mayor número de aislados del grupo de *Roseobacter* posibles, con independencia de qué aislado en concreto poseía esas rutas.

Para cada uno de los aislados seleccionados se llevó a cabo una extracción de ADN con el kit comercial Wizard Genomic DNA Purification (Promega). Se cuantificaron los extractos con un espectrómetro Nanodrop 2000c (Thermo Scientific) y se preparó una mezcla con la misma cantidad de ADN de los aislados de cada uno de los cuatro grupos y se secuenció

mediante la técnica de pirosecuenciación 454 en la compañía Life Sequencing.

Las lecturas se compararon por BLASTX contra la base de datos no redundante mediante *MetGenome Rapid Annotation using Subsystem Technology* (MG-RAST) (Meyer *et al.*, 2008). Todas las búsquedas con BLAST se realizaron con un valor E de 10^{-5} y un alineamiento mínimo de 50 pb. La anotación se realizó utilizando la tecnología *SEED Subsystems*, que agrupa los genes necesarios para una determinada función (Overbeek *et al.*, 2005; Aziz *et al.*, 2008).

Para completar el estudio de las rutas de degradación de hidrocarburos se realizó una búsqueda en los genomas de todos los genes que componen cada una de las vías de degradación de compuestos aromáticos que habían sido descritas anteriormente en los genomas de *Roseobacter*. Para ello se realizó una comparación de secuencias con el programa BLAST con un E-value mínimo de 10^{-10} utilizando como base de datos los genes de degradación descritos para *Roseobacter*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO 1:

Diversidad del clado *Roseobacter* en aguas de puertos deportivos

El objetivo principal de esta parte de la tesis era estudiar en profundidad la composición y la variación temporal de las comunidades bacterianas y en especial, el grupo *Roseobacter* y confirmar su predominancia en ambientes que reciben impacto antropogénico. Para ello se muestrearon periódicamente siete puertos deportivos de la Isla de Mallorca. Estos puertos se dedican a actividades náuticas recreativas (puerto Adriano), pero también a actividades de pesca, transporte de pasajeros o transporte de mercancías (puertos de Palma y Alcudia) (ver apartado 1.1 de Material y Métodos). Debido a su distinta localización geográfica, se encuentran en áreas sometidas a diferentes condiciones de vientos y corrientes (López-Jurado *et al.*, 2008).

1. Caracterización de las muestras de agua

Con el fin de caracterizar las muestras de agua, se midieron varios parámetros fisicoquímicos, como la temperatura *in situ*, la conductividad, pH, concentración de hidrocarburos totales y concentración de clorofila *a*.

La temperatura del agua era similar en todos los puertos para un mismo muestreo, a excepción del puerto de Sóller, donde la temperatura fue inferior a la del resto de puertos en todas las épocas del año. Las temperaturas variaban a lo largo del año desde los 12-14°C en invierno a 28°C en verano (Figura R1.1a). Esta misma variación se observó en las muestras control, con 14°C en marzo y 24°C en octubre de 2009. Estas variaciones térmicas son debidas a la marcada estacionalidad del clima mediterráneo (Duarte *et al.*, 1999) que provoca cambios de temperatura de hasta 16 grados entre estaciones.

En general, se observaron pequeñas variaciones en los valores de conductividad (medianas de los valores entre 35,6 y 47,5 mS cm⁻¹) y pH (medianas entre 7,9 y 8,2) en la mayoría de puertos (Figura R1.1.b, c).

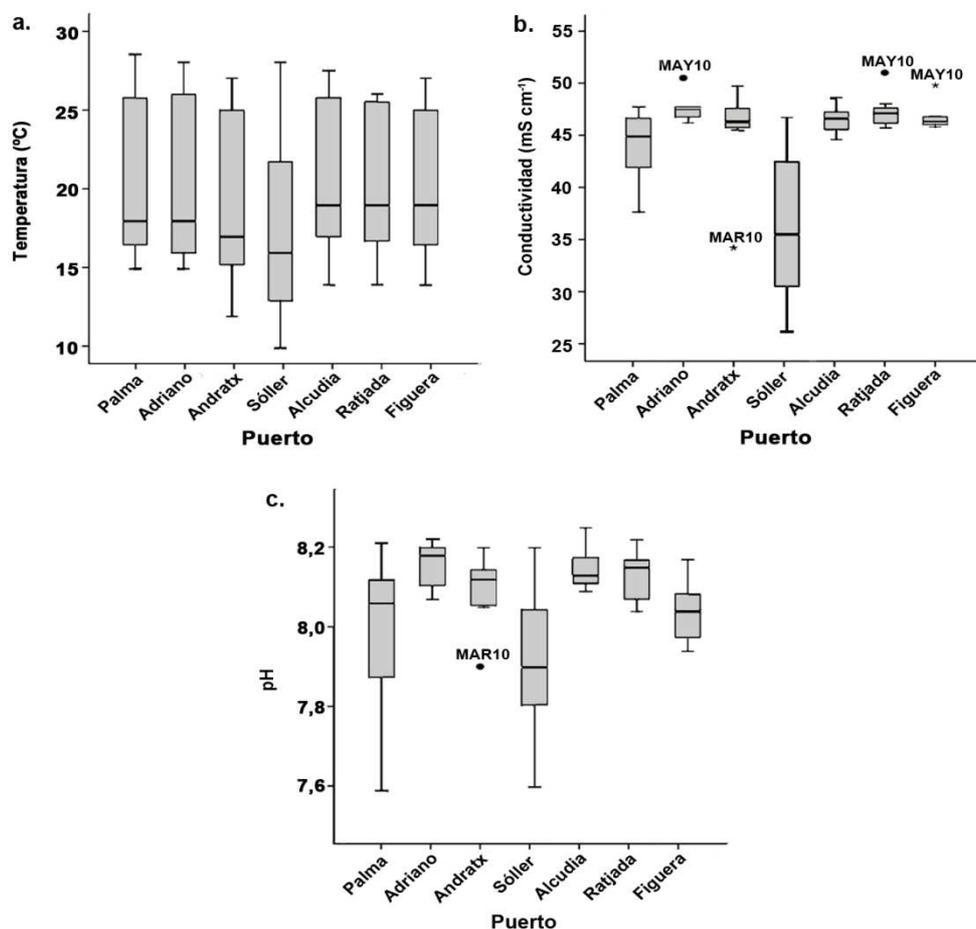


Figura R1.1: Diagramas de caja de las variaciones de temperatura (a), conductividad (b), y pH (c) a lo largo del periodo de estudio. El número de muestras por cada puerto es n=7.

Sin embargo, ambos parámetros mostraron un rango de variación mayor en los puertos de Palma y Sóller, con medianas de los valores inferiores a la del resto de puertos. Las variaciones de estos dos parámetros en estos dos puertos podrían ser debidas probablemente a aportes de agua dulce, procedente de torrentes (en ambos casos hay desembocaduras de torrentes próximas a la zona de muestreo). Se observó una correlación lineal significativa entre la temperatura y la conductividad y el pH (Correlaciones de Spearman: Temperatura-

Conductividad $R=0,570$ $p=0,000$ y Temperatura-pH $R=0,285$ $p=0,047$), probablemente, como consecuencia de la evaporación del agua en los meses más cálidos. Las muestras control mostraron valores medios de conductividad de $47,1 \text{ mS cm}^{-1}$ y de pH de 8,2.

La concentración de clorofila *a* se midió como variable de referencia para la biomasa de fitoplancton, mientras que la concentración de hidrocarburos se utilizó como indicador de contaminación y por tanto del impacto derivado de la actividad portuaria. Las variaciones en la concentración de clorofila *a* y hidrocarburos (Figura R1.2) no parecían responder a ningún patrón específico, aunque la clorofila presentaba cierta tendencia a aumentar en las muestras de verano. Las medianas de las concentraciones de clorofila *a* se encontraban entre $1,03\text{-}2,82 \mu\text{g ml}^{-1}$, aunque cada uno de los puertos mostraba patrones de variación distintos. Como comparación, los valores promedio de concentración de clorofila *a* en las muestras de agua control fueron de $0,4 \mu\text{g ml}^{-1}$. En función de los valores de las medianas se podrían agrupar aquellos puertos que presentaban valores más altos (Palma, Adriano, Andratx y Alcudia). Además, destacaba la elevada variabilidad observada en el puerto de Cala Figuera que contrastaba con los valores relativamente constantes registrados en el puerto de Cala Ratjada.

En cuanto a la concentración de hidrocarburos el rango de variación de las medianas fue de $20\text{-}143 \text{ ppb}$ ($\mu\text{l l}^{-1}$). En general, las medianas de los diferentes puertos fueron bastante similares, a excepción de Palma que mostró el valor más elevado (143 ppb) y que además mostró una mayor variabilidad a lo largo del periodo muestreado. Esto pudo ser debido a que el puerto de Palma es el puerto más grande de los estudiados y por tanto, el que presenta un mayor movimiento de embarcaciones (1785 amarres, ver tabla M1).

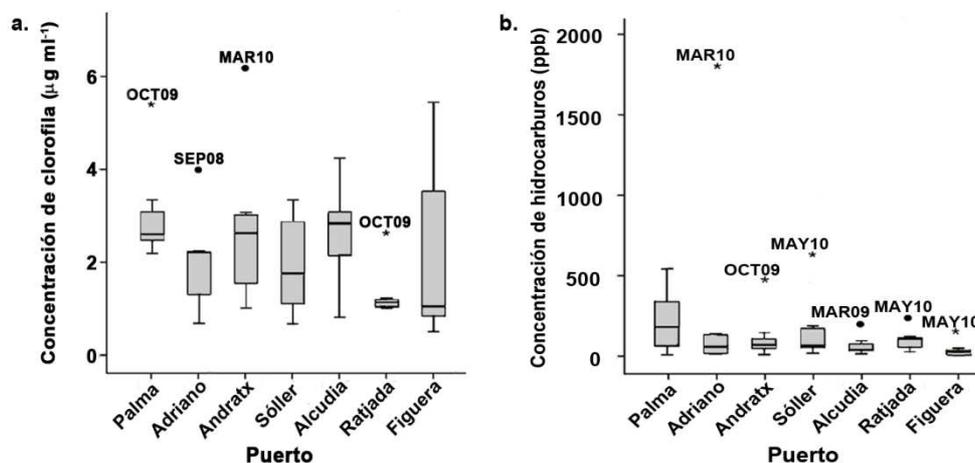


Figura R1.2: Diagramas de cajas de las variaciones en la concentración de clorofila a (a), de hidrocarburos (b) a lo largo del periodo de estudio. El número de muestras por cada puerto es $n=7$.

A pesar de que la mayoría de los valores de concentración de hidrocarburos en un mismo puerto no mostraron variaciones importantes (figura R1.2b), se observaron valores elevados en momentos puntuales, como es el caso de la muestra tomada en puerto Adriano en marzo de 2010 (1804 ppb), en Andratx en octubre de 2009 (476 ppb) o la muestra tomada en el puerto de Sóller en mayo de 2010 (631 ppb). En cambio, la concentración promedio de hidrocarburos en las muestras control fue de 13,5 ppb.

Al comparar los valores obtenidos para las muestras tomadas en puertos y las tomadas de aguas prístinas, no se observaron diferencias importantes en los valores de temperatura, conductividad o pH. No obstante, la concentración de clorofila a en cualquiera de los siete puertos estudiados fue mayor que los valores registrados en las muestras control. En un estudio previo realizado en la zona de puerto Adriano (Nogales *et al.*, 2007; Aguiló-Ferretjans *et al.*, 2008) se obtuvieron resultados similares. Las concentraciones de clorofila a registradas en el interior del puerto

mostraron valores elevados, especialmente en los meses de verano, al igual que lo que se observó en el puerto de Barcelona (Schauer *et al.*, 2000). En cuanto a la concentración de hidrocarburos, se detectaron valores bajos en las muestras control, aunque en algunos casos estos fueron equiparables a las detectadas en puertos. Por ejemplo, las concentraciones de hidrocarburos detectadas entre septiembre de 2008 y marzo de 2010 en el puerto de Cala Figuera son incluso inferiores a las obtenidas en la muestra control en marzo de 2009 (27 ppb).

2. Recuentos microscópicos de procariotas totales y de grupos bacterianos específicos

El número de procariotas totales (recuentos de DAPI) presentes en las aguas de puertos fue relativamente constante con medianas entre $7,3 \times 10^5$ y $1,9 \times 10^6$ células ml^{-1} (Figura R1.3a). Los valores obtenidos para los diferentes puertos fueron similares a excepción de Sóller y Cala Ratjada que presentaban medianas más bajas que el resto. Cabe destacar que los puertos Adriano y Alcudia mostraron mayor variabilidad en el número de procariotas totales durante el periodo de tiempo muestreado. Las medianas del número de células detectadas con las sondas universales EUBI-III (*Bacteria*) se encontraban entre los 4×10^5 y los $1,2 \times 10^6$ células ml^{-1} y al igual que el número de células totales eran similares en todos los puertos estudiados (Figura R1.3b). De nuevo, los puertos de Sóller y Cala Ratjada mostraron las medianas más bajas, así como baja variabilidad entre muestras. La mediana de los porcentajes de detección para *Bacteria* era del 59%, lo que significa que la mayoría de las células detectadas por DAPI fueron detectadas por FISH, lo que es indicativo de que se trataba de células con elevado contenido de ribosomas. En comparación, las muestras control presentaron recuentos de procariotas totales y de *Bacteria* inferiores a los de cualquier puerto como era de esperar (valores

promedio de 4×10^5 células ml^{-1} y $2,8 \times 10^5$ bacterias ml^{-1} , respectivamente). La mayor abundancia de procariontes planctónicos en puertos deportivos en comparación con zonas próximas ha sido descrita con anterioridad por otros autores (Nogales *et al.*, 2007; Schauer *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2007) y ha sido atribuida a la mayor concentración de nutrientes y al agua semiestancada de los puertos (Nogales, 2010).

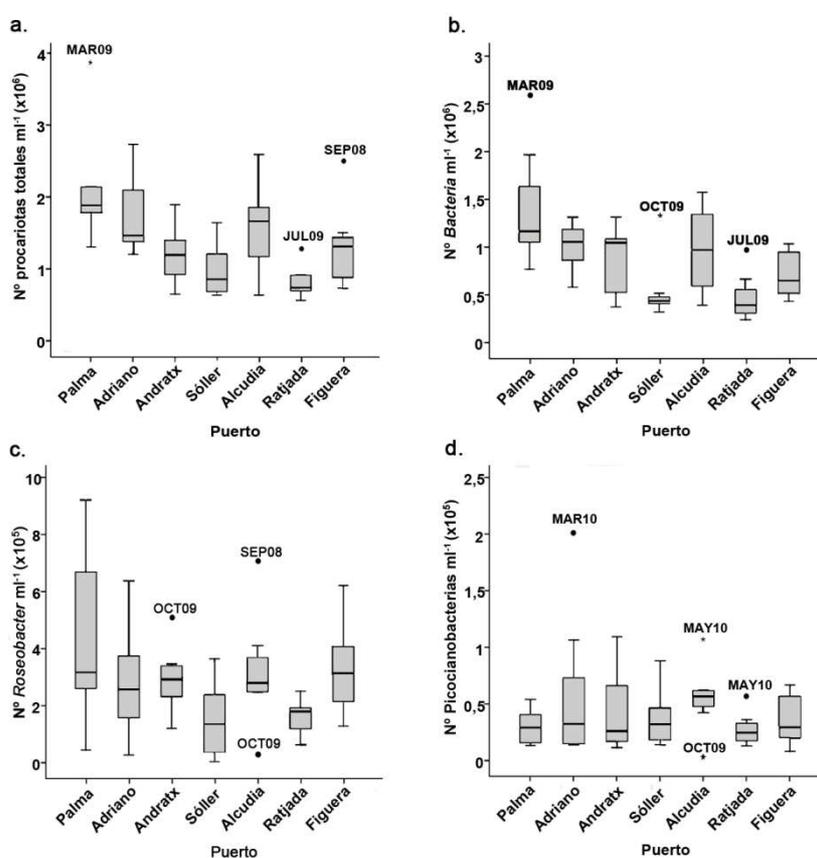


Figura R1.3: Diagramas de caja de los recuentos de DAPI (a), *Bacteria* (FISH sondas EUB338 I-III) (b), *Roseobacter* (FISH sonda ROSEO536R) (c), y recuentos de picocianobacterias (d). El número de muestras por cada puerto es $n=7$.

En cuanto al número de bacterias del clado *Roseobacter* (figura R1.3c) se observó de nuevo que las medianas de los distintos puertos eran

similares (rango de medianas era de $1,4 \times 10^5$ y $3,2 \times 10^5$ células ml^{-1}). La abundancia de *Roseobacter* tuvo una elevada variabilidad a lo largo del tiempo en algunos puertos, como fue el caso de Palma, Adriano, Sóller y Cala Figuera. Los porcentajes de detección de *Roseobacter* respecto al número total de procariotas (recuentos de DAPI) fueron superiores al 10% en 43 de las 49 muestras tomadas en puertos, y en algunos casos se alcanzaron valores del 43%, lo que indica la importancia de este grupo (en términos de abundancia) en estos ambientes.

Por último, los recuentos de picocianobacterias (Figura R1.3d) mostraron medianas similares en todos los puertos (entre $2,4 \times 10^4$ y $5,6 \times 10^4$ células ml^{-1}) a excepción de Alcudia cuya mediana fue más elevada. Destaca la baja variabilidad observada en los puertos de Alcudia y Cala Ratjada, y el elevado porcentaje detectado en puerto Adriano en marzo de 2010 (casi del 17%). Los valores promedio del número de *Roseobacter* y picocianobacterias de las muestras control fue inferior en un orden de magnitud (5×10^4 y $6,1 \times 10^3$ células ml^{-1} , respectivamente) a los valores observados en puertos.

Del estudio estadístico se concluyó que el número de procariotas totales en puertos deportivos no se correlacionaba con parámetros como la temperatura, conductividad, pH o la concentración de hidrocarburos. No obstante, sí se observó una correlación positiva con la concentración de clorofila *a* ($R=0,406$ $p=0,004$). Además, se observó también correlación entre el número total de procariotas y los recuentos de *Bacteria* ($R=0,709$ $p=0,000$) y el número de *Roseobacter* ($R=0,791$ $p=0,000$), de modo que las variaciones en el número de procariotas totales eran debidas al incremento de bacterias, siendo *Roseobacter* uno de los grupos bacterianos implicados. Los recuentos de *Bacteria* correlacionaban también positivamente con la concentración de clorofila *a* ($R=0,341$ $p=0,017$), lo

que indicaría que un incremento en la producción primaria provocaba un incremento en el número de células bacterianas presuntamente activas. Por su parte, los recuentos de *Roseobacter* presentaban una correlación positiva con el número de picocianobacterias ($R=0,333$ $p=0,017$) y la concentración de clorofila ($R=0,325$ $p=0,020$). Sin embargo, la concentración de clorofila *a* no correlacionaba con los recuentos de picocianobacterias, lo que significa que los cambios en la concentración de clorofila probablemente fueran debidos a la presencia de algas. Esto podría indicar que el grupo *Roseobacter* respondía a cambios de las comunidades de algas, ya que numerosos estudios apuntan a la existencia de asociaciones entre estos organismos (Shiba, 1991; Brinkmeyer *et al.*, 2000; Ashen *et al.*, 2000; Pinhassi *et al.*, 2005). El incremento de clorofila es indicativo de disponibilidad de nutrientes, por tanto, el posible incremento de *Roseobacter* podría ir ligado a esa mayor presencia de nutrientes. Por otro lado, no se observó una correlación significativa entre la abundancia del grupo *Roseobacter* en aguas de puertos y la concentración de hidrocarburos. En el estudio previo realizado en puerto Adriano, no se realizaron recuentos de *Roseobacter* mediante la técnica de FISH, pero se infirieron los cambios en la abundancia de algunas poblaciones del clado mediante T-RFs identificativos del grupo. En ese caso, tampoco se pudo establecer correlación con la concentración de hidrocarburos presentes en el medio (Nogales *et al.*, 2007). En cualquier caso, los recuentos de *Roseobacter* demuestran la importancia del grupo en puertos, confirmando resultados preliminares previos (Aguiló-Ferretjans, 2009). En cambio, sí se observó una correlación positiva entre el número de picocianobacterias y la concentración de hidrocarburos en el agua ($R=0,328$, $p=0,019$), lo cual contrastaba con resultados previos que apuntarían a un efecto negativo de los hidrocarburos sobre picocianobacterias (Echeveste *et al.*, 2010; Lanfranconi, 2010).

3. Perfiles de T-RFLP de 16S ADNr de la comunidad bacteriana total en puertos

En primer lugar se analizó la composición de la comunidad bacteriana total en las muestras tomadas de puertos deportivos. El estudio de diversidad se basó en el análisis de perfiles electroforéticos de T-RFLP del gen 16S ARNr (ver apartado 8 de material y métodos). Los resultados del análisis que se muestran aquí se basan en los fragmentos 5' y 3' obtenidos con los enzimas *AluI* y *HhaI* y se tuvo en cuenta tanto la presencia/ausencia como la abundancia relativa de los diferentes picos electroforéticos. Se obtuvieron perfiles de T-RFLP de 16S ADNr para todas las muestras de puertos analizadas.

La diversidad de la comunidad bacteriana se determinó mediante el cálculo del índice de diversidad de Shannon en base a los fragmentos 5' generados por el enzima *AluI*, ya que este extremo es más variable que el 3' y *HhaI* generaba menos fragmentos. Las medianas de los índices de Shannon de las comunidades bacterianas de todos los puertos eran muy similares (entre 1,62–2,18). No obstante, algunos puertos (Palma, Cala Ratjada y Cala Figuera) presentaron medianas menores y un rango de variación menor que el resto de puertos (figura R1.4). Las comunidades de Puerto Adriano y Sóller fueron las que mostraron valores de diversidad mayores, con medianas por encima de 2,5, junto con las comunidades del puerto de Alcudia, que aunque presentaban una mediana menor (2,1) tenían también un amplio rango de variación. El valor de diversidad promedio observado en las muestras control (1,15) fue menor que cualquiera de las medianas de los puertos, lo que significa que en estos ambientes sometidos a contaminación crónica, la diversidad bacteriana es mayor que en las zonas costeras próximas, lo que coincide con lo

observado en otros puertos (Schauer *et al.*, 2000; Nogales *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007; Aguiló-Ferretjans *et al.*, 2008).

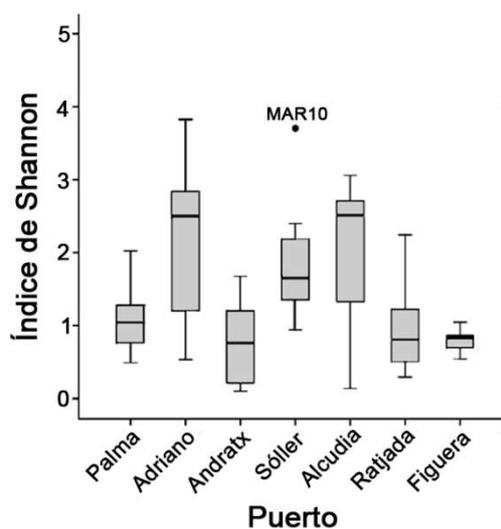


Figura R1.4: Índices de de diversidad de Shannon calculados a partir de los fragmentos 5' generados por el enzima *A/lul*.

El estudio estadístico de los datos mostró que el índice de diversidad de Shannon y la temperatura estaban correlacionados negativamente ($R = -0,301$ $p = 0,034$), de modo que la diversidad era mayor en invierno que en verano. Los valores de los índices de diversidad de este estudio son equiparables a los obtenidos previamente en puerto Adriano (Nogales *et al.*, 2007).

En el análisis comparativo de los perfiles de T-RFLP se utilizaron matrices de distancia (coeficiente Bray-Curtis) que se usaron para determinar las relaciones entre los perfiles de las diferentes muestras mediante análisis por UPGMA o NMDS. La figura R1.5 muestra los resultados de NMDS, en el que se incluyeron también los perfiles de dos muestras control (marzo y octubre de 2009). Se observó una importante dispersión de los puntos, en concordancia a los valores de estrés (0,2179).

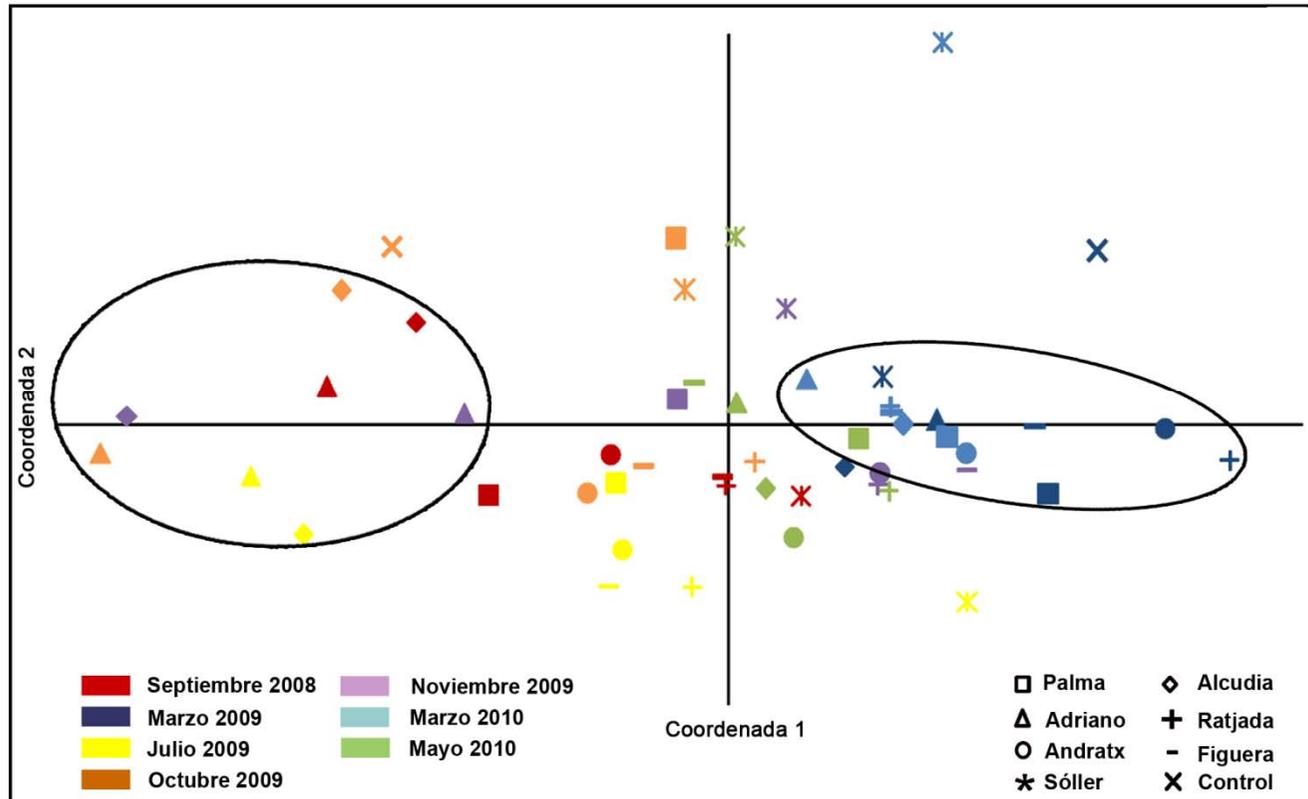


Figura R1.5: Análisis NMDS a partir de los perfiles de T-RFLP del gen 16S ARNr con cebadores universales (estrés 0,2179). La elipse de la izquierda agrupa las muestras de puerto Adriano y Alcudia con un 30% de similitud y la de la derecha las muestras de los meses de marzo con un 47% de similitud.

No obstante, se obtuvieron perfiles de T-RFLP de comunidades microbianas de puertos distintos con valores de similitud elevados (superiores al 60%), lo cual contrasta con los resultados de un estudio previo realizado en puerto Adriano, donde las similitudes entre las muestras tomadas a diferentes tiempos mostraban valores de similitud también del 60%. De este modo, las diferencias entre los perfiles de T-RFLP de 16S ADN_r de muestras de un mismo puerto en distintas épocas del año eran mayores que las observadas entre muestras de puertos distintos. Un ejemplo de ello, fueron los cambios en las comunidades del puerto de Palma. Las muestras de septiembre de 2008 y marzo de 2009 de este puerto presentaban una semejanza de tan solo el 20%, lo que indica que las comunidades microbianas mostraban cambios drásticos a lo largo del año. Sin embargo, en ocasiones la similitud entre muestras tomadas en puertos distintos podía ser mayor que entre muestras de un mismo puerto. Así por ejemplo, la similitud entre las comunidades de los puertos de Palma y Andratx en septiembre de 2008 era casi del 60%. También se observaron valores de similitud elevados para las comunidades bacterianas de los puertos de Cala Ratjada y Cala Figuera, que presentaban similitudes entre el 50 y el 70% en todos los muestreos. Además, el 57% de las muestras de puerto Adriano y Alcudia se agrupaban juntas con un porcentaje de similitud de alrededor del 30% (elipse de la izquierda de la figura R1.5), indicando que las comunidades bacterianas de estos dos puertos eran similares (y diferentes a las del resto de puertos) y además, presentaban patrones de variación semejantes. Así pues, a pesar de las diferentes características de los puertos estudiados (localización, tamaño, corrientes, aportes de agua dulce, usos del puerto, etc.), los resultados mostraron que las comunidades microbianas en puertos deportivos diferentes podrían ser muy similares.

Además, se observó una variación temporal de las comunidades bacterianas, como ya se había descrito en estudios anteriores (Nogales *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2009). Sin embargo, hasta día de hoy no se había realizado ningún estudio de comparación de la diversidad microbiana de puertos distintos, abordando, además, la variación temporal de las comunidades microbianas. En el lado izquierdo de la representación mostrada en la figura R1.5 aparece representada la muestra control de octubre y en el lado derecho la muestra control de marzo, lo que mostraría la variación estacional de aguas naturales. A pesar de ello, estas dos muestras eran más semejantes entre ellas que con ninguna muestra procedente de puertos (40% de similitud). Las variaciones temporales que mostraban las comunidades microbianas provocaron que las muestras de un mismo puerto apareciesen lejanas en la representación por NMDS. Sin embargo, se observaron agrupaciones de muestras tomadas en una misma época o muestreo. El eje de ordenadas dividía las muestras en función de la temperatura del agua. A grandes rasgos, las comunidades de muestras con una temperatura más baja (<20°C) se agrupaban a la derecha del eje, y a la izquierda aquéllas con temperaturas más altas (>20°C). Un claro ejemplo de ello, eran las muestras tomadas en marzo de 2009 y 2010, que aparecían representadas juntas y marcadas en azul en la representación NMDS (86% de las muestras de marzo) mostrando una similitud del 50%. Una situación semejante se observaba para la mayoría de las muestras tomadas en los meses en los que el agua estaba a temperaturas más altas (marcadas por puntos rojos, amarillos y naranjas). Así pues, la temperatura parecía un factor importante que influía en las variaciones temporales de las comunidades microbianas. Las muestras tomadas en invierno y primavera (con independencia del puerto de origen) mostraban comunidades microbianas con un elevado porcentaje de similitud, lo que hacía que apareciesen representadas juntas, mientras que

las de verano y otoño se diferencian de las anteriores, pero tendían a entremezclarse en la representación.

Las variaciones estacionales de las comunidades microbianas observadas en este estudio concuerdan con un estudio realizado en la zona del puerto Victoria, Hong Kong, en el que se demostró que uno de los principales factores que afectaba a la dinámica temporal de las comunidades microbianas era la temperatura (Zhang *et al.*, 2009). También, la temperatura parecía ser un factor importante que influía en la dinámica temporal de las poblaciones bacterianas de la zona de puerto Adriano (Mallorca), ya que la abundancia de los T-RFs más importantes se encontraba correlacionada significativamente con la temperatura (Nogales *et al.*, 2007).

El análisis de componentes principales permitió determinar aquellos T-RFs importantes en la diferenciación de los perfiles de T-RFLP. Los T-RFs obtenidos por el enzima *AluI* aparecen indicados con una A, mientras que los obtenidos por el enzima *HhaI* se indica con una H. Los números 5' y 3' indican el extremo del gen del 16S ARNr al que corresponde cada T-RF. Los fragmentos más relevantes, la frecuencia con la que fueron detectados en los perfiles y su abundancia relativa se muestran en la Tabla R1.1.

Dos de los T-RFs identificados, T-RF 5'A248 y 5'A246, se comprobó que eran generados por diferentes poblaciones del grupo *Roseobacter* (ver apartado 5.2). La frecuencia de aparición de ambos T-RFs era elevada en ambos casos, aunque el T-RF 5'A248 presentaba una frecuencia casi el doble de la del T-RF 5'A246. Además, el 5'A248 fue el que presentó los valores máximos más elevados, alcanzando abundancias relativas de hasta el 27%. Estos dos fragmentos contribuían a la diferenciación de las muestras de invierno de las de verano; las

abundancias relativas de ambos T-RFs presentaban correlaciones significativas con la temperatura. El 5'A248 presentaba una correlación negativa con la temperatura ($R = -0,418$ $p = 0,002$) mientras que el 5'A246 se correlacionaba positivamente con la temperatura ($R = 0,430$ $p = 0,002$). El T-RF 5'A248 era el principal responsable de la separación de las muestras ambos lados del eje de ordenadas, de modo que las muestras que se encontraban en los cuadrantes derechos de en la figura R1.5 presentaban abundancias relativas elevadas para este T-RF.

Tabla R1.1: T-RFs más importantes en la diferenciación de las comunidades bacterianas de puertos deportivos.

T-RF	Frecuencia (%) ^a	Abundancia (%) ^b	Rango (%)	Control (%) ^c
5'A68	69	1,1	0-21,7	0
5'A229	33	0,8	0-5,4	0
5'A246	47	4,1	0-14,2	1
5'A248	80	4,9	0-27,1	0
3'A113	33	1,7	0-24,8	0
3'A337	47	1,4	0-10	0,5
5'H204	27	1,5	0-15,2	0
3'H276	92	4,9	0-18,3	3
3'H299	53	1,6	0-7,5	7,3
3'H300	59	3,1	0-7,8	0,4

^a El número de muestras de los puertos era $n=49$ y para las muestras control $n=2$.

^b Mediana de la abundancia relativa, en las muestras en las que estaba presente el T-RF.

^c Valor promedio de la abundancia en las dos muestras.

La abundancia relativa de cinco de los ocho T-RFs restantes estaba también correlacionada con la temperatura. Así, cuatro de ellos se correlacionaban negativamente con la temperatura, siendo más abundantes en las muestras tomadas en los meses en que el agua era más fría: 5'A68 ($R = -0,453$ $p = 0,001$), 3'A113 ($R = -0,453$ $p = 0,001$), 3'A337 ($R = -0,430$ $p = 0,002$) y 5'H204 ($R = -0,462$ $p = 0,001$). En ambos la abundancia relativa del T-RF 3'H300 se correlacionaba positivamente con

la temperatura ($R=0,610$ $p=0,000$), de tal manera que no se detectó su presencia en las muestras tomadas en los meses de marzo. Además, los T-RFs 3'A113 y 3'H204 correlacionaban positivamente con la concentración de hidrocarburos ($R=0,293$ $p=0,037$ y $R=0,330$ $p=0,018$, respectivamente).

Por último, el T-RF 3'H276 fue el T-RF que aparecía con mayor frecuencia en las muestras de puertos y con una mediana de la abundancia relativa de 4,9. La abundancia relativa de este T-RF mostraba una correlación positiva con la de los T-RF 5'A246 y 5'A248 ($R=0,452$ $p=0,001$ y $R=0,417$ $p=0,002$).

4. Perfiles de T-RFLP de 16S ADN de *Alphaproteobacteria* en puertos

En base a los perfiles de T-RFLP obtenidos con cebadores específicos para *Alphaproteobacteria* se calculó el índice de diversidad de Shannon en base a los fragmentos 5' generados por el enzima *AluI* (figura R1.6).

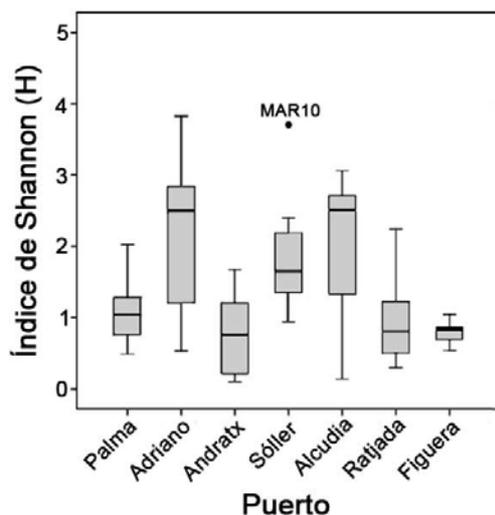


Figura R1.6: Índices de diversidad de Shannon para *Alphaproteobacteria* calculados a partir de los fragmentos 5' generados por el enzima *AluI*.

Las medianas del índice de diversidad de Shannon se encontraban entre 0,8 y 2,6. Se observaron variaciones en los valores del índice de Shannon a lo largo del tiempo de estudio, principalmente en puerto Adriano y Alcudia, que además mostraban medianas muy similares. Los puertos de Palma, Andratx, Cala Ratjada y Cala Figuera mostraron medianas similares (alrededor de 1). Destaca la baja variabilidad observada en Cala Figuera. Los índices de diversidad de las muestras control fueron mayores que los detectados en los puertos, con un valor medio de 3,6.

Al igual que ocurría con los perfiles de T-RFLP de 16S ADNr obtenidos con cebadores universales para *Bacteria*, los perfiles para *Alphaproteobacteria* mostraron que comunidades de puertos distintos presentaban valores de similitud elevados (superiores al 60%). Por ejemplo, las comunidades de alfaproteobacterias de las muestras de los puertos Cala Ratjada y Cala Figuera en noviembre de 2009 mostraron una similitud del 80%. En cambio, las muestras tomadas en el puerto de Cala Figuera a lo largo del periodo de muestreo presentaban similitudes entre el 10 y el 60%. Esto significa, que las poblaciones de *Alphaproteobacteria* de los puertos podían ser más similares entre muestras de puertos distintos que entre las muestras tomadas de un mismo puerto.

También se comprobó que, al igual que la comunidad bacteriana total, las poblaciones de alfaproteobacterias presentes en puertos se encontraban sometidas a variaciones estacionales. Muestras tomadas en la misma época del año aparecen representadas juntas (figura R1.7). Por ejemplo, el 100% de las muestras tomadas en los meses de marzo se agrupan juntas con un porcentaje de similitud mínimo del 40%.

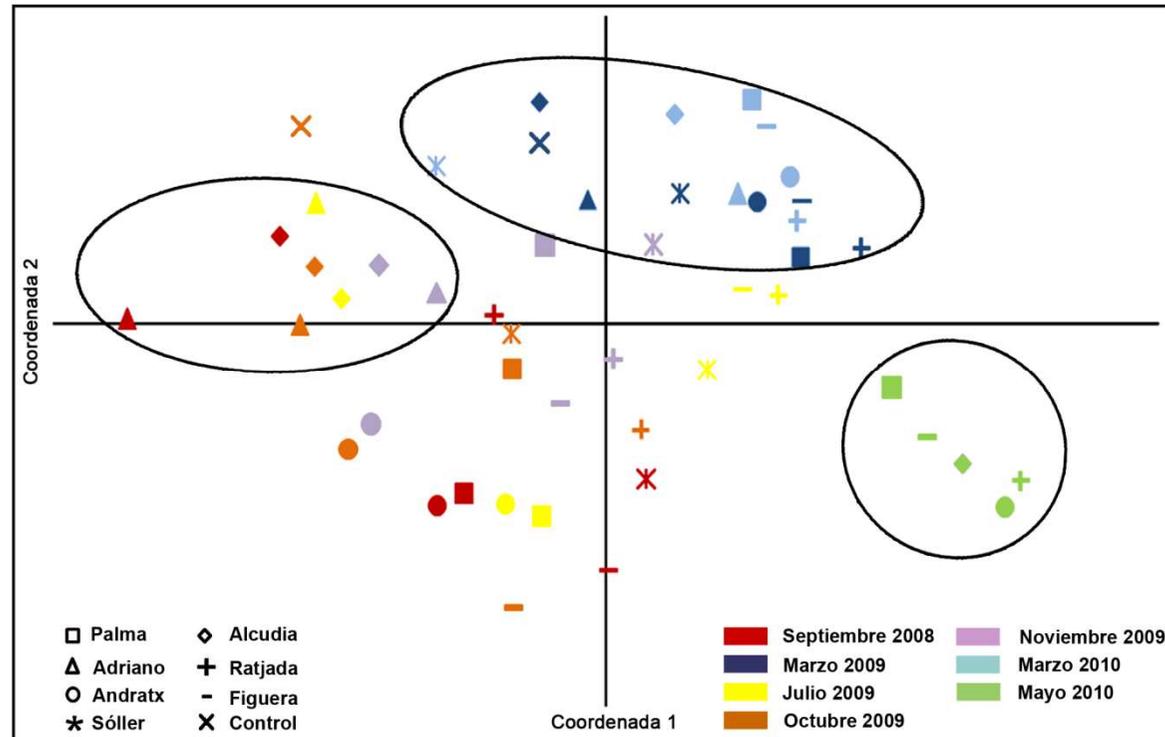


Figura R1.7: Análisis NMDS a partir de los perfiles de T-RFLP del gen 16S ARNr con cebadores específicos de *Alphaproteobacteria* (estrés 0,2254). No se han incluyeron las muestras de Sóller y Adriano de mayo 2010 ya que presentaban perfiles muy divergentes. La elipse de la derecha de la figura agrupa el 50% de las muestras de puerto Adriano y Alcudia (33% de similitud), la de la izquierda agrupa el 100% de las muestras tomadas en marzo (42% de similitud) y el círculo agrupa las muestras tomadas en mayo de 2010 (50% de similitud).

Por otro lado, se observó una clara diferenciación de los perfiles correspondientes a las muestras tomadas en mayo de 2010, probablemente debido a que presentaban pocos T-RFs, aunque éstos eran relativamente abundantes y compartidos por todas las muestras de este mes. Por último, como ocurría para la comunidad bacteriana total, el 50% de las muestras de puerto Adriano y Alcudia se agrupaban juntas, con una semejanza superior al 30%, aunque las muestras de estos dos puertos tomadas en marzo se agrupaban con las de otros puertos del mismo mes.

El análisis de componentes principales permitió identificar aquellos T-RFs más importantes en la diferenciación de los perfiles de las muestras. Se indican con una A aquellos T-RFs obtenidos por la digestión con el enzima *AluI*, con H los obtenidos por *HhaI* y con Ha los obtenidos por *HaeIII*. La tabla R1.2 muestra los T-RFs importantes en la diferenciación de los perfiles de T-RFLP de *Alphaproteobacteria*. Los dos T-RFs más relevantes para la diferenciación de los perfiles fueron los T-RFs 5'A235 y 5'A237, característicos del clado *Roseobacter* (ver apartado 5.2). El T-RF 5'A235 estaba presente en el 69% de las muestras con una mediana de la abundancia relativa del 4,4% (con valores máximos del 39%). El T-RF 5'A237 se detectó en el 94% de las muestras con una mediana del 8,3% (y un valor máximo del 58,9%). Además, estos dos T-RFs se corresponden con los dos identificados en los perfiles de T-RFLP de *Bacteria* (5'A246 y 5'A248). El análisis estadístico mostró que existían correlaciones positivas entre la abundancia de estos T-RFs: 5'A246-5'A235 ($R=0,772$ $p=0,000$) y 5'A248-5'A237 ($R=0,705$ $p=0,000$). La diferencia de tamaño se debe a que los cebadores usados para *Bacteria* y *Alphaproteobacteria* hibridan en posiciones distintas del gen del 16S ARNr.

Tabla R1.2: T-RFs más importantes en la diferenciación de los perfiles de *Alphaproteobacteria*.

T-RF	Frecuencia (%) ^a	Abundancia (%) ^b	Rango (%)	Control (%) ^c
5'A235	69	4,4	0-39,5	1,4
5'A237	94	8,3	0-58,9	7,4
3'A120	63	2,3	0-19,7	9,6
3'A237	27	5,8	0-29,6	0
5'Ha50	33	29,6	0-42	18

^a El número de muestras de los puertos era n=49 y para las muestras control n=2.

^b Mediana de la abundancia relativa, en las muestras en las que estaba presente el T-RF.

^c Valor promedio de la abundancia en las dos muestras.

Otros tres T-RFs contribuyeron a la separación de las muestras: 3'A237, 5'Ha50, 3'A120. Los T-RFs 3'A237 y 5'Ha50 fueron los que mostraron las frecuencias de aparición más bajas (27% y 33%, respectivamente), aunque cuando estaba presente el 5'Ha50 presentaba una mediana de abundancia relativa muy elevada cercana al 30%. La abundancia relativa de los T-RFs 3'A237 y 5'Ha50 mostraron una correlación negativa con la temperatura ($R = -0,522$ $p=0,000$ y $R = -0,941$ $p=0,000$, respectivamente). Por último, el 3'A120 estaba presente en el 63% de las muestras con una mediana del 2,3% y valores máximos casi del 20%. Este T-RF se comprobó que era identificativo de *Actinobacteria* (ver apartado 6). Esto se debe a que los cebadores empleados no eran completamente específicos de *Alphaproteobacteria* (Amann y Fuchs, 2008), por lo que se amplificaron otros grupos bacterianos como *Actinobacteria*. Esto supone que los perfiles mostrados en la figura R1.7 contienen información que no corresponde únicamente a *Alphaproteobacteria*, aunque esto no invalida la comparación de los perfiles de los puertos.

5. Diversidad y dinámica del grupo *Roseobacter* en aguas de puertos

5.1. Identificación de las poblaciones de *Roseobacter* presentes en aguas de puertos

El estudio de la diversidad y dinámica del grupo *Roseobacter* en aguas de puertos era uno de los objetivos principales de esta tesis doctoral. Para estudiar en profundidad la diversidad del grupo presente en aguas de puertos, se generaron genotecas del gen 16S ARNr utilizando cebadores específicos de *Alphaproteobacteria*. Se generaron un total de 15 genotecas correspondientes a las muestras tomadas en septiembre de 2008 y marzo de 2009. Se eligieron estos dos muestreos para estudiar, además de la diversidad, también las variaciones estacionales de las poblaciones del clado *Roseobacter*, dado que se había observado variación a nivel de comunidad mediante el análisis de los perfiles de T-RFLP. Se incluyó además la muestra control tomada en marzo de 2009 para poder comparar los resultados de puertos con lo que ocurre en una comunidad de agua prístina. Se analizaron un total de 1237 clones, de los cuales 896 se pudieron amplificar con cebadores específicos de *Roseobacter*. Todas las secuencias identificadas como quimeras fueron descartadas. Tras agrupar en filotipos (ver más adelante) el número final de secuencias incluidas en este análisis fue de 603, con una longitud promedio de 750 pb. Solo se obtuvieron 16 secuencias pertenecientes a la clase *Alphaproteobacteria* pero no al clado *Roseobacter*. Estas secuencias se relacionaban con los géneros *Nisaea* (7 clones), *Aquaspirillum* (1 clon), *Marinovum* (1 clon) y sin género asignado (7 clones).

Debido a que los cebadores no eran totalmente específicos (Amann y Fuchs, 2008), se obtuvieron también 55 secuencias pertenecientes a la clase *Actinobacteria*. Las secuencias de *Actinobacteria* obtenidas se relacionaban con los géneros *Candidatus Aquiluna* (23 clones),

Salinibacterium (9 clones), *Microcella* (7 clones), *Candidatus Rhodoluna* (5 clones), *Labdella* (3 clones), *Cryocola* (2 clones), *Parkia* (1 clon), *Solirubrobacter* (1 clon) y 4 clones sin género asignado. Tres de los clones relacionados con el género *Candidatus Rhodoluna* presentaban una similitud del 100% con la secuencia de clones detectados en puerto Adriano en el estudio anterior (Aguiló-Ferretjans *et al.*, 2008). La mayor parte de las secuencias obtenidas se afiliaban a actinobacterias de ambientes de agua dulce como lagos (Warnecke *et al.*, 2004), lagos hipersalinos (Demergasso *et al.*, 2008) y de ambientes marinos (Kan *et al.*, 2008; Poretsky *et al.*, 2010). Los géneros *Candidatus Aquiluna* y *Rhodoluna* se han descrito como microorganismos característicos de ambientes de agua dulce. Sin embargo, en este estudio se han detectado clones relacionados con estos géneros en cinco puertos (Palma, 3 clones; Adriano, 26 clones; Andratx, 10 clones; Sóller, 1 clon; Alcudia, 11 clones), lo que indicaría la presencia de estas bacterias en puertos. Por otro lado, la mayoría de los clones procedían de las genotecas de las muestras de septiembre, lo que coincide con los resultados de los perfiles de T-RFLP, en los que la abundancia de los T-RFs identificativos de este grupo era más abundante en los meses de verano (ver apartado 6).

Finalmente, se incluyeron en el estudio 532 secuencias de 16S ARNr afiliadas al grupo *Roseobacter* procedentes de las diferentes genotecas. Las secuencias se agruparon en filotipos al 97% y al 99% de similitud, obteniéndose 39 y 87 filotipos, respectivamente. Las curvas de rarefacción muestran que el esfuerzo de secuenciación fue suficiente, ya que la curva de los filotipos al 97% de similitud llegó a saturación (figura R1.8). De hecho, dos de los filotipos al 97% de similitud acumulaban el 57% de los clones. Por esta razón no se secuenciaron los clones restantes, seleccionados como posibles *Roseobacter* en el cribado de las genotecas.

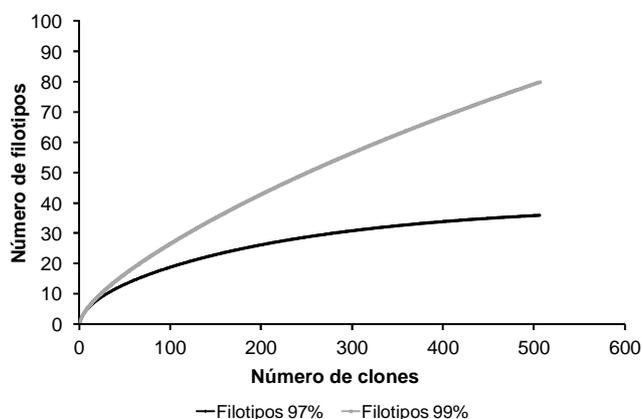


Figura R1.8: Curvas de rarefacción de las genotecas de puertos.

El índice de Shannon se calculó en base a los resultados obtenidos de las genotecas (figura R1.9a). En general, los índices de Shannon fueron mayores para las genotecas del mes de marzo, a excepción de los puertos de Alcudia y Cala Ratjada. En todos los puertos se detectó un mayor número de filotipos en las genotecas de marzo que en las de septiembre. Esto coincide con los índices de diversidad calculados en base a los perfiles de T-RFLP, que también indicaban que la diversidad bacteriana era mayor cuando la temperatura del agua disminuía.

Cabe destacar que los valores de diversidad más altos se registraron en la genoteca de la muestra control de marzo, lo que podría indicar que en aguas de puertos la diversidad del grupo *Roseobacter* era menor, aunque para corroborar esta hipótesis deberían analizarse más muestras control. Los resultados de este estudio coinciden con los de Aguiló-Ferretjans y colaboradores (2008) que detectaron un mayor número de secuencias del grupo *Roseobacter* en puerto Adriano en invierno.

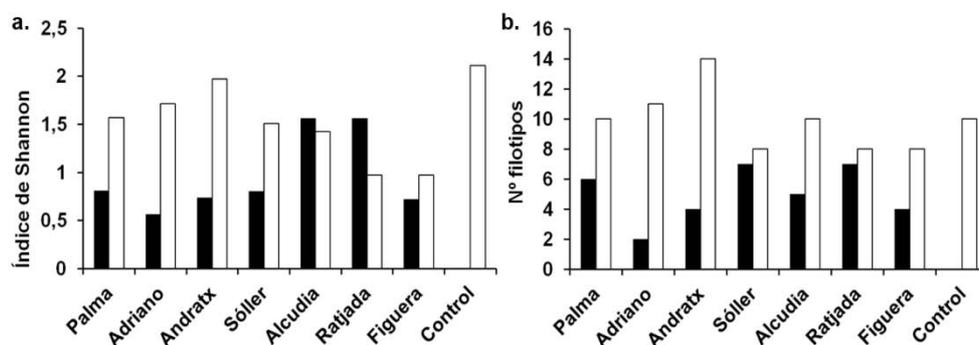


Figura R1.9: Representación del índice de diversidad de Shannon (a) y del número de filotipos (b) del grupo *Roseobacter* detectados en cada una de las genotecas. Las barras negras corresponden a las muestras tomadas en septiembre de 2008 y las blancas a marzo de 2009.

En la tabla R1.3 se indican los filotipos calculados al 97% de similitud de secuencia y el número de clones que los formaban en función del puerto en el que fueron detectados. Los filotipos mayoritarios obtenidos al 97% de similitud (filotipos 2 y 6, tabla R1.3) se conservaban (y mantenían prácticamente el total de clones, 173 y 121, respectivamente) al calcularlos al 99%. Esto, junto con el hecho de que estos dos filotipos mayoritarios se encontraban en casi todos los puertos, indicaba que, a pesar de las diferencias en las comunidades bacterianas de los puertos evidenciadas por los resultados de T-RFLP (ver figuras R1.5 y R1.7), se seleccionaban poblaciones concretas de *Roseobacter* en este tipo de ambientes.

En la figura R1.10 se muestra el árbol filogenético de las secuencias de 16S ADNr en el que aparece un representante de cada uno de los filotipos calculados al 97% de similitud y muestra la afiliación de las secuencias obtenidas en este estudio en relación a las secuencias de referencia.

Diversidad del clado *Roseobacter* en aguas de puertos deportivos

Tabla R1.3: Composición de los filotipos de *Roseobacter* en las diferentes genotecas.

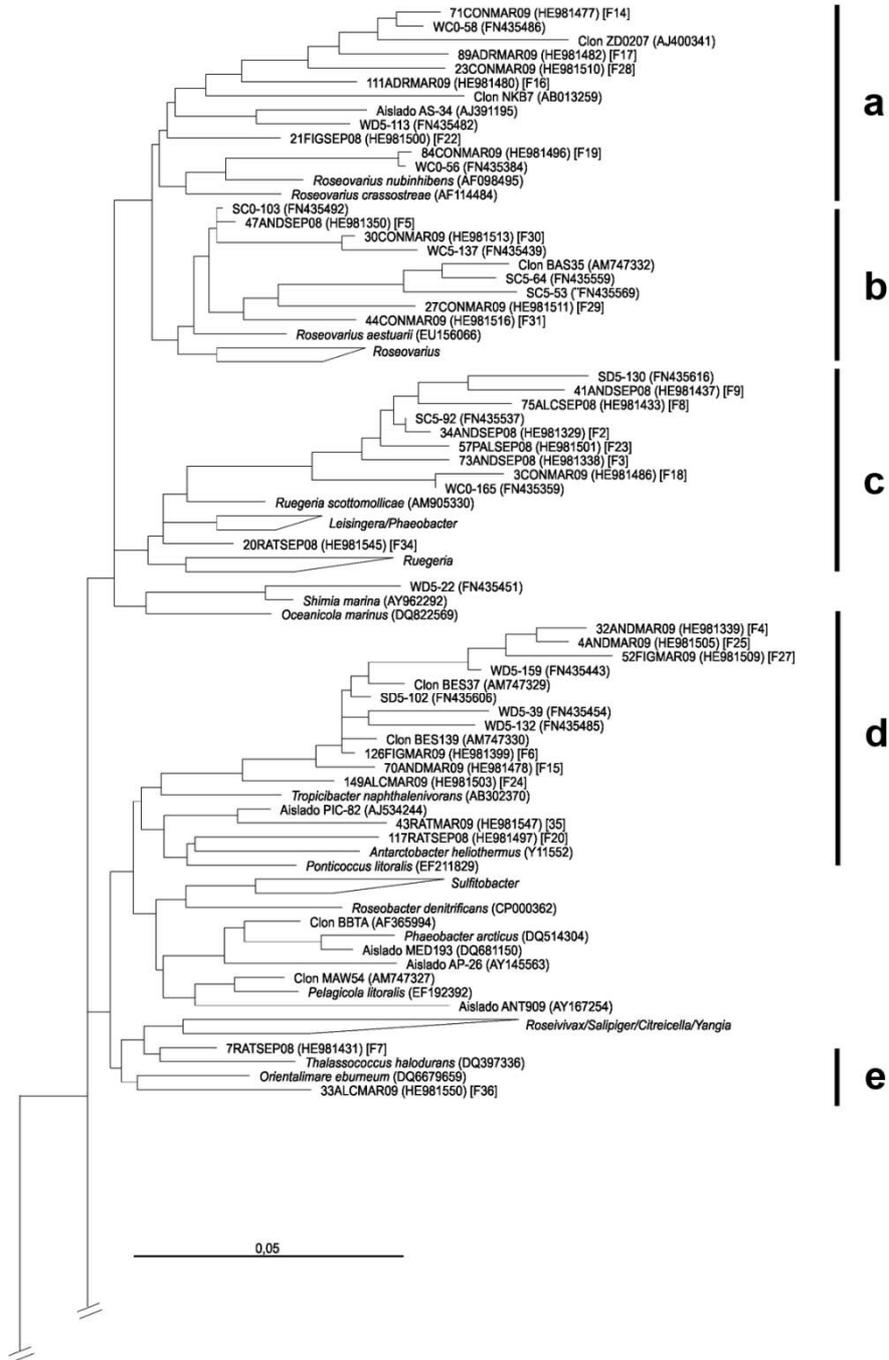
	Septiembre 2008							Marzo 2009								T ^a
	a	b	c	d	e	f	g	a	b	c	d	e	f	g	h	
1				4			6									10
2	47		25	54	2	16	30			1						175
3			2	1												3
4				1						1	1					4
5	13		4	4	1	3	3		1	1		1			3	34
6	1			2		14	4	6	2	19	13	1	30	30		129
7		1				4						1				6
8	1				1			1								3
9	1		1	1	1											4
10					1			21	3	5	1	1	1		1	37
11								1		1						2
12								1					1			2
13								1		2			1			4
14								2	5	2	5	1			3	18
15									1	1			1	2		5
16									1							1
17									3						1	4
18								1	1		1			1	4	8
19									1	1	1			1	4	8
20						1										1
21		3														3
22							1									1
23	1															1
24										1		1		1		3
25								4		3	1		1	2		13
26										2						2
27										1				1		2
28															1	1
29															2	2
30														1	6	7
31															1	1
32									20		2	18				40
33												1				1
34						1										1
35													2			2
36												2				2
37												1				1
38													2			2
39								1	1							2

^a Palma (a), Adriano (b), Andratx (c), Sóller (d), Alcudia (e), Cala Ratjada (f), Cala Figuera (g), Control (h); total clones (T).

El grupo denominado *a* agrupa los filotipos 14, 16, 17, 19, 22 y 28 todos ellos formados únicamente por secuencias de las genotecas de marzo, a excepción del filotipo 22 que estaba formado por un solo clon detectado en el puerto de Cala Figuera en septiembre. Las secuencias de estos seis filotipos se relacionaban con el género *Roseovarius* con un porcentaje de similitud alrededor del 93%. Además, la secuencia de dos filotipos se relacionaban con clones obtenidos en un experimento de contaminación experimental con bajas concentraciones de diesel, preparados con agua de la zona denominada control en este trabajo (Lanfranconi *et al.*, 2010). Esto mismo sucedía con bastantes de los filotipos obtenidos en este estudio, como se muestra a continuación. Así, el filotipo 14 se relacionaba con un clon de microcosmos control (WC0-58) con un 99% de similitud de secuencia y el filotipo 19 con un clon de un microcosmos control, WC0-56, con un 100% de similitud (Lanfranconi *et al.*, 2010).

Los filotipos 29, 30 y 31 (grupo *b* en figura R1.10) estaban formados por clones de la genoteca control (y un clon de Cala Figuera en el filotipo 30). Las secuencias de estos filotipos se relacionaban también con el género *Roseovarius* (96%) y también, con clones de microcosmos control, SC5-137, SC5-64, SC5-53, (Lanfranconi *et al.*, 2010) y el clon BAS35 detectado en la bahía próxima a puerto Adriano (Aguiló-Ferretjans, *et al.*, 2008). El filotipo 5, también en el grupo *b*, estaba formado por clones de genotecas de ambos muestreos, sobretodo de septiembre. Cabe destacar que fue un filotipo altamente representado en el puerto de Palma en septiembre de 2008 (13 clones, 20%). Este filotipo se relacionaba con un clon de microcosmos control, SC103, con una similitud del 99% de secuencia (Lanfranconi *et al.*, 2010).

Diversidad del clado *Roseobacter* en aguas de puertos deportivos



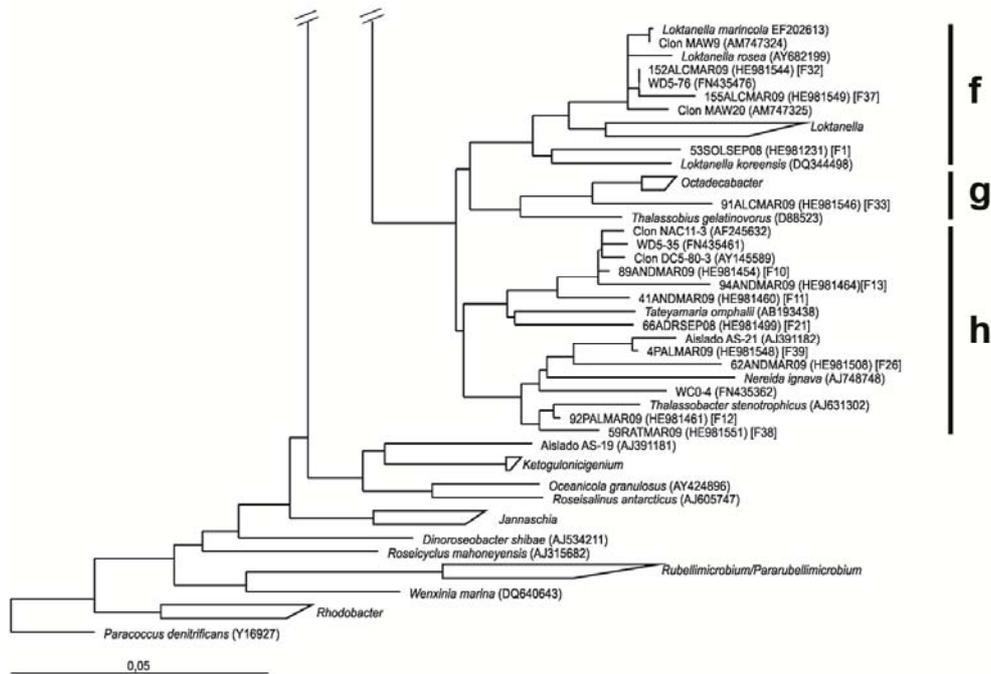


Figura R1.10: Árbol filogenético de 16S ADNr generado por el método de *neighbour-joining* a partir de la matriz de distancias calculada por el método de Jukes-Cantor. El árbol se calculó en base a 92 secuencias de referencia de la base de datos de SILVA versión 108 (Pruesse *et al.*, 2007) y posteriormente se añadieron las secuencias de los clones mediante la herramienta de parsimonia del programa ARB (Ludwig *et al.*, 2004). La secuencia de *Paracoccus denitrificans* se utilizó como *outgroup*. Los nombres de los clones indican: el número se corresponde al número de clon, las tres letras siguientes indican el puerto (PAL, Palma; ADR, Adriano; AND, Andratx; SOL, Sóller; ALC, Alcudia; RAT, Ratjada; FIG, Figuera; CON, Control), y el resto el muestreo (SEP08, septiembre de 2008 y MAR09, marzo de 2009). Entre corchetes se indica el filotipo al que pertenece el clon.

La rama *c* agrupaba los filotipos 2, 3, 8, 9, 18, 23 y 34 formados principalmente por clones del muestreo de septiembre, a excepción del filotipo 18 que está formado por clones de marzo. Todos estos filotipos se relacionaban con el género *Ruegeria*. Los filotipos 8 y 9 se relacionaban con el clon SD5-130 procedente de un microcosmos tratado con diesel (96% de similitud), mientras que los filotipos 2, 3 y 23 se relacionaban con

un clon de microcosmos control, SC5-92, (98% de similitud) (Lanfranconi *et al.*, 2010). Por último, el filotipo 18 (formado por 4 clones de puertos y 4 de la muestra control) se relacionaba con un clon del de microcosmos control, WC0-165 al 99% de similitud (Lanfranconi *et al.*, 2010). De todos estos filotipos, el 2 era uno de los dos filotipos mayoritarios de las genotecas de puertos (175 clones en total). Agrupaba el 70% de las secuencias de las genotecas del mes de septiembre 2008 y se detectaba solamente en este muestreo, a excepción de un solo clon de la genoteca del puerto de Andratx de marzo de 2009. Este filotipo se observó en las genotecas de todos los puertos excepto en la de Puerto Adriano, y con muy baja abundancia en la del puerto de Alcudia (2 clones), dos puertos en los que se detectaron pocas secuencias de *Roseobacter* en el muestreo de septiembre del 2008.

En el grupo *d*, los filotipos 15, 24, 25, 27 y 35 estaban formados íntegramente por secuencias del mes de marzo, mientras que el filotipo 20 estaba formado por una sola secuencia del mes de septiembre. Los filotipos 4 y 6 agrupaban secuencias de ambos muestreos, aunque la mayoría de las secuencias del filotipo 6, pertenecían al mes de marzo. La secuencia de los filotipos 20 y 35 se relacionaban con el género *Antarctobacter* (91% y 95% de similitud, respectivamente) y el aislado PIC-82 (95% de similitud) obtenido de un enriquecimiento de fitoplancton (Allgaier *et al.*, 2003). Los otros filotipos del grupo *d* se relacionaban con clones de microcosmos tratados con diesel (Lanfranconi *et al.*, 2010): los filotipos 4 y 25 se relacionaban con el clon WD5-159 al 96 y 95% de similitud, respectivamente, mientras el filotipo 27 lo hacía con el clon WD5-39 (95%). Los filotipos 15 y 24 se relacionaban con dos clones aislados de la playa próxima a puerto Adriano en verano, BES37 y BES139 al 97% y 99%, respectivamente (Aguiló-Ferretjans *et al.*, 2008). Cabe destacar que el filotipo 6 agrupaba casi el 60% de las secuencias del muestreo de marzo

(129 clones), aunque se observó también en genotecas del mes de septiembre en 4 puertos (con abundancia relevante sólo en el puerto de Cala Ratjada, 14 clones, 31%). Sin embargo, tal como se había observado para el otro filotipo predominante (filotipo 2), se detectaron pocos clones de este filotipo en las genotecas de Puerto Adriano (2 clones) y Alcudia (1 clon), así como un número relativamente bajo en la de Palma (6 clones). La secuencia de este filotipo se relacionaba con el clon SD5-102 (Lanfranconi *et al.*, 2010) al 99% de similitud y *Tropicibacter naphthalenivorans* (con un 95% de similitud), una bacteria descrita como degradadora de hidrocarburos policíclicos aislada de aguas del puerto de Semarang (Harwati *et al.*, 2009).

El grupo e incluía los filotipos 7 y 36. El primero estaba formado por clones del mes de septiembre a excepción de un clon del puerto de Alcudia del mes de marzo. El filotipo 36 estaba formado por dos secuencias detectadas en Cala Ratjada en el mes de marzo. La secuencia del filotipo 7 se relacionaba con el género *Thalassococcus* (97% de similitud) y la del 36 con el género *Orientalimare* (95%).

Los filotipos 1, 32 y 37 (grupo f) estaban formados por secuencias detectadas en puertos en el mes de septiembre (filotipo 1) o marzo (32 y 37). Las secuencias de los tres se relacionaban con el género *Loktanella* con un 98% de similitud de secuencia. Los filotipos 32 y 37 se relacionaban, también, con un clon de microcosmos tratados con diesel, WD5-76 al 100% y 99% de similitud, respectivamente (Lanfranconi *et al.*, 2010) y dos clones detectados en puerto Adriano ocho años antes con un porcentaje de similitud superior al 99% (Aguiló-Ferretjans *et al.*, 2008), lo que sugeriría que estas poblaciones se mantienen o aparecen recurrentemente en estos ambientes. Además, cabe destacar que el filotipo 32 estaba formado por 40 secuencias todas ellas procedentes de

las genotecas de marzo de los puertos Adriano y Alcudia (en las cuales era el filotipo predominante), a excepción de dos secuencias procedentes del puerto de Sóller. Esto, junto con la baja abundancia de secuencias de los filotipos 2 y 6 en estos puertos, podría explicar por qué los perfiles de T-RFLP de estos dos puertos se agrupaban juntos diferenciándose del resto (figura R1.5 y R1.7).

El filotipo 33 se encuentra en el grupo *g* que se relacionaba con el género *Octadecabacter* (97% de similitud).

Los filotipos del grupo *h* (10, 11, 12, 13, 21, 26, 38 y 39) estaban todos formados por secuencias pertenecientes a las genotecas del mes de marzo a excepción del filotipo 21 que estaba formado por tres secuencias de puerto Adriano de septiembre. Además, cabe destacar que este fue uno de los dos únicos filotipos detectados en puerto Adriano en ese muestreo (3 clones). Las secuencias de los filotipos 10, 13 y 21 estaban relacionadas con el género *Tateyamaria* (96% y 94% de similitud, respectivamente) y el 10 y 13 con el clon WD5-35 de microcosmos tratados con diesel (Lanfranconi *et al.*, 2010) con una similitud superior al 98%. El filotipo 10 destaca además porque más del 60% de los clones de ese filotipo se detectaron en el puerto de Palma en marzo, genoteca en la que era el filotipo predominante (21 clones). Los filotipos 26 y 39 se relacionan con el género *Nereida* (95% de similitud de secuencia). Por último, las secuencias de los filotipos 12 y 38 se relacionaban con el género *Thalassobacter* (similitud superior al 98%).

Los resultados del análisis de las genotecas indicaban que existía una gran diversidad del grupo *Roseobacter* en aguas de puertos y que además se producían variaciones estacionales ya que los filotipos detectados en el mes de septiembre generalmente no eran los mismos que los detectados en marzo, y viceversa. Además, la diversidad detectada en

marzo de 2009 era mayor que la de septiembre de 2008, ya que el número de filotipos detectados fue mayor. Se detectaron dos filotipos mayoritarios, el 2 y el 6, siendo el primero el más abundante del muestreo de septiembre y el segundo del muestreo de marzo. El filotipo 6 se encontraba relacionado con un miembro del grupo que había sido descrito como degradador de hidrocarburos, *Tropicibacter naphthalenivorans*, y además, no se detectó su presencia en la genoteca control, lo permitiría hipotetizar que podría tratarse de una población seleccionada por la presencia de hidrocarburos en el ambiente de los puertos. Del mismo modo, algunos filotipos solo fueron detectados en la genoteca de la muestra control (filotipos 28, 29 y 31), lo que podría indicar que las condiciones ambientales del puerto no favorecería la presencia de estos filotipos, aunque para confirmarlo sería necesario analizar más muestras control.

5.2. Abundancia y dinámica de *Roseobacter* en aguas de puertos deportivos

Con el fin de monitorizar las variaciones estacionales de los filotipos de *Roseobacter* más abundantes en el resto de muestreos, se estudiaron los cambios en la abundancia relativa de sus T-RFs identificativos. Para ello se identificaron estos T-RFs utilizando los clones de las genotecas, relacionando el tamaño de los T-RFs con la secuencia de 16S ADNr. Además se realizó la comprobación experimentalmente tanto con los cebadores específicos de *Alphaproteobacteria*, que originaban fragmentos más pequeños, como para los universales de *Bacteria*. Cinco T-RFs obtenidos con el enzima *AluI* fueron identificados como característicos para clones del grupo *Roseobacter* (Tabla R1.4). De modo que con toda seguridad estos 5 T-RFs eran informativos de la abundancia relativa del grupo *Roseobacter* tanto respecto a la comunidad microbiana total (ver apartado 3), como a las poblaciones de *Alphaproteobacteria* (ver apartado

4). Algunos de estos T-RFs coincidían con los propuestos como identificativos del grupo *Roseobacter* en trabajos previos, como por ejemplo el 5'A245 y el 5'A248 (Lanfranconi *et al.*, 2010).

Tabla R1.4: T-RFs identificativos de diferentes poblaciones del clado *Roseobacter*, todos ellos basados en los fragmentos *AluI* 5'.

T-RF <i>Alphaproteobacteria</i> ^a	T-RF <i>Bacteria</i> ^a	Correlaciones ^b
234	245	0,024
235	246	0,772**
236	247	0,408**
237	248	0,705**
239	250	0,710**

^a*Alphaproteobacteria* se refiere a fragmentos obtenidos con los cebadores ALF1bf y ALF968r; *Bacteria*, se refiere a fragmentos obtenidos con los cebadores 27f y 1389r.

^bCoefficientes de correlación de Spearman entre la abundancia relativa de las parejas de fragmentos en perfiles de T-RFLP de muestras ambientales; Significación estadística: **: p<0,01.

A continuación se analizó la abundancia relativa de estos cinco T-RFs tanto en los perfiles de T-RFLP obtenidos con cebadores específicos de *Alphaproteobacteria* así como los obtenidos con cebadores universales de *Bacteria* a partir de las muestras de ADN ambiental de puertos. El análisis estadístico indicó que la abundancia de cada uno de los T-RFs obtenidos con cebadores de *Alphaproteobacteria* correlacionaba con su correspondiente de *Bacteria* (a excepción de la pareja 5'A234-5'A245 debido a que este T-RF estaba presente solo en el 17% de las muestras), lo que indicaba que el método empleado permitía detectar con fiabilidad las principales poblaciones de *Roseobacter* tanto en los perfiles de la comunidad total (*Bacteria*) como en los perfiles para *Alphaproteobacteria*.

Dos parejas de estos T-RFs eran mayoritarios en los perfiles de T-RFLP de las muestras de agua de los puertos estudiados, el T-RF 5'A235 y el 5'A237 (T-RFLP *Alphaproteobacteria*) o 5'A246 y 5'A248 (T-RFLP

Bacteria) como se ha mostrado en las tablas R1.1 y R1.2. Estos resultados estaban de acuerdo con los obtenidos en las genotecas porque el T-RF 5'A246 se correspondía principalmente con el filotipo 2, mientras que el 5'A248 lo hacía con el filotipo 6, aunque no eran exclusivos de estos filotipos. Así el T-RF 5'A246 era generado también por los filotipos 3 y 5 (filotipos detectados en septiembre), mientras que el 5'A248 por los filotipos 10 y 32 (filotipos detectados principalmente en marzo). Como se mencionó en los apartados 3 y 4 mediante el análisis de componentes principales de los perfiles con ADN ambiental se comprobó que estos T-RFs jugaron un papel importante en la diferenciación de las muestras tanto para los perfiles para *Bacteria*, como para los perfiles de *Alphaproteobacteria*.

Para determinar la abundancia relativa de las poblaciones de *Roseobacter* representadas por estos T-RFs respecto a la comunidad total, se centró el análisis en los T-RFs generados con cebadores universales (5'A246 y 5'A248). Las medianas de la abundancia relativa del T-RF 5'A246 fueron, en general bajas, mostrando valores entre 0 y 4% (figura R1.11a). En los puertos de Adriano y Alcudia prácticamente no se detectó este T-RF, lo que confirmaba los resultados obtenidos para el filotipo 2 en las genotecas de septiembre de 2008 (ver Tabla R1.3). En los otros puertos, se observaron variaciones más importantes, de modo que la abundancia relativa podía variar entre el 0 y el 10 %, en el caso de Cala Figuera, en función de la época del año. En el puerto de Andratx se obtuvo la mediana de abundancia relativa más alta (4%), pero en noviembre de 2009 se registraron valores del 14%. En las muestras control también se detectaba este T-RF con un valor promedio de 1%.

En cuanto al T-RF 5'A248 (figura R1.11b), las medianas mostraron valores ligeramente más elevados que en el caso anterior (entre el 1 y el

5%). En la mayoría de puertos, se detectaron valores máximos entre el 10 y el 15%, incluso algún valor atípico de hasta el 27% (en Palma en marzo de 2009). Al contrario de lo observado para el T-RF 5'A246, en puerto Adriano y Alcudia se observó una abundancia relativa y una variación de este T-RF equiparable a la de los otros puertos. El T-RF 5'A248 no se detectó en ninguna de las muestras control analizadas.

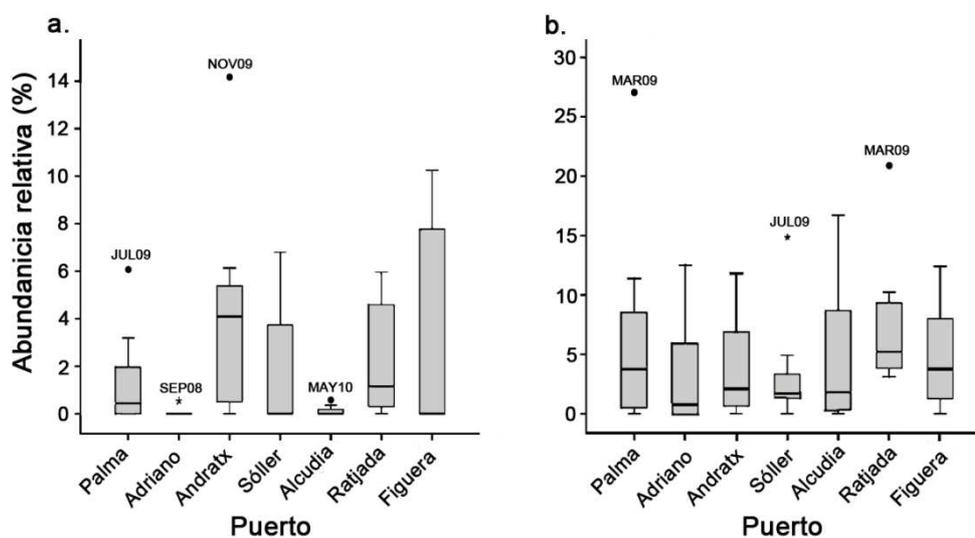


Figura R.1.11: Diagrama de cajas de la abundancia relativa de dos poblaciones del grupo *Roseobacter* identificadas por los T-RFs 5'A246 (a) y 5'A248 (b).

Se analizó también si la abundancia relativa de alguno de estos T-RFs estaba relacionada con características del agua muestreada. La abundancia relativa del T-RF 5'A246 mostró una correlación positiva con la temperatura ($R=0,430$ $p=0,002$), al contrario que la del T-RF 5'A248, que se correlacionaba negativamente ($R= -0,418$ $p=0,002$). Se observaba el mismo resultado para las correlaciones de la abundancia relativa de los correspondientes fragmentos 5'A235 y 5'A237 (*Alphaproteobacteria*). El T-RF 5'A246 presentaba abundancias relativas mayores en los meses en los que el agua presentaba una temperatura más alta, especialmente en los

muestreos de septiembre 2008 y octubre 2009, del mismo modo que el filotipo 2 era el más abundante de las genotecas de septiembre (Tabla R1.3). Por el contrario, el T-RF 5'A248 era el predominante en los meses más fríos (muestreos de marzo), aunque en los meses de otoño y primavera, se detectaban ambos T-RFs (figura R1.12). Esto coincide con los resultados de la genotecas, que mostraron que un filotipo que corresponde a este T-RF (filotipo 6) era el más abundante de las muestras de marzo. Estos resultados indican que las poblaciones de *Roseobacter* representadas por estos dos T-RFs mostraban variaciones estacionales como se había visto en general para la comunidad bacteriana total y para *Alphaproteobacteria* en este estudio. Además, la abundancia relativa del T-RF 5'A246 se correlacionaba negativamente con los recuentos de picocianobacterias ($R = -0,306$ $p = 0,0032$). Sin embargo, las abundancias relativas de estos dos T-RFs no presentaron correlaciones significativas con parámetros relevantes del ambiente estudiado como las concentraciones de clorofila *a* o de hidrocarburos.

El resto de T-RFs identificados de *Roseobacter* (5'A245, 5'A247 y 5'A250) eran minoritarios en los perfiles y aparecían, en general, de forma puntual en determinados puertos y épocas del año (figura R1.12). El T-RF 5'A245 era generado por clones del filotipo 1, el 5'A247 por el filotipo 7 y el 5'A250 por el filotipo 25. En general, estos tres T-RFs aparecían al final del invierno y en primavera, nunca en los meses más cálidos. Esto coincide con los índices de diversidad calculados a partir de las genotecas, que indicaban que en verano la diversidad del grupo *Roseobacter* era menor que en invierno.

Diversidad del clado *Roseobacter* en aguas de puertos deportivos

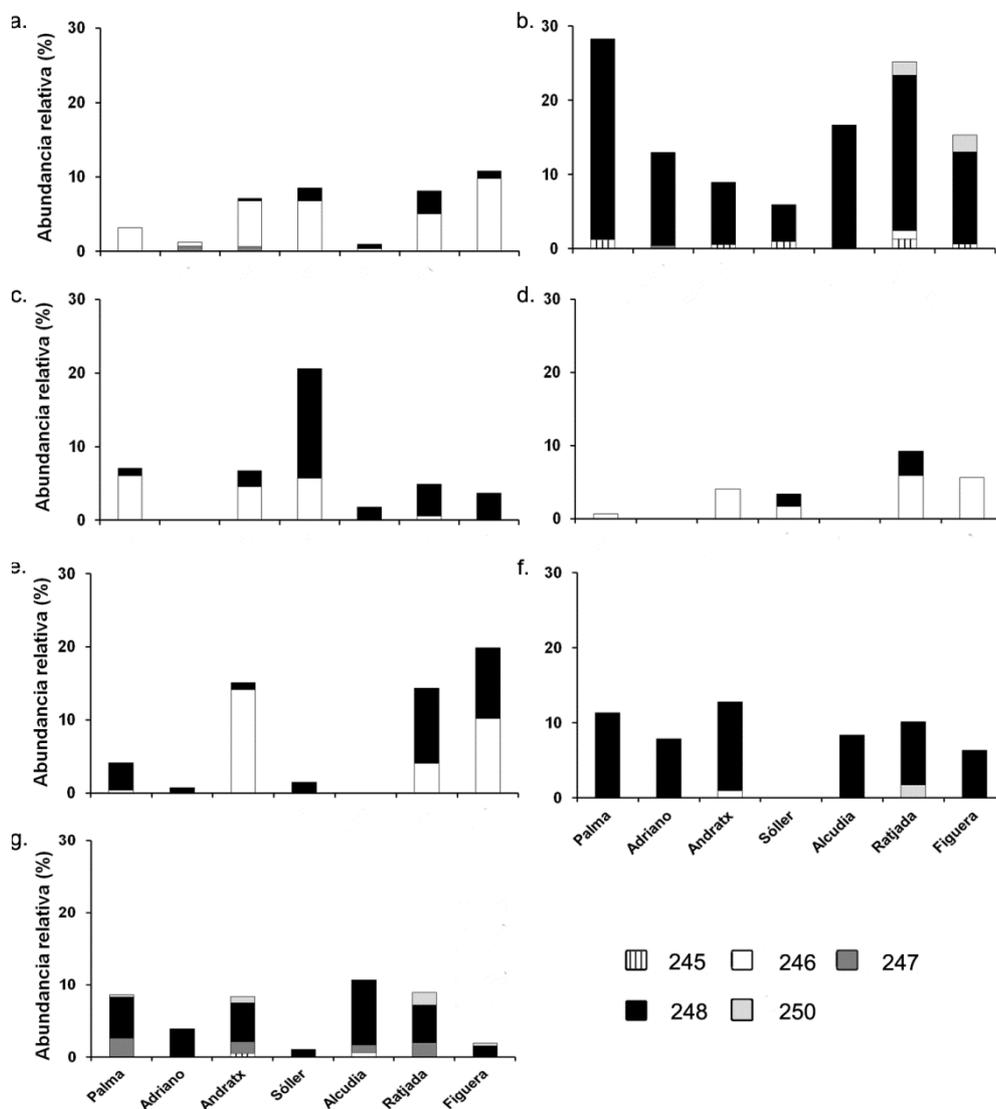


Figura R1.12: Representación de la abundancia relativa de los T-RFs (5'AluI) identificados como pertenecientes al grupo *Roseobacter* en perfiles para la comunidad bacteriana total. Los paneles corresponden a septiembre de 2008 (a), marzo (b), julio (c), octubre (d) y noviembre de 2009 (e), marzo (f) y mayo de 2010 (g).

Como los T-RFs predominantes (5'A246 y 5'A248) no se correspondían únicamente con los filotipos mayoritarios detectados en las genotecas (2 y 6) se pusieron a punto dos parejas de cebadores

específicos para estos filotipos, con el fin de cuantificar su abundancia mediante qPCR de forma específica. Además, se cuantificó la abundancia total de bacterias utilizando cebadores universales, con el fin de poder relativizar la abundancia de cada uno de los filotipos respecto a la comunidad bacteriana total.

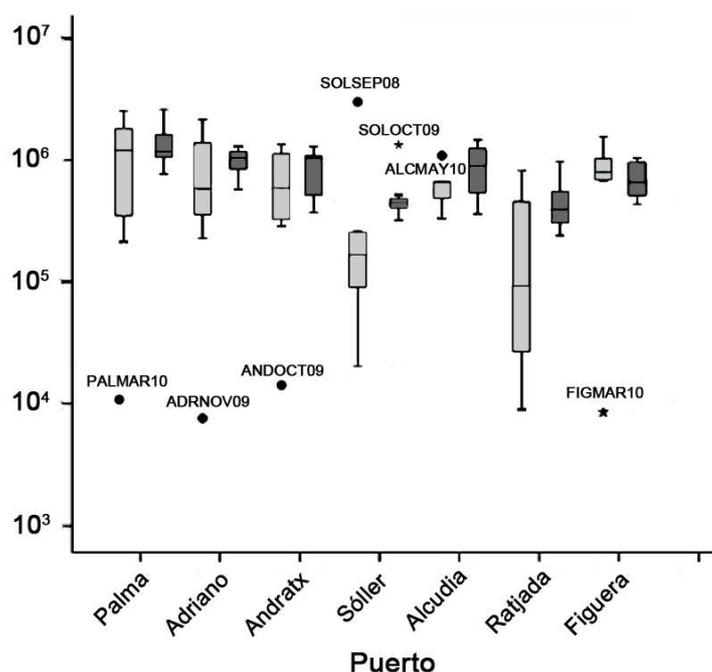


Figura R1.13: Diagrama de caja de la cuantificación por qPCR (cajas gris claro) y de los recuentos de *Bacteria* por FISH con la sonda EUB I-III (cajas gris oscuro). Los valores de qPCR corresponden al número de copias del gen 16S ARNr por mililitro de muestra de agua de puerto, los recuentos FISH corresponden al número de procariontes por mililitro de muestra.

De la comparación de los resultados de los recuentos de FISH con las sondas EUBI-III y la cuantificación por qPCR para *Bacteria*, se observó que en la mayoría de los puertos las medianas y el rango de los valores coincidían relativamente bien (figura R1.13), a excepción de los puertos de Sóller y Cala Ratjada. Los rangos de los valores obtenidos por qPCR eran

mayores que en los recuentos por FISH, siendo Cala Ratjada la que mostraba mayor variabilidad. El análisis estadístico dio fiabilidad a la técnica ya que existían correlaciones significativas entre los valores de qPCR para *Bacteria* y los recuentos de procariotas totales ($R=0,521$, $p=0,000$), así como, con el número de bacterias detectadas por FISH con las sondas EUB I-III ($R=0,338$, $p=0,018$).

En cuanto a la cuantificación de los dos filotipos estudiados (2 y 6), los resultados obtenidos por qPCR coinciden con lo observado previamente mediante el estudio de los T-RFs identificativos de *Roseobacter* (5'A246 y 5'A248). Los valores de abundancias relativas obtenidas por ambas técnicas no son comparables, ya que son técnicas distintas que utilizan cebadores con eficiencias diferentes, pero sí el patrón de variación de los filotipos a lo largo del tiempo.

Generalmente, la abundancia relativa del filotipo 2 determinada por qPCR era mayor durante los meses de verano disminuyendo en los meses de invierno (figura R1.14a y figura A1 del anexo). Las abundancias relativas más elevadas del filotipo 2 se registraron en puerto de Andratx alcanzando valores del 30% en septiembre de 2008, julio, octubre y noviembre de 2009. En cambio, en los meses de marzo, cuando la temperatura del agua alcanzaba los valores mínimos detectados en este estudio (10-15 grados), el filotipo 2 mostraba abundancias relativas muy bajas (valor máximo del 1%) o incluso no se detectaba. Así, el análisis estadístico mostró que existía una correlación positiva significativa entre la temperatura y la abundancia relativa del filotipo 2 determinada por qPCR ($R=0,502$ $p=0,000$). La cuantificación del filotipo 2 por qPCR concordaba con los resultados obtenidos de las genotecas y con las variaciones en la abundancia relativa del T-RF 5'A246. De hecho existía una correlación

positiva ($R=0,771$ $p=0,000$) entre la abundancia relativa del T-RF 5'A246 y la abundancia relativa del filotipo 2 cuantificado por qPCR.

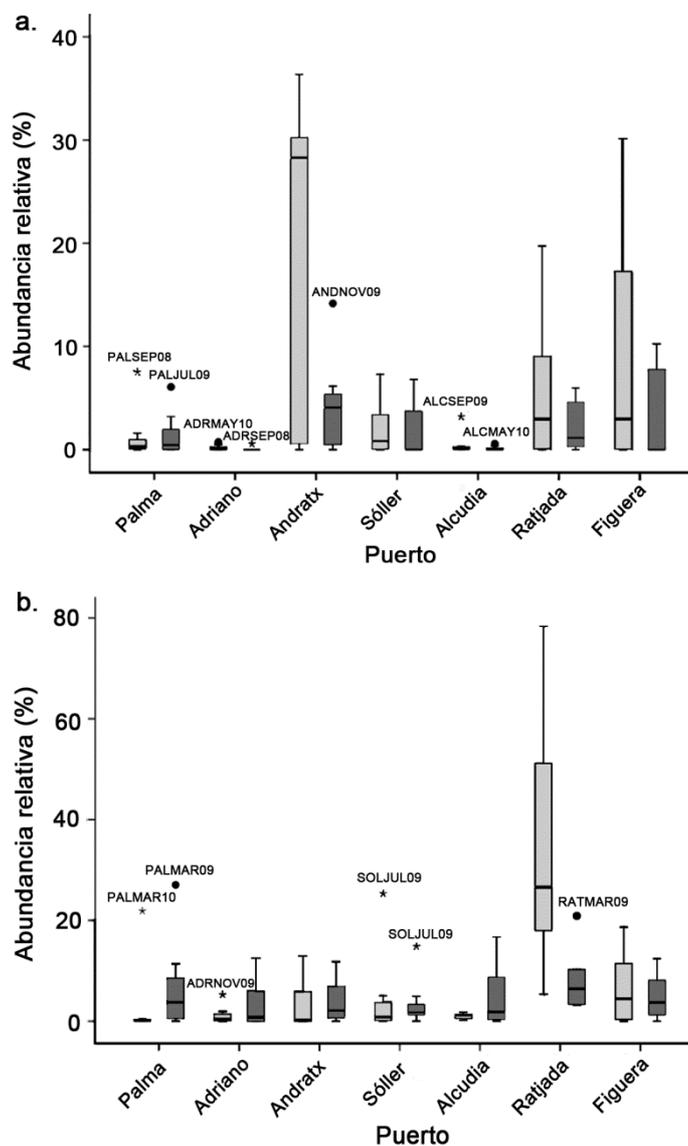


Figura R1.14: Abundancia relativa del filotipo 2 (a) y filotipo 6 (b) en puertos cuantificada por qPCR (cajas en gris claro) y abundancia relativa del T-RF 5'A246 (a) o 5'A248 (b) (cajas en gris oscuro) a lo largo de todo el periodo de muestreo. El valor de abundancia relativa del filotipo 6 de Cala Ratjada de mayo de 2010, no se ha tenido en cuenta en el análisis porque daba un valor anómalo.

Dado que la qPCR es una técnica mucho más sensible, en ocasiones se detectaba filotipo 2 en puertos (p.e. en puerto Adriano en mayo de 2010) para los cuales no se había detectado la presencia del T-RF 5'A246. También se produjo la situación contraria, esto es, que no se detectó la presencia del filotipo 2 por qPCR, pero sí se detectó el T-RF 5'A246 (por ejemplo en puerto Adriano en septiembre de 2008). Esto se explica por el hecho de que el T-RF 5'A246 no era específico del filotipo 2, lo que, teniendo en cuenta que la qPCR es una técnica más sensible, significaría que el T-RF generado no sería debido a la presencia del filotipo 2 en esas muestras.

En cuanto al filotipo 6, las medianas de los valores obtenidos por las dos técnicas fueron similares, a excepción de los puertos de Palma y Cala Ratjada (figura R1.14b). Fue en este último puerto donde se observó una mayor variabilidad y se detectaron los valores más altos de este filotipo en todos los muestreos, excepto en marzo de 2010. Los resultados obtenidos por qPCR para filotipo 6 coincidían con los cambios en la abundancia relativa del T-RF 5'A248 y se demostró que existía una correlación significativa entre estos dos parámetros ($R=0,441$ $p=0,001$). Sin embargo, en este caso no se pudo establecer una correlación significativa entre la abundancia determinada por qPCR de este filotipo y la temperatura. De hecho, los resultados de qPCR no muestran una variación estacional de esta población de *Roseobacter* tan clara como la del T-RF5'A248 (figura R1.12 y figura A2, anexo).

Evidencias previas a este trabajo indicaban que el clado *Roseobacter* podría ser uno de los grupos predominantes en aguas sometidas a impacto antropogénico. En un estudio previo en el que se realizó un muestreo en 17 puertos de la Isla de Mallorca se observó que el clado *Roseobacter* (figura I5) era el grupo bacteriano más abundante

(Aguiló-Ferretjans, 2009). La relevancia de este grupo también se había observado en otros puertos, como es el caso del puerto Victoria (Zhang *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2009) y en el puerto Xiamen (Ma *et al.*, 2009). Sin embargo, hasta el momento no se había realizado ningún estudio comparativo de la diversidad microbiana presente varios puertos y a lo largo del tiempo. Tampoco se había comprobado específicamente que el clado *Roseobacter* era uno de los grupos dominantes en estos ambientes ni determinado su diversidad. Los recuentos del número de *Roseobacter* por FISH (mediante una sonda específica), así como las abundancias relativas de los T-RFs identificativos del grupo han demostrado la relevancia del clado *Roseobacter* en las aguas de los puertos estudiados. La construcción de genotecas del gen 16S ARNr permitió estudiar en detalle las poblaciones del clado presentes en las aguas de puertos, mostrando la gran diversidad del grupo en este tipo de ambientes. Se detectaron poblaciones concretas del clado *Roseobacter* en todos los puertos estudiados, siendo dos de estas poblaciones (filotipos 2 y 6) predominantes en la mayoría de puertos en función de la época del año. Estas poblaciones presentaban una dinámica temporal ligada a las variaciones de la temperatura del agua y era similar en todos los puertos estudiados. Además, estos filotipos predominantes en puertos no fueron detectados en las muestras control, sino que en esta muestra aparecían filotipos muy concretos que no estaban presentes en las aguas de puertos. Es más, la diversidad del grupo fue mayor en la muestra control de marzo, que en cualquiera de las muestras de puertos de ese mismo muestreo. Estos resultados son coherentes con los observados en otros estudios donde se compararon comunidades de bacterioplancton procedentes de ambientes con diferente grado de impacto. Las poblaciones de *Roseobacter* detectadas en el interior de puerto Adriano eran distintas a las presentes en la bahía, mostrando una distribución opuesta (Nogales *et al.*,

2007; Aguiló-Ferretjans *et al.*, 2008). Esto podría indicar que los factores ambientales intrínsecos de ambientes sometidos a impacto antropogénico juegan un papel clave en la selección de determinadas poblaciones del grupo.

Los puertos son ambientes artificiales creados por el hombre que se caracterizan por ser masas de agua semiestancadas (y con intercambio de agua limitado) sometidas a contaminación tanto por hidrocarburos como por nutrientes (Nogales, 2010). En este estudio solo se pudo demostrar la influencia de la temperatura del agua en la selección de determinadas poblaciones del clado *Roseobacter*. Así, no se observaron correlaciones significativas entre la abundancia de las poblaciones de *Roseobacter* estudiadas y la concentración de clorofila, aunque sí existía correlación con el número total de *Roseobacter* (recuentos de FISH). Tampoco, se pudo establecer una correlación con la concentración de hidrocarburos, no obstante, se detectaron varios filotipos que se relacionaban con clones detectados en ambientes contaminados con hidrocarburos (Lanfranconi *et al.*, 2010) o bacterias descritas como degradadoras (Harwati *et al.*, 2009). Podrían existir otros parámetros, además de los estudiados, que pueden influir en la selección de determinadas poblaciones de *Roseobacter* en este tipo de ambientes, como la disponibilidad de nutrientes o la presencia de metales pesados. En el puerto Victoria se determinó que factores como la turbidez, pH y nutrientes, por ejemplo, el nitrógeno, juegan un papel clave en la estructura de la comunidad bacteriana. También, se demostró que la contaminación del agua determinaba la estructura de la comunidad microbiana en el puerto Victoria (Zhang *et al.*, 2007). A menudo coexisten múltiples contaminantes o factores ambientales que pueden tener un efecto sinérgico o antagónico que juegan un papel importante en la selección de determinados grupos bacterianos.

6. Inferencia de la composición de las comunidades bacterianas en puertos deportivos

En este estudio no era un objetivo analizar en detalle la composición de las comunidades bacterianas presentes en aguas de puertos deportivos mediante análisis de secuencias de 16S ADNr. Sin embargo, gracias a la información generada en estudios previos (Nogales *et al.*, 2007; Lanfranconi *et al.*, 2010) se disponía de una base de datos obtenida a partir de clones que relacionaba tamaños de T-RFs con secuencias de 16S ADNr, a nivel de grupos filogenéticos amplios. Así, utilizando esta base de datos se pudo inferir la identificación de varios grupos bacterianos en los perfiles de T-RFLP de 16S ADNr obtenidos con cebadores universales de las muestras de los puertos deportivos. La correspondencia entre los T-RFs identificativos de poblaciones del grupo *Roseobacter* determinados en este estudio (y las similitudes de secuencias de clones), con los definidos anteriormente (Lanfranconi *et al.*, 2010) da robustez a esta aproximación.

En primer lugar se analizó la abundancia relativa de T-RFs identificativos de grupos cuya presencia se había detectado previamente en aguas de Puerto Adriano: el grupo OMG, *Bacteroidetes* y *Actinobacteria* (Nogales *et al.*, 2007; Aguiló-Ferretjans *et al.*, 2008).

El grupo OMG [gammaproteobacterias marinas oligotróficas (Cho y Giovannoni, 2004)], identificado por los T-RFs 5'A229 y 3'H354, fue uno de los grupos detectados en las aguas de los puertos estudiados. El T-RF 5'A229 fue uno de los T-RFs que contribuían a la diferenciación de los perfiles de T-RFLP (tabla R1.1). La presencia de estos dos T-RFs se detectó en el 57% de las muestras de agua tomadas en puertos. La abundancia relativa de este grupo era baja en general; las medianas se encontraban alrededor del 1% (valor máximo 5,4%) y en el puerto de

Alcudia solo se detectaron estos T-RFs en mayo de 2010 (figura R1.15). Las muestras control mostraron un valor promedio de abundancia relativa bajo de 0,2%.

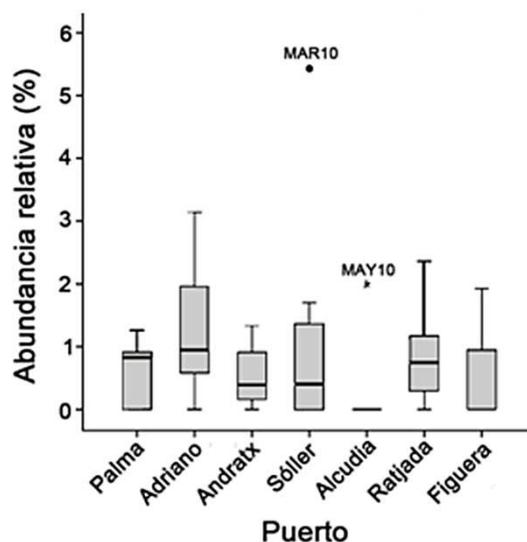


Figura R1.15: Diagrama de cajas de la suma de las abundancias relativas de los T-RFs 5'A229 y 3'H354, indicativos del grupo OMG, en aguas de puertos.

Este grupo de bacterias oportunistas parecen estar presentes en ambientes sometidos a contaminación crónica. En estudios anteriores se detectó este grupo como uno de los grupos más abundantes de gammaproteobacterias en puerto Adriano en verano y su abundancia mostraba una correlación positiva con la temperatura (Nogales *et al.*, 2007; Aguiló-Ferretjans *et al.*, 2008). En cambio, en este estudio no se ha detectado una correlación significativa entre la abundancia relativa de los T-RF 5'A229 y 3'H354 con la temperatura, pero la suma de las abundancias relativas de estos mostró una correlación positiva con el T-RF 5'A246 de *Roseobacter*, que era más abundante en los meses de verano. No se ha podido establecer una correlación entre la concentración de hidrocarburos y la abundancia relativa de los dos T-RFs identificativos del este grupo, pero estas bacterias no parecen verse afectadas por la

presencia de hidrocarburos en el ambiente, sino más bien todo lo contrario. En experimentos de microcosmos en los que se simulaba un episodio de contaminación con diesel, se observó un incremento en la abundancia relativa de este grupo en los microcosmos tratados respecto a los control (Lanfranconi *et al.*, 2010).

La presencia del grupo de *Bacteroidetes* se infirió en base a los T-RFs 5'H92 y 5'H94. Estos T-RFs fueron relativamente abundantes, detectados en el 92% de las muestras de puertos con medianas entre el 2 y el 3% y valores máximos de hasta 15,7%. En general, la abundancia de este grupo no sufrió variaciones muy marcadas, sobre todo en el puerto de Palma, donde destacaba la baja variabilidad (figura R1.16). El valor medio de la abundancia relativa en las muestras control fue del 1,4%, inferior a las medianas de cualquiera de los puertos. El sumatorio de la abundancia relativa de los dos T-RFs mostraba una correlación negativa con la temperatura ($R = -0,561$ $p = 0,000$). También se observó una correlación positiva con la abundancia relativa del T-RF 5'A248 (identificativo de *Roseobacter*), ya que la abundancia de ambos era mayor cuando la temperatura del agua era más baja.

Los resultados obtenidos en este estudio en siete puertos deportivos concuerdan con los obtenidos anteriormente en puerto Adriano (Nogales *et al.*, 2007), en los que observaron que *Bacteroidetes* era un grupo abundante en el interior del puerto y en la zona de influencia de éste. La presencia de este grupo en estos ambientes sometidos a impacto antropogénico también fue descrita en el puerto Victoria, Hong Kong (Zhang *et al.*, 2007) y el puerto de Xiamen (Ma *et al.*, 2009), lo que significa que se trata de un grupo adaptado a vivir en ambientes sometidos a contaminación crónica.

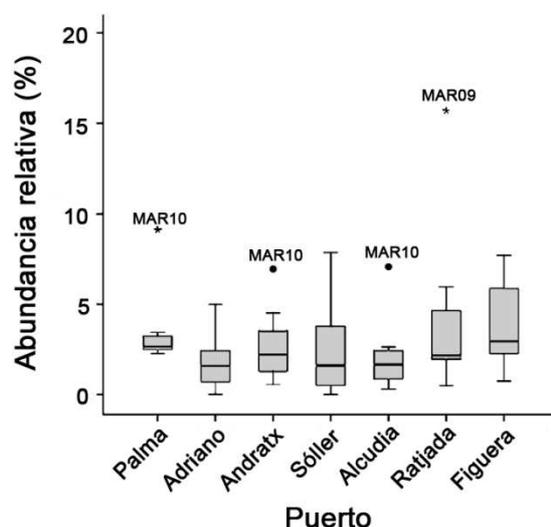


Figura R1.16: Diagrama de caja de la suma de la abundancia relativa de los T-RFs 5'H92 y 5'H94, indicativos del grupo *Bacteroidetes*, en aguas de puertos.

La presencia del grupo *Actinobacteria* fue detectada en las aguas de puertos mediante los T-RFs 3'A120 (importante en la diferenciación de los perfiles de T-RFLP, tabla R1.2) y 3'A156 (con los cebadores de *Alphaproteobacteria*). Como se ha comentado previamente, los cebadores de *Alphaproteobacteria* presentaban inespecificidades (Amann y Fuchs, 2008). El análisis de las genotecas (apartado 5.1.) permitió detectar que estos cebadores permitían amplificar ciertos tipos de *Actinobacteria*, que se habían detectado previamente en el estudio en Puerto Adriano (Nogales *et al.*, 2007; Aguiló-Ferretjans *et al.*, 2008). Como la monitorización de este grupo se realizó en base a los dos T-RFs indicados (3'A120 y 3'A156) en los perfiles de *Alphaproteobacteria*, en este caso los porcentajes se expresan en referencia al total de fragmentos obtenidos para esta clase (figura R1.17). Las medianas de la suma de las abundancias relativas de los T-RFs 3'A120 y 3'A156 en los puertos se encontraban entre el 0 y el 10%. Estos T-RFs se detectaron en el 75% de las muestras de puertos. En general, los valores de abundancia relativa no sufrieron variaciones muy

importantes, a excepción de puerto Adriano y sobretodo el puerto de Alcudia, donde se obtuvo la mediana más elevada, alcanzando en este puerto, incluso el 15% de abundancia respecto a *Alphaproteobacteria*.

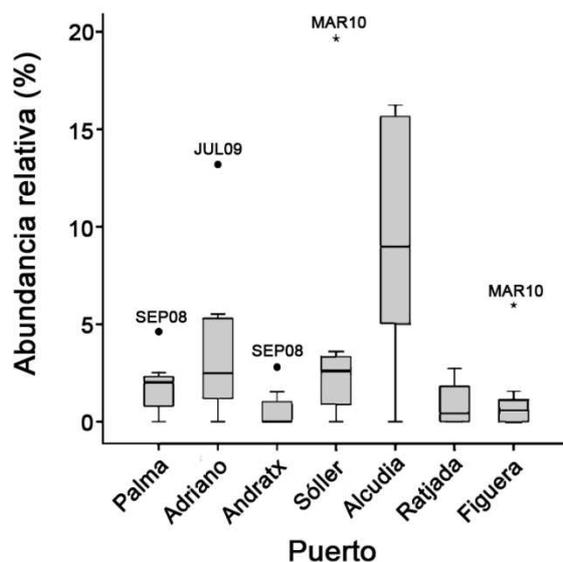


Figura R1.17: Diagrama de cajas de la suma de la abundancia relativa de los T-RFs 3'A120 y 3'A156, indicativo del grupo *Actinobacteria* en aguas de puertos.

En el estudio previo en puerto Adriano se detectaron también actinobacterias relacionadas con ambientes de agua dulce, siendo éstas una de los grupos más abundantes en el puerto en verano (Aguiló-Ferretjans *et al.*, 2008). En aquel estudio previo, no se pudo determinar si provenían de aportes alóctonos o si proliferaban bajo determinadas condiciones ambientales y/o presencia de determinadas fuentes de carbono presentes en el puerto. En este estudio se ha detectado la presencia de este tipo de bacterias en todos los puertos y en la mayoría de las muestras tomadas en diferentes momentos. Esto podría indicar que estas bacterias podrían ser miembros estables de las comunidades microbianas en aguas de puertos. Sin embargo, sería necesario un estudio

exhaustivo para poder comprobar esta hipótesis y determinar qué papel juegan en estos ambientes.

Finalmente, se analizó la abundancia relativa del T-RF identificativo del grupo oligotrófico marino SAR11 que es el grupo de bacterias heterótrofas más abundante en aguas oligotróficas (Morris *et al.*, 2002). SAR11 era el grupo predominante en muestras control de la zona más alejada a la bocana de Puerto Adriano, y raramente se había detectado en el interior del puerto (Nogales *et al.*, 2007; Aguiló-Ferretjans *et al.*, 2008).

La presencia del grupo SAR11 se monitorizó mediante la abundancia relativa del T-RF 5'A171 de los perfiles obtenidos con cebadores universales. En general, la abundancia relativa de este T-RF fue baja o incluso nula durante la mayor parte del año y en todos los puertos, como ya se había descrito con anterioridad para Puerto Adriano (Nogales *et al.*, 2007; Aguiló-Ferretjans *et al.*, 2008) (figura R1.18).

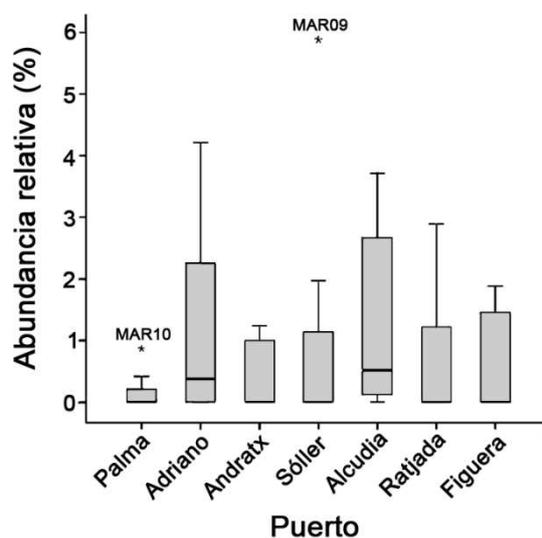


Figura R1.18: Diagrama de cajas de la abundancia relativa del T-RF 5'A171, indicativo del grupo SAR11 en aguas de puertos.

Este T-RF se detectó en el 47% de las muestras registrándose valores máximos del entre el 3-5% (principalmente en muestras tomadas en marzo). Esto podría atribuirse probablemente, a que la actividad náutica es mayor en verano. Las medianas de la mayoría de puertos eran cero a excepción de los puertos Adriano y Alcudia, que además fueron los dos puertos donde se observaba la mayor variación en abundancia relativa. Las muestras control presentaron un valor promedio alrededor del 4%.

La presencia de hidrocarburos y una mayor concentración de nutrientes en el agua podrían explicar la baja presencia del grupo SAR11 en puertos. Aunque no se midió la concentración de nutrientes en el agua de los puertos estudiados, se observaron valores de concentración de clorofila (figura R1.2a) y recuentos de procariotas (figura R1.3a) mayores a los observados en las muestras control. Estudios anteriores han evidenciado el efecto negativo que ejercen los hidrocarburos sobre este grupo bacteriano. En un experimento de microcosmos con aguas oligotróficas contaminadas con diesel se observó una drástica disminución en la detección de secuencias pertenecientes a este grupo en los microcosmos tratados a las 65 horas del inicio del experimento (Lanfranconi, *et al.*, 2010). La abundancia relativa del T-RF 5'A171 disminuyó un 50% a las 27 horas del inicio y un 92% al final del experimento (89 horas). En otros estudios de diversidad microbiana de las aguas de los puertos Victoria (Hong Kong) y Xiamen (Singapur) no se ha detectado la presencia de este grupo bacteriano, probablemente debido a los mayores niveles de contaminación, ya que se trata de puertos más grandes que los estudiados en este trabajo y con mayor tráfico de embarcaciones.

CAPÍTULO 2:

**Respuesta del grupo
Roseobacter a la contaminación
por hidrocarburos y nutrientes**

A día de hoy existen trabajos que relacionan la presencia del clado *Roseobacter* en ambientes sometidos a contaminación por hidrocarburos (ver apartado 4 de la introducción). Varios autores han obtenido aislados del grupo procedentes de ambientes muy diversos como aguas costeras (González y Moran, 1997), sedimentos de un manglar (Brito *et al.*, 2006), aguas de un puerto (Harwati *et al.*, 2007) que han mostrado capacidad para crecer con hidrocarburos (alcanos o aromáticos) como única fuente de carbono y energía. Numerosos estudios de diversidad han comprobado, que en general, el grupo responde favorablemente al tratamiento con hidrocarburos (ver tabla I2). Así, trabajos anteriores habían mostrado la presencia del grupo *Roseobacter* en ambientes sometidos a impacto antropogénico (Nogales *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007; Aguiló-Ferretjans *et al.*, 2008). En el capítulo anterior, se demostró que el grupo *Roseobacter* era uno de los grupos más abundantes en las aguas de los puertos estudiados tanto por recuentos de FISH como por qPCR. El análisis de diversidad realizado por genotecas del 16S ADNr, permitió la detección de filotipos del grupo *Roseobacter* presentes solo en las muestras de agua prístina. Sin embargo, se detectaron dos filotipos presentes en la mayoría de los puertos en función de la época del año. Estos resultados parecían indicar que se produce una selección de las poblaciones del grupo *Roseobacter* en este tipo de ambientes. No obstante, no se pudo establecer una correlación significativa con la concentración de hidrocarburos del agua. En un estudio previo a esta tesis se realizaron dos experimentos de microcosmos (uno en verano y otro en invierno) con agua oligotrófica que se contaminó con bajas concentraciones de un hidrocarburo refinado (diesel) en un intento de simular eventos de contaminación que podrían ocurrir en zonas costeras explotadas con fines turísticos. La concentración de diesel empleada en ese estudio era el doble del contenido de hidrocarburos permitidos en las descargas de efluentes en las zonas

especiales de acuerdo al Convenio MARPOL 73/78 (<http://www.imo.org>) para la prevención de la contaminación por los buques (Lanfranconi *et al.*, 2010). Los resultados de ese estudio mostraron cambios en las comunidades microbianas en respuesta a la contaminación. En particular, se observó un incremento en el número de clones del grupo *Roseobacter* en los microcosmos tratados con diesel, aunque en los microcosmos de verano la mayoría de secuencias pertenecían a la familia *Oceanospirillaceae*, que incluye bacterias marinas oligotróficas degradadoras de hidrocarburos (Garrity *et al.*, 2005). En ese estudio no se añadieron nutrientes porque no se pretendía estimular la biodegradación de hidrocarburos (Lanfranconi *et al.*, 2010), que es lo que habitualmente se ha realizado en los experimentos de contaminación artificial con hidrocarburos (Coulon *et al.*, 2007; McKew *et al.*, 2007a; McKew *et al.*, 2007b). Sin embargo, los puertos son ambientes sometidos a contaminación por hidrocarburos así como por nutrientes. Por lo tanto, se planteó la hipótesis de que la adición de bajas concentraciones de diesel juntamente con algún nutriente (nitrógeno o fósforo), también en bajas concentraciones, podría favorecer el desarrollo de bacterias del grupo *Roseobacter*, y explicar su predominio en puertos.

Para analizar en detalle la respuesta del grupo *Roseobacter* de aguas oligotróficas a la contaminación por diesel, con y sin adición simultánea de nutrientes, se realizó un nuevo experimento de microcosmos. Además, se pretendía comprobar si se estimulaban poblaciones de *Roseobacter* parecidas a las observadas en el ambiente en las muestras de puertos deportivos.

1. Cambios en la abundancia de procariotas totales y de grupos bacterianos específicos

Se realizaron dos experimentos de microcosmos (denominados en adelante M1 y M2) con agua oligotrófica tomada a final de invierno (marzo de 2011) con 15 días de separación entre un muestreo y otro. En cada ocasión se prepararon 4 microcosmos que fueron tratados con 30 mg l⁻¹ diesel (D); 30 mg l⁻¹ de diesel y 7,89 mg l⁻¹ NaNO₃ (D+N); 30 mg l⁻¹ de diesel y 1,2 mg l⁻¹ Na₂HPO₄ (D+P), y finalmente uno sin tratar, que se consideró el microcosmos control (C). Los microcosmos se incubaron con luz natural y temperatura controlada entre 15 y 16°C con el fin de reproducir las condiciones naturales (14°C).

La concentración de clorofila *a* en el agua inicial era de 0,38 y 0,23 µg l⁻¹ valores similares a los registrados en las muestras control del capítulo anterior para muestras tomadas en marzo. Para determinar el estado inicial del agua antes de aplicar el tratamiento (posible limitación de la comunidad microbiana por nitrógeno o fósforo en el agua) se realizaron experimentos adicionales. Para ello se prepararon botellas estériles con 400 ml de agua y se trataron por duplicado. Dos botellas fueron suplementadas con NaNO₃ (a una concentración final de 16 µM), dos con NaH₂PO₄ (concentración final de 1 µM), y finalmente dos botellas más, sin tratamiento, fueron consideradas control. Se incubaron las botellas con luz natural y a 16°C durante 24 h. Pasado este tiempo, se realizaron recuentos de procariotas totales, que aparecen representados en la figura A3 (ver anexo). No se observaron diferencias en los recuentos de las botellas tratadas respecto al control. Por tanto, podría decirse que no había deficiencias de ninguno de los dos nutrientes (N y P), lo que indicaba que para la cantidad de carbono presente en el agua al inicio del experimento había suficiente cantidad de nitrógeno y fósforo.

Por lo que respecta a los dos experimentos con tratamientos de diesel y nutrientes, en ambos casos las comunidades microbianas evolucionaron de forma similar en cuanto a los recuentos por lo que los resultados se dan en promedio de los dos experimentos (figura R2.1).

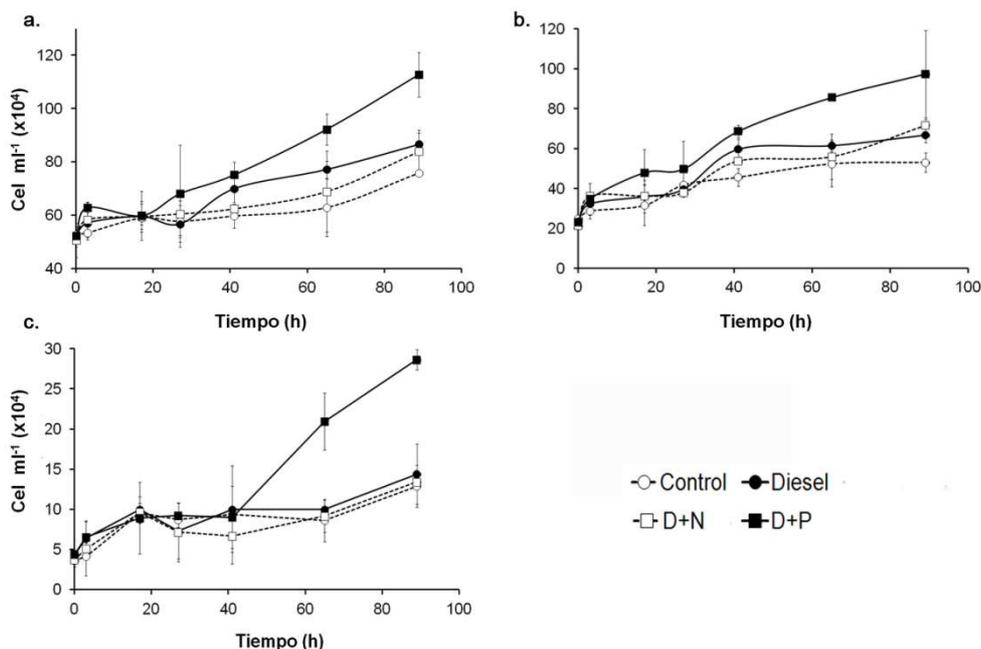


Figura R2.1: Variación del número de procariontes totales (a), de *Bacteria* (b) y de *Roseobacter* (c). Se muestra la media de los dos experimentos.

Los recuentos de número total de procariontes en los microcosmos control mostraron un cierto efecto del confinamiento; el incremento de células se produjo sobre todo al final del experimento, a partir de las 65 horas (incremento de $2,3 \times 10^5$ cél ml⁻¹). Por lo que respecta a los tratamientos, no se observaron incrementos significativos del número de procariontes totales en los microcosmos D+N respecto a los microcosmos control (figura R2.1a), aunque el número de procariontes totales fue ligeramente superior al final del experimento. En cambio, en los microcosmos tratados con diesel se observó un incremento significativo

respecto al control a partir de las 41 horas (el incremento fue de $1,1 \times 10^5$ cél ml⁻¹ a las 89 horas). En cuanto a los microcosmos D+P, el efecto estimulador del tratamiento se observó también a partir de las 41 horas, produciéndose al final del experimento un incremento significativo respecto al control de aproximadamente $3,7 \times 10^5$ cél ml⁻¹.

El número de células detectadas con las sondas universales EUB I-III (*Bacteria*) fue incrementando a lo largo del experimento, siendo mayor en todos los microcosmos tratados con diesel, con o sin adición de nutrientes al final del experimento (89 h) como puede verse en la figura R2.1.b. Como en el número de procariotas totales, el efecto se observó más rápidamente y en mayor medida en el caso de los microcosmos D+P. Al principio del experimento el porcentaje de detección con las sondas EUBI-III en los microcosmos control respecto a DAPI era de alrededor del 45% y aumentó hasta el $70 \pm 6,5\%$ a las 89 horas. En los microcosmos tratados con diesel se produjo un incremento mayor en el número de células detectadas por las sondas EUB I-III hasta el $78 \pm 1,8\%$, mientras que en los microcosmos tratados con D+N y D+P fue de hasta el $86 \pm 4,5\%$ y el $86 \pm 13\%$, respectivamente. Estos resultados demuestran que el tratamiento, sobre todo tras la adición de nutrientes, provocó la estimulación de microorganismos con alto contenido de ribosomas, y por tanto fácilmente detectables mediante FISH. El incremento se debió probablemente a la proliferación de bacterias de crecimiento rápido, como pueden ser gammaproteobacterias (ver apartado 3.4).

Los resultados observados en los microcosmos tratados con diesel obtenidos en este trabajo son comparables a los obtenidos por Lanfranconi y colaboradores (2010), en los experimentos que realizaron en invierno. Estos autores también observaron que el número de procariotas totales al final del experimento había aumentado en 9×10^5 cel ml⁻¹ en los

microcosmos tratados con diesel, debido principalmente a la estimulación de bacterias de crecimiento rápido a consecuencia del tratamiento con diesel. No obstante, los recuentos de procariotas totales fueron inferiores a los obtenidos en experimentos de bioremediación con adición simultánea de nutrientes, donde el número total de células puede llegar a alcanzar valores de 10^9 al final del experimento. Sin embargo, cabe destacar que estos experimentos suelen tener una duración mayor que los experimentos realizados en este trabajo (Yakimov *et al.*, 2005; Cappello *et al.*, 2007; Coulon *et al.*, 2007). Además, en este estudio se trataron los microcosmos con pequeñas cantidades de diesel, que es una mezcla de hidrocarburos refinados, mientras que en los estudios de biodegradación citados (Cappello *et al.*, 2007; Coulon *et al.*, 2007) se utilizaba crudo de petróleo en cantidades elevadas para simular un vertido (concentraciones 30 veces superiores a la de este estudio). Asimismo, las concentraciones de nutrientes empleadas en este estudio fueron también bajas en comparación a las empleadas en estudios de biodegradación, por ejemplo, Yakimov y colaboradores (2005) emplearon una concentración de nitrógeno y de fósforo 56 y 31 veces superior a las concentraciones usadas en el presente estudio.

El principal objetivo de este estudio era determinar la respuesta del grupo *Roseobacter* a la adición de diesel y nutrientes. Para ello se realizaron recuentos de FISH con la sonda específica ROS536R (Brinkmeyer *et al.*, 2000). Se observó un aumento en el número de células del grupo *Roseobacter* en los microcosmos control, incremento que se produjo sobre todo a partir de las 65 horas. Como puede verse en la figura R2.1.c no se observaron cambios significativos en el número de células de *Roseobacter* de los microcosmos de diesel ($1,4 \times 10^5$ cel ml⁻¹ a las 89 h) y D+N ($1,3 \times 10^5$ cel ml⁻¹) respecto a los recuentos en microcosmos control ($1,3 \times 10^5$ cel ml⁻¹). En cambio, el número de células del grupo *Roseobacter*

de los microcosmos D+P aumentó a partir de las 41 horas. Al final del experimento el número de células era el doble que en los microcosmos control ($2,9 \times 10^5$ cel ml⁻¹ a las 89 horas).

Dado que en experimentos anteriores de microcosmos contaminados artificialmente con hidrocarburos se habían observado cambios en la abundancia de gammaproteobacterias (Yakimov *et al.*, 2005; McKew *et al.*, 2007; Coulon *et al.*, 2007; Cappello *et al.*, 2007; Lanfranconi *et al.*, 2010), se hicieron también recuentos con la sonda específica para la clase *Gammaproteobacteria* GAM42a (Manz *et al.*, 1992). La variación en el número de gammaproteobacterias no fue igual en los dos microcosmos por lo que en la figura R2.2 se presentan los resultados para los dos microcosmos por separado.

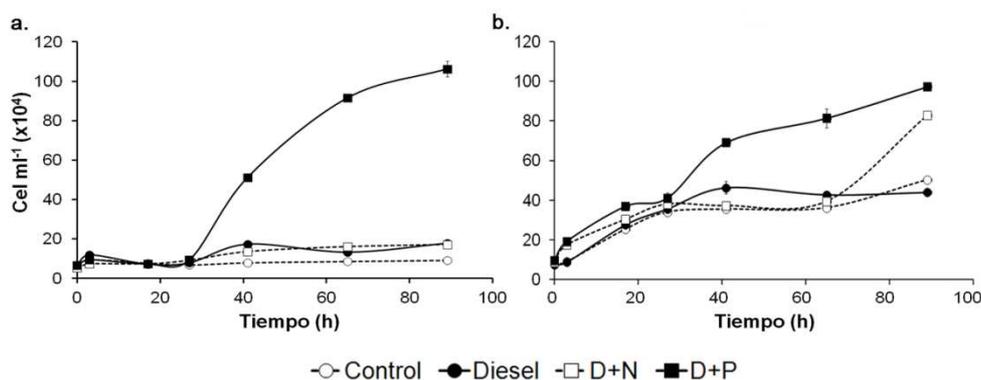


Figura R2.2: Recuentos de la abundancia de *Gammaproteobacteria*, del primer experimento (a) y del segundo (b).

Al inicio de ambos experimentos cerca del 30% de *Bacteria* pertenecían a la clase *Gammaproteobacteria*. Como puede verse en la figura R2.2a en el primer experimento (M1) el número de gammaproteobacterias se mantuvo similar al control en todos los tratamientos hasta las 27 h de incubación. A partir de ese momento se observó un incremento significativo en todos los tratamientos, que fue

particularmente importante en el caso del microcosmos D+P. Los recuentos de este grupo al final del experimento M1 fueron 16 veces superiores a los del inicio en los microcosmos D+P (de $6,9 \times 10^4$ cél ml⁻¹ al inicio hasta $1,1 \times 10^6$ cél ml⁻¹ al final) y 12 veces superiores a los del control al final del experimento. Los recuentos finales en D y D+N fueron casi el doble que los del control.

En el segundo experimento (M2) se observó un incremento significativo de gammaproteobacterias al inicio del experimento (3-17h) en los tratamientos D+N y D+P (figura R2.2.b). A partir de 27 h de incubación los recuentos fueron similares tanto en los tratamientos D y D+N como el control, excepto en el caso de D+N al final del experimento (el número de células era 1,5 veces superior que el del microcosmos control). Como en el experimento M1, el mayor incremento en el número de gammaproteobacterias se registró en los microcosmos tratados con diesel y fósforo a partir de 41h de incubación. En este experimento se produjo un cierto incremento en el número de gammaproteobacterias en el microcosmos control, siendo unas 6 veces mayor al final del experimento.

El análisis estadístico mostró correlaciones positivas entre el número de bacterias del grupo *Roseobacter* con los valores de procariotas totales y *Bacteria* para todos los tratamientos ($p < 0,05$). En el caso del número de *Gammaproteobacteria* se observó que también existía una correlación positiva con los recuentos de procariotas totales y *Bacteria* de los microcosmos tratados, pero no en los microcosmos control. Estos resultados refuerzan la evidencia de que estos dos grupos bacterianos contribuyeron al incremento en el número de procariotas totales observado en los microcosmos tras los tratamientos (Figura R2.1a). La abundancia de *Roseobacter* fue siempre inferior a la de gammaproteobacterias, tanto al inicio de los experimentos (4×10^4 cél ml⁻¹ y 7×10^4 cél ml⁻¹,

respectivamente) como durante los tratamientos. Ambos grupos, *Roseobacter* y gammaproteobacterias, respondieron de forma positiva a la adición conjunta de diesel y fosfato, pero los recuentos finales de *Roseobacter* fueron aproximadamente un orden de magnitud inferiores a los de gammaproteobacterias en estas condiciones (grupo *Roseobacter* $2,9 \times 10^5$ cél ml⁻¹ y gammaproteobacterias 1×10^6 cél ml⁻¹). De hecho, las gammaproteobacterias suponían alrededor del 90% del número de procariontes totales en los microcosmos D+P, lo que supone que la comunidad al final del experimento se encontraba dominada por este grupo bacteriano.

2. Cambios de la comunidad bacteriana total en respuesta a los tratamientos

El estudio de los cambios en las comunidades bacterianas se basó en el análisis de los perfiles de T-RFLP obtenidos con cebadores universales para las muestras de agua tomadas a diferentes tiempos (ver apartado 3 del Material y Métodos). Se utilizó la molécula de 16S ARNr para las siguientes técnicas moleculares con el fin de analizar las bacterias presuntamente activas presentes en los microcosmos, que serían por tanto las que estarían respondiendo al tratamiento. Los perfiles de T-RFLP estaban formados por los T-RFs obtenidos de la digestión con enzimas de restricción (*AluI* y *HhaI*) y se realizó un análisis con el método de UPGMA y el coeficiente de Bray-Curtis.

En el dendrograma (figura R2.3) se puede observar una clara diferenciación de las muestras en cuatro grupos en función del tiempo de incubación y del tratamiento.

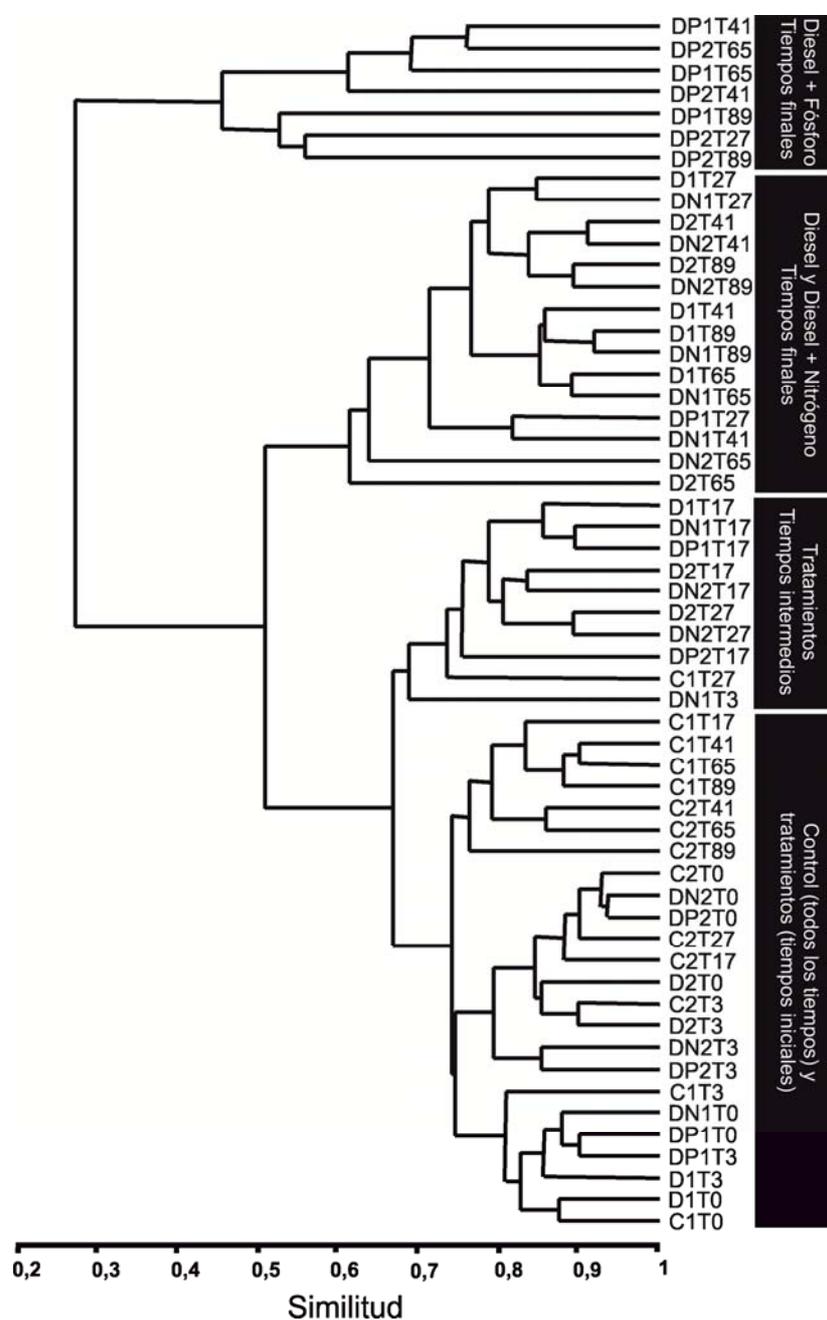


Figura R2.3: Dendrograma calculado con el método de UPGMA basado en los fragmentos 5' obtenidos al digerir con los enzimas *AluI* y *HhaI*. El nombre de las muestras indican el tratamiento (C: control, D: diesel, DN: diesel y nitrógeno, DP: diesel y fósforo), el experimento (1 ó 2) y el tiempo de incubación (T_x).

Las muestras de los tratamientos correspondientes al inicio del experimento (0-3 horas), y todas las muestras de los microcosmos control se agrupaban en un mismo grupo con unos valores de similitud normalmente por encima del 80%, lo significa que no se detectaron cambios en las comunidades microbianas durante las primeras tres horas de tratamiento. Las comunidades microbianas al inicio de los experimentos M1 y M2 no eran exactamente iguales, de modo que se agrupaban en subgrupos separados. Sin embargo, presentaban niveles de similitud elevados de alrededor de 73%. Las muestras de los microcosmos control de tiempos finales (a partir de las 41 horas) se agrupaban en otro subgrupo con valores de similitud superior al 70% con las muestras iniciales, lo que indicaba que no se produjeron variaciones importantes en la composición microbiana a consecuencia del confinamiento, a pesar del incremento del número de procariontes observado (figura R2.1a). Cabe destacar que dos muestras (microcosmos D+N 3 h y control 27 h del experimento M1) no se agruparon con el resto de las muestras control o iniciales, sino que se agruparon con las muestras de los tratamientos intermedios.

En general, los cambios de las comunidades bacterianas sufridos en respuesta al tratamiento se observaron a partir de las 17 y 27 horas de incubación, dependiendo del tratamiento. Todos los perfiles obtenidos de los tratamientos (D, D+N y D+P) tras 17 horas de incubación se agrupaban en un segundo grupo con valores de similitud intragrupo también superiores al 70%, mientras que la similitud de este grupo con el de las muestras control fue algo superior al 65%. En este grupo aparecían también los perfiles correspondientes a los tratamientos D y D+N del M2 tras 27 horas de incubación. En cambio, los perfiles correspondientes a este mismo tiempo y estos mismos tratamientos en el M1 se agrupaban con los perfiles correspondientes a los tiempos finales de estos tratamientos. Esto hace pensar que en los microcosmos D y D+N del

experimento 1 los cambios en la composición bacteriana fueron más rápidos que en el segundo experimento.

Los perfiles correspondientes a los tiempos finales de incubación de los tratamientos D y D+N (41-89 horas) de los dos experimentos se agruparon en un tercer grupo, que presentaba menos de un 50% de similitud con las muestras del principio del experimento y de los microcosmos control. El hecho de que los perfiles de T-RFLP de estos tratamientos se agrupasen juntos, indica que la respuesta de las comunidades microbianas fue semejante, al igual que ya se había visto en los recuentos de células totales y de *Bacteria* (figura R2.1a, b). Esto indica que la adición simultánea de nitrógeno junto con el diesel no alteró el número de células (con respecto a la adición de diesel) ni aparentemente la composición de la comunidad bacteriana total, lo que indicaría que la disponibilidad de nitrógeno del agua original era suficiente.

Finalmente, el cuarto grupo estaba constituido por los perfiles de las comunidades bacterianas de los tiempos intermedios (41-65 h) y finales (89 h) de los microcosmos de D+P. Los perfiles que constituían este grupo tenían valores de similitud inferiores al 50%, lo que indicaba una variabilidad en la composición de las comunidades bacterianas de resultados de este tratamiento. Además, estas muestras presentaban un porcentaje de semejanza con las muestras del inicio del experimento por debajo del 30%. Esto indica que se produjeron cambios drásticos en la composición de las comunidades de los microcosmos tratados con diesel y fósforo, tal como ya se había observado en los recuentos de procariotas totales de *Bacteria* y de *Roseobacter* (figura R2.1) y de *Gammaproteobacteria* (figura R2.2). Además, los cambios en la composición de las comunidades bacterianas en tratamientos D+P fueron evidentes a tiempos de incubación

más cortos (27 horas) que en los tratamientos D y D+N, y en este caso fueron más acusados en el caso del M2.

Los índices de diversidad de Shannon se calcularon en base a los T-RFs 5' generados por el enzima *AluI* (tabla R2.1).

Tabla R2.1: Índices de diversidad de Shannon calculados en base a la abundancia relativa T-RFs 5' generados con el enzima *AluI*.

Tiempo (h)	Control		Diesel		D+N		D+P	
	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2
0	2,50	2,73	2,43	2,75	2,67	2,77	2,73	2,82
3	2,76	2,88	2,85	2,83	3,26	2,61	2,84	2,58
17	3,17	2,88	3,36	2,94	3,03	2,89	3,04	2,84
27	2,95	2,69	2,76	2,79	2,75	2,80	3,04	2,63
41	2,91	2,94	2,56	2,83	2,80	2,69	2,37	2,48
65	3,06	2,93	2,59	3,30	2,63	2,66	2,60	2,48
89	2,83	3,31	2,49	2,58	2,58	2,72	2,36	2,62

Los índices no mostraron cambios relevantes de la diversidad microbiana entre el inicio y el final del experimento en ninguno de los tratamientos. Entre las 3 y las 27 horas se produjo un leve incremento en los valores de los índices de diversidad de los microcosmos, alcanzando valores ligeramente superiores a 3. No obstante, al final del experimento (a partir de las 41 horas) se produjo una disminución, volviendo a los niveles iniciales (entre 2,50 y 2,80). En cambio, al comparar los índices de diversidad al final del experimento (89 horas) de los tratamientos respecto al control se observaba una disminución de los índices de diversidad en ambos experimentos, M1 y M2. Estos resultados contrastan con resultados anteriores en los que se vio que el tratamiento con diesel provocaba una rápida disminución de la diversidad microbiana a las tres horas de incubación (Lanfranconi *et al.*, 2010). Aunque no se observaron cambios

relevantes en los índices de diversidad debidos al tratamiento, sí se observó una disminución en el número de T-RFs mayoritarios. Así, el número de T-RFs con abundancias relativas superiores al 2%), disminuía con respecto al control.

La respuesta rápida de las comunidades bacterianas al tratamiento por diesel, había sido descrita anteriormente por Lanfranconi y colaboradores (2010) que realizaron experimentos de microcosmos en las mismas condiciones que este estudio. En el estudio previo se observaron cambios en la comunidad microbiana a partir de las 17 horas de incubación después de la adición de diesel. Al comparar con otros trabajos es importante tener en cuenta la duración del experimento y las concentraciones empleadas de hidrocarburos y nutrientes. Como ya se ha comentado antes, las concentraciones empleadas de hidrocarburos y nutrientes en este estudio son mucho más bajas que las utilizadas en otros. Además, la duración de este experimento fue de 89 horas, mientras que otros estudios de microcosmos y/o biodegradación pueden durar 15 días como en el caso de Cappello *et al.* (2007) o 90 días como en el caso de Coulon *et al.* (2007). Así pues, se han descrito cambios en la comunidad bacteriana en respuesta a la adición de crudo (900 mg l⁻¹), KH₂PO₄ (0,077 g l⁻¹), NH₄ (0,2 g l⁻¹), NaNO₃ (0,1 g l⁻¹) a los dos días del inicio del experimento (Cappello *et al.*, 2007). Coulon y colaboradores (2007) estudiaron los cambios sufridos por las comunidades microbianas en respuesta a la adición de crudo (0,4% v/v) y nutrientes (nitrógeno 5 mM y fósforo 0,25 mM) mediante T-RFLP y DGGE. Ambas técnicas mostraron que se producía una respuesta a los siete días del tratamiento y se observaron cambios significativos en los perfiles de T-RFLP y DGGE entre las comunidades naturales y las de los microcosmos tratados. McKew y colaboradores (2007) realizaron también experimentos de microcosmos que suplementaron con nutrientes (20 mg l⁻¹ de NH₄NO₃ y 10 mg l⁻¹

KH_2PO_4) y diferentes tipos de hidrocarburos. Las comunidades bacterianas de los microcosmos tratados eran distintas de las del agua inicial (<10% similitud), pero también eran distintas en función del tipo de hidrocarburo añadido (según el tipo de n-alcano o poliaromático). Esto corrobora que la adición de hidrocarburos con y sin adición simultánea de nutrientes provoca cambios importantes en las comunidades microbianas.

El análisis de componentes principales de los perfiles de T-RFLP mostró la misma agrupación de las muestras que el dendrograma mostrado en la figura R2.3. Además, permitió identificar los 14 T-RFs con mayor peso en la diferenciación de los perfiles de T-RFLP correspondientes a las comunidades bacterianas. Los T-RFs generados por el enzima *AluI* aparecen indicados con una A y los generados por *HhaI* con una H. Los T-RFs 5'A171, 5'A189, 5'A204, 5'A249 y 5'H94 eran muy abundantes en los microcosmos control y los tiempos iniciales de los tratamientos (entre 2 y el 11%). Sin embargo, en los microcosmos de diesel y D+N se observó una disminución en la abundancia relativa de estos T-RFs (valores máximos del 4%), siendo mayor la reducción en los microcosmos D+P donde estos T-RFs llegaron a desaparecer. Por tanto, estos cuatro T-RFs contribuían a la agrupación de las muestras de los microcosmos control, así como, los tiempos iniciales de los tratamientos.

Los T-RFs 5'A150, 5'A229, 5'A236 y 5'H354 contribuían a la agrupación de las muestras de tiempos finales de los microcosmos de diesel y D+N. Estos T-RFs estaban presentes al inicio del experimento con una abundancia relativa alrededor de un 2% de media, aumentando en respuesta a los tratamientos con diesel y D+N hasta abundancias relativas entre el 4 y el 13%. En los microcosmos D+P, en general, o bien no se produjo incremento en la abundancia de estos T-RFs o bien el incremento fue menor.

En el caso de la agrupación de las muestras de tiempos finales de los microcosmos D+P, se detectaron seis T-RFs importantes: 5'A68, 5'A75, 5'A156, 5'A190, 5'A230 y 5'H205. Las abundancias relativas de estos T-RFs al inicio del experimento eran en general inferior al 1%. El T-RF 5'A68 aparecía irregularmente en los perfiles de las muestras finales de los microcosmos D+P con abundancias relativas alrededor del 12%. El 5'A75 fue un T-RF muy abundante (13-17%) en las muestras DP1T41, DP2T41 y DP2T65, que en el dendrograma aparecían cercanas. El 5'A156 adquirió relevancia a partir de las 27 horas de tratamiento alcanzando abundancias relativas al final del experimento de entre el 3 y el 6%. El T-RF 5'A190 aparecía a partir de las 17-27 horas alcanzando valores de abundancia relativa de hasta el 7,5%, aunque disminuyó hacia el final a abundancias relativas del 2-3,5%. El T-RF 5'A230 solo estaba presente en las muestras DP2T27, DP2T41, DP2T65 y DP1T65, pero desaparecía a las 89 horas. Por último, el H205 aumentó mucho su abundancia relativa a partir de las 27 horas con abundancias relativas entre el 10-18%.

Por último el T-RF 5'A248 contribuía a separar las muestras de los tiempos iniciales y muestras control de los tiempos intermedios y finales de los microcosmos tratados. No se detectó en los microcosmos control, ni en los tiempos iniciales de los microcosmos tratados. Sin embargo, su abundancia relativa aumentó a partir de las 17 horas de incubación, con abundancias de hasta el 7%, en los microcosmos de diesel y D+N. En cambio, en los microcosmos D+P aumentó la abundancia relativa, pero descendía al final del experimento.

3. Cambios en el grupo *Roseobacter* en respuesta a los tratamientos

El principal objetivo de esta tesis era determinar la respuesta del grupo *Roseobacter* a la adición de diesel y nutrientes. Como se ha mostrado en el apartado anterior, en los experimentos realizados en este

trabajo los recuentos de FISH no mostraban cambios en el número de células del grupo *Roseobacter* en los microcosmos D y D+N respecto a los controles, mientras que en los microcosmos D+P se observó un incremento a partir de las 41 horas de incubación (figura R2.1c). Para el estudio con más detalle de la respuesta del grupo *Roseobacter* al tratamiento, se estudió el comportamiento de los T-RFs identificativos del grupo: 5'A245, 5'A246, 5'A248 y 5'A250. Estos T-RFs coinciden con los que se habían identificado en las muestras ambientales en el capítulo anterior (tabla R1.4). Los T-RFs 5'A246 y 5'A250 se detectaron puntualmente y con abundancias relativas, en general por debajo del 1%. En cambio, los T-RFs 5'A245 y 5'A248 se detectaron en la mayoría de muestras y permitieron estudiar el comportamiento de estas poblaciones de *Roseobacter* frente al tratamiento con diesel y nutrientes. La respuesta del grupo *Roseobacter* al tratamiento dependía del T-RF analizado (Figura R2.4), ya que éstos presentaron dinámicas opuestas al tratamiento.

La abundancia relativa del T-RF 5'A245 descendió significativamente a partir de las 17 horas en todos los tratamientos respecto al control. En el microcosmos tratado con diesel la abundancia relativa de este fragmento se redujo en un tercio (del 3 al 2%) respecto al microcosmos control a las 89 horas. En el microcosmos D+N el descenso fue mayor, del 66%, respecto al microcosmos control (del 3 al 1%). Pero el tratamiento con D+P fue el que causó una reducción mayor, de modo que a las 27 h se había reducido a la mitad en el M1 y a un cuarto en el M2 mientras que, a partir de las 41 horas prácticamente no se detectaba este T-RF en estos tratamientos.

En cambio, la abundancia relativa del T-RF 5'A248 aumentó tras la adición de diesel y nutrientes en los tres tratamientos. Como se muestra en la figura R2.4, en el microcosmos control solo se detectó la presencia de

este T-RF en el tiempo 27 horas en el experimento M1. Al final del experimento, en el microcosmos tratado con D+P la abundancia relativa del T-RF 5'A248 era del 1,5%, mientras que en tratado con diesel era del 3% y el mayor incremento se registró en el microcosmos tratado con D+N donde la abundancia relativa era del 3,6%. Transitoriamente las abundancias relativas del T-RF 5'A248 superaron el 6% (por ejemplo en los microcosmos D+N a las 3 horas de incubación en el experimento M1).

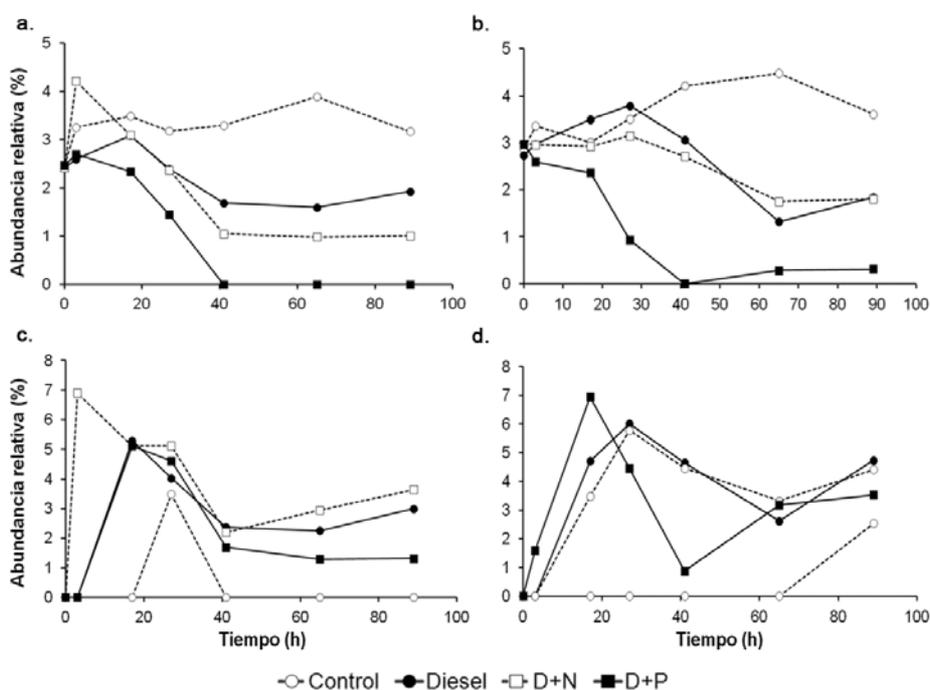


Figura R2.4: Representación de la abundancia relativa de dos T-RFs identificativos del grupo *Roseobacter*. Los paneles corresponden a 5'A245 M1 (a), 5'A245 M2 (b), 5'A248 M1(c) y 5'A248 M2 (d).

Estos resultados indican que determinadas poblaciones de *Roseobacter* (las que estarían representadas por el T-RF 5'A245) se verían negativamente afectadas por la presencia de hidrocarburos en el medio, lo que concuerda con los resultados del estudio de puertos de la Isla de Mallorca (capítulo 1), donde este T-RF se detectaba solo en ciertas

épocas del año y siempre con abundancias relativas inferiores al 2% (figura R1.12). Por otro lado, el T-RF 5'A248 se encontraba ampliamente representado en aguas de puertos, especialmente en las muestras de invierno (ver figuras R1.11b y R1.12) y se ha visto que su abundancia relativa aumentaba en respuesta a la adición de diesel y nutrientes. Estos resultados concuerdan en parte con el incremento en la abundancia relativa del T-RF 5'A248 en respuesta a la adición de diesel observado en el estudio previo de microcosmos, aunque en ese estudio, también aumentaba el T-RF 5'A245 (Lanfranconi *et al.*, 2010). Otros estudios también han demostrado que determinadas poblaciones del grupo *Roseobacter* responden de forma distinta al tratamiento con hidrocarburos (McKew *et al.*, 2007a, ver apartado 4 de la introducción).

En el capítulo anterior, se comprobó que varios filotipos del clado *Roseobacter* observados en aguas de puertos deportivos se caracterizaban por el T-RF 5'A248, entre los que destacaba el filotipo 6. Éste era uno de los filotipos mayoritarios detectado en aguas de puertos, y agrupaba el 60% de las secuencias de 16S ADN_r de las genotecas del muestreo de marzo de 2009. Debido a la relevancia del filotipo 6 en aguas de puertos (figuras R1.12 y R1.14b) y al incremento en la abundancia relativa del T-RF 5'A248 tras la adición de diesel y nutrientes, se quiso cuantificar específicamente la variación a lo largo del experimento de microcosmos del filotipo 6 mediante qPCR, utilizando los cebadores específicos y el protocolo diseñado en este trabajo (ver apartado 10 del material y métodos). Se cuantificó también la abundancia de *Bacteria*, utilizando para ello cebadores universales. Como el análisis de la diversidad en microcosmos se basó en la molécula de 16S ARN_r, la cuantificación se realizó mediante qRT-PCR, que incluye un paso de transcripción inversa previo a la amplificación por PCR.

Los resultados de cuantificación de *Bacteria* mediante FISH con la sonda EUB I-III (cél ml⁻¹) y por qRT-PCR (copias de 16S ARNr ml⁻¹) eran en general similares en todas las muestras control y en los tiempos iniciales (figura R2.5).

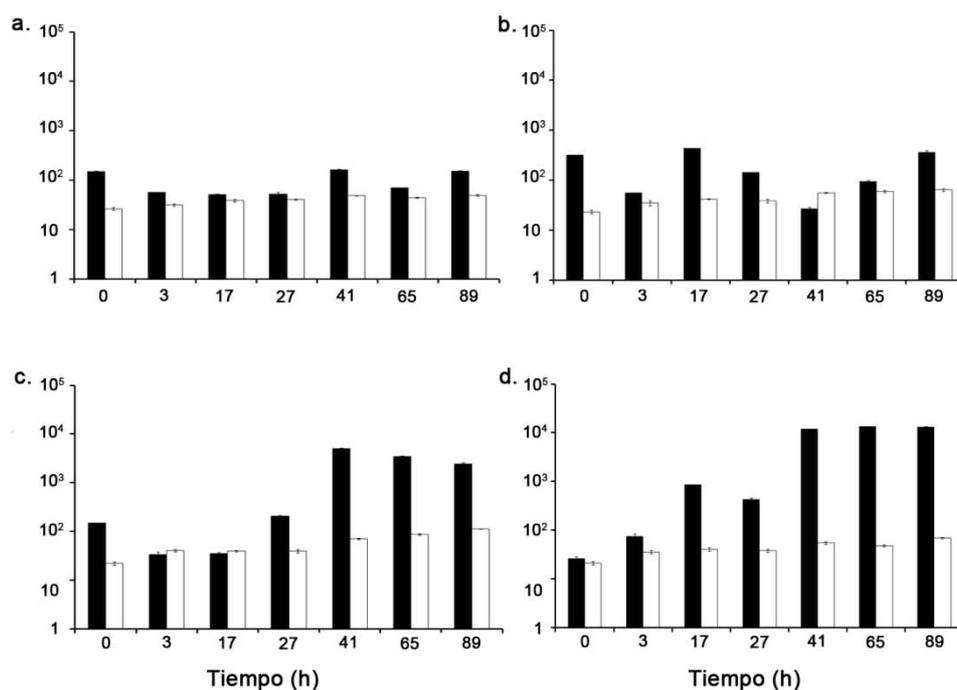


Figura R2.5: Representación de los valores obtenidos por qRT-PCR para *Bacteria* (negro), recuentos FISH (sonda EUB I-III) (blanco) para cada uno de los microcosmos: control (a), diesel (b), diesel y nitrógeno (c) y diesel y fósforo (d). Se muestran los valores del M1, pero el comportamiento de M2 fue similar. Los valores de qPCR corresponden al número de moléculas de 16S ARNr por mililitro de muestra de agua de puerto, los recuentos de FISH corresponden a células por mililitro de agua.

A partir de las 27 horas de experimento en los microcosmos suplementados con diesel y nutrientes se observó una mayor diferenciación entre los valores obtenidos por qRT-PCR y FISH (unos dos órdenes de magnitud), respecto a tiempos anteriores. Esto podría deberse a la proliferación de una o más poblaciones de crecimiento rápido que

presentasen alto contenido en ribosomas. Además, esto coincide con el tiempo en el que se detecta un incremento importante en el número de *Gammaproteobacteria* por FISH (figura R2.2) sobre todo en el microcosmos D+P. El número promedio de operones de 16S ARNr por genoma en el tipo de gammaproteobacterias que proliferan en tratamientos D+P (ver apartado 4) es de 4,5-5 (Lee *et al.*, 2009) por lo que esta explicación sería plausible.

La cuantificación de *Bacteria* se realizó con intención de relativizar la abundancia del filotipo 6 de *Roseobacter* respecto a la comunidad microbiana total. Sin embargo, la elevada proliferación de gammaproteobacterias en los tratamientos (figura R2.2) hizo que el número de bacterias totales creciese muy rápidamente (figura R2.1a), mientras que las poblaciones de *Roseobacter* aumentaban más lentamente (figura R2.1c). Esto tuvo efecto en las abundancias relativas calculadas de esta forma, sobre todo en los tiempos finales de los tratamientos D+P. En cualquier caso, la abundancia relativa del filotipo 6 determinada por qRT-PCR fue superior en los tratamientos en comparación con el control (figura R2.6a, b). Hubo diferencias entre los dos experimentos, de modo que en M1 se observó un incremento más rápido que en M2. También se relativizó la abundancia del filotipo 6 (cuantificada por qRT-PCR) respecto al número de células de *Roseobacter* (recuentos de FISH) y los resultados se muestran en la figura R2.6c, d. De esta manera se evaluaba la variación en la abundancia de este filotipo en relación al global de bacterias del clado *Roseobacter* presente en los tratamientos. El patrón de variación del filotipo 6 a los diferentes tratamientos fue similar para los dos experimentos, ya que en ambos casos se obtuvieron valores más elevados que en el control. Pero en el primer experimento la respuesta fue más rápida (17 h) que en el segundo experimento (41 h), y los valores de abundancia relativa del segundo

experimento fueron más elevados, aproximadamente de un orden de magnitud (figura R2.6c, d).

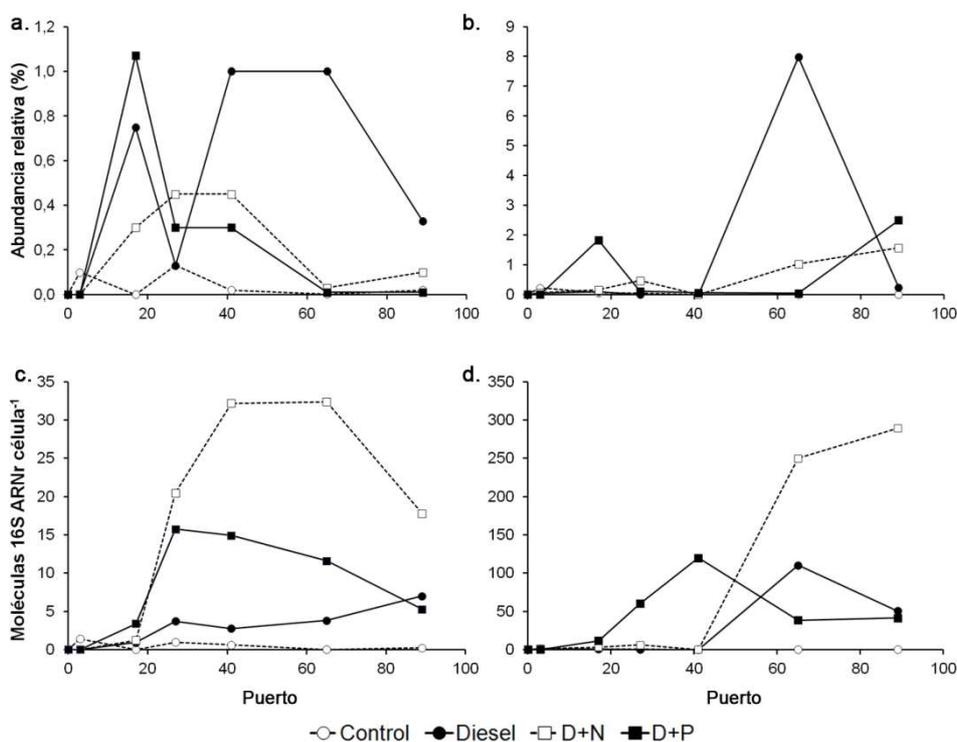


Figura R2.6: Representación de la abundancia relativa del filotipo 6 de M1 (a) y M2 (b) y del número de moléculas de 16S ARNr del filotipo 6 respecto al número de células de *Roseobacter* de M1 (c) y M2 (d).

La abundancia relativa del filotipo 6 se mantuvo constante en ambos experimentos en el microcosmos control, donde prácticamente no se detectó, a lo largo de todo el tiempo del ensayo. En el microcosmos tratados con diesel del experimento M1, la abundancia relativa se mantuvo constante, alrededor de 3-4 moléculas de ARNr de filotipo 6 por célula del clado *Roseobacter*. En el segundo experimento (M2), aumentó la abundancia relativa a las 65 horas, aunque volvió a bajar a las 89 horas a 50 moléculas de ARNr por célula. En ambos experimentos se observó un

incremento del filotipo 6 en los microcosmos D+N alcanzando valores de 18 y 290 moléculas de 16S ARNr, respecto al número de células de *Roseobacter*. Por último, en los microcosmos tratados con D+P, se observó un incremento acusado del filotipo 6 (hasta a 16 moléculas en el M1 a las 27 horas y 120 en el M2 a las 41 horas), aunque al final la abundancia disminuía hasta alcanzar los mismos valores que para el microcosmos tratado con diesel. Los resultados mostraron que todos los tratamientos provocaron, en mayor o menor medida, un incremento en la abundancia del filotipo 6, particularmente el tratamiento con diesel y nitrógeno. Sin embargo, este filotipo no parecía ser tan abundante en los experimentos de microcosmos tratados con diesel como se había visto que era en aguas de puertos (con una abundancia relativa del 11% los muestreos de marzo, figura R1.12). Por lo tanto, aunque la presencia conjunta de hidrocarburos y nutrientes, que es lo que se observa en puertos deportivos, pueda favorecer a organismos del filotipo 6, parece que su predominancia en estos ambientes puede ser debida a la participación de otros factores, desconocidos hasta el momento. En cualquier caso, la disponibilidad de nitrógeno parece ser más determinante que la de fosfatos.

Con el fin de estudiar en profundidad la diversidad del grupo *Roseobacter* al final de los experimentos de microcosmos, se generaron genotecas del 16S ARNr con cebadores específicos para *Alphaproteobacteria* de las muestras tomadas tras 65 horas de incubación. Esto permitía comparar los resultados con los obtenidos previamente para el tratamiento con diesel sin adición de nutrientes (Lanfranconi *et al.*, 2010). Se prepararon genotecas de los controles y de todos los tratamientos de los dos experimentos. No obstante, no fue posible generar genotecas de calidad para las muestras de los microcosmos de diesel y D+N del segundo experimento de microcosmos. Al igual que en el capítulo

anterior, se seleccionaron los clones susceptibles de pertenecer al grupo *Roseobacter* mediante la amplificación del inserto con cebadores específicos (apartados 9 de material y métodos). De las 6 genotecas generadas se analizaron un total de 281 clones, de los cuales 268 tenían inserto. El 67% de los que tenían inserto amplificaron con los cebadores específicos de *Roseobacter* (ver apartado 9 del material y métodos) y fueron secuenciados. Al final se obtuvieron 102 secuencias de *Roseobacter*, una vez descartadas las de *Alphaproteobacteria* pero que no pertenecían al clado (ya que los cebadores no eran del todo específicos) y las posibles quimeras. Las secuencias pertenecientes al grupo *Roseobacter* se agruparon en filotipos al 97% de similitud, obteniéndose un total de 24 filotipos. Las curvas de rarefacción para estas genotecas mostraron que hubiera sido necesario un mayor esfuerzo de cribado y secuenciación de clones del clado *Roseobacter* para cubrir por completo la diversidad del grupo (figura R2.7). Tan sólo las genotecas de los microcosmos D+P fueron las que presentaron una curva más asintótica, y en las que podría considerarse que se habían muestreado los clones principales.

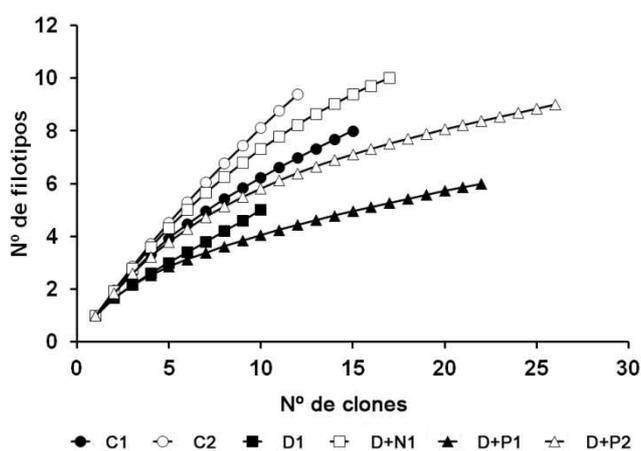


Figura R2.7: Curvas de rarefacción de las genotecas de 16S ARNr.

Respuesta del grupo *Roseobacter* a la contaminación

La tabla R2.2 muestra la composición de los 24 filotipos detectados en las genotecas de los microcosmos. Muchos de los filotipos (10) se encontraban representados por un único clon, cinco filotipos estaban formados por 2 clones cada uno y tres agrupaban 3 clones. Los otros seis filotipos estaban formados por seis o más clones cada uno.

Tabla R2.2: Composición en filotipos (al 97% de similitud) de secuencias del grupo *Roseobacter* de las genotecas generadas a partir de microcosmos tras 65 h.

Filotipo	C 1	C 2	D 1	D+N 1	D+P 1	D+P 2 ^a	Total
m1	4		6	4	1	3	18
m2						3	3
m3				1			1
m4	2	3		1			6
m5				2			2
m6	1	1	1			5	8
m7					1		1
m8		2	1	2	12	8	25
m9		1				1	2
m10		1		2	5	3	10
m11	4	1	1				6
m12			1	1			2
m13		1					1
m14	1	1					2
m15				1	2		3
m16					1		1
m17		1					1
m18		1				1	2
m19						1	1
m20				1			1
m21	1						1
m22	1			2			3
m23						1	1
m24	1						1

^a C: Control; D: Diesel; D+N: Diesel y Nitrógeno; D+P: Diesel y fósforo; 1: experimento 1; 2: experimento 2.

En cuanto al número de filotipos presentes en cada una de las genotecas, no se observaron grandes diferencias entre los controles y los tratamientos. En las genotecas del microcosmos control se detectó un total

de 8 filotipos en M1 y 10 en M2 (solo 4 compartidos). Esto significa que existía cierta variabilidad entre las muestras sin tratar de los dos experimentos, lo que era de esperar ya que las comunidades microbianas del tiempo inicial mostraban una divergencia del 30% (figura R2.3). En vista de las diferencias observadas en los microcosmos control se podría esperar que la respuesta a los tratamientos fuera distinta. Al no disponer de las genotecas de diesel y D+N del segundo experimento no se pudo comprobar para esos dos tratamientos. Sin embargo, se observaron diferencias en la composición de las genotecas de los microcosmos D+P de los dos experimentos con el control, detectándose 6 filotipos en M1 y 9 en M2. Lo que significa que algunas de las poblaciones de *Roseobacter* detectadas en los dos experimentos fueron distintas.

En el microcosmos D, la mayoría de las secuencias observadas pertenecían al filotipo m1, que también era abundante en los microcosmos control del M1 y en el D+N del M1, por lo que probablemente se tratase de una población presente en el agua inicial y que era capaz de tolerar la presencia de diesel.

En las genotecas del microcosmos D+N se detectaron más filotipos que en las del control y que el microcosmos D del experimento M1. El filotipo m1 era el más abundante en esta muestra aunque aparecieron otros cinco filotipos minoritarios que no estaban presentes en genotecas del microcosmos control.

En las genotecas de los microcosmos D+P es donde se detectaron los cambios más aparentes, ya que aparecieron filotipos diferentes y con el mayor número de clones. El filotipo m8 fue el más abundante con 25 clones de los cuales 12 procedían del microcosmos D+P del M1 y 8 del D+P del M2, lo que indica las poblaciones representadas por este filotipo se vieron muy favorecidas por este tratamiento. El filotipo m10 estaba

formado por 10 clones de los cuales el 80% procedían de los microcosmos D+P (10 clones del D+P M1 y 3 clones del D+P M2). Por último, 5 de los 8 clones que formaban el filotipo m6 (que se corresponde con el filotipo 6 del capítulo 1) fueron detectados en el microcosmos D+P del M2, lo que coincide con los resultados de qPCR, en los que se detectaron niveles mucho más altos (10 veces más) de este filotipo en el microcosmos D+P del M2 que en el del M1. En los microcosmos tratados con D+P se detectaron cinco filotipos minoritarios exclusivos: m2, m7, m16, m19 y m23, todos ellos formados por un clon a excepción del filotipo m2, que agrupaba 3 clones.

La tabla R2.3 indica los clones o secuencias tipo más cercanos a los filotipos detectados en los microcosmos. Diez de los filotipos detectados se relacionan con clones encontrados en aguas de puertos, o muestras control del capítulo 1. Del mismo modo, cinco de los filotipos detectados en los microcosmos control se relacionaban con clones detectados también en los microcosmos sin tratamiento o en la zona de bahía (muestra control del capítulo 1). Esto confirmaría que hay ciertas poblaciones de *Roseobacter* que habitan preferentemente ambientes prístinos y la presencia de contaminación les afecta negativamente.

Los filotipos más abundantes en los microcosmos tratados fueron el m6 (8 clones), m10 (10 clones) y el m8 (25 clones). El filotipo m6 coincidía con el filotipo 6 que se había detectado con anterioridad en las aguas de puertos estudiados en el capítulo 1 y que se cuantificó por qRT-PCR en este experimento de microcosmos (figura R2.6). Al igual que los filotipos m8 y m10, se encontraba formado principalmente, por secuencias procedentes de las genotecas de los microcosmos tratados (tabla R2.2).

Tabla R2.3: Secuencias con mayor similitud a los filotipos detectados en los microcosmos.

Filotipo	Secuencia relacionada	Nº Acceso	Origen ^a	% Similitud
m1	SC0-103	FN435492	b	99
m2	WD5-35	FN435461	b	99
m3	<i>Roseovarius mucosus</i>	AJ534215	d	96
m4	WD5-113	FN435482	b	96
m5	<i>Ketogulonicigenium vulgare</i>	AF136849	d	95
m6	126FIGMAR09	HE981399	a	99
m7	WD5-22	FN435451	b	99
m8	89ANDMAR09	HE981454	a	99
m9	111ADRMAR09	HE981480	a	96
m10	<i>Nereida ignava</i>	AJ748748	d	99
m11	71CCONMAR09	HE981477	a	99
m12	47ANDSEP08	HE981350	a	98
m13	SC5-53	FN435569	b	97
m14	SC5-53	FN435569	b	97
m15	41ANDMAR09	HE981460	a	98
m16	<i>Nereida ignava</i>	AJ748748	d	96
m17	WC0-165	FN435359	b	96
m18	<i>Roseobacter denitrificans</i>	CP000362	d	97
m19	59RATMAR09	HE981551	a	96
m20	WC0-165	FN435359	b	97
m21	<i>Tateyamaria omphali</i>	AB193438	d	96
m22	111ADRMAR09	HE981480	a	97
m23	89ANDMAR09	HE981454	a	97
m24	84CONMAR09	HE981496	a	97

^a Origen: Clones de los puertos analizados en el capítulo 1 (a); clones del estudio de microcosmos de Lanfranconi y colaboradores (2010) (b); clones detectados previamente en puerto Adriano (Aguiló-Ferretjans *et al.*, 2008) (c); especies tipo (d).

Estos tres filotipos se encontraban estrechamente relacionados con clones detectados en puertos y en experimentos de microcosmos tratados con diesel (Lanfranconi *et al.*, 2010). El filotipo m6 presentaba un 99% de similitud con clones de puertos, clones detectados en microcosmos control, SD5-102 (Lanfranconi *et al.*, 2010) y con un clon detectado en la playa cercana a puerto Adriano, BES139 (Aguiló-Ferretjans *et al.*, 2008). El

filotipo m8 estaba estrechamente relacionado con el filotipo 10 (99%) detectado sobre todo en el puerto de Palma en marzo de 2009 (tabla R1.3), mientras que el filotipo 10 se relacionaba con el género *Nereida* (99%). Además, estos tres filotipos (m6, m8 y m10) generan el T-RF 5'A248, ampliamente detectado en aguas de puertos en invierno y cuya abundancia aumentó en respuesta al tratamiento con diesel y nutrientes.

En principio, se trabajaba con la hipótesis de que el filotipo m6 fuese el más abundante en los microcosmos tratados con diesel y nutrientes, ya que era el filotipo más abundante en aguas de puertos deportivos en los meses de invierno. Sin embargo, los resultados de este trabajo indican que, las poblaciones representadas por este filotipo respondían positivamente al tratamiento, de acuerdo a los resultados de qRT-PCR. En cambio, el filotipo más abundante observado en las genotecas fue el m8, que había sido encontrado en aguas de puertos, sobre todo en el puerto de Palma (tabla R1.3). Esto significa que los resultados de este estudio no reproducen exactamente lo observado mayoritariamente en el ambiente. Esto pudo ser debido a que las aguas de puertos sufren una contaminación crónica por hidrocarburos y nutrientes, mientras que en estos experimentos de microcosmos se simulaba un episodio de contaminación por la explotación de las zonas costeras, utilizando para ello aguas no contaminadas. Podríamos hipotetizar que en un experimento más largo, el filotipo m6 podría llegar a dominar las poblaciones de *Roseobacter*. En cualquier caso, los resultados de estos experimentos de microcosmos, indican que la respuesta del grupo *Roseobacter* a la contaminación con diesel se ve condicionada por la adición simultánea o no de nutrientes. Por ejemplo, en el presente estudio se ha demostrado que la adición simultánea de nitrógeno junto con el diesel, provocó un mayor incremento de la abundancia relativa del T-RF 5'A248 y del filotipo m6, respecto a la adición de solo diesel o D+P. No

obstante, deben existir otros factores que influyen en la selección de determinadas poblaciones del grupo.

La presencia de determinadas poblaciones de *Roseobacter* en ambientes contaminados por hidrocarburos podría ser debida a la capacidad de éstos, de crecer con hidrocarburos (Harwati *et al.*, 2007) y a disponer de vías de degradación de compuestos aromáticos propuestas previamente (Moran *et al.*, 2007; Buchan y González, 2010, Newton *et al.*, 2010). Sin embargo, sería necesario más trabajo para conocer en profundidad el papel de estas bacterias en la degradación de hidrocarburos.

4. Respuesta de las principales poblaciones bacterianas del bacterioplancton al tratamiento

Aunque no era el objetivo principal de esta tesis, en base a estudios previos de la composición de comunidades bacterianas en microcosmos como los realizados en este estudio (Lanfranconi *et al.*, 2010), y dado que T-RFs relevantes observados en este estudio coincidían con fragmentos observados previamente, se pudo inferir la identidad de otros grupos bacterianos implicados en la respuesta a los tratamientos. De acuerdo a esto, los grupos más abundantes al inicio del experimento fueron tentativamente identificados como *Cyanobacteria* (T-RFs 5'A189, 5'A204), SAR11 (T-RF 5'A171), *Roseobacter* (T-RF 5'A245), *Bacteroidetes* (T-RF 5'H92 y 5'H94) y gammaproteobacterias del grupo OMG (T-RF 5'A229). Estos T-RFs fueron de especial relevancia para la diferenciación de los perfiles de T-RFLP de las muestras de los microcosmos tratados y los controles (ver apartado 1). La variación en la abundancia de los T-RFs de cada uno de estos grupos al tratamiento fue distinta, de forma que la abundancia relativa de algunos grupos aumentó (OMG y *Roseobacter*),

mientras que la de otros disminuyó, como es el caso de SAR11 y de las cianobacterias.

4.1. *Gammaproteobacteria*

Al inicio del experimento el T-RF 5'A229 (identificativo del grupo OMG) no era uno de los T-RFs detectados más abundantes (0,9–2%). Su abundancia aumentó ligeramente en los microcosmos control y los D+P (5% a las 89 horas), mientras que aumentó de forma considerable en los microcosmos tratados con diesel y D+N (10,7 y 11,9%, respectivamente). Además, a lo largo del experimento aparecían otros T-RFs identificativos de otra población de OMG (T-RF 5'H354). Como muestra la figura R2.8, al inicio del experimento este T-RF mostraron una abundancia relativa baja (0–2%), mientras que su abundancia relativa aumentaba en los microcosmos tratados con diesel y D+N hasta valores próximos al 11-14% a las 89 horas. Este incremento no se observaba en los microcosmos tratados con D+P, donde solo hubo un incremento transitorio entre las 17 y 27 h, aunque el T-RF 5'A229 en el experimento M2 alcanzó los mismos valores de abundancia relativa del microcosmos D+N a las 89 horas.

El análisis estadístico indicó que el sumatorio de la abundancia relativa de estos los T-RFs 5'A229 y 5'H354 de los microcosmos D y D+N correlacionaban positivamente con el número de bacterias ($R=0,851$ $p=0,000$ y $R=0,868$ $p=0,000$), pero solo la del microcosmos D también correlacionaba con el número de gammaproteobacterias ($R=0,609$ $p=0,021$). El incremento del grupo OMG en los microcosmos tratados con diesel es coherente con los resultados obtenidos por Lanfranconi *et al.* (2010). En ese experimento previo de microcosmos se observó un incremento en la detección de clones pertenecientes al grupo OMG en los microcosmos tratados con diesel, siendo uno de los grupos mayoritarios, sobre todo en verano (Lanfranconi *et al.*, 2010). La presencia del grupo

OMG ya se había detectado en puerto Adriano como uno de los grupos predominantes siendo más abundante en verano, mientras que en la zona de bahía no estaba presente, siendo SAR86 el grupo predominante en aguas prístinas (Aguiló-Ferretjans *et al.*, 2008). También se detectó la presencia de este grupo en el 57% de las muestras de puertos, aunque con abundancias relativas muy bajas (ver apartado 6 del capítulo 1).

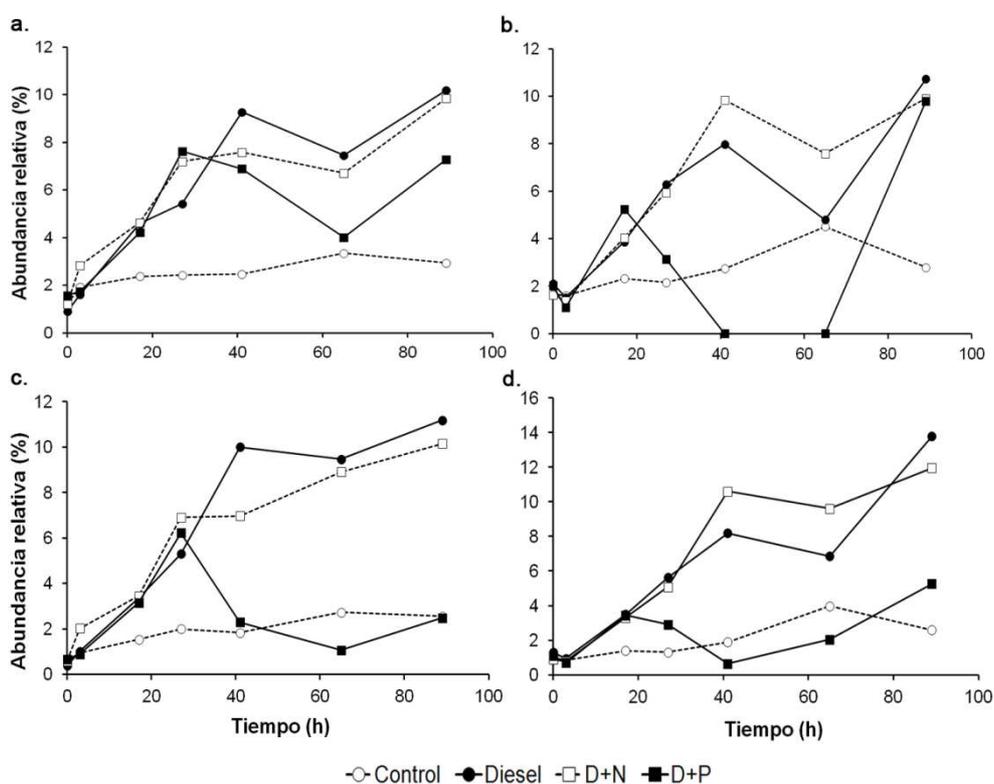


Figura R2.8: Abundancia relativa de dos T-RFs identificativos del grupo OMG: T-RF 5'A229 M1 (a) T-RF 5'A229 M2 (b), T-RF 5'H354 M1 (c) y T-RF 5'H354 M2 (d).

El incremento en los T-RFs identificativos del grupo OMG estaba en concordancia sobretodo con el incremento en el número de gammaproteobacterias determinado por FISH a partir de 27 h en los tratamientos D y D+N (figura R2.2), pero no reflejaba el incremento en los

recuentos observados en los microcosmos D+P. Para identificar qué tipo de gammaproteobacterias proliferaban en los microcosmos tratados con D+P, se generaron genotecas de los tiempos 65 horas de los dos microcosmos de este tratamiento, utilizando cebadores universales (ver apartado 9 del material y métodos).

El 70% de los clones analizados (un total de 23) de estas genotecas pertenecían al género *Alteromonas*, y de éstos el 80% se relacionaban con *A. macleodii* con un 98,5% de similitud de secuencia de 16S ADNr. El otro 30% de los clones eran cercanos a los géneros *Glaciecola* (5 clones) y *Neptunibacter* (2 clones). Estos resultados demostraron que el incremento en el número de células de *Gammaproteobacteria* en los microcosmos tratados con D+P no fue debido al incremento de OHCB (bacterias marinas degradadoras obligadas de hidrocarburos) como se ha observado en otros estudios (Head *et al.*, 2006; Yakimov *et al.*, 2007), sino a la respuesta del género *Alteromonas* a la adición de diesel y fósforo.

El análisis por T-RFLP de estos clones permitió identificar el T-RF 5'H205 como identificativo de los géneros *Alteromonas* y *Glaciecola*, sin embargo, teniendo en cuenta los porcentajes de clones detectados de cada uno de estos géneros, la abundancia relativa de este fragmento probablemente se debía sobre todo a *Alteromonas*. Como se esperaba, la abundancia relativa del T-RF 5'H205 aumentó sobre todo en los microcosmos D+P de ambos experimentos, aunque se registró algún incremento puntual en el microcosmos D+N del M1 y el D del M2 (figura R2.9). El incremento en abundancia de este T-RF fue más rápido en el microcosmos M2 (a partir de las 3 horas), que en el M1 (a partir de las 17 horas). En el caso del M1 se produjo un incremento de la abundancia relativa hasta aproximadamente el 20%, pero desapareció en el tiempo 89

horas. En el M2 la abundancia relativa aumentó hasta alcanzar el valor máximo a las 65 horas (16%), disminuyendo a algo más del 10% al final del experimento.

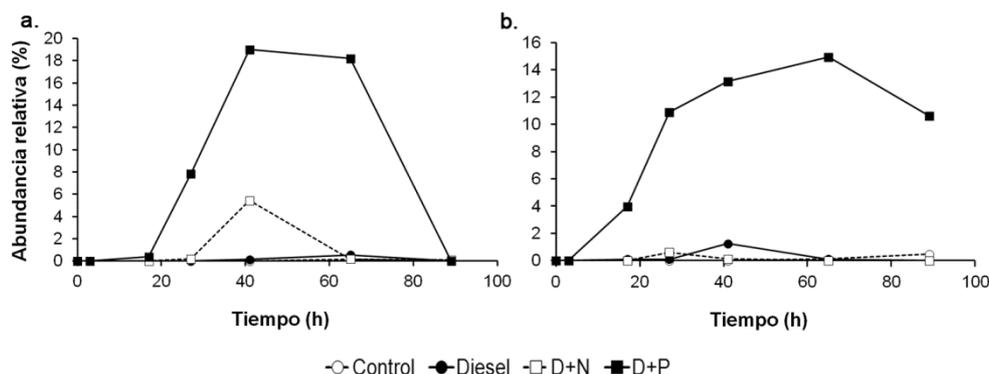


Figura R2.9: Abundancia relativa del T-RF 5'H205 identificativo de *Alteromonas* y *Glaciecola* en M1 (a) y M2 (b).

El incremento en el número de *Gammaproteobacteria* ha sido ampliamente descrito en numerosos estudios de diversidad en procesos de biodegradación (Coulon *et al.*, 2007; Cappello *et al.*, 2007; McKew *et al.*, 2007a; McKew *et al.*, 2007b). De modo que las gammaproteobacterias parecen responder favorablemente a la presencia de hidrocarburos en el ambiente. En el estudio de diversidad microbiana realizado en puertos (capítulo 1) este T-RF no fue uno de los importantes desde el punto de presencia y abundancia, detectándose solo en el 30% de las muestras y con una mediana de abundancia relativa del 0,5%. Los experimentos de microcosmos preparados con agua procedente del estuario del Támesis, y tratados con nutrientes y distintas clases de hidrocarburos mostraron una proliferación de bacterias OHCB, de los géneros *Alcanivorax*, *Cycloclasticus* y *Thalassolitus*, dominando uno u otro en función del tipo de hidrocarburo añadido (Coulon *et al.*, 2007; McKew *et al.*, 2007a; McKew *et al.*, 2007b). En nuestro estudio sin embargo, no se han detectado bacterias

de estos géneros y en su lugar se detectó el grupo OMG como se ha mencionado anteriormente y bacterias del género *Alteromonas* (en microcosmos D+P). *Alteromonas* es una bacteria heterótrofa marina ubicua que responde rápidamente a perturbaciones en el medio, como puede ser un aporte de nutrientes (Lebaron *et al.*, 1999; Shi *et al.*, 2012). Con respecto a la relación entre el género *Alteromonas* y los hidrocarburos se ha observado su presencia en experimentos de degradación de hidrocarburos (Iwabuchi *et al.*, 2002) y el estudio del genoma de la cepa *Alteromonas* sp. SN2 ha evidenciado la presencia de rutas de degradación de hidrocarburos poliaromáticos (Math *et al.*, 2012). También en un experimento de comparación de la diversidad microbiana antes y después de un episodio de perturbación por adición de tolueno, se observó que tras la perturbación la comunidad microbiana se encontraba dominada por bacterias pertenecientes al género *Alteromonas*. Sin embargo, los autores de este estudio sugirieron que este grupo era capaz de utilizar los nutrientes liberados por la ruptura de otros microorganismos provocada por el efecto del tolueno (Zemb *et al.*, 2010). El incremento de *Alteromonas* en los microcosmos D+P, probablemente, fue debido a la adición de fósforo y no tanto a la adición de diesel, ya que esta bacteria prácticamente no se observó en los tratamientos D y D+N.

4.2. Bacteroidetes

El grupo *Bacteroidetes* fue uno de los más abundantes al inicio del experimento (sus T-RFs identificativos, 5'H92 y 5'H94, presentaban una abundancia relativa del 6%). La respuesta de la población identificada por el T-RF 5'H92 fue distinta dependiendo del tratamiento (figura R2.10). En el caso del microcosmos D+P se observó un descenso en la abundancia relativa de este T-RF en ambos experimentos, aunque al final los niveles se igualaban a los del control (6% para M1 y 3% para M2). En cambio, en

los tratamientos con diesel y D+N, se producía un incremento de la abundancia relativa, aproximadamente el doble respecto a los microcosmos control (12% en M1 y 8% en M2 a las 89 h).

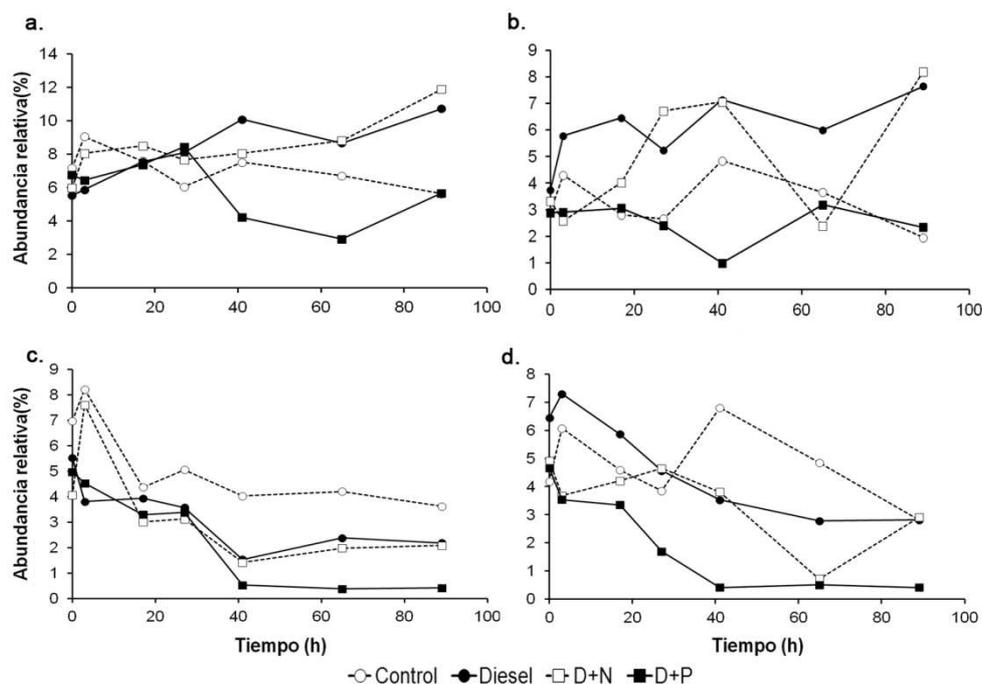


Figura R2.10: Representación de la abundancia relativa de dos T-RFs identificativos del grupo *Bacteroidetes*, 5'H92 M1 (a), 5'H92 M2 (b), 5'H94 M1 (c), 5'H94 M2 (d).

En el caso del T-RF 5'H94, todos los tratamientos provocaron un descenso en su abundancia relativa de este T-RF en comparación al control en el primer experimento. En los tratamientos de diesel y D+N del M1 la abundancia relativa de este T-RF a las 89 horas se había reducido a la mitad respecto a los microcosmos control (del 4% al 2%). Mientras que en los microcosmos tratados con D+P la abundancia relativa a las 89 h se redujo a una décima parte respecto a los microcosmos control (del 4% al 0,4%). En el segundo experimento, se observó un descenso en la abundancia relativa de este T-RF en los microcosmos D y D+N respecto al

control a las 27 horas, aunque al final del experimento, los valores se igualaron a los del control. En el caso del microcosmos D+P se produjo un claro descenso de la abundancia relativa del 5'H94 a partir de las 17 horas, con una abundancia relativa a las 89 horas cercana a cero, al igual que en el primer experimento.

Estos resultados contrastan con los de Lanfranconi y colaboradores (2010) que no observaron cambios significativos en la detección de clones pertenecientes al grupo *Bacteroidetes* en los microcosmos tratados con diesel, respecto a los control. Sin embargo, la presencia de este grupo en aguas de puertos ha sido descrita en la bibliografía (Zhang *et al.*, 2007; Ma *et al.*, 2009) y en el capítulo anterior se detectó la presencia de este grupo en los siete puertos estudiados. Los valores de abundancia relativa observados al inicio del experimento de microcosmos (6%) fueron mayores a los observados en las muestras control del capítulo 1 (promedio de 1,4%), sobre todo si tenemos en cuenta que en el capítulo anterior se mostró el sumatorio de la abundancia relativa de ambos T-RFs (figura R1.16). La disminución de la abundancia relativa del T-RF 5'H94 como consecuencia del tratamiento coincide con lo observado en puertos, donde este T-RF presentaba una mediana de abundancia relativa de 0,4%, mientras que el T-RF 5'H92 era más abundante con una mediana de 1,6%.

4.3. Variación en la abundancia de *Cyanobacteria*

Se observó una reducción significativa de la abundancia relativa de los tres T-RFs identificativos del género *Synechococcus* (5'A125, 5'A189 y 5'A204) en todos los tratamientos respecto al microcosmos control a partir de las 17 h del inicio del experimento (figura R2.11). La reducción más importante se observó en los microcosmos D+P, en los que al final del experimento no se detectaban ninguno de estos tres T-RFs. En

los microcosmos tratados con diesel y D+N la abundancia de estos T-RFs era la mitad de la detectada en los microcosmos control.

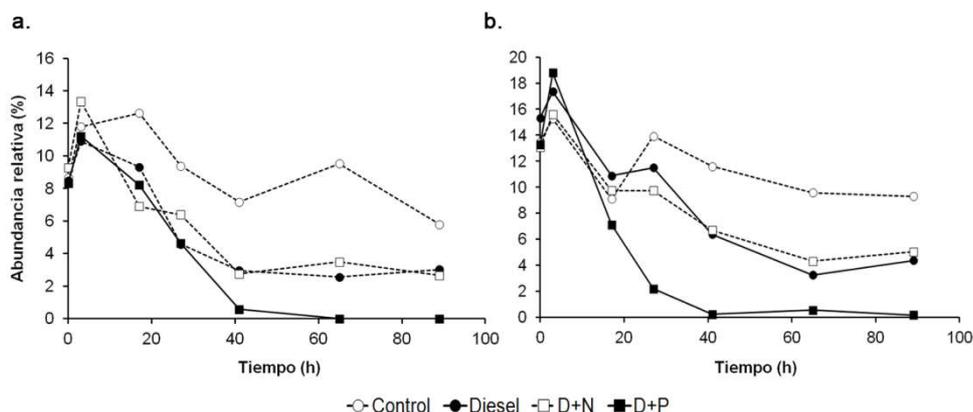


Figura R2.11: Representación de la suma de las abundancia relativas de los tres T-RFs identificativos del grupo *Synechococcus* para el M1 (a) y M2 (b).

Estos resultados son coherentes con los observados por Lanfranconi *et al.* (2010) ya que también observaron una disminución de la abundancia relativa de estos T-RFs en los microcosmos tratados con diesel. Esto sugiere que *Synechococcus* responde negativamente a la presencia de diesel en el medio, independientemente de si se adicionan nutrientes conjuntamente o no. Otros estudios confirman este hecho, por ejemplo, se estudió el efecto de dos hidrocarburos poliaromáticos (pireno y fenantreno) sobre el crecimiento, la abundancia y la viabilidad de determinadas poblaciones de fitoplancton. El tamaño celular demostró ser un factor determinante en la sensibilidad, siendo *Prochlorococcus* y *Synechococcus* los dos grupos más sensibles (Echeveste *et al.*, 2010). Esto también es coherente con los resultados obtenidos por González y colaboradores (2009), que observaron la desaparición de *Synechococcus* y *Prochlorococcus* de microcosmos tratados con la fracción soluble en agua del crudo a las 24 h del inicio del experimento. En el estudio previo de diversidad realizada en puerto Adriano no se detectaba la presencia de

Synechococcus en invierno (Aguiló-Ferretjans *et al.*, 2008) y en el análisis de puertos (capítulo 1) la detección de los T-RFs identificativos de *Cyanobacteria* fue esporádica.

4.4. SAR11

La respuesta del grupo SAR11 se infirió en base al T-RF 5'A171, cuya abundancia relativa se vio drásticamente reducida en los microcosmos diesel y D+N (disminución de casi el 90% respecto a los microcosmos control a las 89 horas), mientras que no se detectaba su presencia en los microcosmos tratados con D+P a partir de las 41 horas (figura R2.12).

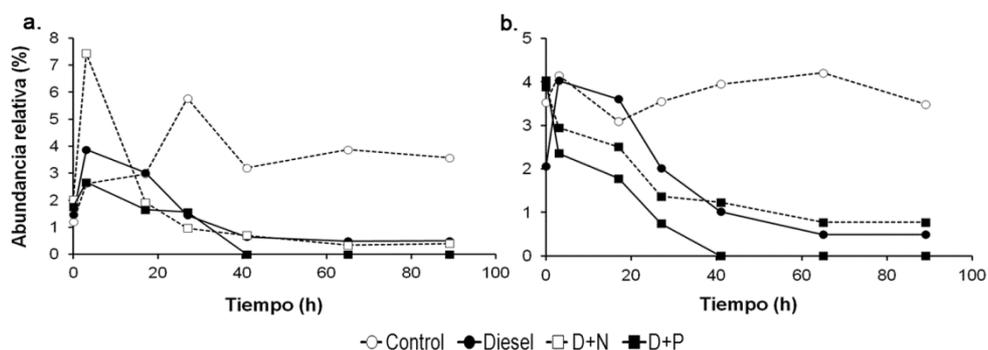


Figura R2.12: Representación de la abundancia relativa de T-RF 5'A171 identificativo del grupo SAR11 de los dos experimentos de microcosmos, M1 (a) y M2 (b).

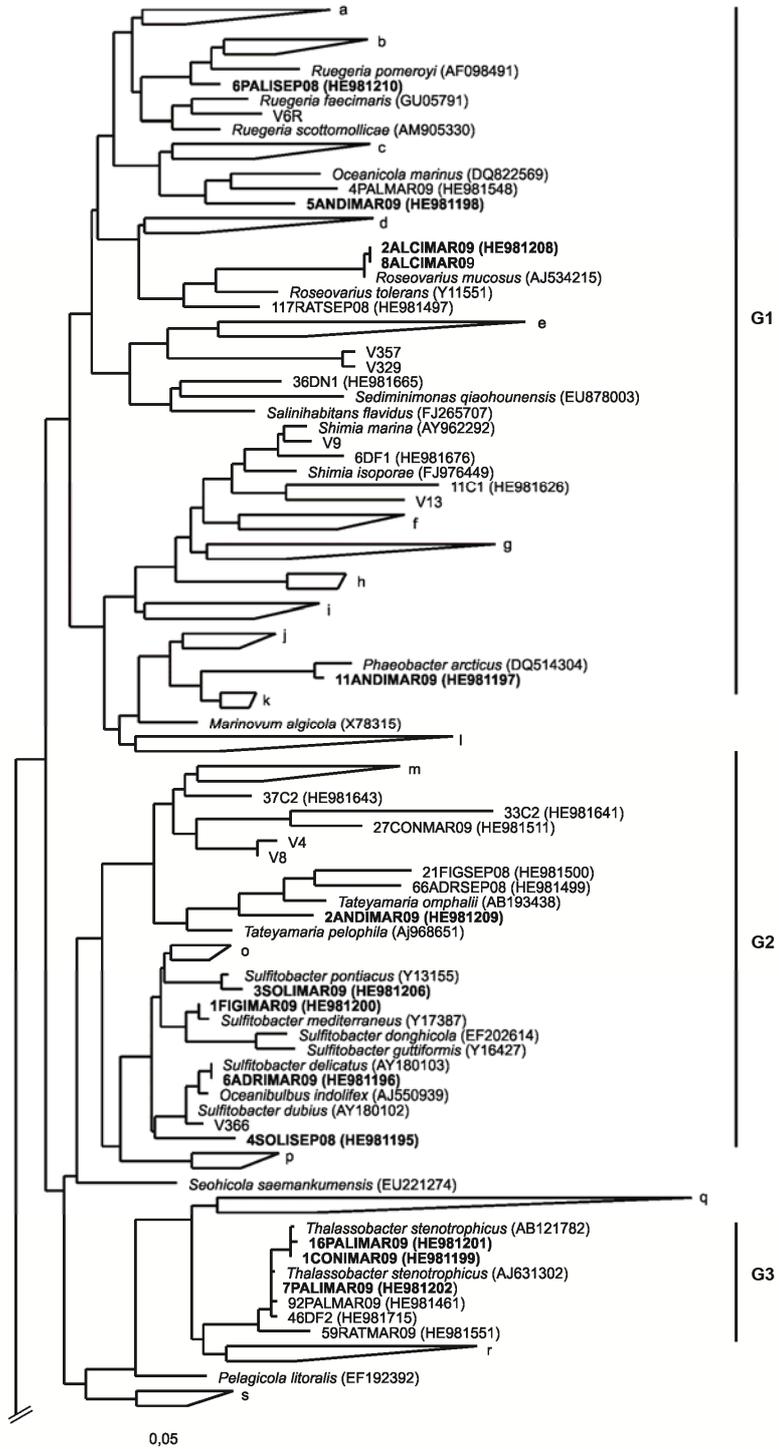
La respuesta negativa de este grupo a la presencia de hidrocarburos en el medio ya se había observado con anterioridad en experimentos de microcosmos tratados con diesel. Al final del experimento no se detectaron secuencias pertenecientes a SAR11 en los microcosmos tratados, tanto en invierno como en verano (Lanfranconi *et al.*, 2010). Los resultados del estudio presentado en esta tesis muestran que la adición de nutrientes no modifica la respuesta de este grupo a la contaminación con diesel.

CAPÍTULO 3:
Caracterización de aislados del
clado *Roseobacter*

El clado *Roseobacter* es un grupo de bacterias fácilmente cultivables en el laboratorio lo que las convierte en un buen modelo para entender la ecología y fisiología bacteriana en el ambiente marino. Para estudiar características de aislados procedentes de ambientes crónicamente contaminados se generó una colección de aislados de *Roseobacter* a partir de agua de puertos. El objetivo de esta parte del trabajo era su caracterización con el fin de estudiar la capacidad metabólica, en especial, el potencial para la degradación de hidrocarburos. En total obtuvieron 18 aislados de 7 puertos diferentes. Se obtuvo también un aislado de la zona control considerada no contaminada.

1. Identificación de los aislados en base a secuenciación del gen del 16S ARNr

Con el fin de identificar los aislados del grupo *Roseobacter* obtenidos, se secuenció el gen del 16S ARNr obteniendo un tamaño medio de secuencia de 1300 pb. Para el análisis filogenético se utilizaron las secuencias completas de 16S ADNr de todas las especies tipo del clado disponibles hasta el momento. Para comparar las secuencias de los aislados con las de clones ambientales se incluyeron también los clones descritos en los capítulos 1 y 2 (figura R3.1). Este análisis nos permitió asignar el género al que pertenecían los aislados y determinar la similitud de éstos con los clones detectados en puertos (capítulo 1) y de los experimentos de microcosmos (capítulo 2). Además, de los 19 aislados obtenidos en esta tesis doctoral se analizaron 5 aislados obtenidos de microcosmos control (Lanfranconi, comunicación personal) y 3 aislados obtenidos de muestras de arena completamente cubiertas por crudo de la costa gallega contaminada por el vertido del Prestige (Nogales, comunicación personal), lo que hace un total de 27 aislados.



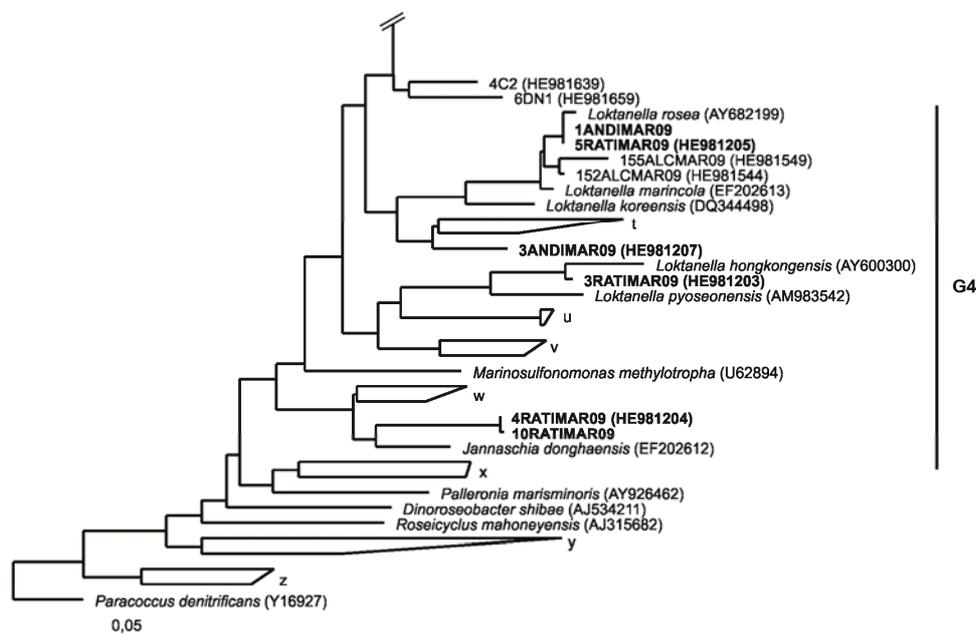


Figura R3.1: Árbol filogenético de secuencias de 16S ADNr generado por el método de *neighbour-joining* a partir de la matriz de distancias calculada por el método de Jukes-Cantor. El árbol se calculó en base a las secuencias tipo de la base de datos SSU 108 SILVA (Pruesse *et al.*, 2007) y se añadieron las secuencias de los clones por el método de parsimonia implementado en el paquete ARB (Ludwig *et al.*, 2004). *Paracoccus denitrificans* se utilizó como *outgroup*. Algunas ramas (denominadas a-z), en las cuales no se afiliaban ninguna secuencia de este estudio aparecen colapsadas. Las secuencias incluidas en estas ramas aparecen indicadas en tabla A3 del anexo. Los aislados se nombraron del mismo modo que se nombraron los clones del capítulo 1, pero se añadió la letra l entre el puerto y el muestreo, para diferenciarlos de los clones. Los que no fueron aislados en esta tesis aparecen indicados con la letra V y un número. Los clones de microcosmos aparecen indicados con el número de clon, las letras indican el tratamiento (C, control; D, diesel, D+N, diesel y nitrógeno, D+P, diesel y fósforo) y el número al final indica el experimento (1, M1 y 2, M2). Los grupos genómicos aparecen indicados de G1 a G4.

Los aislados de puertos se afiliaron a 8 géneros distintos: *Ruegeria* (6PALISEP08), *Roseovarius* (5ANDIMAR09, 2ALCIMAR09 y 8ALCIMAR09), *Phaeobacter* (11ANDIMAR09), *Sulfitobacter* (3SOLIMAR09, 1FIGMAR09, 6ADRIMAR09, 4SOLISEP08), *Tateyamaria*

(2ANDIMAR09), *Thalassobacter* (7PALIMAR09, 16PALIMAR09), *Loktanella* (1ANDIMAR09, 5RATIMAR09, 3ANDIMAR09 y 3RATIMAR09) y *Jannaschia* (4RATIMAR09 y 10RATIMAR09). Estos resultados concuerdan con los observados en el capítulo 1, donde se observó una gran diversidad del grupo *Roseobacter* en puertos deportivos. Además, se aislaron miembros de un mismo género en varios puertos, como es el caso del género *Sulfitobacter*, del que se aislaron 4 cepas, dos de ellas en el puerto de Sóller, otra en puerto Adriano y otra en el puerto de Cala Figuera. Sin embargo, estos aislados presentaron una similitud de secuencia del gen del 16S ARNr inferior al 98,7% (en base 1266 pb de longitud de secuencia), lo que indicaría que podría tratarse de especies distintas (Stackebrandt y Ebers, 2006). Lo contrario ocurría con los aislados del género *Loktanella*, dos de ellos (5RATIMAR09 y 1ANDIMAR09 aislados del puerto de Cala Ratjada y Andratx, respectivamente), que presentaban un porcentaje de semejanza de secuencia del 16S ARNr del 100%. Esto significa que, en base a los resultados de secuencia de 16S ADNr, se encontró la misma especie en dos o más puertos, lo que reforzaría el hecho de que en puertos se seleccionan determinadas poblaciones del grupo *Roseobacter*, como se discutió en el capítulo 1. En el caso de aislados que presentan un elevado porcentaje de similitud de secuencia del 16S ADNr (>99%) y que procedían de un mismo puerto, [como es el caso de los aislados 4RATIMAR09 y 10RATIMAR09, 7PALIMAR09 y 16PALIMAR09, así como, 2ALCIMAR09 y 8ALCIMAR09, aislados de los puertos de Cala Ratjada, Palma y Alcudia, respectivamente], probablemente se tratase de reisolamientos (ver anexo, tabla A4). En cuanto al aislado V366, obtenido de muestras contaminadas con crudo del Prestige, mostró una elevada similitud de 16S ARNr (99%) con la cepa 6ADRIMAR09 aislado de puerto Adriano. La mayoría de los aislados procedentes de puertos o muestras contaminadas no presentaron similitud

con los clones aislados de aguas de puertos o de microcosmos. Solo otros dos aislados, 5RATIMAR09 y 1ANDIMAR09, se relacionaron (similitud >99%) con dos filotipos detectados en puertos, 155ALCMAR09 (filotipo 37, formado por 1 solo clon) y 152ALCMAR09 (filotipo 32, que agrupa 40 clones de puerto Adriano y Alcudia).

Por último, respecto a los aislados procedentes de aguas prístinas, dos de ellos (V4 y V8) parecían tratarse de reislamientos, puesto que presentaban una similitud de secuencia del 100% y procedían de la misma muestra de agua. Además, estos aislados se encontraban próximos al filotipo 27CONMAR09 formado solo por clones detectados en la muestra control de marzo de 2009 (capítulo 1) y el clon 33C2 obtenido de los microcosmos control, aunque con ambos clones presentaban una similitud del 94%. Los otros cuatro aislados de aguas prístinas se asignaron a cuatro géneros distintos: V6R (*Ruegeria*), V9 (*Shimia*), V13 (*Thalassococcus*) y 1CONIMAR09 (*Thalassobacter*). Este último aislado presentaba una semejanza superior al 99% con los aislados 7PALIMAR09 y 16PALIMAR09, ambos obtenidos del puerto de Palma. Además, estos tres aislados aparecían relacionados con un filotipo detectado en puertos (92PALMAR09, filotipo 12) y otro detectado en microcosmos tratado con diesel y fósforo (46DF2, filotipo m19) con los que presentaban una similitud del 99%.

El análisis filogenético permitió la asignación de los aislados a géneros. Sin embargo, la filogenia del grupo *Roseobacter* basada en secuencias de 16S ARNr ha demostrado ser problemática y poco robusta. Los géneros que contienen más secuencias descritas (p.e. *Ruegeria*, *Sulfitobacter*, *Loktanella*, *Jannaschia*, etc.) tendían a agruparse en ramas estables, mientras que géneros con pocas especies tendían a aparecer en ramas distintas cada vez que se calculaba el árbol. Además, había

géneros cuyas especies aparecían en ramas distintas del árbol, es lo que ocurre, por ejemplo, con el género *Oceanicola*, del cual se han descrito 5 especies, que aparecen repartidas por el árbol en lugar de aparecer en una misma rama.

Los problemas en la determinación de la filogenia del grupo han sido descritos también por otros autores. Buchan y colaboradores (2005) realizaron un exhaustivo análisis filogenético basado en 1497 secuencias de clones y aislados con una longitud superior a 1000 pb. Utilizando un porcentaje de similitud igual o superior al 99% agruparon las secuencias en 67 linajes, e intentaron correlacionar esos linajes con el ambiente del que habían sido aislados o detectados. De la realización de este análisis filogenético, concluyeron que la filogenia del grupo era problemática. Los autores atribuían la problemática a que se ha asignado el mismo nombre de género a más de un linaje monofilético (por ejemplo, *Roseobacter* y *Ruegeria*). También hicieron referencia a la inestabilidad de las ramas del árbol. No obstante, era posible la identificación de superlinajes robustos dentro del clado, como era el caso del grupo *Loktanella*, *Roseobacter*, *Octadecabacter-Ruegeria*, etc.

Posteriormente, Brinkhoff y colaboradores (2008) realizaron una revisión del grupo en la que también hicieron referencia a la problemática de la filogenia del clado. En ese momento, sólo dos géneros (*Sulfitobacter* y *Loktanella*) agrupaban más de cinco especies válidamente descritas cada uno. En la actualidad, más de la mitad de los géneros del grupo (36 géneros) se encuentran representados por una única especie y sólo hay 7 géneros con 5 o más especies válidamente descritas (*Loktanella*, *Sulfitobacter*, *Ruegeria*, *Roseovarius*, *Oceanicola*, *Phaeobacter* y *Jannaschia*). En general, los géneros con mayor número de especies descritas forman ramas filogenéticas robustas, mientras que las

agrupaciones del resto de géneros son variables, dependiendo de cómo se realiza la reconstrucción filogenética. Se han descrito especies distintas (p.e. *Phaeobacter inhibens* o *Maribius salinus*) con un porcentaje de similitud del 99% o superior con la especie más próxima (Martens *et al.*, 2006; Choi *et al.*, 2007). Asimismo, las diferencias entre géneros son a menudo inferiores al 4% (Brinkhoff *et al.*, 2008). Por ejemplo, la diferencia de la secuencia de 16S ADNr entre las especies *Ruegeria atlantica* y *Silicibacter lacuscaerulensis* es del 1,7%. Inicialmente, se describieron como géneros distintos, aunque estudios posteriores demostraron la necesidad de unificar estos dos géneros (Yi *et al.*, 2007). Este es solo un ejemplo de los problemas taxonómicos del grupo. Además, el 78% de las especies descritas hasta el momento fueron descritas en base a una sola cepa. Todo ello provoca que muchos de los nodos de los árboles filogenéticos, en especial aquellos que separan las grandes agrupaciones, presenten valores de *bootstrap* bajos (inferiores al 50%) y no ofrezcan información filogenética clara. Para mejorar la filogenia del grupo, Newton y colaboradores (2010) realizaron un estudio filogenético de 32 cepas, cuyos genomas habían sido secuenciados, basado en 70 genes presentes en el genoma en copia única. La topología del árbol que obtuvieron sugería la presencia de 5 grandes grupos dentro del clado *Roseobacter*, que presentaban valores de *bootstrap* elevados (entre el 77 y el 100%), indicando que la utilización de varios genes puede ser una solución a la inestabilidad de la filogenia basada en el 16S ARNr. En ese estudio, además, consideraban necesaria una revisión de la descripción de dos especies del género *Oceanicola* (*O. granulatus* y *O. batsensis*) puesto que aparecían siempre en ramas distintas del árbol.

2. Diferenciación de los aislados por MALDI-TOF

La técnica de MALDI-TOF está siendo ampliamente usada en el diagnóstico clínico microbiológico para la identificación de bacterias patógenas (Welker, 2011). Esta técnica muestra un gran potencial en microbiología ambiental, ya que permite la caracterización y comparación rápida (y con relativo bajo coste) de aislados del ambiente. Una vez los aislados han crecido en placa, pueden ser identificados mediante procedimientos rutinarios en unas pocas horas. Además, permite la agrupación de aislados, reduciendo el número de muestras para una posterior identificación, por ejemplo, por secuenciación de ADN. El uso de esta técnica con células intactas ha demostrado ser una técnica fiable en la identificación bacteriana si se dispone de una base de datos consistente (Welker y Moore, 2011).

Con el fin de complementar la diferenciación de los aislados que se había hecho en base al 16S ADNr, se analizaron éstos por MALDI-TOF. Para comprobar si la antigüedad del cultivo afectaba al espectro de MALDI-TOF, los espectros de dos cepas de referencia (*Ruegeria pomeroyi* DSS-3 y *Phaeobacter gallaeciensis* BS107) se obtuvieron a diferentes tiempos de incubación (2, 3, 5, 6, 9 y 10 días) en placas de agar marino y a partir de cultivos sembrados diferentes días. Los espectros obtenidos no mostraron variaciones importantes entre los 2 y 10 días de incubación en *Ruegeria pomeroyi* DSS-3 (figura R3.2) y *Phaeobacter gallaeciensis* BS107, obteniéndose una variación en los valores m/z máxima de 350 y 600 ppm, respectivamente. Estas pruebas se realizaron sin calibrante interno, por lo que si se hubiera utilizado éste, la variación hubiera sido incluso menor.

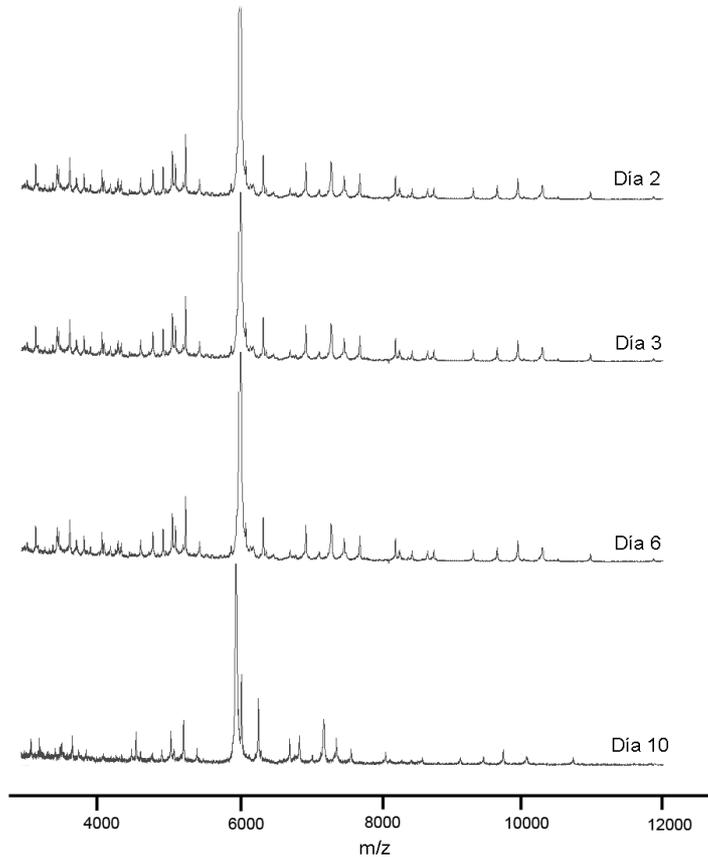


Figura R3.2: Espectros de MALDI-TOF obtenidos de *Ruegeria pomeroyi* DSS-3 crecida en placas de agar marino durante varios días.

Otros autores coinciden con el hecho de que el medio de cultivo o el tiempo de incubación de un cultivo no afectan al patrón de picos del espectro, aunque los valores m/z pueden mostrar cierto grado de variación (Welker y Moore, 2011). El hecho de que la mayoría de los picos de un espectro son debidos a proteínas ribosómicas (hasta 50 picos por espectro), explicaría la estabilidad de los espectros a pesar de las diferentes condiciones de cultivo (Teramoto *et al.*, 2007). Además, de las proteínas ribosómicas, los espectros muestran otras proteínas que son principalmente estructurales (aquellas sin función catalítica que se

expresan constitutivamente) como las chaperonas, proteínas de unión al ADN, etc. (Valentine *et al.*, 2005). A pesar de que no se observaron cambios importantes, los espectros posteriores se obtuvieron a partir de colonias crecidas entre 2 y 4 días, utilizando calibrante interno, para obtener unos valores de m/z más precisos.

Los espectros de 16 cepas tipo (ver tabla M5 del apartado 12 de material y métodos) y los 27 aislados analizados en este estudio del clado *Roseobacter* se obtuvieron utilizando una ventana espectral de 1,7-20 kDa. Cada espectro se obtuvo por cuadruplicado ya que se realizaron 2 réplicas biológicas y 2 técnicas. En total se identificaron 253 marcadores de entre los picos obtenidos de todos los espectros tal y como se detalla en el apartado 12 de material y métodos. En base a esos marcadores se creó una matriz de presencia/ausencia de esos marcadores en los perfiles de cada una de las muestras. Se calculó la media de las réplicas técnicas y con la matriz resultante se calculó un dendrograma por UPGMA y coeficiente de Dice (figura R3.3).

Para los aislados 7PALIMAR09 y 2ANDIMAR09 no se consiguió obtener espectros de calidad, por lo que fueron excluidos del estudio. En la mayoría de los casos (excepto el aislado V357), las réplicas de las muestras se agrupaban juntas, presentando un porcentaje de similitud superior al 70%. Cuando se comparan los espectros de dos réplicas se suele observar variación (normalmente inferior al 30%), que puede reducirse mediante la optimización del método, aunque siempre se observa cierto porcentaje de variación que resulta intrínseco al análisis y resulta prácticamente imposible de eliminar (Welker y Moore, 2011).

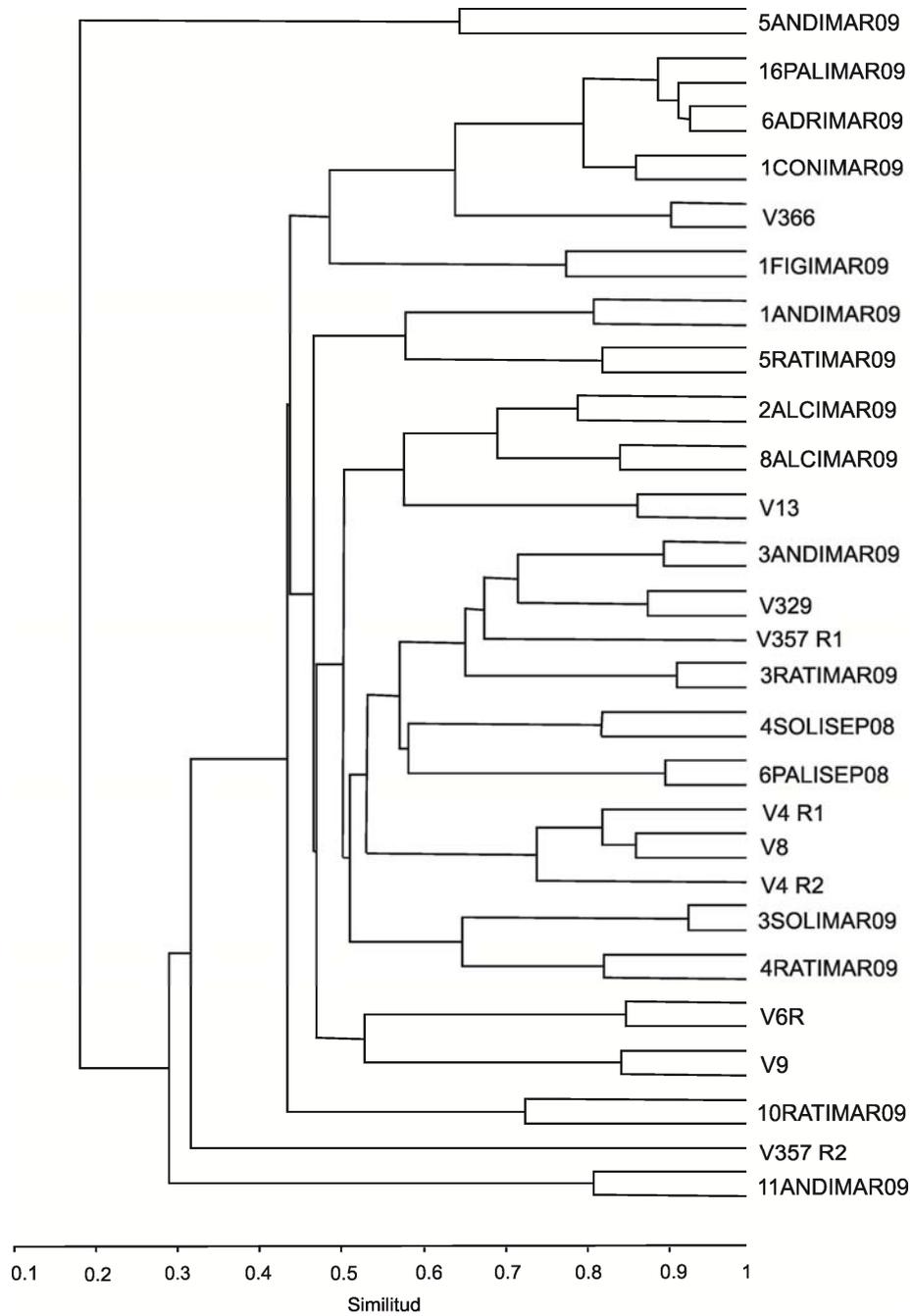


Figura R3.3: Dendrograma calculado por UPGMA y usando el coeficiente de Dice de los perfiles de MALDI-TOF de los aislados analizados en este estudio. En general, las réplicas de una misma muestra aparecen juntas, por lo que se ha indicado una sola vez el nombre. Si las réplicas no agrupaban, se indica junto al nombre R1 (réplica 1) o R2 (réplica 2).

En base a los espectros de MALDI-TOF, no se observó agrupación de las muestras de cepas de referencia pertenecientes a un mismo género, a excepción de *R. denitrificans* y *R. litoralis* que aparecieron en un mismo grupo (figura A4, ver anexo). Sin embargo, la mayoría de aislados con un porcentaje de similitud del 16S ARNr elevado ($\geq 99\%$) se agruparon en un mismo grupo e incluso las réplicas podían entremezclarse, presentando espectros con elevados niveles de semejanza. Este es el caso, por ejemplo, de las parejas de aislados V4/V8 (100% similitud en 16S ARNr y 70% en los espectros), 2ALCIMAR09/8ALCIMAR09 (similitud con *Roseovarius* por 16S ARNr) y 1ANDIMAR09/5RATIMAR09 (similitud 100% mediante 16S ARNr). En cambio, los aislados 10RATIMAR09 y 4RATIMAR09 no se agruparon a pesar de que compartían una similitud de 99% en secuencia de 16S ARNr y ambos eran próximos a *Jannaschia donghaensis*.

Por tanto, mediante el análisis por MALDI-TOF se pudieron diferenciar aislados distintos del grupo *Roseobacter*. Sin embargo, no se pudieron clasificar a nivel de géneros de acuerdo con lo publicado anteriormente, ya que a nivel de género o familia los espectros suelen ser tan diferentes que hace problemática la clasificación a esos niveles taxonómicos (Welker y Moore, 2011). La identificación de aislados es posible cuando se dispone de una base de datos de calidad. Este fue el principal problema al que nos enfrentamos, ya que las bases de datos comerciales como la de Biotyper (Bruker Daltonics), no incluyen miembros del grupo *Roseobacter* (comunicación personal). Por ello, analizamos junto con nuestros aislados 16 cepas tipo de las que disponíamos en nuestro laboratorio en el momento del estudio, aunque se demostró que no fueron suficientes (Figura A4, ver anexo). Sería necesario crear una base de datos con los espectros de todas las especies tipo válidamente descritas del grupo *Roseobacter* para conseguir identificaciones fiables.

Ante la imposibilidad de generar una base de datos de MALDI-TOF con todas las especies tipo del grupo *Roseobacter* propusimos una alternativa en un trabajo que realizamos en colaboración con el grupo de Jean Armengaud del Departamento de Bioquímica y Toxicología Nuclear, CEA-IBEB-SBTN. Se propuso una aproximación nueva para la identificación de aislados ambientales pertenecientes a grupos no representados en las bases de datos de MALDI-TOF. Este método se basó en la definición de biomarcadores. Para ello se recolectaron espectros de MALDI-TOF utilizando calibrantes internos que se añadían a la muestra con el fin de conseguir una mayor exactitud en la determinación de la relación masa/carga (m/z) de los picos. A continuación se procedió a la identificación de las proteínas que generaban los picos de MALDI-TOF mediante el análisis de hidrolizados trípticos de proteínas de bajo peso molecular por proteómica *shotgun* mediante nanoLC-MS/MS (Christie-Oleza *et al.*, 2012a; Christie-Oleza *et al.*, 2012b). La utilidad del método se demostró tomando como ejemplo el género *Ruegeria*, perteneciente al grupo *Roseobacter*.

La estrategia seguida contaba de tres pasos: a) obtención de los espectros de MALDI-TOF a partir de colonias crecidas en agar marino; b) identificación por nanoLC-MS/MS *shotgun* de las proteínas de bajo peso molecular (<20kDa); c) emparejar los picos de los espectros de MALDI-TOF con las proteínas más abundantes detectadas por nanoLC-MS/MS. Se utilizó la cepa *Ruegeria lacuscaerulensis* ITI-1157 como referencia. Se obtuvieron un total de 100 valores m/z para esta cepa por MALDI-TOF. Por otra parte, se obtuvieron 204 polipéptidos por debajo de 20 kDa mediante nanoLC-MS/MS, y se calculó la abundancia relativa de estas proteínas. A continuación se emparejaron los picos obtenidos en los espectros de MALDI-TOF con los polipéptidos más abundantes de las 204 previamente seleccionadas, teniendo en cuenta los cambios post-traduccionales, como

la eliminación de la metionina o la acetilación. De este modo, se seleccionaron nueve proteínas que daban lugar a 18 valores m/z (formas mono y biprotonadas) para evaluar si un aislado era candidato a pertenecer al género *Ruegeria*. Estas proteínas no presentaban otras modificaciones post-traduccionales, aparte de la eliminación de la metionina, lo que facilitaba el cálculo teórico de los pesos moleculares finales. Para determinar si las nueve proteínas podían ser buenos biomarcadores, se utilizaron las secuencias de los genomas de otras seis cepas de *Ruegeria* disponibles en las bases de datos. Los genes para cinco de estas proteínas resultaron estar bien conservadas en los genomas mostrando elevado grado de similitud entre homólogos. Se seleccionaron las proteínas ribosómicas L29, L30, L32 y S17, así como, la proteína de unión al ADN HU, no sólo por presentar funciones conservadas, sino también, porque son fácilmente detectables por MALDI-TOF. Por último, se comprobó que los valores m/z predichos para *R. pomeroyi* DSS-3, cepa para la cual se disponía de mucha información proteómica (Christie-Oleza *et al.*, 2012a), podían ser identificados en un análisis de MALDI-TOF de rutina.

La validez del método para la identificación rápida de bacterias del género *Ruegeria* fue evaluada mediante un análisis rápido de 30 aislados bacterianos procedentes de aguas costeras del Mediterráneo que realizó el grupo del Dr. Jean Armengaud. Tan solo en uno de los aislados se detectaron 8 de los 10 posibles valores de m/z de los cinco biomarcadores descritos para el género *Ruegeria*. Los valores de los iones con las dos cargas (1+ y 2+) fueron detectados para las proteínas ribosomales L30, S17, L29, y la proteína de unión al ADN HU. No se detectaron las señales para la proteína L32, lo que indicaría posibles divergencias aminoacídicas respecto a las cepas de *Ruegeria* estudiadas en la propuesta de los biomarcadores. A pesar de esto, la secuenciación del 16S ADNr confirmó

que el aislado problema pertenecía al género *Ruegeria* con un 100% de similitud de secuencia con *R. pelagia* (Christie-Oleza *et al.*, 2012b). Por lo tanto, los biomarcadores propuestos para la identificación de aislados de *Ruegeria* mediante MALDI-TOF resultaban de utilidad.

En base a este trabajo, y con el fin de reforzar la utilidad de los biomarcadores, analizamos su presencia en los espectros de MALDI-TOF de los 27 aislados analizados en esta tesis doctoral, que ya se habían identificado a nivel de género mediante secuenciación de 16S ADNr y entre las cuales había un único aislado perteneciente al género *Ruegeria* (6PALISEP08). Para ello se buscaron las señales correspondientes a los 5 biomarcadores propuestos para este género. Para el aislado 6PALISEP08 se detectaron los picos correspondientes a las formas mono- y diprotonadas para 3 biomarcadores (6 de los 10 posibles valores de m/z de los biomarcadores): la proteína ribosómica L29 (m/z 7583,04 para $[M+H]^+$ y 3789,84 para $[M+2H]^{2+}$), la proteína ribosómica S17 (m/z 8604,17 para $[M+H]^+$ y 4303,28 para $[M+2H]^{2+}$) y la proteína de unión al ADN HU (m/z 9887,79 para $[M+H]^+$ y 4943,90 para $[M+2H]^{2+}$). No se detectaron las señales para las proteínas L32 y L30, lo que indicaría que estas proteínas podrían presentar ciertas divergencias con las de las cepas de *Ruegeria* con las que se propusieron los biomarcadores (Christie-Oleza *et al.*, 2012b). La proteína L30 se había propuesto como el biomarcador idóneo para hacer un primer cribado, ya que era el menos heterogénea en términos de secuencia. Sin embargo, no encontramos los picos (1+ y 2+) correspondientes a esta proteína en el espectro del aislado 6PALISEP08. En cuanto al resto de aislados, que no pertenecían al género *Ruegeria*, se detectó la proteína L30 en los aislados 10RATIMAR09 y V357. No obstante, no se detectó ningún otro de los cinco biomarcadores en estos dos aislados. Estos resultados indican que se debería reevaluar la utilización de la proteína L30 como primer identificador. Los otros

biomarcadores L29, S17, HU y L32 se detectaron en el espectro de algún aislado, pero nunca se detectaron más de dos biomarcadores por cepa. Cabe destacar que solo se consideró que un biomarcador estaba presente, si se detectaban las dos formas de una proteína (1+ y 2+), ya que le confiere mayor fiabilidad y precisión a la identificación.

A pesar, de los buenos resultados obtenidos hasta el momento sería necesario más trabajo para mejorar el sistema de detección incluyendo otras especies o cepas del género *Ruegeria* para comprobar la eficacia del método, así como para extender este tipo de trabajo a otros géneros del clado *Roseobacter*. Es importante tener en cuenta que, para dar mayor robustez al método, la identificación a nivel de género no se puede basar únicamente en valores fijos de m/z, sino que estos deben de ser recalculados para cada especie, debido a las sustituciones aminoacídicas que pueden afectar al peso molecular de las proteínas (y por tanto, al valor m/z). Esto permitiría definir rangos de valores m/z para cada biomarcador y/o determinar porcentajes de presencia de los biomarcadores seleccionados en el conjunto de especies del género. Para recalcular el valor m/z de los biomarcadores es necesario disponer de la secuencia del genoma de cada cepa de referencia utilizada. Idealmente, sería deseable disponer de las secuencias genómicas de todas las especies tipo de cada uno de los géneros. Obviamente, esto no es posible en el momento actual por lo que se producen situaciones como las descritas en este trabajo (detección de solo 3 marcadores para el aislado 6PALISEP08) o las descritas previamente [*Ruegeria pelagia* (Christie-Oleza *et al.*, 2012b)]. No obstante, este método permite un cribado de aislados ambientales más rápido, sencillo y económico que la secuenciación de 16S ADNr, permitiendo identificar aquellos aislados susceptibles de pertenecer al género *Ruegeria*, y por extensión a otros

géneros bacterianos de interés ambiental que no se encuentran representados en las bases de datos de MALDI-TOF.

3. Estudio genómico de los aislados

Los resultados obtenidos en el capítulo 1 mostraron que existe una gran diversidad del clado *Roseobacter* en puertos y que este grupo se encuentra sometido a una marcada variación temporal. Sin embargo, a pesar de las diferencias de localización y características intrínsecas de cada uno de los puertos se observó que la diversidad del grupo era similar entre los puertos estudiados con una predominancia de filotipos específica. Experimentos de simulación de contaminación con diesel con y sin adición simultánea de nutrientes han mostrado que determinadas poblaciones de *Roseobacter* responden favorablemente al tratamiento, aunque la respuesta de este grupo parecía depender de la adición o no de nutrientes. Esta respuesta positiva de determinadas poblaciones del grupo *Roseobacter* a la contaminación por hidrocarburos, podría estar relacionada con la participación de éstas en procesos de biodegradación. La capacidad de este grupo de crecer en presencia de hidrocarburos ha sido demostrada en estudios anteriores (Harwati *et al.*, 2007; Harwati *et al.*, 2008; Harwati *et al.*, 2009). La primera vía de degradación de hidrocarburos aromáticos descrita en miembros del grupo *Roseobacter* fue la del β -cetoadipato (Buchan *et al.*, 2000). Posteriormente, la secuenciación del genoma de cepas del grupo permitió postular la presencia de más vías de degradación. Un total de seis rutas se han propuesto hasta el momento en genomas de bacterias de este grupo: la del benzoato, fenilacetato, homoprotocatecuato, homogentisato, gentisato y protocatecuato (Moran *et al.*, 2007; Buchan y González, 2010; Newton *et al.*, 2010), como ya se ha descrito en la introducción de esta tesis doctoral.

Teniendo en cuenta la diversidad de los aislados obtenidos en este estudio, evidenciada tanto por secuenciación de 16S ADNr como por los perfiles de MALDI-TOF, nos propusimos el estudio de la diversidad de rutas de degradación de hidrocarburos presentes en los genomas de estos aislados del grupo *Roseobacter*. Por la limitación en el número de genomas que era posible secuenciar y dado que el objetivo en esta fase del estudio era analizar la diversidad de rutas de degradación de hidrocarburos, y no tanto qué aislado en concreto poseía las rutas detectadas, se decidió agrupar los aislados para la secuenciación.

La agrupación de los aislados para su posterior secuenciación, se realizó en base a la filogenia del grupo basada en el gen del 16S ARNr que incluyó secuencias de las cepas tipo del clado *Roseobacter*, de los clones obtenidos en las genotecas de puertos y microcosmos (figura R3.1). En total se incluyeron 214 secuencias. Los aislados de este estudio se agruparon en cuatro grupos distintos en base a la semejanza del 16S ADNr. En aquellos casos en que dos aislados presentaban una similitud del gen 16S ARNr igual o superior al 99%, presentaban la misma morfología colonial, y procedían del mismo puerto (lo que aumentaba la posibilidad de que perteneciesen a la misma especie o incluso fueran el mismo aislado) se incluyó solo uno. De este modo, se secuenció el genoma de 17 de los aislados en cuatro grupos: 11ANDIMAR09, 5ANDIMAR09, 6PALISEP08, 2ALCIMAR09 (G1); 3SOLIMAR09, 1FIGIMAR09, 4SOLISEP08, 6ADRIMAR09, 2ANDIMAR09 (G2); 1CONIMAR09, 16PALIMAR09, 7PALIMAR09 (G3) y 4RATIMAR09, 3RATIMAR09, 3ANDIMAR09, 5RATIMAR09, 1ANDIMAR09 (G4). Los aislados del grupo 3 se correspondían con un único género: *Thalassobacter*. El G1 incluía aislados de *Ruegeria*, *Roseovarius* y *Phaeobacter*. El G2 agrupaba aislados de los géneros *Sulfitobacter* y *Tateyamaria*. Finalmente, el G4 incluía aislados de *Loktanella* y *Jannaschia*

(figura R3.1). Se extrajo el ADN de cada uno de los aislados, se prepararon mezclas con cantidades equitativas de los ADNs de los aislados pertenecientes a un mismo grupo, y las mezclas se secuenciaron por la tecnología de pirosecuenciación (Roche 454) como se detalla en el apartado de materiales y métodos. En la tabla R3.1 se indican las características de la información obtenida de cada uno de los grupos de genomas secuenciados.

En todos los casos el tamaño medio de las secuencias fue de alrededor de 350 pb y no se observaron diferencias significativas en el contenido GC de los genomas, que además era cercano al porcentaje GC medio de los genomas de *Roseobacter* descritos previamente (58%). Como muestra la tabla R3.1, para los grupos 3 y 4 se obtuvo un número mayor de secuencias. En base a los datos de secuencia se estimó la cobertura que se había obtenido de los genomas incluidos en cada grupo. La cobertura se calculó a partir del número de pares de bases secuenciadas dividido por el número de aislados de cada grupo y el tamaño medio del genoma de un *roseobacter*. Este último valor se calculó como la media de todos los tamaños de los genomas que han sido secuenciados hasta el momento. La cobertura de los genomas de los grupos fueron bajas, siendo el G3 el que presentó una mayor cobertura y número de secuencias, algo que era de esperar teniendo en cuenta que era el grupo con menos aislados y que éstos eran más similares entre ellos (compartían un 99% de similitud de secuencia de 16S ADNr).

Los genomas se anotaron utilizando la tecnología SEED *Subsystems*, que agrupa los genes necesarios para una determinada función, utilizando el servidor MG RAST (Overbeek *et al.*, 2005; Aziz *et al.*, 2008). Nos centramos en el estudio de las rutas de degradación de hidrocarburos aromáticos postuladas anteriormente en los genomas de

bacterias del grupo *Roseobacter* (Moran *et al.*, 2007; Buchan y González, 2010; Newton *et al.*, 2010).

Tabla R3.1: Características de los grupos de genomas secuenciados.

	G1	G2	G3	G4
Tamaño (pb)	15140669	18395152	25313935	22260857
Nº secuencias	43151	53177	71846	63715
Longitud media secuencias (pb)	350 ± 136	345 ± 138	352 ± 138	349 ± 137
Contenido GC medio (%)	57 ± 4	59 ± 4	58 ± 4	61 ± 5
Cobertura estimada	0,9x	0,9x	2x	1x
Tamaño estimado genoma (Mb) ^a	5,2	7,7	4,2	7,5

^a Según el informe de la compañía que realizó la secuenciación.

Para determinar la presencia de las vías se analizó la presencia en los genomas secuenciados de los genes que codifican para el primer enzima de las seis rutas de degradación de hidrocarburos aromáticos postuladas en *Roseobacter*, así como la ruta de degradación de salicilato. Se tomó como referencia el primer gen de la vía, porque enzimas de la parte baja de la vía pueden ser comunes a otras rutas metabólicas. Así, se buscaron los genes de las siguientes vías de degradación: (1) *pcaG* para protocatecuato; (2) *gtdA* para gentisato; (3) *hmgA* para homogentisato; (4) *paaK* para fenilacetato; (5) *benA* para benzoato; (6) *hpaD* para homoprotocatecuato, y (7) *nahG* para salicilato. Las búsquedas con BLAST se realizaron con un valor E de 10^{-5} y un porcentaje de identidad mínimo del 60%. Además, los resultados obtenidos para los grupos de genomas secuenciados en este trabajo (tabla R3.2) se compararon con 37 cepas del clado cuyo genoma había sido secuenciado (ver anexo, tabla A5). Para la comparación, se hicieron también dos subgrupos de los 37 genomas disponibles, en función de la procedencia de los aislados. Así, se definió un subgrupo de diez genomas de aislados procedentes de zonas costeras (costeros) y un subgrupo de cuatro aislados obtenidos de zonas costeras y

que se aislaron bajo presión selectiva utilizando como única fuente de carbono la lignina (degradadores de lignina).

Tabla R3.2: Detección de las seis vías de degradación de compuestos aromáticos propuestas en genomas del grupo *Roseobacter* y de la vía de degradación de salicilato en los grupos de genomas de este estudio.

	<i>pcaG</i> ^a	<i>gtdA</i>	<i>hmgA</i>	<i>paaK</i>	<i>benA</i>	<i>hpaD</i>	<i>nahG</i>
G1	+	+	+	+	+	+	+
G2	+	-	+	+	+	+	+
G3	+	-	-	-	-	-	+
G4	+	-	+	+	-	-	+
37 Genomas	+	+	+	+	+	+	+
10 Costeras	+	+	-	+	-	+	+
4 Degradadoras lignina	+	+	+	+	-	+	+

^aLa detección de una vía se indica con un signo + y en el caso contrario un -.

Se observaron diferencias en el número y tipo de vías detectadas en los diferentes grupos de genomas. En el grupo G1 se detectaron todas las vías de degradación de compuestos aromáticos, mientras que en G2 se detectaron todas excepto la del gentisato. En los otros dos grupos genómicos se detectó la presencia de menos rutas. Así, en G3 solo se detectaron las de degradación de protocatecuato y salicilato, que son las dos vías que se encontraron en todos los grupos estudiados. En G4 no se detectaron las vías del gentisato, benzoato y homoprotocatecuato. En el grupo de los 37 genomas de cepas del clado *Roseobacter* se detectaron las 7 vías, tal y como era de esperar, ya que todas ellas están presentes en el genoma de *Ruegeria pomeroyi* DSS-3 y *Jannaschia* sp. CCS1 (Moran *et al.*, 2007). En los genomas de aislados costeros se detectaron todas las vías, a excepción de las del homogentisato y benzoato, presentando similitud con lo observado en alguno de los aislados de puertos. Por último, en las 4 cepas degradadoras de lignina se detectaron

todas las rutas, a excepción de la del benzoato, mostrando mayor semejanza con los G1 y G2, en cuanto al número de vías detectadas.

Los resultados obtenidos para los aislados de puertos coinciden con las predicciones sobre la presencia de rutas para degradación de compuestos aromáticos realizadas en base a estudios genómicos de los miembros de *Roseobacter* (Newton *et al.*, 2010). Así, la vía del protocatecuato (rama del β -cetoadipato) está presente en el 75% de los genomas de *Roseobacter*, la del homogentisato en el 69%, y la del fenilacetato en el 56%. En cambio, las vías para la degradación de benzoato y gentisato se han predicho tan solo en un 16% de los genomas secuenciados (Buchan y González, 2010, Newton *et al.*, 2010). Estos valores son similares a los obtenidos para nuestros grupos: protocatecuato y salicilato (100%), homogentisato (75%), fenilacetato (50%), homoprotocatecuato (50%), benzoato (50%) y gentisato (25%).

Para las siete vías de degradación de compuestos aromáticos estudiadas, se determinó la presencia de todos los genes de esas vías para los cuatro grupos genómicos (figuras R3.4, R3.5, R3.6, R3.7). Para G1 se detectaron las seis vías de degradación y todos los genes de cada una de las vías a excepción del segundo gen de la vía del gentisato. En general, la mayoría de los genes de las vías fueron detectados en el caso de G2. En el caso de la vía del gentisato, sólo el último gen de la vía fue detectado, por lo que se consideró, que esa ruta no estaba presente en ese genoma. En G3 se detectaron algunos genes de la vía de degradación del protocatecuato y el gen que transforma el salicilato a catecol. También se encontraron algunos genes de las vías del homoprotocatecuato y el homogentisato, pero no el primer enzima de esas rutas.

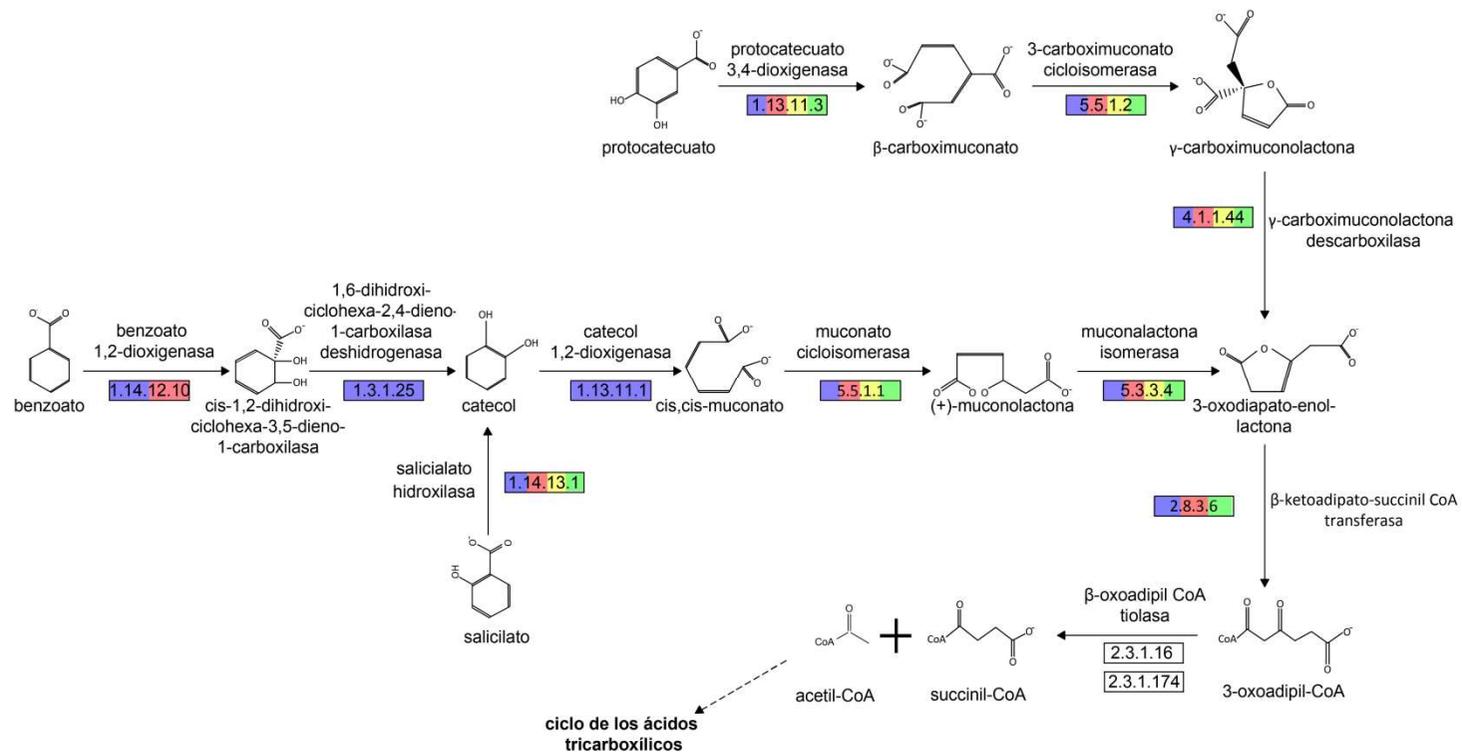


Figura R3.4: Vías de degradación del benzoato, salicilato y protocatecuato. Se indican los enzimas detectados en cada uno de los grupos genómicos con colores: azul (G1), rojo (G2), amarillo (G3) y verde (G4).

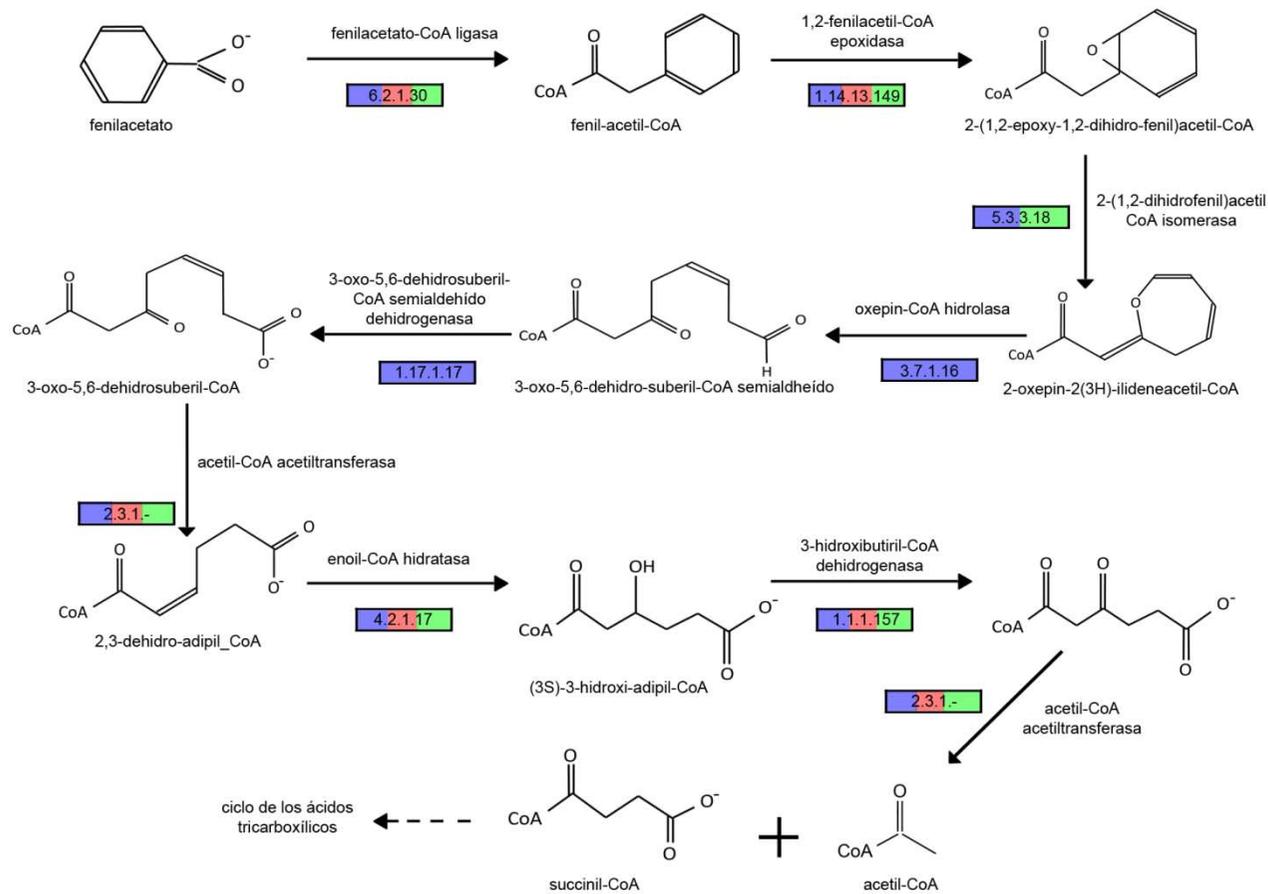


Figura R3.5: Vía de degradación del fenilacetato. Se indican los enzimas detectados en cada uno de los grupos genómicos con colores: azul (G1), rojo (G2), amarillo (G3) y verde (G4).

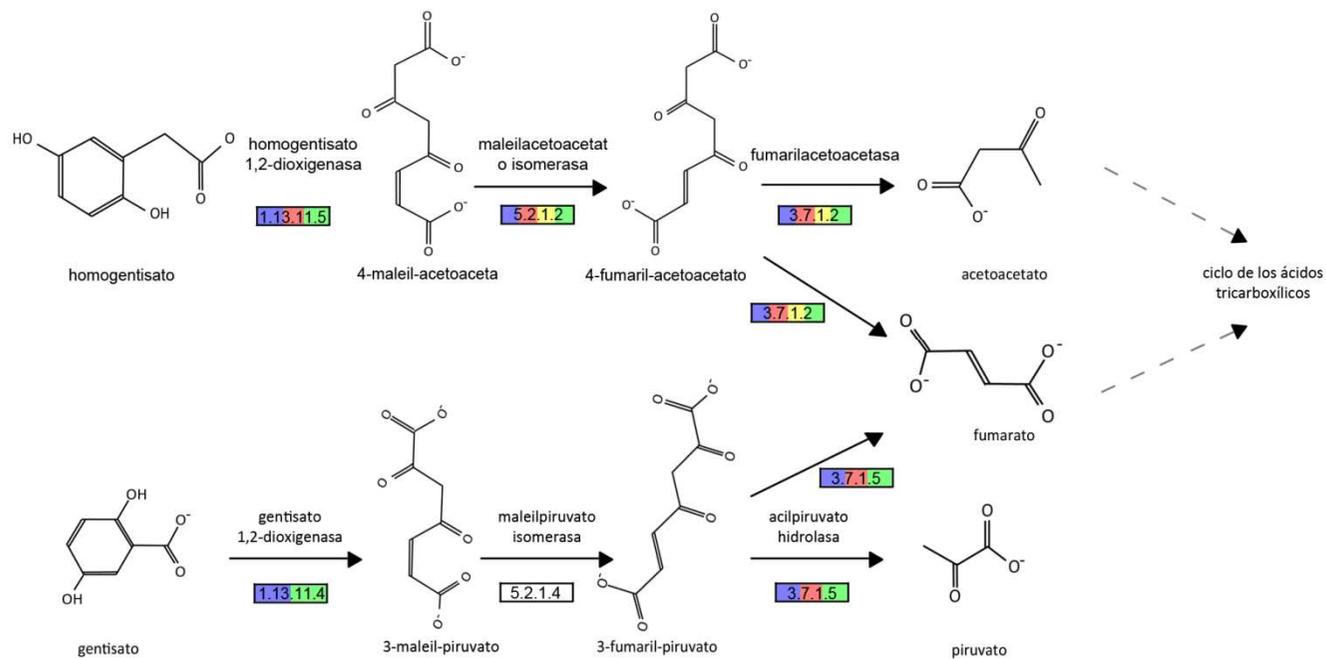


Figura R3.6: Vías de degradación del homogentisato y gentisato. Se indican los enzimas detectados en cada uno de los grupos genómicos con colores: azul (G1), rojo (G2), amarillo (G3) y verde (G4).

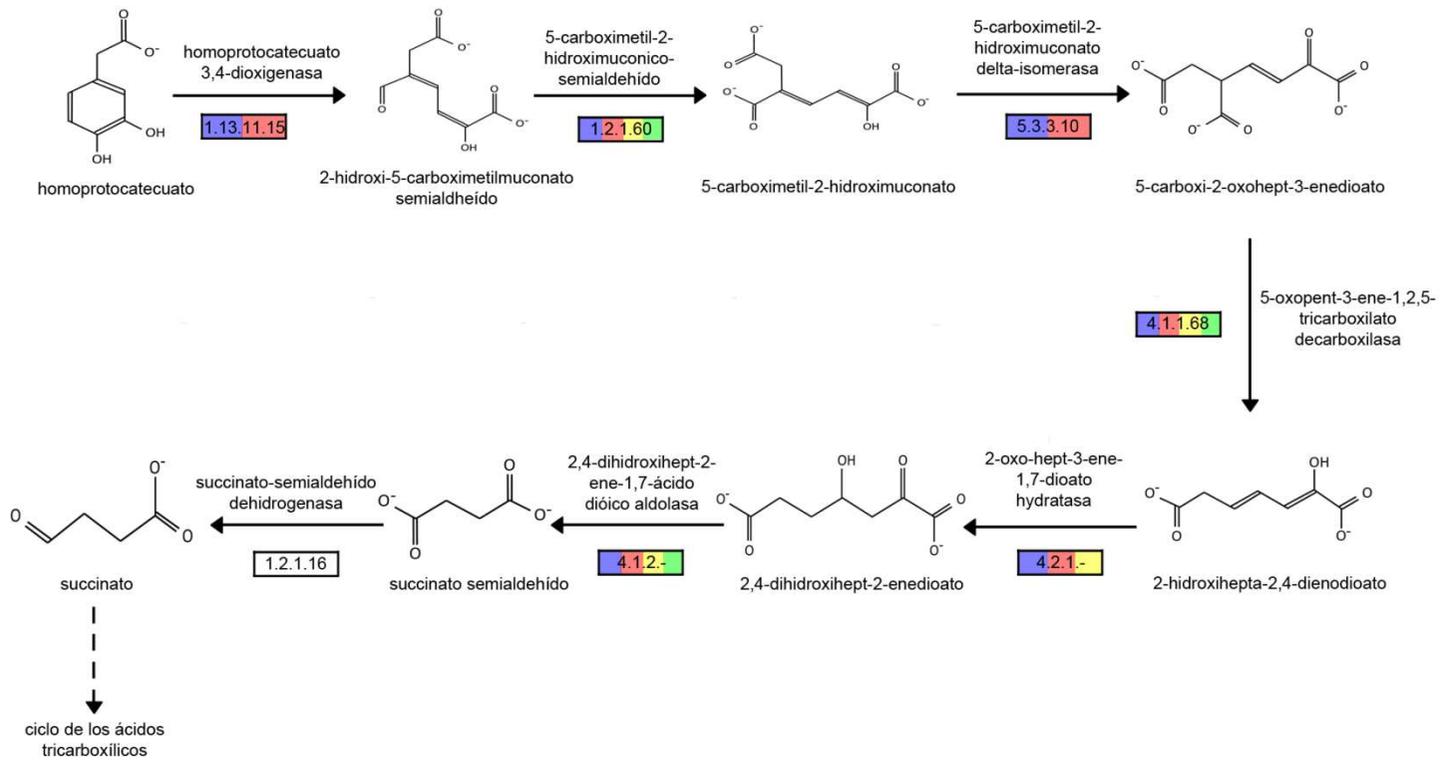


Figura R3.7: Vía de degradación del homoprotocatechuato. Se indican los enzimas detectados en cada uno de los grupos genómicos con colores: azul (G1), rojo (G2), amarillo (G3) y verde (G4).

Por último, todos los genes de las rutas de protocatecuato y homogentisato fueron detectados en G4, mientras que solo se encontraron algunos genes de las rutas del gentisato y homoprotocatecuato.

4. Crecimiento de aislados del grupo *Roseobacter* con hidrocarburos como fuente de carbono y energía

La capacidad de los aislados del grupo *Roseobacter* obtenidos de aguas de puertos para crecer a expensas de compuestos aromáticos como fuente de carbono y energía se comprobó mediante cultivos en medio líquido de Medio Mineral Marino (MMM). Se analizaron los siguientes hidrocarburos aromáticos: naftaleno, benzoato, salicilato, gentisato, protocatecuato, homoprotocatecuato, fenilacetato y homogentisato. Además, se comprobó la capacidad de los aislados para crecer en placas de MMM suplementado con las mismas fuentes de carbono, y también, con diesel, p-hidroxibenzoato y mandelato. Los crecimientos en medio sólido se realizaron con luz y en oscuridad, para determinar la posible existencia de diferencias entre ambas condiciones de cultivo. Es importante recordar que todas las bacterias del grupo *Roseobacter* aisladas en este estudio fueron obtenidas en placas de agar marino de Zobell y MMM suplementado con casaminoácidos como fuente de carbono, sin presión selectiva por la presencia de hidrocarburos.

Todos los aislados del grupo *Roseobacter* procedentes de aguas de puertos, a excepción de 1FIGIMAR09, fueron capaces de crecer con alguno de los hidrocarburos ensayados. En cambio, el único aislado que no procedía de aguas de puertos (1CONIMAR09), no mostró capacidad para crecer con ninguno de los compuestos (tabla R3.3), a pesar de que compartía un 99% de similitud de secuencia de 16S ARNr con los aislados 7PALIMAR09 y 16PALIMAR09, y producía espectros de MALDI-TOF similares a 6ADRMAR09 y 16PALIMAR09.

Tabla R3.3: Crecimiento en medio líquido de aislados del grupo *Roseobacter* obtenidos en este estudio con hidrocarburos aromáticos.

	Benzoato	Salicilato	Gentisato	Protocatecuato	Homogentisato	Homoprotocatecuato	Fenilacetato	Naftaleno ^c
6PALISEP08 ^a	–	–	–	+	–	–	+	–
5ANDIMAR09	+	–	+	+	+	–	+	–
2ALCIMAR09	+	–	– ^b	+	–	–	–	–
11ANDIMAR09	–	–	+	+	+	–	+	–
3SOLIMAR09	–	–	+	–	+	–	+	–
1FIGIMAR09	–	–	–	–	–	–	–	–
6ADRIMAR09	+	+	–	–	–	–	–	–
4SOLISEP08	+	+	+	–	+	–	+	–
2ANDIMAR09	+	–	+	–	–	–	–	–
7PALIMAR09	–	+	+	+	+	–	+	–
16PALIMAR09	–	–	+	+	+	–	+	–
1CONIMAR09	–	–	–	–	–	–	–	–
1ANDIMAR09	+	–	+	–	+	–	+	–
5RATIMAR09	–	–	+	+	+	–	+	–
3ANDIMAR09	–	+	+	–	–	–	+	– ^b
3RATIMAR09	+	+	+	+	+	–	+	–
4RATIMAR09	+	+	+	+	+	–	+	–
8ALCIMAR09	+	–	– ^b	+	–	–	–	–
10RATIMAR09	+	+	+	+	+	–	+	–

^a Los grupos genómicos se indican con sombreado alterno de G1 a G4. Los aislados 8ALCIMAR09 y 10RATIMAR09, no se incluyeron en ninguno de los grupos genómicos por presentar una similitud $\geq 99\%$ del gen 16S ARNr con 2ALCIMAR09 y 4RATIMAR09, respectivamente.

^b En placa se observó crecimiento.

^c Crecimiento en placa con vapores de diesel: 3ANDIMAR09; con p-hidroxibenzoato: 3ANDIMAR09, 5ANDIMAR09, 3SOLIMAR09, 2ALCIMAR09, 8ALCIMAR09, 3RATIMAR09, con mandelato: no se observó crecimiento en ninguno de los aislados.

Esto indica que a pesar de ser bacterias que probablemente se considerarían de la misma especie en base a secuencia de 16S ADNr, presentan características catabólicas diferentes. Esto está de acuerdo con lo observado, a partir del estudio de los genomas de dos cepas de una misma especie, las cepas de *Phaeobacter gallaeciensis* BS17 y 2.10. La cepa BS17 presenta una alcano monooxigenasa que no presenta la cepa 2.10 (Buchan y González, 2010).

En general, los aislados presentaron una gran versatilidad en la utilización de compuestos aromáticos. Once aislados fueron capaces de crecer con más de cuatro hidrocarburos. Tres de ellos, 3RATIMAR09, 4RATIMAR09 y 10RATIMAR09 (procedentes todos de Cala Ratjada), fueron capaces de crecer con 6 de las 8 fuentes de carbono ensayadas en medio líquido.

Otro aspecto a destacar, es que la capacidad para crecer con compuestos aromáticos no estaba relacionada con ningún género en concreto. Así, por ejemplo, cuatro de los aislados del G2 pertenecían al género *Sulfitobacter*, pero cada uno de ellos presentaba diferente capacidad para crecer con los compuestos ensayados. Lo mismo ocurría con los aislados del G3, pertenecientes al género *Thalassobacter* y los de G4 que pertenecían al género *Loktanella*. Esto demuestra que existe mucha diversidad en cuanto a posibles capacidades, como se ha observado en el estudio de los genomas.

La mayoría de los aislados fueron capaces de crecer con benzoato (10), gentisato (13), protocatecuato (11), fenilacetato (13), homogentisato (11) y la mitad de ellos en salicilato (7). No obstante, cabe destacar que ninguno de los aislados estudiados mostró capacidad para crecer con homoprotocatecuato. Estos resultados contrastan con lo observado por medio del estudio de genomas, puesto que la ruta de degradación del

homoprotocatecuato se ha predicho en el 44% de los genomas (Buchan y González, 2010; Newton *et al.*, 2010), así como en G1 y G2. Ninguno de los aislados tampoco fue capaz de crecer en naftaleno en las condiciones ensayadas. La capacidad de degradación de naftaleno por parte de miembros del grupo *Roseobacter* ha sido menos estudiada, aunque Harwati y colaboradores (2007) aislaron 8 cepas del puerto Semarang (Indonesia) capaces de crecer con naftaleno y alquilnaftalenos. Una de estas cepas fue descrita como *Tropicibacter naphthalenivorans*, bacteria capaz de degradar hidrocarburos aromáticos policíclicos entre ellos el naftaleno (Harwati *et al.*, 2009). Además, el aislado V357 es capaz de crecer con naftaleno como única fuente de carbono y energía (trabajo del grupo no publicado).

Los resultados de los cultivos en medio sólido crecidos en condiciones de luz o oscuridad mostraron diferencias. El aislado 3ANDIMAR09 era capaz de crecer con diesel y gentisato en condiciones de luz, pero no en los cultivos incubados en oscuridad. Lo mismo ocurría con los aislados 2ALCIMAR09 y 8ALCIMAR09 que podían crecer con p-hydroxibenzoato con luz. El comportamiento contrario se observó en el aislado 3RATIMAR09 que era capaz de crecer con gentisato y protocatecuato en oscuridad, pero no con luz. Este tipo de diferencias ha sido observado por otros autores (T. McGenity, comunicación personal), aunque se desconoce la base biológica subyacente.

Algunos resultados del estudio genómico no coincidían con los resultados obtenidos por cultivos. Una de las incongruencias observadas al comparar los resultados del estudio genómico y de los cultivos es lo observado por ejemplo en G3. Las rutas de degradación para el gentisato, fenilacetato y homogentisato no habían sido detectadas en los genomas de este grupo. En el caso de las vías del fenilacetato y gentisato no se detectó

ninguno de los genes de las vías (figuras R3.5 y R3.6), mientras que en la vía del homogentisato no se detectó el primer enzima de la ruta (figura R3.6). No obstante, dos de las cepas de G3 mostraron capacidad para crecer con esos compuestos.

Por otro lado, en el caso del G1, se habían detectado todas las vías de degradación de compuestos aromáticos estudiadas. Sin embargo, ninguno de los aislados de ese grupo fue capaz de crecer con salicilato ni homoprotocatecuato en las condiciones ensayadas. Lo mismo ocurría con G2, ya que la vía de degradación del homoprotocatecuato estaba presente en el genoma de ese grupo, pero ninguno de los aislados de ese grupo mostró la capacidad de crecer con ese compuesto. En ambos grupos se habían detectado todos los genes de la ruta de degradación del homoprotocatecuato, como muestra la figura R3.7.

El hecho de que algunos aislados fuesen capaces de crecer con compuestos cuyas vías de degradación no habían sido detectadas en los genomas pudo ser debido a las bajas coberturas de los genomas, lo que habría imposibilitado la detección de los genes de esa vía. Otra posibilidad, sería que la metodología empleada en la búsqueda de genes en los genomas no fuera lo suficientemente eficaz, por lo que sería necesaria la mejora del método y en la anotación de estos genes. En el caso contrario, en el que se habían detectado las rutas en los genomas pero ninguno de los miembros de un grupo pudo crecer con esas fuentes de carbono, podría ser debido a que las condiciones de cultivo ensayadas no fueran favorables para el crecimiento con esos compuestos. Factores como la concentración del compuesto aromático utilizada, la temperatura, o el hecho de que los microorganismos actúen solos o en grupo, etc. podrían afectar al crecimiento (Van Hamme, *et al.*, 2003).

Capítulo 3

Otra posibilidad era que las rutas de degradación no estuviesen completas en ninguno de las cepas del grupo, impidiendo así el crecimiento individual de los aislados utilizando esos compuestos como únicas fuentes de carbono y energía.

Tabla R3.4: Crecimiento en cultivos mixtos de aislados del clado *Roseobacter*.

	G1	G2	G3	G4
Benzoato	6PALISEP08	3SOLIMAR09	7PALIMAR09	5RATIMAR09
	11ANDIMAR09	1FIGIMAR09	16PALIMAR09	3ANDIMAR09
			1CONIMAR09	
	+	+	-	+
Salicilato	6PALISEP08	3SOLIMAR09	16PALIMAR09	1ANDIMAR09
	11ANDIMAR09	1FIGIMAR09	1CONIMAR09	5RATIMAR09
	2ALCIMAR09	2ANDIMAR09		
	5ANDIMAR09			
	-	+	-	+
Gentisato	6PALISEP08	6ADRIMAR09		
	2ALCIMAR09	1FIGIMAR09		
	-	-		
Protocatecuato		3SOLIMAR09		1ANDIMAR09
		1FIGIMAR09		3ANDIMAR09
		2ANDIMAR09		
		4SOLISEP08		
		-		-
Homogentisato	6PALISEP08	1FIGIMAR09		
	2ALCIMAR09	6ADRIMAR09		
		2ANDIMAR09		
	+	+		
Homoprotocatecuato	6PALISEP08	3SOLIMAR09	7PALIMAR09	5RATIMAR09
	11ANDIMAR09	1FIGIMAR09	16PALIMAR09	3ANDIMAR09
	2ALCIMAR09	2ANDIMAR09	1CONIMAR09	1ANDIMAR09
	5ANDIMAR09	4SOLISEP08		4RATIMAR09
		6ADRIMAR09		3RATIMAR09
	+	+	+	+
Fenilacetato		1FIGIMAR09		
		2ANDIMAR09		
		6ADRIMAR09		
		+		

En ese caso, nos planteamos si aquellos aislados de un grupo genómico que no habían podido crecer por sí solos podrían crecer si eran incubados conjuntamente. Para responder a esa pregunta se prepararon cultivos mixtos, que se inocularon con aquellos aislados de un mismo grupo que no hubieran sido capaces de crecer con un compuesto determinado. Las diferentes combinaciones probadas y los resultados obtenidos se indican en la tabla R.3.4.

En todos los grupos, al menos una de las combinaciones probadas resultó dar un resultado positivo. En algunos casos, los aislados que no habían sido capaces de crecer con determinadas fuentes de carbono, crecieron al estar en presencia de otros aislados del mismo grupo. En G1, los cultivos combinados de dos o más aislados crecieron con 3 de las 5 fuentes de carbono probadas: benzoato, gentisato y homoprotocatecuato. En G2 en todas las combinaciones se observó crecimiento a excepción de aquellas crecidas con gentisato y protocatecuato. En el cultivo de todos los miembros del G3 con homoprotocatecuato se observó crecimiento. De las cuatro combinaciones probadas para G4 se observó crecimiento con 3 de los 4 compuestos probados. En base a los resultados, estas bacterias parecen colaborar cuando crecen con determinados compuestos aromáticos, o bien unas cepas producen compuestos necesarios para el crecimiento de otras.

Harwati y colaboradores (2007) aislaron 138 colonias distintas del puerto Semarang, en Indonesia. Las colonias se aislaron de placas de medio inorgánico suplementado con crudo como única fuente de carbono. A pesar de haber sido aisladas bajo presión selectiva, 22 de las cepas no crecieron con ningún componente del crudo. Una de las hipótesis que presentaron para explicar esos resultados fueron las interacciones tróficas que se producen entre los microorganismos de un ambiente marino

contaminado con hidrocarburos. Algunas de estas relaciones mutualistas en procesos de biodegradación están relacionados con la producción de surfactantes que promueven la biodisponibilidad y degradación (Head *et al.*, 2006). En aguas contaminadas con crudo y suplementadas con nitrógeno, fósforo y hierro, se observó un incremento significativo de la biodegradación de la fracción de compuestos aromáticos, en presencia de un polisacárido extracelular producido por *Rhodococcus rhodochrous* (Iwabuchi *et al.*, 2008). Los resultados de estos cultivos mostraron la importancia de la cooperación entre los microorganismos en los procesos de degradación de compuestos aromáticos.

Los resultados obtenidos en este capítulo muestran la diversidad cultivable del grupo *Roseobacter* en ambientes contaminados por hidrocarburos, como es el caso de puertos deportivos. Además, se ha demostrado que se produce selección de determinadas poblaciones del grupo *Roseobacter* en este tipo de ambientes, ya que una misma cepa ha sido aislada de dos puertos distintos. Sin embargo, cepas con elevado porcentajes de similitud del 16S ADNr y con espectros de MALDI-TOF similares, no presentan las mismas características genómicas. Por ejemplo, los aislados 7PALIMAR09, 16PALIMAR09 y 1CONIMAR09 presentaban una similitud de secuencia del 16S ADNr superior al 99% (afiliados al género *Thalassobacter*), sin embargo, mostraron diferentes capacidades a la hora de crecer con compuestos aromáticos como única fuentes de carbono y energía. El estudio genómico de estos aislados ha revelado la gran versatilidad de vías de degradación de compuestos aromáticos, aunque ha dejado en evidencia la necesidad de mejorar los sistemas de detección de estos genes, así como su anotación.

DISCUSIÓN GENERAL

Como se ha explicado en la introducción, el grupo *Roseobacter* había sido detectado en aguas de puertos y propuesto como uno de los grupos predominantes en estos ambientes (Nogales *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007; Aguiló-Ferretjans *et al.*, 2008; Aguiló-Ferretjans, 2009; Ma *et al.*, 2009). Sin embargo, todos estos estudios se habían centrado en el análisis de la diversidad de la comunidad bacteriana total, por lo que la información relativa al grupo *Roseobacter* era de carácter general. Además, se disponía de indicios que mostraban una alta variabilidad en la proporción del grupo *Roseobacter* en aguas de puertos deportivos (Nogales *et al.*, 2007; Aguiló-Ferretjans, 2009), lo que implicaba incluso la no detección de este grupo bacteriano en ocasiones. En base a estas observaciones se hacía necesario clarificar si realmente el grupo *Roseobacter* era numéricamente relevante en comunidades microbianas de aguas de puertos y si estaba presente en estos ambientes de forma regular.

Para responder a esta pregunta en este trabajo se planteó por primera vez un estudio sistemático de comparación de las comunidades bacterianas totales, de *Alphaproteobacteria* (la clase a la que pertenece el grupo *Roseobacter*) y del propio grupo *Roseobacter*, en aguas de siete puertos situados alrededor de Isla de Mallorca, con capacidad y actividades diferentes (tabla M1) y diferentes características físico-químicas (figuras R1.1 y R1.2). Además se realizaron muestreos periódicos con el fin de poder evaluar también la variación temporal.

Se determinó que el grupo *Roseobacter* estaba presente en todas las muestras analizadas de estos puertos (figura R1.3), con abundancias superiores al 10% respecto a recuentos totales de procariotas en la mayoría de las muestras (88%) y valores máximos que alcanzaron hasta el 43% del total de los recuentos con DAPI. Estos resultados de recuentos mediante FISH se vieron reforzados por la determinación de las

abundancias relativas de T-RFs indicativos de poblaciones de *Roseobacter* (figura R.1.11). Por lo tanto, quedaba demostrada la importancia numérica del grupo *Roseobacter* en aguas de los puertos estudiados y confirmada su relevancia en estos ambientes.

Las bacterias del grupo *Roseobacter* son oportunistas y pueden verse favorecidas por el incremento en la concentración de nutrientes y la presencia de hidrocarburos (ver revisión Buchan y González, 2010), dos condiciones que ocurren en puertos. De acuerdo con esto, se observó una correlación positiva significativa entre el número total de células de *Roseobacter* (recuentos de FISH) con la concentración de clorofila en el agua de puertos, pero no así con la concentración de hidrocarburos. En base a los resultados de esta tesis puede decirse que el incremento en nutrientes en aguas de puertos (evaluado aquí indirectamente mediante la cuantificación de clorofila) es uno de los factores que determina la predominancia de *Roseobacter* en estos ambientes. En cambio, la presencia de hidrocarburos no determinaría tanto la abundancia de *Roseobacter* pero probablemente contribuiría a perfilar la diversidad de poblaciones de este grupo en estos ambientes (ver más adelante).

En relación con los análisis de diversidad, uno de los resultados más sorprendentes de este trabajo fue constatar el alto grado de similitud en las comunidades bacterianas presentes en diferentes puertos muestreados. Así, a pesar de la alta variabilidad observada, existían similitudes remarcables entre los perfiles de T-RFLP de 16S ADNr obtenidos tanto con cebadores universales (comunidad total) como con cebadores para *Alphaproteobacteria*, para las muestras de los diferentes puertos (figuras R1.5 y R1.7). Los resultados de este trabajo demuestran la existencia de comunidades bacterianas singulares en puertos de la Isla de Mallorca, que comparten una parte relevante de sus miembros a pesar de

su diferente localización geográfica (figura M1) y características (tabla M1 y figuras R1.1 y R1.2). Pero además, se determinó que había una dinámica temporal común de las comunidades bacterianas de estos puertos fuertemente determinada por la temperatura, como se demostraba tanto por la ordenación de los perfiles en el análisis NMDS (figuras R1.5 y R1.7), como por las correlaciones significativas de la abundancia relativa de T-RFs importantes. Esta importancia de la temperatura se había descrito también en el estudio previo en Puerto Adriano (Nogales *et al.*, 2007; Aguiló-Ferretjans *et al.*, 2008), y en el puerto Victoria en Hong-Kong (Zhang *et al.*, 2009). Por lo tanto, se puede concluir que las comunidades de estos puertos son diversas y dinámicas, pero existen patrones de composición que se repiten en el tiempo [por ejemplo, si comparamos las comunidades de las muestras tomadas en marzo de 2009 y 2010, o las correspondencias encontradas entre los resultados relativos a puerto Adriano de este estudio y los resultados previos (Nogales *et al.*, 2007; Aguiló-Ferretjans *et al.*, 2008)]. Pero aún es más interesante la demostración de que los patrones se repiten simultáneamente en puertos con diferente localización geográfica.

Cuando se llevó el análisis de la diversidad del grupo *Roseobacter* al nivel de detalle que permite la secuenciación de 16S ADNr en dos muestreos concretos del estudio (septiembre 2008 y marzo 2009), se obtuvo otro resultado interesante. Así, se demostró que la mayoría de las secuencias detectadas en las 14 genotecas obtenidas de puertos se agrupaban en dos únicos filotipos (denominados 2 y 6) utilizando umbrales de similitud altos (99%). Cabe recordar que los niveles de similitud de secuencia de 16S ADNr entre clones de diferentes muestras ambientales no suelen ser tan elevados. Estos resultados parecen indicar que las condiciones ambientales de las aguas de puertos seleccionan determinadas poblaciones concretas del grupo *Roseobacter*. Otros filotipos

relevantes observados fueron el 5, 10, 14, 25 y 32, aunque estos solo se observaban en abundancias relevantes en genotecas de algunos de los puertos. La cuantificación de la abundancia de los filotipos 2 y 6 en todas las muestras analizadas, tanto en base a T-RFs identificativos (figura R1.12) como a los resultados de qPCR (figura R1.14), demostró que estos filotipos eran relevantes en la mayoría de los puertos y muestreos. Es también interesante remarcar que estos filotipos mayoritarios mostraron una dinámica temporal y que se sustituyeron el uno al otro en todos los puertos en función del calentamiento o enfriamiento de la masa de agua (filotipo 2 predominando cuando la temperatura era más alta y filotipo 6 cuando era más baja). Como no se observaron correlaciones significativas ni entre la abundancia relativa de los T-RFs identificativos de estos dos filotipos (5'A246 y 5'A248) o la determinada por qPCR, con las concentraciones de clorofila o de hidrocarburos en el agua de los puertos, se hace difícil hipotetizar la razón que explicaría el éxito de las poblaciones de *Roseobacter* representadas por los filotipos 2 y 6 en este tipo de ambiente. Desafortunadamente, en este trabajo no se consiguieron aislados relacionados con los filotipos 2 y 6, lo que hubiese permitido un estudio en profundidad de sus características metabólicas. Es posible que otros factores como la disponibilidad de determinados nutrientes (por ejemplo, diferentes formas de nitrógeno o fósforo) o la presencia de metales pesados, u otros contaminantes, jueguen un papel importante en la selección de los filotipos. En este sentido, son interesantes los resultados de los experimentos realizados en microcosmos, que muestran diferencias en la abundancia relativa de determinados T-RFs de *Roseobacter* (figura R2.4), de la cantidad de filotipo 6 detectada por qPCR (figura R2.6), y de la composición de genotecas (tabla R2.2) dependiendo de si se hacía un tratamiento con diesel y nitrógeno o bien con diesel y fósforo. Y aunque la información que proporcionan las genotecas

obtenidas de microcosmos es insuficiente, también es interesante que el filotipo más abundante en los dos experimentos realizados con diesel y fosfato (m8, 20 clones en total en genotecas de estos microcosmos) se relacionase con la secuencia de uno de los filotipos abundantes en el puerto de Palma y presente también en otros puertos (filotipo 10, grupo *h* en figura R1.10, formado por 37 clones). O también, que la abundancia de filotipo 6 determinada por qRT-PCR fuese mayor en los microcosmos tratados con diesel y nitrógeno (figura R2.6). Estos resultados indican que probablemente sería necesario llegar a un nivel de resolución mayor en la determinación de la concentración de diferentes nutrientes (formas de N y P), así como de los diferentes hidrocarburos que pueden estar presentes en el agua de puertos (como evidencian los resultados mostrados en el capítulo 3), para poder establecer relaciones consistentes con poblaciones (filotipos) específicos de *Roseobacter*.

A pesar de la falta de correlaciones estadísticas con la concentración de hidrocarburos en el agua, un porcentaje elevado de las secuencias de clones de *Roseobacter* (pertenecientes a filotipos de los grupos *d*, *f* y *h* en la figura R1.10; 238 clones, 44%) estaban relacionadas con: (1) secuencias de clones obtenidos en un experimento en microcosmos de contaminación de agua costera oligotrófica (de la zona control analizada en este estudio) tratados con bajas concentraciones de diesel (Lanfranconi *et al.*, 2010); (2) secuencias obtenidas previamente en genotecas de puerto Adriano o la playa adyacente a su bocana (Aguiló-Ferretjans *et al.*, 2008); (3) en el caso del filotipo 6 (perteneciente al grupo *d*), con la secuencia de la especie *Tropicibacter naphthalenivorans*, una bacteria descrita como degradadora de hidrocarburos (Harwati *et al.*, 2009), y (4) con secuencias de microcosmos tratados con diesel y fosfato como se ha mencionado anteriormente. Podría hipotetizarse que las poblaciones de *Roseobacter* representadas por estas secuencias podrían

aprovecharse de la presencia de hidrocarburos en el ambiente portuario, y probablemente degradar algunos de ellos. Las capacidades catabólicas de los aislados de *Roseobacter* obtenidos en esta tesis apoyan la evidencia de que en estos ambientes encontramos bacterias de este grupo capaces de degradar un número variable de hidrocarburos aromáticos (tablas R3.3 y R3.4).

El resto de secuencias de clones de genotecas de puertos se afiliaban mayoritariamente con secuencias observadas previamente en muestras de agua de la zona costera próxima a puerto Adriano (Aguiló-Ferretjans *et al.*, 2008; Lanfranconi *et al.*, 2010) y probablemente representen bacterias del grupo *Roseobacter* presentes de forma natural en la zona costera de la Isla de Mallorca. Sin embargo, cabe mencionar que varios de los filotipos mayoritarios observados en marzo de 2009 en puertos (6, 25 y 32) no se observaron en las genotecas de la muestra control de ese muestreo (tabla R1.3). También se produjo la situación contraria. Había filotipos, como el 29, 30 y 31, que sólo se observaban en la genoteca de la muestra control, confirmándose así la evidencia previa de que determinadas poblaciones de *Roseobacter* quedarían excluidas de ambientes contaminados como los puertos (Nogales *et al.*, 2007; Aguiló-Ferretjans *et al.*, 2008).

En el estudio previo realizado por Lanfranconi y colaboradores (2010) se estudió la respuesta de la comunidad bacteriana a la adición de pequeñas cantidades de diesel, intentando simular un evento de contaminación debido a la explotación turística de las zonas costeras. Los resultados de ese estudio revelaron indicios de que el grupo *Roseobacter* respondía al tratamiento con diesel, aunque en ese caso se analizó la respuesta de la comunidad bacteriana total y no de este grupo en concreto. Una respuesta positiva del grupo *Roseobacter* a la contaminación con

hidrocarburos se había observado también en otros estudios que evaluaron cambios en la comunidad bacteriana total (ver tabla I2). El hecho de que en puertos se hubiera observado una correlación entre el grupo *Roseobacter* y la concentración de clorofila *a* (indicador indirecto de la disponibilidad de nutrientes), llevaba a plantearse si la respuesta de las poblaciones del grupo a la contaminación por hidrocarburos se veía condicionada por la presencia simultánea de nutrientes. No se ha de olvidar que la actividad de los puertos conlleva una perturbación compleja, que incluye la introducción de contaminantes (hidrocarburos, metales pesados, biocidas), así como el incremento en nutrientes (tabla I1). Todos estos factores, y/o su interacción, condicionan la composición de las comunidades microbianas en el interior de puertos y en la zona inmediatamente adyacente a sus bocanas (Nogales *et al.*, 2007).

Para analizar en detalle la respuesta de las poblaciones del grupo *Roseobacter* a la adición de diesel y nutrientes, se realizaron dos experimentos de microcosmos. Hasta el estudio realizado en esta tesis no se había realizado ningún trabajo de esta naturaleza, centrado en estudiar específicamente la respuesta del grupo *Roseobacter* a este tipo de contaminación. Además, los experimentos de microcosmos realizados en esta tesis se diferenciaban de trabajos anteriores (Cappello *et al.*, 2007; Coulon *et al.*, 2007; McKew *et al.*, 2007a; McKew *et al.*, 2007b), en que se utilizó un hidrocarburo refinado como es el diesel, que además se suministró en pequeñas cantidades acompañado también de bajas concentraciones de nitrógeno o fósforo. Con ello se pretendía simular condiciones más cercanas a las que pueden producirse en el ambiente.

Independientemente de la adición o no de nutrientes conjuntamente con diesel, la respuesta de la comunidad bacteriana fue igual de rápida. En

general, se produjo entre las 17 y 27 horas en función del tratamiento (figuras R2.1, R2.2 y R2.3), lo que es coherente con los resultados del estudio previo sin adición de nutrientes (Lanfranconi *et al.*, 2010). Sin embargo, cabe mencionar que los cambios fueron más acusados en el tratamiento con diesel y fosfato, tanto en la comunidad bacteriana total (figura R2.3), como en la diversidad del grupo *Roseobacter* (tabla R2.2). Atendiendo a los recuentos microscópicos de *Roseobacter*, tan sólo se evidenció un incremento significativo respecto al control tras el tratamiento con diesel y fosfato. Sin embargo, eso no significaba que en los demás tratamientos no se produjeran cambios en las poblaciones de *Roseobacter*. Así, todos los tratamientos provocaron un incremento en la abundancia relativa del T-RF 5'A248 y la del filotipo 6 medida por qRT-PCR (figuras R2.4c-d y R2.6), en especial, en los microcosmos tratados con diesel y nitrógeno. También todos los tratamientos causaron la disminución en la abundancia de la población o poblaciones representadas por el T-RF 5'A245 (Figura R2.4a,b) [coherente con lo observado en puertos, ya que este T-RF era minoritario y detectado de forma puntual (figura R1.12)]. Los resultados de esta tesis indicarían que la adición simultánea de diesel y nitrógeno tendría un efecto más favorable para ciertas poblaciones de *Roseobacter* que sólo la adición de diesel, o la adición de diesel conjuntamente con fósforo. Una posible explicación a esto sería que estas bacterias dispusiesen de mecanismos de captación de nitrógeno con mayor eficiencia que los de fósforo, o bien, que esta población se viera en desventaja al competir con las gammaproteobacterias (principalmente del género *Alteromonas*) que proliferaron en los microcosmos tratados con diesel y fosfato.

El objetivo final de esta tesis era la creación de una colección de aislados del grupo *Roseobacter* procedentes de ambientes sometidos a contaminación crónica, para realizar un estudio genómico y metabólico,

centrado en el análisis de su capacidad de degradar compuestos aromáticos. Debido a la relevancia de las bacterias del grupo *Roseobacter* en ambiente marino y la relativa facilidad de su cultivo, se dispone de mucha información genómica de aislados del grupo *Roseobacter* (Newton *et al.*, 2010). Sin embargo, entre todos los aislados cuyo genoma ha sido secuenciado solo hay dos (*Sagittula stellata* E-37 y *Sulfitobacter* sp. EE-36) para los cuales se había analizado su capacidad de crecimiento en compuestos aromáticos (Buchan *et al.*, 2000), aunque no se han publicado estudios posteriores profundizando en ello. Por otra parte, no se dispone del genoma de ninguno de los aislados degradadores de hidrocarburos obtenidos por Brito y colaboradores (2006) o Harwati y colaboradores (2007), ni siquiera de las especies tipo *Tranquillimonas alkanivorans* y *Tropicibacter naphthalenivorans* (Harwati *et al.*, 2008; 2009). Recientemente, nuestro grupo ha publicado el boceto del genoma de *Citreicella aestuarii* 357, cuyas capacidades catabólicas están siendo analizadas. Por lo tanto, la mayor parte de la información relativa a la supuesta capacidad de los miembros del grupo *Roseobacter* para degradar hidrocarburos procede de la búsqueda de genes homólogos en sus genomas (ver tabla I3 y figura I10) y no ha sido comprobada experimentalmente. Como muestran los resultados de esta tesis y se comenta a continuación esto puede llevar a conclusiones erróneas.

En esta tesis doctoral se ha generado una colección de 17 aislados del grupo *Roseobacter* procedentes de aguas de puertos. A diferencia de la colección de aislados del puerto de Semarang en Indonesia (Harwati *et al.*, 2007), es importante recordar que en este trabajo no se ha aplicado presión selectiva por hidrocarburos en el medio de cultivo sino que se ha utilizado un medio general para el aislamiento de bacterias heterótrofas marinas. Los aislados que se han obtenido en esta tesis se afiliaban a 8 géneros distintos. De todos ellos, dos géneros (*Tateyamaria* y

Thalassobacter) no se encontraban representados en las colecciones descritas previamente (Buchan *et al.*, 2000; Brito *et al.*, 2006; Harwati *et al.*, 2007; 2008; 2009). Además, Harwati y colaboradores no pudieron demostrar la degradación de componentes del crudo por parte de ninguno de sus aislados de *Ruegeria*. El único aislado de *Ruegeria* obtenido en esta tesis (6PALISEP08) creció a expensas de dos de los compuestos monoaromáticos ensayados, protocatecuato y fenilacetato (Tabla R3.3). Por lo tanto, los resultados de esta tesis, junto con los de los autores citados previamente, elevan a dieciséis los géneros del clado *Roseobacter* con representantes capaces de crecer o degradar diferentes hidrocarburos.

Además en este trabajo se ha realizado un análisis genómico de los aislados obtenidos. A pesar de las limitaciones de cobertura por la aproximación seguida (ver tabla R3.1) esto ha permitido comparar los resultados de la predicción de rutas catabólicas en los genomas (tabla R3.2 y figuras R3.4-R3.7) con los resultados experimentales de crecimiento de los aislados en diferentes hidrocarburos (tabla R3.3). Aunque en general hubo una buena correspondencia (en este trabajo se detectaron siete rutas de degradación de compuestos aromáticos en los genomas de los grupos de aislados y se comprobó la capacidad de éstos de crecer con estas fuentes de carbono), las incongruencias observadas entre el estudio genómico y los cultivos llevan a pensar en la necesidad de mejorar los mecanismos de detección de estos genes, así como su anotación. Así mismo, hay que incidir en los procedimientos de cultivo para mejorar los ensayos de crecimiento y degradación. Por ejemplo, resultaría interesante explorar con detalle la influencia de la luz, en base a los resultados obtenidos en este trabajo y por otros autores (T. McGenity, comunicación personal). Ninguno de los aislados de *Roseobacter* obtenidos en este estudio era capaz de producir bacterioclorofila *a*, ni se han encontrado genes para fototrofia anoxigénica aeróbica en los grupos

de genomas secuenciados por lo que no puede presumírseles este tipo de metabolismo. La información genómica generada en este estudio, así como los resultados de crecimiento en hidrocarburos, van a permitir la selección de los aislados más interesantes para los futuros estudios genómicos y bioquímicos planeados por el grupo de investigación.

Finalmente, un resultado interesante de esta tesis ha sido mostrar que ciertos aislados, que eran incapaces de crecer en cultivos puros con determinados hidrocarburos (benzoato, salicilato, homogentisato, homoprotocatecuato, y fenilacetato), eran capaces de hacerlo cuando eran incubados en cultivos mixtos (tablas R3.3 y R3.4). El caso del homoprotocatecuato es particularmente interesante porque ninguno de los aislados pudo crecer individualmente con esta fuente de carbono. En cambio, se observó crecimiento en los cuatro cultivos mixtos (cada uno de ellos formado por la totalidad de los aislados del correspondiente grupo genómico). Es importante tener en cuenta que en el ambiente los microorganismos no actúan de forma aislada, sino que cooperan en los procesos de degradación de hidrocarburos (Head *et al.*, 2006). Este resultado podría ser un ejemplo de cooperación metabólica, cuyo análisis será objeto de investigación en el grupo de investigación.

La presente tesis doctoral ha contribuido a mejorar el conocimiento de la diversidad del grupo *Roseobacter* de ambientes sometidos a impacto antropogénico como son los puertos deportivos, demostrándose claramente que es uno de los grupos predominantes en estas aguas y que su diversidad en estos ambientes es muy particular. Además, se ha comprobado que la respuesta del grupo a la contaminación por diesel y nutrientes no es uniforme, y que es importante analizar con detalle el papel de compuestos de nitrógeno y fósforo en la respuesta de determinadas poblaciones del grupo *Roseobacter*. Finalmente, se ha creado una

colección de miembros del grupo *Roseobacter* aislados de aguas de puertos, que ha ampliado la diversidad de géneros con representantes capaces de crecer o degradar hidrocarburos, y ha permitido por primera vez relacionar datos experimentales de crecimiento en hidrocarburos con datos genómicos en bacterias de este grupo.

CONCLUSIONES

1. El presente estudio ha demostrado que el clado *Roseobacter* es uno de los grupos predominantes en los puertos de la Isla de Mallorca estudiados, tanto en base a los recuentos de FISH con una sonda específicas como a la abundancia relativa de T-RFs identificativos del grupo (principalmente 5'A246 y 5'A248). El enriquecimiento en nutrientes del agua (demostrado en este trabajo por las concentraciones de clorofila *a*) ha resultado ser un factor relevante en la abundancia total de este grupo.
2. A pesar de las diferentes características y localización de los puertos estudiados, las comunidades bacterianas (total y *Alphaproteobacteria*) de puertos distintos mostraron elevados niveles de similitud, en ocasiones incluso mayores que las observadas entre muestras de un mismo puerto tomadas a diferentes tiempos. También fue similar la dinámica temporal de las comunidades en todos ellos, que estaba fuertemente condicionada por la temperatura del agua.
3. Las secuencias de 16S ARNr de clones del grupo *Roseobacter* obtenidas en los muestreos de septiembre 2008 y marzo 2009 se agrupaban principalmente en dos únicos filotipos (denominados 2 y 6), definidos con un umbral de similitud de secuencia alto (99%). En base a esto se puede postular que estos filotipos representarían dos especies particulares (o dos grupos de especies muy relacionadas), ampliamente distribuidas en puertos de la Isla de Mallorca. La cuantificación de la abundancia de los filotipos 2 y 6 en todas las muestras analizadas, tanto en base a sus T-RFs identificativos (5'A246 y 5'A248) como a los resultados de qPCR, demostró que estos filotipos, y particularmente el filotipo 6, eran

Conclusiones

numéricamente relevantes en la mayoría de los puertos y muestreos.

4. La temperatura del agua fue un factor determinante en la dinámica de las poblaciones del clado *Roseobacter* presentes en aguas de puertos, como se demostró por las correlaciones significativas con las abundancias relativas de los T-RFs 5'A246 y 5'A248, así como las determinadas por qPCR de los filotipos 2 y 6.
5. Aunque un 44% de las secuencias de 16S ARNr de genotecas de puertos se relacionaban con contaminación por hidrocarburos no se obtuvieron correlaciones significativas de la abundancia de los T-RFs 5'A246 y 5'A248, ni de los filotipos 2 y 6 con la concentración de hidrocarburos en el agua. Aunque la presencia de hidrocarburos es un factor determinante para la diversidad de *Roseobacter* como muestran los experimentos en microcosmos, sin duda existen otros factores que juegan un papel importante en la selección de determinadas poblaciones del clado *Roseobacter* en aguas de puertos y que no han sido evaluados en esta tesis.
6. En los experimentos de microcosmos con agua costera prístina tratada con diesel (con y sin adición simultánea de nitrógeno y fósforo) se demostró el incremento de bacterias del grupo *Roseobacter* cuantificables mediante FISH, aunque éste fue siempre inferior al de gammaproteobacterias, particularmente en el tratamiento con diesel y fosfato. En este tratamiento se observaron también las mayores divergencias en composición de la comunidad según los perfiles de T-RFLP para 16S ARNr. Diferentes poblaciones de *Roseobacter* (representadas por los T-RFs 5'A245 y 5'A248) se vieron afectadas de forma distinta por el tratamiento, lo que indica que ciertas poblaciones se ven potenciadas por la

presencia de hidrocarburos (y nutrientes), mientras que otras se ven afectadas negativamente.

7. En todos los tratamientos, pero principalmente en el de diesel y nitrato, se produjo un incremento de la abundancia relativa del T-RF 5'A248 y del filotipo 6 (cuantificado por qRT-PCR), ambos determinados como numéricamente relevantes en las muestras de puertos. Por lo tanto, la presencia de diesel en el agua, y sobretodo la disponibilidad de nitrato, podría ayudar a explicar la predominancia en estos ambientes de las poblaciones de *Roseobacter* representadas por estos indicadores. De forma similar, la presencia de diesel y la disponibilidad de fosfato podría ayudar a explicar la abundancia del filotipo 10 en algunos puertos como el de Palma, ya que en los microcosmos tratados con diesel y fosfato se seleccionaron bacterias con secuencias de 16S ARNr similares a este filotipo.
8. La variedad de aislados del clado *Roseobacter* procedentes de aguas de puertos (18 aislados distribuidos en 8 géneros), obtenidos sin presión selectiva por hidrocarburos, puso en evidencia la gran diversidad cultivable del grupo en estos ambientes. Se obtuvieron aislados de puertos distintos que, según los valores de similitud en secuencia de 16S ADNr, se podrían considerar como miembros de la misma especie. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por técnicas independientes de cultivo que también apuntan a la predominancia de poblaciones particulares de *Roseobacter* en los puertos analizados (por ejemplo, filotipos 2 y 6).
9. La técnica de MALDI-TOF ha demostrado ser de utilidad para la diferenciación rápida de aislados del clado *Roseobacter* proporcionando mayor resolución que la secuenciación de 16S

ADNr, pero no ha permitido la identificación de los aislados debido a las limitaciones de las bases de datos. Sin embargo, se ha contribuido a poner a punto una metodología, que combinando resultados de MALDI-TOF con proteómica *shotgun* mediante nanoLC-MS/MS ha permitido definir biomarcadores para la identificación de aislados ambientales, habiéndose demostrado su aplicación a la identificación de aislados del género *Ruegeria*.

10. La estrategia de agrupar aislados relacionados filogenéticamente para secuenciar conjuntamente sus genomas ha permitido la exploración de la diversidad de genes para el catabolismo de hidrocarburos en un total de 17 aislados, organizados en cuatro grupos, con un coste relativamente bajo. A pesar de que los valores de cobertura estimados fuesen bajos, su equivalencia para los diferentes grupos ha permitido compararlos en base al número y tipo de vías para la degradación de hidrocarburos aromáticos detectadas. Así se detectaron más rutas de degradación en los grupos G1 (aislados de *Ruegeria*, *Roseovarius* y *Phaeobacter*) y G2 (aislados de *Sulfitobacter* y *Tateyamaria*) que en los grupos G3 (aislados de *Thalassobacter*) y G4 (aislados de *Loktanella* y *Jannaschia*). En todos los grupos se detectaron genes para la vía del protocatecuato, que es la más frecuentemente observada en genomas del grupo *Roseobacter* según resultados previos de otros autores.
11. La mayoría de los aislados (17 de 18) fueron capaces de crecer, en cultivo puro, con al menos uno de los hidrocarburos aromáticos proporcionados como única fuente de carbono, y el 60% de ellos crecieron con al menos cuatro. La capacidad para crecer con compuestos aromáticos no estaba relacionada con ningún género

en concreto. Además, aislados del mismo género tenían diferentes patrones de crecimiento con hidrocarburos, lo que indica una gran diversidad en cuanto a sus capacidades. Por otra parte, los experimentos realizados en cultivos mixtos apuntan a la posibilidad de que se puede producir cooperación metabólica entre aislados diferentes para crecer en algunos de los compuestos aromáticos ensayados, entre los cuales destaca el ejemplo del homoprotocatecuato.

12. Aunque los datos genómicos de los grupos de aislados coinciden bien con los datos de cultivo, se han observado discrepancias (detección por homología de secuencia de rutas catabólicas para un compuesto pero ausencia de crecimiento de los aislados, y viceversa). Esto ha puesto de manifiesto la necesidad de mejorar la detección y anotación de los genes de las rutas de degradación de hidrocarburos en genomas de *Roseobacter*, así como de las técnicas de ensayo en cultivo.

BIBLIOGRAFÍA

-
- Aguiló-Ferretjans, M.M., Bosch, R., Martín-Cardona, C., Lalucat, J., Nogales, B. (2008) Phylogenetic analysis of the composition of bacterial communities in human exploited coastal environments from Mallorca Island (Spain). *Syst Appl Microbiol* **31**: 231–240.
- Aguiló-Ferretjans, M.M. (2009) Dinàmica espaciotemporal de comunitats bacterianes marines en relació a l'ús del litoral a l'illa de Mallorca. Tesis Doctoral. Universitat de les Illes Balears. 166 p.
- Allgaier, M., Uphoff, H., Felske, A., Wagner-Döbler, I. (2003) Aerobic anoxygenic photosynthesis in *Roseobacter* clade bacteria from diverse marine habitats. *Appl Environ Microbiol* **69**: 5051–5059.
- Alonso-Sáez, L., Balagué, V., Sà, E.L., Sánchez, O., González, J.M., Pinhassi, J., Massana, R., Pernthaler, J., Pedrós-Alió, C., Gasol, J.M. (2007) Seasonality in bacterial diversity in north-west Mediterranean coastal waters: assessment through clone libraries, fingerprinting and FISH. *FEMS Microbiol Ecol* **60**: 98–112.
- Alonso-Sáez, L., Sánchez, O., Gasol, J.M., Balagué, V., Pedrós-Alió, C. (2008) Winter-to-summer changes in the composition and single-cell activity of near-surface Arctic prokaryotes. *Environ Microbiol* **10**: 2444–2454.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**: 403–410.
- Amann, R.L., Binder, B.J., Olson, R.J., Chisholm, S.W., Devereux, R., Stahl, D.A. (1990) Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ Microbiol* **56**: 1919–1925.

Bibliografía

- Amann, R.I., Fuchs, B.M. (2008) Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence *in situ* hybridization techniques. *Nat Rev Microbiol* **6**: 339–348.
- Ashelford, K.E., Chuzhanova, N.A., Fry, J.C., Jones, A.J., Weightman, A.J. (2005) At least 1 in 20 16S rRNA sequence records currently held in public repositories is estimated to contain substantial anomalies. *Appl Environ Microbiol* **71**: 7724–7736.
- Ashelford, K.E., Chuzhamova, N.A. Fry, J.C., Jones, A.J., Weigthman, A.J. (2006) New screening software shows that most recent large 16S rRNA gene clone libraries contain chimeras. *Appl Environ Microbiol* **72**: 5734–5741.
- Ashen, J. B., Goff, L. J. (2000) Molecular and ecological evidence for species specificity and coevolution in a group of marine algal-bacterial symbioses. *Appl Environ Microbiol* **66**: 3024–3030.
- Aziz, A.K., Bartels, D., Best, A.A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R.A., Formsma, K., Gerdes, S., Glass, E.M., Kubal, M., Meyer, F., Olsen, G.J., Olson, R., Osterman, A.L., Overbeek, R.A., McNeil, L.K., Paarmann, D., Paczian, T., Parrello, B., Pusch, G.D., Reich, C., Stevens, R., Vassieva, O., Vonstein, V., Wilke, A., Zagnitko, O. (2008) The RAST server: Rapid annotation using subsystems technology. *BMC Genomics* **9**: 75–90.
- Bernabé, G., Bernabé-Quet, R. (2000) Man and the shore. *En: Ecology and management of coastal waters. The aquatic environment.* (ed. Bernabé y Bernabé-Quet). Springer, Praxis Publishing Londres. pp. 117–132.

-
- Berthe-Corti, L., Bruns, A. (1999) The impact of oxygen tension on cell density and metabolic diversity of microbial communities in alkane degrading continuous-flow cultures. *Microb Ecol.* **37**: 70–77.
- Berthe-Corti, L., Nachtkamp, M. (2010). Bacterial communities in hydrocarbon-contaminated marine coastal environments. *En: Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology.* (ed. Timmis, K.N.) Springer-Verlag Berlin Heidelberg pp. 2349–2359.
- Biebl, H., Allgaier, M., Tindall, B.J., Koblizek, M., Luensdorf, H., Pukall, R. Wagner-Döbler, I. (2005). *Dinoroseobacter shibae* gen. nov., sp. nov., a new aerobic phototrophic bacterium isolated from dinoflagellates. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**: 1089–1096.
- Boettcher, K.J., Geaghan, K.K., Maloy, A.P., Barber, B.J. (2005) *Roseovarius crassostreae* sp. nov., a member of the *Roseobacter* clade and the apparent cause of juvenile oyster disease (JOD) in cultured Eastern oysters. *Int J Syst Evol Microbiol.* **55**: 1531–1537.
- Brakstad, O.G., Lødeng, A.G.G. (2005) Microbial diversity during biodegradation of crude oil in seawater from the North Sea. *Microb Ecol* **49**: 94–103.
- Bray, J.R., Curtis, J.T. (1957) An ordination of the upland forest communities of southern Wisconsin. *Ecol Monogr* **27**: 325–349.
- Brinkhoff, T., Giebel, H.A., Simon, M. (2008) Diversity, ecology, and genomics of the *Roseobacter* clade: a short overview. *Arch Microbiol* **189**:531–539.
- Brinkmeyer, R., Rappé, M., Gallacher, S., Medlin, L. (2000) Development of clade (*Roseobacter* and *Alteromonas*) and taxon-specific

Bibliografía

- oligonucleotide probes to study interactions between toxic dinoflagellates and their associated bacteria. *Eur J Phycol* **35**: 315–329.
- Brito, E.M.S., Guyoneaud, R., Goñi-Urriza, M., Ranchou-Peyruse, A., Verbaere, A., Crapez, M.A.C., Wasserman, J.C.A., Duran, R. (2006) Characterization of hydrocarbonoclastic bacterial communities from mangrove sediments in Guanabara Bay, Brazil. *Res Microbiol* **157**: 752–762.
- Brooijmans, R.J.W., Pastink, M.I., Siezen, R.J. (2009) Hydrocarbon-degrading bacteria: the oil-spill clean-up crew. *Microb Biotechnol* **2**: 587–594.
- Buchan, A., Collier, L.S., Neidle, E.L., Moran, M.A. (2000) Key aromatic-ring-cleaving enzyme, protocatechuate 3,4-dioxygenase, in the ecologically important marine *Roseobacter* lineage. *Appl Environ Microbiol* **66**: 4662–4672.
- Buchan, A., González, J.M., Moran, M.A. (2005) Overview of the marine *Roseobacter* lineage. *Appl Environ Microbiol* **71**: 5665–5677.
- Buchan, A., González, J.M. (2010) *Roseobacter*. *En: Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*. (ed. Timmis, K.N.) Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp. 1335–1343.
- Cappello, S., Caruso, G., Zampino, D., Monticelli, L.S., Maimone, G., Denaro, R., Tripodo, B., Troussellier, M., Yakimov, M., Giuliano, L. (2007) Microbial community dynamics during assays of harbour oil spill bioremediation: a microscale simulation study. *J Appl Microbiol* **102**: 184–194.
- Chang, Y.J., Stephen, J.R., Richter, A.P., Venosa, A.D., Brüggemann, J., Macnaughton, S.J., Kowalchuk, G.A., Haines, J.R., Kline, E., White,

-
- D.C. (2000) Phylogenetic analysis of aerobic freshwater and marine enrichment cultures efficient in hydrocarbon degradation: effect of profiling method. *J Microbiol Methods* **40**: 19–31.
- Cho, J.C., Giovannoni, S.J. (2004) Cultivation and growth characteristics of a diverse group of oligotrophic marine *Gammaproteobacteria*. *Appl Environ Microbiol* **70**: 432–440.
- Choi, D.H., Cho, J.C., Lanoil, B.D., Giovannoni, S.J., Cho, B.C. (2007) *Maribius salinus* gen. nov., sp. nov., isolated from a solar saltern and *Maribius pelagius* sp. nov., cultured from the Sargasso Sea, belonging to the *Roseobacter* clade. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**: 270–275.
- Christie-Oleza, J.A., Fernandez, B., Nogales, B., Bosch, R., Armengaud, J. (2012a) Proteomic insights into the lifestyle of an environmentally relevant marine bacterium. *ISME J* **6**: 124–135.
- Christie-Oleza, J.A., Piña-Villalonga, J.M., Guerin, P., Miotello, G., Bosch, R., Nogales, B., Armengaud, J. (2012b) Shotgun nanoLC-MS/MS proteogenomics to document MALDI-TOF biomarkers for screening new members of the *Ruegeria* genus. *Environ Microbiol* DOI: 10.1111/j.1462-2920.2012.02812.x.
- Cloern, J.E. (2001) Our evolving conceptual model of the coastal eutrophication problem. *Mar Ecol Prog Ser* **210**: 223–253.
- Cloern, J.E., Jassby, A.D. (2008) Complex seasonal patterns of primary producers at the land–sea interface. *Ecol Lett* **11**: 1294–1303.
- Conselleria de Turisme i Esports. INESTUR – CITTIB (2011) El turisme a les Illes Balears. Anuari 2011. Conselleria de Turisme i Esports. Govern de les Illes Balears.

Bibliografía

- Coulon, F., McKew, B.A., Osborn, A.M., McGenity, T.J., Timmmis, K.N. (2007) Effects of temperature and biostimulation on oil-degrading microbial communities in temperate estuarine waters. *Environ Microbiol* **9**: 177–186.
- Crain, C.M., Kroeker, K., Halpern, B. (2009) Interactive and cumulative effects of multiple human stressors in marine systems. *Ecol Lett* **11**: 1304–1315.
- Daims, H., Bruhl, A., Amann, R., Schleifer, K. -H., Wagner, M. (1999) The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all *Bacteria*: development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Syst Appl Microbiol* **22**: 434–444.
- Demergasso, C., Escudero, L., Casamayor, E.O., Chong, G., Balagué, V., Pedrós-Alió, C. (2008) Novelty and spatio-temporal heterogeneity in the bacterial diversity of hypersaline Lake Tebenquiche (Salar de Atacama). *Extremophiles* **12**: 491–504.
- Denaro, R., D'Auria, G., Di Marco, G. Genovese, M., Troussellier, M., Yakimov, M.M., Giuliano, L. (2005) Assessing terminal restriction fragment length polymorphism suitability for the description of bacterial community structure and dynamics in hydrocarbon-polluted marine environments. *Environ Microbiol* **7**: 78–87.
- Dice, L.R. (1945) Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology* **26**: 297–302.
- Duarte, C.M., Agustí, S., Kennedy, H., Vaque, D. (1999) The Mediterranean climate as a template for Mediterranean marine ecosystems: the example of the Northeast Spanish littoral. *Prog. Oceanogr.* **44**: 245–270.

-
- Echeveste, P., Agustí, S., Dachs, J. (2010) Cell size dependent toxicity thresholds of polycyclic aromatic hydrocarbons to natural and cultured phytoplankton populations. *Environ Poll* **158**: 299–307.
- European Environment Agency, (EEA) (2006) Priority issues in the Mediterranean environment. EEA Report No. 4. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg. pp. 88.
- European Environment Agency, (EEA) (2010) Marine and coastal environment – SOER 2010 thematic assessment. The European environment. State and outlook 2010. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg. pp. 55.
- Fahy, A., Lethbridge, G., Earle, R., Ball, A.S., Timmis, K.N., McGenity, T.J. (2005) Effects of long-term benzene pollution on bacterial diversity and community structure in groundwater. *Environ Microbiol* **7**: 1192–1199.
- Ferraro, G., Meyer-Roux, S., Muellenhoff, O., Pavliha, M., Svetak, J., Tarchi, D., Topouzelis, K. (2009) Long term monitoring of oil spills in the European seas. *Int J Remote Sens* **30**: 627–645.
- Garrity, G.M., Bell, J.A., and Lilburn, T. (2005) Family I. *Oceanospirillaceae* fam. nov. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed. Vol. 2 (The *Proteobacteria*), part B (The *Gammaproteobacteria*). (ed. Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T., and Garrity, G.M.) Springer, New York, USA. pp. 271–295.
- Gauthier, M.J., Lafay, B., Christen, R., Fernández, L., Acquaviva, M., Bonin, P., Bertrand, J.C. (1992) *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* gen. nov., sp. nov., a new, extremely halotolerant, hydrocarbon-degrading marine bacterium. *Int J Syst Bacteriol* **42**: 568–576.

- Giuliano, L., De Domenico, M., De Domenico, E., Höfle, M.G., Yakimov, M.M. (1999) Identification of culturable oligotrophic bacteria within naturally occurring bacterioplankton communities of the Ligurian sea by 16S rRNA sequencing and probing. *Microb Ecol* **37**: 77–85.
- Glöckner, F.O., Amann, R., Alfreider, A., Pernthaler, J., Psenner, R., Trebesius, K., and Schleifer, K.-H. (1996) An *in situ* hybridization protocol for detection and identification of planktonic bacteria. *Syst Appl Microbiol* **19**: 403–406.
- González, J.M., Moran, M.A. (1997) Numerical dominance of a group of marine bacteria in the α -subclass of the class *Proteobacteria* in coastal seawater. *Appl Environ Microbiol* **63**: 4237–4242.
- González, J.M., Mayer, F., Moran, M.A., Hodson, R.E., Whitman, W.B. (1997) *Sagittula stellata* gen. nov., sp. nov., a lignin-transforming bacterium from a coastal environment. *Int J Syst Bacteriol* **47**: 773–780.
- González, J., Figueiras, F.G., Aranguren-Gassis, M., Crespo, B.G., Fernández, E., Morán, X.A.G., Nieto-Cid, M. (2009) Effect of a simulated oil spill on natural assemblages of marine phytoplankton enclosed in microcosms. *Est Coast Shelf Sci* **83**: 265–276.
- Halpern, B.S., Selkoe, K.A., Micheli, F. y Kappel, C.V. (2007) Evaluating and ranking the vulnerability of global marine ecosystems to anthropogenic threats. *Conserv Biol* **21**: 1301–1315.
- Halpern, B.S., Walbridge, S., Selkoe, K.A., Kappel, C.V., Micheli, F., D'Agrosa, C., Bruno, J.F., Casey, K.S., Ebert, C., Fox, H.E., Fujita, R., Heinemann, D., Lenihan, H.S., Madin, E.M., Perry, M.T., Selig, E.R., Spalding, M., Steneck, R., Watson, R. (2008) A global map of human impact on marine ecosystems. *Science* **139**: 948–952.

-
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T., Ryan, P.D. (2001) PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol Electron* **4**: 1–9.
- Hara, A., Syutsubo, K., Harayama, S. (2003) *Alcanivorax* which prevails in oil-contaminated seawater exhibits broad substrate specificity for alkane degradation. *Environ Microbiol* **5**: 746–753.
- Harayama, S., Kasai, Y., Hara, A. (2004) Microbial communities in oil-contaminated seawater. *Curr Opin Biotech.* **15**: 205–214.
- Harwati, T.U., Kasai, Y., Kodama, Y., Susilaningih, D., Watanabe, K. (2007) Characterization of diverse hydrocarbon-degrading bacteria isolated from Indonesian seawater. *Microbes Environ* **22**: 412–415.
- Harwati, T.U., Kasai, Y., Kodama, Y., Susilaningih, D., Watanabe, K. (2008) *Tranquillimonas alkanivorans* gen. nov., sp. nov., an alkane-degrading bacterium isolated from Semarang Port in Indonesia. . *Int J Syst Evol Microbiol* **58**: 2118–2121.
- Harwati, T. U., Kasai, Y., Kodama, Y., Susilaningih, D., Watanabe, K. (2009) *Tropicibacter naphthalenivorans* gen. nov., sp. nov., a polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from Semarang Port in Indonesia. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**: 392–396.
- Head, I.M., Jones, D.M., Röling, W.F.M. (2006) Marine microorganisms make a meal of oil. *Nat Rev Microbiol* **4**: 173–182.
- Hedlund, B.P., Geiselbrecht, A.D., Bair, T.J., Staley, J.T. (1999) Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by a new marine bacterium, *Neptunomonas naphthovorans* gen. nov., sp. nov. *Appl Environ Microbiol* **65**: 251–259.

Bibliografía

- Hernandez-Raquet, G., Budzinski, H., Caumette, P., Dabert, P., Le Ménach, K. (2006) Molecular diversity studies of bacterial communities of oil polluted microbial mats from the Etang de Berre (France). *FEMS Microbiol Ecol* **58**: 550–562.
- Instituto de Estadística de las Islas Baleares (Ibestad):
<http://ibestat.caib.es/ibestat/page>.
- Islam, M.S., Tanaka, M. (2004) Impact of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: a review and synthesis. *Mar Pollut Bull* **48**: 624–649.
- ISO:9377-2:2000. Calidad del agua. Determinación del índice de hidrocarburos. Parte 2: Método por extracción con disolvente y cromatografía de gases. (Septiembre 2001).
- Iwabuchi, N., Sunairi, M., Urai, M., Itoh, C., Anzai, H., Nakajima, M., Harayama, S. (2002). Extracellular polysaccharides of *Rhodococcus rhodochrous* S-2 stimulate the degradation of aromatic components in crude oil by indigenous marine bacteria. *Appl Environ Microbiol* **68**: 2337–2343.
- Joint group of experts on the scientific aspects of marine environmental protection, GESAMEP. (2007) Estimates of oil entering the marine environment from sea-based activities. Reports and studies, GESAMEP, 75. UN, UNEP, FAO, UNESCO-IOC, WMO, UNIDO, IMO, IAEA, London. pp. 83.
- Jukes, T.H., and Cantor, C.R. (1969) Evolution of protein molecules. *En: Mammalian Protein Metabolism*. (ed. Munro, H.N.) Academic Press, New York, USA. pp. 21–132.

-
- Kalhoefer, D., Thole, S., Voget, S., Lehmann, R., Liesegang, H., Wollher, A., Daniel, R., Simon, M., Brinkhoff, T. (2011) Comparative genome analysis and genome-guided physiological analysis of *Roseobacter litoralis*. *BMC Genomics*. **12**: 324.
- Kan, J., Evans, S.E., Cheng, F., Suzuki, M.T. (2008) Novel estuarine bacterioplankton in rRNA operon libraries from the Chesapeake Bay. *Aquat Microb Ecol* **51**: 55–66.
- Kasai, Y., Kishira, H., Sasaki, T., Syutsubo, K., Watanabe, K., Harayama, S. (2002) Predominant growth of *Alcanivorax* strains in oil-contaminated and nutrient supplemented sea water. *Environ Microbiol* **4**: 141–147.
- Lane, D.J. (1991) 16S/23S rRNA sequencing. *En: Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. (eds. Stackebrandt, E., and Goodfellow, M.). UK: Wiley. Chichester pp. 115–175.
- Lanfranconi, M.P. (2010) Funtional response of marine microbial communities to diesel pollution. Tesis doctoral. Universitat de les Illes Balears. 157 p.
- Lanfranconi, M.P., Bosch, R., Nogales, B. (2010) Short-term changes in composition of active marine bacterial assemblages in response to diesel oil pollution. *Microb Biotechnol* **3**: 607–621.
- Lebaron, P., Servais, P., Troussellier, M., Courties, C., Vives-Rego, J., Muyzer, G., Bernard, L., Guindulain, T., Schäfer, H., Stackebrandt, E. (1999) Changes in bacterial community structure in seawater mesocosms differing in their nutrient status. *Aquat Microb Ecol* **19**: 255–267.

Bibliografía

- Lee, Z.M., Bussema, C., Schmidt, T.M. (2009) rrnDB: documenting the number of rRNA and tRNA genes in bacteria and archaea. *Nucleic Acids Res* **37**: 1–5.
- Liu L., Li, Y., Zhang, J., Zhou, Z., Liu, J., Li, X., Zhou, J., Du, G., Wang, L., Chen, J. (2011) Complete genome sequence of the industrial strain *Ketogulonicigenium vulgare* WSH-001. *J Bacteriol.* **193**: 6108–6109.
- López-Jurado, J.L., Marcos, M., Monserrat, S. (2008) Hydrographic conditions affecting two fishing grounds of Mallorca island (Western Mediterranean): during the IDEA Project (2003-2004). *J Mar Syst* **71**: 303–315.
- Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richter, L., Meier, H., Yadhukumar, Buchner, A., Lai, T., Steppi, S., Jobb, G., Förster, W., Brettske, I., Gerber, S., Ginhart, A.W., Gross, O., Grumann, S., Hermann, S., Jost, R., König, A., Liss, T., Lüssmann, R., May, M., Nonhoff, B., Reichel, B., Strehlow, R., Stamatakis, A., Stuckmann, N., Vilbig, A., Lenke, M., Ludwig, T., Bode, A., Schleifer, K.H. (2004) ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res* **32**: 1363–1371.
- Ma, Y., Xiong, H., Tang, S., Yang, Q., and Li, M. (2009) Comparison of the community structure of planktonic bacteria in ballast water from entry ships and local sea water in Xiamen Port. *Prog Nat Sci* **19**: 947–953.
- Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M., Schelifer, K.H. (1992) Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of *Proteobacteria*: problems and solutions. *Syst Appl Microbiol* **15**: 593-600.
- Martens, T., Heidorn, T., Pukall, R., Simon, M., Tindall, B.J., Brinkhov, T. (2006) Reclassification of *Roseobacter gallaeciensis* Ruiz-Ponte *et al.*

-
- 1998 as *Phaeobacter gallaeciensis* gen. nov., comb. nov., description of *Phaeobacter inhibens* sp. nov., reclassification of *Ruegeria algicola* (Lafay *et al.* 1995) Uchino *et al.* 1998 as *Marinovum algicola* gen. nov., comb. nov., and emended descriptions of the genera *Roseobacter*, *Ruegeria*, and *Leisingera*. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**: 1293–1304.
- Math, R.K., Jin, H.M., Kim, J.M., Hahn, Y., Park, W., Madsen, E.L., Jeon, C.O. (2012) Comparative genomics reveals adaptation by *Alteromonas* sp. SN2 to marine tidal-flat conditions: cold tolerance and aromatic hydrocarbon metabolism. *PLoS One* **7**: e35784.
- McKew, B.A., Coulon, F., Osborn, A.M., Timmis, K.N., McGenity, T.J. (2007a) Determining the identity and roles of oil-metabolizing marine bacteria from the Thames estuary, UK. *Environ Microbiol* **9**: 165–176.
- McKew, B.A., Coulon, F., Yakimov M.M., Denaro, R., Genovese, M., Smith, C.J., Osborn, A.M., Timmis, K.N., McGenity, T.J. (2007b) Efficacy of intervention strategies for bioremediation of crude oil in marine systems and effects on indigenous hydrocarbonoclastic bacteria. *Environ Microbiol* **9**: 1562–1571.
- Meyer, F., Paarmann, D., D'Souza, M., Olson, R., Glass, E. M., Kubal, M., Paczian, T., Rodriguez, A., Stevens, R., Wilke, A., Wilkening, J., Edwards, R.A. (2008). The metagenomics RAST server-a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. *BMC Bioinformatics* **9**: 386–394.
- Moran, M.A., González, J.M., Kiene, R.P. (2003) Linking a bacterial taxon to sulfur cycling in the sea: studies of the marine *Roseobacter* group. *Geomicrobiol J* **20**: 375–88.

- Moran, M.A., Buchan, A., González, J.M., Heidelberg, J.F., Whitman, W. B., Kiene, R.P., Henriksen, J.R., King, G.M., Belas, R., Fuqua, C., Brinkac, L., Lewis, M., Johri, S., Weaver, B., Pai, G., Eisen, J.A., Rahe, E., Sheldon, W.M., Ye, W., Miller, T.R., Carlton, J., Rasko, D.A., Paulsen, I.T., Ren, Q., Daugherty, S.C., Deboy, R.T., Dodson, R.J., Durkin, A.S., Madupu, R., Nelson, W.C., Sullivan, S.A., Rosovitz, M.J., Haft, D.H., Selengut, J., Ward, N. (2004) Genome sequence of *Silicibacter pomeroyi* reveals adaptations to the marine environment. *Nature* **432**: 910–913.
- Moran, M.A., Belas, R., Schell, M.A., González, J.M., Sun, F., Sun, S., Binder, B.J., Edmonds, J., Ye, W., Orcutt, B., Howard, E.C., Meile, C., Palefsky, W., Goesmann, A., Ren, Q., Paulsen, I., Ulrich, L.E., Thompson, L.S., Saunders, E., Buchan, A. (2007) Ecological genomics of marine roseobacters. *Appl Environ Microbiol* **73**: 4559–4569.
- Moran, M.A., Miller, W.L. (2007) Resourceful heterotrophs make the most of light in the coastal ocean. *Nat Rev Microbiol*. **5**: 792–800.
- Morris, R.M., Rappé, M.S., Connon, S.A., Vergin, K.L., Siebold, W.A., Carlson, C.A., Giovannoni, S.J. (2002) SAR11 clade dominates ocean surface bacterioplankton communities. *Nature* **420**: 806–810.
- Muyzer, G., Brinkhoff, T., Nübel, U., Santegoeds, C., Schäfer, H., Waver, C. (1998). Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology. *En: A. D. L. Akkermans, J. D. van Elsas, F. J. Bruijn (ed.). En: Molecular Microbial Ecology Manual. Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, Países Bajos. pp 1–27.*
- Neef, A. (1997) Anwendung der in situ Einzelzell-Identifizierung von Bakterien zur Populationsanalyse in komplexen mikrobiellen Biozönosen. Doctoral thesis. Technische Universität München.

-
- Newton, R.J., Griffin, L.E., Bowles, K.M., Meile, C., Gifford, S., Givens, C.E., Howard, E.C., King, E., Oakley, C.A., Reisch, C.R., Rinta-Kanto, J.M., Sharma, S., Sun, S., Varaljay, V., Vila-Costa, M., Westrich, J.R., Moran, M.A. (2010) Genome characteristics of a generalist marine bacterial lineage. *ISME J* **4**: 784–798.
- Nogales, B., Timmis, K.N., Nedwell, D.B., Osborn, A.M. (2002) Detection and diversity of expressed denitrification genes in estuarine sediments after reverse transcription-PCR amplification from mRNA. *Appl Environ Microbiol* **68**: 5017–5025.
- Nogales, B., Aguiló-Ferretjans, M.M., Martín-Cardona, C., Lalucat, J., Bosch, R. (2007) Bacterial diversity, composition and dynamics in and around recreational coastal areas. *Environ Microbiol* **9**: 1913–1929.
- Nogales, B. (2010) Harbors and marinas. *En: Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology.* (ed. Timmis, K.N.) Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp. 2361–2367.
- Nogales, B., Lanfranconi, M.P., Piña-Villalonga, J.M., Bosch, R. (2011) Anthropogenic perturbations in marine microbial communities. *FEMS Microbiol Rev* **35**: 275–298.
- Onishchenko, O.M., Kiprianova, E.A. (2004) Bacteria of the genus *Psychrobacter* isolated from water of the Black Sea. *Microbiology* **73**: 287–288.
- Osborn, A.M., Moore, E.R.B., Timmis, K.N. (2000) An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environ Microbiol* **2**: 39–50.

- Overbeek, R., Begley, T., Butler, R.M., Choudhuri, J.V., Chuang, H.Y., Cohoon, M., de Crécy-Lagard, V., Diaz, N., Disz, T., Edwards, R., Fonstein, M., Frank, E.D., Gerdes, S., Glass, E.M., Goesmann, A., Hanson, A., Iwata-Reuyl, D., Jensen, R., Jamshidi, N., Krause, L., Kubal, M., Larsen, N., Linke, B., McHardy, A.C., Meyer, F., Neuweger, H., Olsen, G., Olson, R., Osterman, A., Portnoy, V., Pusch, G.D., Rodionov, D.A., Rückert, C., Steiner, J., Stevens, R., Thiele, I., Vassieva, O., Ye, Y., Zagnitko, O., Vonstein, V. (2005) The subsystems approach to genome annotation and its use in the project to annotate 1000 genomes. *Nucleic Acids Res* **33**: 5691–5702.
- Paerl, H.W. (2006) Assessing and managing nutrient-enhanced eutrophication in estuarine and coastal waters: interactive effects of human and climatic perturbations. *Ecol Eng* **26**: 40–54.
- Pearson, W.R., y Lipman, D.J. (1988) Improved tools for biological sequence comparison. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 2444–2448.
- Pinhassi, J., Simó, R., González, J.M., Vila, M., Alonso-Sáez, L., Kiene, R.P., Moran MA, Pedrós-Alió C. (2005) Dimethylsulfoniopropionate turnover is linked to the composition and dynamics of the bacterioplankton assemblage during a microcosm phytoplankton bloom. *Appl Environ Microbiol* **71**: 7650–7660.
- Poretsky, R.S., Sun, S., Mou, X., Moran, M.A. (2010) Transporter genes expressed by coastal bacterioplankton in response to dissolved organic carbon. *Environ Microbiol* **12**: 616–627.
- Prabakaran, S.R., Manorama, R., Delille, D., Shivaji, S. (2007) Predominance of *Roseobacter*, *Sulfitobacter*, *Glaciecola* and *Psychrobacter* in seawater collected off Ushuaia, Argentina, Sub-Antarctica. *FEMS Microbiol Ecol* **59**: 342–355.

-
- Pruesse, E., Quast, C., Knittel, K., Fuchs, B., Ludwig, W., Peplies, J., Glöckner, F.O. (2007) SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned rRNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Res* **35**: 7188–7196.
- Röling, W.F.M., Milner, M.G., Jones, D.M., Lee, K., Daniel, F., Swannell, R.J.P., Head, I.M. (2002) Robust hydrocarbon degradation and dynamics of bacterial communities during nutrient-enhanced oil spill bioremediation. *Appl Environ Microbiol* **68**: 5537–5548.
- Saitou, N., Nei, M. (1987) The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**: 406–425.
- Sambrook, J., Russell, D.W. (2001) Molecular cloning, a laboratory manual, vol.1. CSHL Press, New York. pp.1659.
- Schauer, M., Massana, R., Pedrós-Alió, C. (2000) Spatial differences in bacterioplankton composition along the Catalan coast (NW Mediterranean) assessed by molecular fingerprinting. *FEMS Microbiol Ecol* **33**: 51–59.
- Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., Lesniewski, R.A., Oakley, B.B., Parks, D.H., Robinson, C.J., Sahl, J.W., Stres, B., Thallinger, G.G., Van Horn, D.J., Weber, C.F. (2009) Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* **75**: 7337–7341.
- Seyedsayamdost, M.R., Case, R.J., Kolter, R., Clardy, J. (2011) The Jekyll-and-Hyde chemistry of *Phaeobacter gallaeciensis*. *Nat Chem* **3**: 331–335.

Bibliografía

- Shi, Y., McCarren, J., DeLong, E. (2012) Transcriptional responses of surface water marine microbial assemblages to deep-sea water amendment. *Environ Microbiol* **14**: 191–206.
- Shiba, T. (1991) *Roseobacter litoralis* gen. nov., sp.nov., and *Roseobacter denitrificans* sp.nov., aerobic pink-pigmented bacteria which contain bacteriochlorophyll *a*. *Syst Appl Microbiol* **14**: 140–145.
- Smith, C.J., Danilowicz, B.S., Clear, A.K., Costello, F.J., Wilson, B., Meijer, W.G. (2005) T-Align, a web-based tool for comparison of multiple terminal restriction fragment length polymorphism profiles. *FEMS Microbiol Ecol* **54**: 375–380.
- Sneath, P.H., Sokal, R.R. (1962) Numerical Taxonomy. *Nature* **193**: 855–860.
- Stackebrandt, E., Ebers, J. (2006) Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiol today*. **133**: 152–155.
- Suárez-Suárez, L. Y., Brunet-Galmés, I., Piña-Villalonga, J. M., Christie-Oleza, J. A., Peña, A., Bennasar, A., Armengaud, J., Nogales, B., Bosch, R. Draft genome of *Citricella aestuarii* strain 357, a member of the *Roseobacter* clade isolated without xenobiotic pressure from petroleum-polluted beach. *J Bacteriol* DOI:10.1128/JB.01261-12.
- Swingle, W.D., Sadekar, S., Mastrian, S.D., Matthies, S.D., Hao, J., Ramos, H., Acharya, C.R., Conrad, A.L., Taylor, L.H., Dejesa, L.C., Shah, M.K., O'Huallachain, M.E., Lince, M.T., Blankenship, R.T., Beatty, J.T., Touchman, J.W. (2007) The complete genome sequence of *Roseobacter denitrificans* reveals a mixotrophic rather than photosynthetic metabolism. *J Bacteriol* **189**: 683–690.

-
- Tang, K.H., Feng, X., Tang, Y.J., Blankenship, R. E. (2009) Carbohydrate metabolism and carbon fixation in *Roseobacter denitrificans* OCh114. *PLoS One* 4: e7233.
- Tait, R.V., Dipper, F.A. (1998) The oceans. *En: Elements of marine ecology*. Oxford: Butterworth Heinemann. Londres. pp. 1–24.
- Teramoto, K., Sato, H., Sun, L., Torimura, M., Tao, H., Yoshikawa, H., Hotta, Y., Hosoda, A., Tamura, H. (2007) Phylogenetic classification of *Pseudomonas putida* strains by MALDI-MS using ribosomal subunit proteins as biomarkers. *Anal Chem* **79**: 8712–8719.
- Valentine, N. B., Wunschel, S. C., Wunschel, D. S., Petersen, C. E., Wahl, K. L. (2005) Effect of culture conditions on microorganism identification by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol* **71**: 58–64.
- Van Hamme, J.D., Singh, A., Ward, O.P. (2003) Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**: 503–549.
- Wagner-Döbler, I., Biebl, H. (2006) Environmental biology of the marine *Roseobacter* lineage. *Annu Rev Microbiol* **60**:255–280.
- Wagner-Dobler, I., Ballhausen, B., Berger, M., Brinkhoff, T., Buchholz, I., Bunk, B., Cypionka, H., Daniel, R., Drepper, T., Gerds, G., Hahnk, S., Han, C., Jahn, D., Kalhoefer, D., Kiss, H., Klenk, H.P., Kyrpides, N., Liebl, W., Liesegang, H., Meincke, L., Pati, A., Petersen, J., Piekarski, T., Pommerenke, C., Pradella, S., Pukall, R., Rabus, R., Stackebrandt, E., Thole, S., Thompson, L., Tielen, p., Tomasch, J., von Jan, M., Wanphrut, N., Wichels, A., Zech, H., Simon, M (2010) The complete genome sequence of the algal symbiont *Dinoroseobacter shibae*: a hitchhiker's guide to life in the sea. *ISME J* **4**: 61–77.

Bibliografía

- Warnecke, F., Amann, R., Pernthaler, J. (2004) Actinobacterial 16S rRNA genes from freshwater habitats cluster in four distinct lineages. *Environ Microbiol* **6**: 242–253.
- Welker, M. (2011) Proteomics for routine identification of microorganisms. *Proteomics* **11**: 3143–3153.
- Welker, M., Moore, E.R.B. (2011) Applications of whole-cell matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in systematic microbiology. *Syst Appl Microbiol* **34**: 2–11.
- Xiong, X.H., Han, S., Wang, J.H., Jiang, Z.H., Chen, W., Jia, N., Wei, H.L., Cheng, H., Yang, Y.X., Zhu, B., You, S., He, J.Y., Hou, W., Chen, M.X., Yu, C.J., Jiao, Y.H., Zhang, W.C. (2011) Complete genome sequence of the bacterium *Ketogulonicigenium vulgare* Y25. *J Bacteriol.* **193**: 315–316.
- Yakimov, M.M., Denaro, R., Genovese, M., Cappello, S., D'Auria, G., Chernikova, T.N., Timmis, K.N., Golyshin, P.N., Giluliano, L. (2005) Natural microbial diversity in superficial sediments of Milazzo Harbor (Sicily) and community successions during microcosm enrichment with various hydrocarbons. *Environ Microbiol* **7**: 1426–1441.
- Yakimov, M.M., Timmis, K.N., Golyshin, P.N. (2007) Obligate oil-degrading marine bacteria. *Curr Opin Biotech* **18**: 257–266.
- Yi, H., Lim, Y.W., Chun, J. (2007) Taxonomic evaluation of the genera *Ruegeria* and *Silicibacter*: a proposal to transfer the genus *Silicibacter* Petursdottir and Kristjansson 1999 to the genus *Ruegeria* Uchino *et al.* 1999. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**: 815–819.
- Ying, J.Y., Wang, B.J., Dai, X., Yang, S.S., Liu, S.J., Liu, Z.P. (2007) *Wenxinia marina* gen. nov., sp. nov., a novel member of the

Roseobacter clade isolated from oilfield sediments of the South China Sea. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**: 1711–1716.

Zemb, O., West, N., Bourrain, M., Godon, J.J., Lebaron, P. (2010) Effect of a transient perturbation on marine bacterial communities with contrasting history. *J Appl Microbiol* **109**: 751–762.

Zhang, R., Liu, B., Lau, S.C.K., Ki, J.S., Qian, P.Y. (2007) Particle-attached and free-living bacterial communities in a contrasting marine environment: Victoria Harbor, Hong Kong. *FEMS Microbiol Ecol* **61**: 496–508.

Zhang, R., Lau, S.C.K., Ki, J.S., Thiyagarajan, V., Qian, P.Y. (2009) Response of bacterioplankton community structures to hydrological conditions and anthropogenic pollution in contrasting subtropical environments. *FEMS Microbiol Ecol* **69**: 449–460.

ANEXO

Listado de tablas del anexo

Tabla A1: Números de acceso de las secuencias de clones detectadas en el estudio de puertos (capítulo 1).

Tabla A2: Números de acceso de las secuencias de clones detectadas en el estudio de microcosmos (capítulo 2).

Tabla A3: Secuencias presentes en las ramas colapsadas de la figura R3.1.

Tabla A4: Tabla de similitudes de secuencia de 16S ADNr de los aislados estudiados en el capítulo 3.

Tabla A5: Listado de genomas del grupo *Roseobacter* analizados en el capítulo 3.

Listado del figuras del anexo

Figura A1: Abundancia relativa del filotipo 2 en puertos a lo largo de todo el periodo de muestreo.

Figura A2: Abundancia relativa del filotipo 6 en puertos a lo largo de todo el periodo de muestreo.

Figura A3: Recuentos de número total de procariontes pasadas 24 horas de incubación. Se representa la media de los valores obtenidos de los dos experimentos.

Figura A4: Dendrograma basado en los espectros de MALDI-TOF calculado por UPGMA mediante el coeficiente de Dice, incluyendo las cepas de referencia.

Tabla A1: Números de acceso de las secuencias de clones detectadas en el estudio de puertos (capítulo 1).

Nº acceso	Secuencia ^a	F	Septiembre							Marzo								T ^b
			a	b	c	d	e	f	g	a	b	c	d	e	f	g	h	
HE981231	53SOLSEP08	1				2												2
HE981232	24RATSEP08	1							1									1
HE981233	51RATSEP08	1							2									2
HE981234	14SOLSEP08	2				1												1
HE981235	15SOLSEP08	2				1												1
HE981236	84SOLSEP08	2				1												1
HE981237	85SOLSEP08	2				1												1
HE981238	86SOLSEP08	2				1												1
HE981239	87SOLSEP08	2				1												1
HE981240	94SOLSEP08	2				1												1
HE981241	26SOLSEP08	2	1		1	9												11
HE981242	30SOLSEP08	2				1												1
HE981243	31SOLSEP08	2				1												1
HE981244	39SOLSEP08	2				1												1
HE981245	42SOLSEP08	2				1												1
HE981246	56SOLSEP08	2				1												1
HE981247	102SOLSEP08	2				1												1
HE981248	105SOLSEP08	2				1												1
HE981249	115SOLSEP08	2				1												1
HE981250	60SOLSEP08	2				1												1
HE981251	63SOLSEP08	2	4			5		1	2									12
HE981252	67SOLSEP08	2				1												1
HE981253	69SOLSEP08	2				1												1
HE981254	77SOLSEP08	2				1												1
HE981255	99SOLSEP08	2				1												1
HE981256	14RATSEP08	2							1									1
HE981257	9RATSEP08	6							1									1
HE981258	110RATSEP08	2							1									1
HE981259	44RATSEP08	2							1									1
HE981260	63RATSEP08	2							1									1
HE981261	52ALCSEP08	2						1										1
HE981262	105PALSEP08	2	1															1
HE981263	119PALSEP08	2	1															1
HE981264	74PALSEP08	2	1															1
HE981265	115RATSEP08	2							1									1
HE981266	32SOLSEP08	2				1												1
HE981267	74SOLSEP08	2				1												1
HE981268	119SOLSEP08	2				1												1

Anexo

Nº acceso	Secuencia ^a	F	Septiembre							Marzo							T ^b	
			a	b	c	d	e	f	g	a	b	c	d	e	f	g		h
HE981269	117SOLSEP08	2				1												1
HE981270	116SOLSEP08	2				1												1
HE981271	110PALSEP08	2	1															1
HE981272	113PALSEP08	2	1															1
HE981273	25PALSEP08	2	4		2	11	1	3	1									22
HE981274	26PALSEP08	2	1															1
HE981275	41PALSEP08	2	1															1
HE981276	4PALSEP08	2	1															1
HE981277	52PALSEP08	2	2															2
HE981278	6PALSEP08	2	1															1
HE981279	77PALSEP08	2	1															1
HE981280	79PALSEP08	2	1															1
HE981281	87PALSEP08	2	1															1
HE981282	91PALSEP08	2	1															1
HE981283	92PALSEP08	2	1															1
HE981284	96PALSEP08	2	1															1
HE981285	9PALSEP08	2	1															1
HE981286	118PALSEP08	2	1															1
HE981287	16PALSEP08	2	1															1
HE981288	49PALSEP08	2	8		5	1												14
HE981289	60PALSEP08	2	1															1
HE981290	8PALSEP08	2	1															1
HE981291	13PALSEP08	2	1															1
HE981292	62PALSEP08	2	1															1
HE981293	98PALSEP08	2	1															1
HE981294	11PALSEP08	2	1															1
HE981295	39PALSEP08	2	1															1
HE981296	43PALSEP08	2	1															1
HE981297	58PALSEP08	2	1															1
HE981298	11FIGSEP08	2						2	1									3
HE981299	12FIGSEP08	2								1								1
HE981300	14FIGSEP08	2				1				4								5
HE981301	19FIGSEP08	2								1								1
HE981302	20FIGSEP08	2								1								1
HE981303	22FIGSEP08	2								1								1
HE981304	23FIGSEP08	2								1								1
HE981305	24FIGSEP08	2								1								1
HE981306	26FIGSEP08	2								1								1
HE981307	29FIGSEP08	2								1								1
HE981308	30FIGSEP08	2								1								1
HE981309	31FIGSEP08	2								1								1

Anexo

Nºacceso	Secuencia ^a	F	Septiembre							Marzo								T ^b
			a	b	c	d	e	f	g	a	b	c	d	e	f	g	h	
HE981310	32FIGSEP08	2							1									1
HE981311	33FIGSEP08	2							1									1
HE981312	34FIGSEP08	2							1									1
HE981313	3FIGSEP08	2							1									1
HE981314	6FIGSEP08	2							1									1
HE981315	7FIGSEP08	2							1									1
HE981316	59FIGSEP08	2							1									1
HE981317	60FIGSEP08	2						1	1									2
HE981318	64FIGSEP08	2							1									1
HE981319	65FIGSEP08	2							1									1
HE981320	79FIGSEP08	2	1			2			1									4
HE981321	107ANDSEP08	2			1													1
HE981322	109ANDSEP08	2			1													1
HE981323	112ANDSEP08	2			1													1
HE981324	114ANDSEP08	2			1													1
HE981325	115ANDSEP08	2			1													1
HE981326	25ANDSEP08	2			1													1
HE981327	27ANDSEP08	2			1													1
HE981328	2ANDSEP08	2			1													1
HE981329	34ANDSEP08	2			1													1
HE981330	35ANDSEP08	2			1													1
HE981331	6ANDSEP08	2			1													1
HE981332	7ANDSEP08	2			1													1
HE981333	87ANDSEP08	2			1													1
HE981334	16ANDSEP08	2			1													1
HE981335	67ANDSEP08	2			1													1
HE981336	9ANDSEP08	2			1													1
HE981337	18ANDMAR09	2										1						1
HE981338	73ANDSEP08	3			1													1
HE981339	32ANDMAR09	4										1						1
HE981340	109PALSEP08	5	1															1
HE981341	88PALSEP08	5	1															1
HE981342	22PALSEP08	5	1															1
HE981343	27PALSEP08	5	1															1
HE981344	83PALSEP08	5	1					1										2
HE981345	14PALSEP08	5	1															1
HE981346	101PALSEP08	5	1															1
HE981347	70PALSEP08	5	1															1
HE981348	85PALSEP08	5	1															1
HE981349	105ANDSEP08	5	1		1													2
HE981350	47ANDSEP08	5			1													1

Anexo

Nºacceso	Secuencia ^a	F	Septiembre							Marzo								T ^b	
			a	b	c	d	e	f	g	a	b	c	d	e	f	g	h		
HE981351	57ANDSEP08	5			1														1
HE981352	60ANDSEP08	5			1														1
HE981353	102ANDMAR09	5										1							1
HE981354	28CONMAR09	5															1	1	1
HE981355	34CONMAR09	5	1														1	2	2
HE981356	47CONMAR09	5															1	1	1
HE981357	11RATSEP08	1						1											1
HE981358	12RATSEP08	6						1											1
HE981359	53RATSEP08	6						1											1
HE981360	58RATSEP08	6						1											1
HE981361	76RATSEP08	6						1											1
HE981362	79RATSEP08	6						1											1
HE981363	80RATSEP08	6						1											1
HE981364	13FIGSEP08	6								1									1
HE981365	27FIGSEP08	6								1									1
HE981366	8FIGSEP08	6								1									1
HE981367	25PALMAR09	6									1								1
HE981368	98PALMAR09	6									1		1						2
HE981369	48ADRMAR09	6										1							1
HE981370	17SOLMAR09	6												1					1
HE981371	37SOLMAR09	6												1					1
HE981372	48SOLMAR09	6												1					1
HE981373	7SOLMAR09	6	1			2		4	1	2		9	3		11	7			40
HE981374	152SOLMAR09	6												1					1
HE981375	50SOLMAR09	6												1					1
HE981376	53SOLMAR09	6												1					1
HE981377	54SOLMAR09	6												1					1
HE981378	65SOLMAR09	6												1					1
HE981379	68SOLMAR09	6												1					1
HE981380	73SOLMAR09	6												1					1
HE981381	97RATSEP08	6						1											1
HE981382	15ANDMAR09	6											1						1
HE981383	33ANDMAR09	6											2						2
HE981384	46ANDMAR09	6											1						1
HE981385	55ANDMAR09	6											1						1
HE981386	58ANDMAR09	6											1						1
HE981387	72ANDMAR09	6											1						1
HE981388	77ANDMAR09	6											1						1
HE981389	37ALCMAR09	6													1				1
HE981390	109RATMAR09	6													1		1		1
HE981391	16RATMAR09	6													1				1

Anexo

Nºacceso	Secuencia ^a	F	Septiembre							Marzo							T ^b
			a	b	c	d	e	f	g	a	b	c	d	e	f	g	
HE981392	19RATMAR09	6												1			1
HE981393	44RATMAR09	6												1			1
HE981394	31RATMAR09	6												1			1
HE981395	103RATMAR09	6												1			1
HE981396	74RATMAR09	6												1			1
HE981397	116FIGMAR09	6													1		1
HE981398	122FIGMAR09	6												2	2		4
HE981399	126FIGMAR09	6													1		1
HE981400	127FIGMAR09	6													1		1
HE981401	135FIGMAR09	6													1		1
HE981402	136FIGMAR09	6													1		1
HE981403	80FIGMAR09	6													1		1
HE981404	32FIGMAR09	6													1		1
HE981405	40FIGMAR09	6													1		1
HE981406	11FIGMAR09	6													1		1
HE981407	13FIGMAR09	6													1		1
HE981408	17FIGMAR09	6													1		1
HE981409	24FIGMAR09	6													1		1
HE981410	3FIGMAR09	6													1		1
HE981411	50FIGMAR09	6													1		1
HE981412	59FIGMAR09	6													1		1
HE981413	61FIGMAR09	6													1		1
HE981414	74FIGMAR09	6													1		1
HE981415	12RATMAR09	6												1			1
HE981416	29RATMAR09	6												1			1
HE981417	40RATMAR09	6												1			1
HE981418	41RATMAR09	6												1			1
HE981419	49RATMAR09	6												1			1
HE981420	56RATMAR09	6												1			1
HE981421	64RATMAR09	6												1			1
HE981422	72RATMAR09	6												1			1
HE981423	73RATMAR09	6												1			1
HE981424	89RATMAR09	6												1			1
HE981425	36FIGMAR09	6													1		1
HE981426	7FIGMAR09	6													1		1
HE981427	95RATSEP08	6							1								1
HE981428	28RATSEP08	7							1								1
HE981429	86RATSEP08	7							1								1
HE981430	47ALCMAR09	7												1			1
HE981431	7RATSEP08	7							1								1
HE981432	74RATSEP08	7							1								1

Anexo

Nºacceso	Secuencia ^a	F	Septiembre							Marzo								T ^b
			a	b	c	d	e	f	g	a	b	c	d	e	f	g	h	
HE981433	75ALCSEP08	8					1											1
HE981434	5SOLSEP08	1				1												1
HE981435	27ALCSEP08	9					1											1
HE981436	89PALSEP08	9	1															1
HE981437	41ANDSEP08	9			1													1
HE981438	10PALMAR09	10								1								1
HE981439	28PALMAR09	10								1								1
HE981440	33PALMAR09	10								1								1
HE981441	58PALMAR09	10								1								1
HE981442	5PALMAR09	10								1								1
HE981443	103PALMAR09	10								1								1
HE981444	105PALMAR09	10								1								1
HE981445	95PALMAR09	10								1								1
HE981446	96PALMAR09	10								1								1
HE981447	99PALMAR09	10								1								1
HE981448	110PALMAR09	10								1								1
HE981449	115PALMAR09	10								2								2
HE981450	106ADMAR09	10									1							1
HE981451	100ANDMAR09	10								1		1						2
HE981452	108ANDMAR09	10										1	1					2
HE981453	86ANDMAR09	10								6	1	1						8
HE981454	89ANDMAR09	10										1						1
HE981455	105CONMAR09	10														1		1
HE981456	37RATMAR09	10												1				1
HE981457	70RATMAR09	35												1				1
HE981458	86ALCMAR09	10											1					1
HE981459	77ALCSEP08	10						1										1
HE981460	41ANDMAR09	11										1						1
HE981461	92PALMAR09	12									1							1
HE981462	83RATMAR09	12												1				1
HE981463	101ANDMAR09	13										1						1
HE981464	94ANDMAR09	13										1						1
HE981465	5RATMAR09	13												1				1
HE981466	62PALMAR09	14									1							1
HE981467	57ADMAR09	14										1						1
HE981468	75ADMAR09	14										1						1
HE981469	76ADMAR09	14										1						1
HE981470	9ADMAR09	9										1						1
HE981471	6SOLMAR09	14												1				1
HE981472	9SOLMAR09	14												1				1
HE981473	60SOLMAR09	14												1				1

Anexo

Nº acceso	Secuencia ^a	F	Septiembre							Marzo							T ^b	
			a	b	c	d	e	f	g	a	b	c	d	e	f	g		h
HE981474	7ANDMAR09	14									2	1					1	4
HE981475	45ALCMAR09	14												1				1
HE981476	56CONMAR09	14															1	1
HE981477	71CONMAR09	14															1	1
HE981478	70ANDMAR09	15									1							1
HE981479	54FIGMAR09	15														1		1
HE981480	111ADRMAR09	16									1							1
HE981481	114ADRMAR09	17									1							1
HE981482	89ADRMAR09	17									2							2
HE981483	112PALMAR09	18								1								1
HE981484	77ADRMAR09	18									1							1
HE981485	16SOLMAR09	18											1					1
HE981486	3CONMAR09	18															1	1
HE981487	42CONMAR09	18															1	1
HE981488	48CONMAR09	18															1	1
HE981489	70CONMAR09	18															1	1
HE981490	66ADRMAR09	19									1							1
HE981491	64SOLMAR09	19												1				1
HE981492	6ANDMAR09	19										1						1
HE981493	125FIGMAR09	19														1		1
HE981494	4CONMAR09	19															1	1
HE981495	8CONMAR09	19															1	1
HE981496	84CONMAR09	19															1	1
HE981497	117RATSEP08	20							1									1
HE981498	88ADRSEP08	21		1														1
HE981499	66ADRSEP08	21		1														1
HE981500	21FIGSEP08	22								1								1
HE981501	57PALSEP08	23	1															1
HE981502	12ANDMAR09	24										1						1
HE981503	149ALCMAR09	24													1			1
HE981504	53PALMAR09	25								1								1
HE981505	4ANDMAR09	25										1						1
HE981506	28ANDMAR09	25										1						1
HE981507	61ANDMAR09	26										1						1
HE981508	62ANDMAR09	26										1						1
HE981509	52FIGMAR09	27														1		1
HE981510	23CONMAR09	28															1	1
HE981511	27CONMAR09	29															1	1
HE981512	100CONMAR09	29															1	1
HE981513	30CONMAR09	30															1	1
HE981514	31CONMAR09	30															1	1

Anexo

Nº acceso	Secuencia ^a	F	Septiembre							Marzo							T ^b	
			a	b	c	d	e	f	g	a	b	c	d	e	f	g		h
HE981515	86CONMAR09	30															1	1
HE981516	44CONMAR09	31															1	1
HE981517	10ADMAR09	32									1							1
HE981518	13ADMAR09	32									1							1
HE981519	24ADMAR09	32									1							1
HE981520	28ADMAR09	32									1							1
HE981521	30ADMAR09	32									1							1
HE981522	45ADMAR09	32									1							1
HE981523	56ADMAR09	32									1							1
HE981524	62ADMAR09	32									1							1
HE981525	80ADMAR09	32									1							1
HE981526	103ADMAR09	32									1							1
HE981527	104ADMAR09	32									1							1
HE981528	107ADMAR09	32									1							1
HE981529	108ADMAR09	32									1							1
HE981530	112ADMAR09	32									1							1
HE981531	115ADMAR09	32									1							1
HE981532	35SOLMAR09	32												1				1
HE981533	103ALCMAR09	32													1			1
HE981534	105ALCMAR09	32													1			1
HE981535	115ALCMAR09	32													1			1
HE981536	122ALCMAR09	32													1			1
HE981537	159ALCMAR09	32													1			1
HE981538	30ALCMAR09	32													1			1
HE981539	44ALCMAR09	32													1			1
HE981540	94ALCMAR09	32													1			1
HE981541	111ALCMAR09	32									2				4			6
HE981542	118ALCMAR09	32													1			1
HE981543	137ALCMAR09	32													1			1
HE981544	152ALCMAR09	32									3				3			6
HE981545	20RATSEP08	34							1									1
HE981546	91ALCMAR09	33													1			1
HE981547	43RATMAR09	35														1		1
HE981548	4PALMAR09	39									1							1
HE981549	155ALCMAR09	37													1			1
HE981550	33ALCMAR09	36													1			1
HE981551	59RATMAR09	38														1		1
HE981552	58SOLSEP08	1					1											1
HE981553	62SOLSEP08	1					1											1
HE981554	111RATSEP08	1							1									1
HE981555	59RATSEP08	1							1									1

Anexo

Nº acceso	Secuencia ^a	F	Septiembre							Marzo							T ^b	
			a	b	c	d	e	f	g	a	b	c	d	e	f	g		h
HE981556	48RATSEP08	1						1										1
HE981557	18SOLSEP08	3				1												1
HE981558	21SOLSEP08	4				1												1
HE981559	2FIGSEP08	5							1									1
HE981560	23ANDSEP08	2			1													1
HE981561	33ANDSEP08	3			1													1
HE981562	118SOLMAR09	4											1					1
HE981563	69PALSEP08	5	1															1
HE981564	30PALSEP08	5	1															1
HE981565	92SOLSEP08	5				1												1
HE981566	109ADMAR09	5									1							1
HE981567	151ALCMAR09	5												1				1
HE981568	11SOLSEP08	5				1												1
HE981569	1SOLSEP08	5				1												1
HE981570	37SOLSEP08	5				1		1										2
HE981571	43RATSEP08	5						1										1
HE981572	99RATSEP08	5						1										1
HE981573	15FIGSEP08	5							1									1
HE981574	1FIGSEP08	5							1									1
HE981575	62FIGSEP08	5							1									1
HE981576	56ANDMAR09	5										1						1
HE981577	14ADRSEP08	7		1														1
HE981578	96RATSEP08	6						1										1
HE981579	93PALSEP08	8	1															1
HE981580	2PALMAR09	10									1							1
HE981581	31PALMAR09	6									1							1
HE981582	36PALMAR09	6									1							1
HE981583	52PALMAR09	8									1							1
HE981584	65PALMAR09	11									1							1
HE981585	107PALMAR09	13									1							1
HE981586	67ADMAR09	6										1						1
HE981587	102ADMAR09	10										1						1
HE981588	81ANDMAR09	10											1					1
HE981589	129FIGMAR09	6													1			1
HE981590	42RATMAR09	6												1				1
HE981591	43FIGMAR09	6														1		1
HE981592	53ADMAR09	14										1						1
HE981593	137SOLMAR09	14											1					1
HE981594	113PALMAR09	14									1							1
HE981595	1ADMAR09	15										1						1
HE981596	128FIGMAR09	24														1		1

Anexo

Nº acceso	Secuencia ^a	F	Septiembre							Marzo							T ^b
			a	b	c	d	e	f	g	a	b	c	d	e	f	g	
HE981597	130FIGMAR09	15													1		1
HE981598	34FIGMAR09	18													1		1
HE981599	45CONMAR09	17														1	1
HE981600	74CONMAR09	19														1	1
HE981601	104PALMAR09	25								1							1
HE981602	97PALMAR09	25								1							1
HE981603	107SOLMAR09	25											1				1
HE981604	85PALMAR09	25								1							1
HE981605	53RATMAR09	25												1			1
HE981606	51ANDMAR09	25									1						1
HE981607	133FIGMAR09	25													1		1
HE981608	41FIGMAR09	25													1		1
HE981609	104ANDMAR09	27										1					1
HE981610	65FIGMAR09	30													1		1
HE981611	35CONMAR09	30														1	1
HE981612	59CONMAR09	30														1	1
HE981613	120ADRMAR09	39								1							1
HE981614	156SOLMAR09	32											1				1
HE981615	136ALCMAR09	36												1			1
HE981616	154ALCMAR09	32												1			1
HE981617	32RATMAR09	38													1		1
HE981618	73CONMAR09	30														1	1
HE981619	108RATSEP08	2							1								1
HE981620	65RATSEP08	2							1								1
HE981621	17ADRSEP08	21		1													1
HE981622	83RATSEP08	2							1								1

^a Se agruparon las secuencias al 100% de similitud y se envió a la base de datos únicamente una secuencia representante de cada grupo que es el que consta en la tabla.

^b Abreviaturas: F: filotipo; a: Palma; b: Adriano; c: Andratx; d: Sóller; e: Alcudia; f: Ratjada; g: Figuera; h: Control; T: Total.

Tabla A2: Números de acceso de las secuencias de clones detectadas en el estudio de microcosmos (capítulo 2).

Nº acceso	Secuencia ^a	F	C1	C2	D1	D+N1	D+P1	D+P2 ^b	Total
HE981623	3C1	1	1						1
HE981624	7C1	11	1						1
HE981625	10C1	11	1						1
HE981626	11C1	14	1						1
HE981627	12C1	11	1						1
HE981628	18C1	21	1						1
HE981629	20C1	4	1						1
HE981630	22C1	22	1						1
HE981631	24C1	24	1						1
HE981632	31C1	1	1						1
HE981633	40C1	1	1						1
HE981634	61C1	1	1						1
HE981635	64C1	4	1	1					2
HE981636	91C1	6	1						1
HE981637	93C1	11	1						1
HE981638	2C2	6		1					1
HE981639	4C2	9		1					1
HE981640	23C2	11		1					1
HE981641	33C2	13		1					1
HE981642	35C2	4		1					1
HE981643	37C2	18		2					2
HE981644	40C2	8		1					1
HE981645	47C2	4		1					1
HE981646	56C2	17		1					1
HE981647	66C2	4		1					1
HE981648	67C2	8		1					1
HE981649	1D1	11			1				1
HE981650	2D1	8			1				1
HE981651	15D1	1			1				1
HE981652	16D1	12			1				1
HE981653	19D1	1			2				2
HE981654	20D1	6			1				1
HE981655	22D1	1			1				1
HE981656	26D1	1			1				1
HE981657	36D1	1			1				1
HE981658	2DN1	22				1			1
HE981659	6DN1	5				1			1
HE981660	12DN1	10				1			1
HE981661	17DN1	5				1			1

Anexo

Nº acceso	Secuencia ^a	F	C1	C2	D1	D+N1	D+P1	D+P2 ^b	Total
HE981662	22DN1	1				1			1
HE981663	23DN1	12				1			1
HE981664	31DN1	1				1			1
HE981665	36DN1	3				1			1
HE981666	37DN1	8				1			1
HE981667	50DN1	1				1			1
HE981668	57DN1	22				1			1
HE981669	71DN1	20				1			1
HE981670	72DN1	15				1			1
HE981671	73DN1	8				1	1		2
HE981672	75DN1	1				1			1
HE981673	78DN1	10				1			1
HE981674	80DN1	4				1			1
HE981675	2DF1	10					1		1
HE981676	6DF1	7					1		1
HE981677	7DF1	10					1		1
HE981678	12DF1	8					1		1
HE981679	14DF1	8					1		1
HE981680	18DF1	8					1		1
HE981681	19DF1	8					1		1
HE981682	22DF1	8					1		1
HE981683	23DF1	8					1	1	2
HE981684	24DF1	15					1		1
HE981685	27DF1	8					1		1
HE981686	30DF1	8					1		1
HE981687	35DF1	10					1		1
HE981688	36DF1	8					1		1
HE981689	38DF1	8					1		1
HE981690	49DF1	15					1		1
HE981691	52DF1	10					1		1
HE981692	53DF1	16					1		1
HE981693	54DF1	8					1		1
HE981694	56DF1	1					1		1
HE981695	64DF1	10					1		1
HE981696	10DF2	8						1	1
HE981697	11DF2	2						2	2
HE981698	12DF2	6						1	1
HE981699	13DF2	6						1	1
HE981700	14DF2	8						1	1
HE981701	16DF2	8						1	1
HE981702	19DF2	2						1	1
HE981703	20DF2	1						1	1

Nº acceso	Secuencia ^a	F	C1	C2	D1	D+N1	D+P1	D+P2 ^b	Total
HE981704	21DF2	8						1	1
HE981705	23DF2	8						1	1
HE981706	25DF2	9						1	1
HE981707	28DF2	6						1	1
HE981708	30DF2	23						1	1
HE981709	31DF2	10						1	1
HE981710	32DF2	8						1	1
HE981711	33DF2	8						1	1
HE981712	34DF2	10						1	1
HE981713	36DF2	2						1	1
HE981714	40DF2	1						1	1
HE981715	46DF2	19						1	1
HE981716	50DF2	6						1	1
HE981717	52DF2	10						1	1
HE981718	54DF2	1						1	1
HE981719	56DF2	18						1	1

^a Se agruparon las secuencias al 100% de similitud y se envió a la base de datos únicamente una secuencia representante de cada grupo que es el que consta en la tabla.

^b Abreviaturas: F: filotipo; C: control; D: diesel; D+N: diesel y nitrógeno; D+P: diesel y fósforo; los números indican el experimento 1 ó 2.

Anexo

Tabla A3: Secuencias presentes en las ramas colapsadas de la figura R3.1.

Grupo	Secuencia	Tipo de secuencia	Nº acceso
a	24C1	Filotipo microcosmos (1 clon)	HE981631
	84CONMAR09	Filotipo puertos (8 clones)	HE981496
	20C1	Filotipo microcosmos (6 clones)	HE981629
	73ANDSEP08	Filotipo puertos (3 clones)	HE981338
	71DN1	Filotipo microcosmos (1 clon)	HE981669
	44CONMAR09	Filotipo puertos (1 clon)	HE981516
	57PALSEP08	Filotipo puertos (1 clon)	HE981501
	34ANDSEP08	Filotipo puertos (175 clones)	HE981329
	3CONMAR09	Filotipo puertos (8 clones)	HE981486
	61C1	Filotipo microcosmos (18 clon)	HE981634
	30CONMAR09	Filotipo puertos (7 clones)	HE981513
	23DN1	Filotipo microcosmos (2 clones)	HE981663
	47ANDSEP08	Filotipo puertos (34 clones)	HE981350
	b	<i>Ruegeria atlantica</i>	Especie tipo
<i>Ruegeria lacuscaerulensis</i>		Especie tipo	U77644
<i>Ruegeria mobilis</i>		Especie tipo	AB255401
<i>Ruegeria pelagia</i>		Especie tipo	DQ916141
c	<i>Pseudoruegeria aquimaris</i>	Especie tipo	DQ675021
	<i>Pseudoruegeria lutimaris</i>	Especie tipo	FJ374173
	<i>Celeribacter neptunius</i>	Especie tipo	FJ535354
	<i>Nautella italica</i>	Especie tipo	AM904562
	<i>Roseovarius crassostreae</i>	Especie tipo	AF114484
	41ANDSEP08	Filotipo puertos (4 clones)	HE981437
	<i>Roseovarius nubinhibens</i>	Especie tipo	AF098495
d	56C2	Filotipo microcosmos (1 clon)	HE981646
	48RATSEP08	Filotipo puertos (10 clones)	HE981556
	20RATSEP08	Filotipo puertos (1 clon)	HE981545
	<i>Roseovarius aestuarii</i>	Especie tipo	EU156066
	75ALCSEP08	Filotipos puertos (3 clones)	HE981433
	<i>Roseovarius halotolerans</i>	Especie tipo	EU431217
	<i>Roseovarius pacificus</i>	Especie tipo	DQ120726
e	<i>Tranquillimonas alkanivorans</i>	Especie tipo	AB302386
	<i>Roseivivax halodurans</i>	Especie tipo	D85829

Grupo	Secuencia	Tipo de secuencia	Nº acceso
e	<i>Salipiger mucosus</i>	Especie tipo	AY527274
	<i>Roseivivax halotolerans</i>	Especie tipo	D85831
	<i>Marivita cryptomonadis</i>	Especie tipo	EU512919
	<i>Citricella thiooxidans</i>	Especie tipo	AY639887
	<i>Yangia pacifica</i>	Especie tipo	AJ877265
f	<i>Roseivivax lentus</i>	Especie tipo	FJ875966
	7RATSEP08	Filotipo puertos (6 clones)	HE981497
	<i>Thalassococcus halodurans</i>	Especie tipo	DQ397336
g	33ALCMAR09	Filotipo puertos (2 clones)	HE981550
	<i>Octadecabacter antarcticus</i>	Especie tipo	U14583
	<i>Octadecabacter arcticus</i>	Especie tipo	U73725
	91ALCMAR09	Filotipo puertos (1 clon)	HE981546
	70RATMAR09	Filotipo puertos (2 clones)	HE981457
	<i>Thalassobius gelatinovorans</i>	Especie tipo	D88523
	<i>Thalassobius aestuarii</i>	Especie tipo	AY442178
h	<i>Thalassobius mediterraneus</i>	Especie tipo	AJ878874
	<i>Marivita litorea</i>	Especie tipo	EU512918
	<i>Marivita cryptomonadis</i>	Especie tipo	EU512919
i	<i>Marivita byunsanensis</i>	Especie tipo	FJ467624
	<i>Oceanicola pacificus</i>	Especie tipo	DQ659449
	<i>Saemankumia lutimaris</i>	Especie tipo	EU336981
	<i>Oceanicola nanhaiensis</i>	Especie tipo	DQ414420
	<i>Maritimibacter alkaliphilus</i>	Especie tipo	DQ915443
	<i>Oceanicola batsensis</i>	Especie tipo	AY424898
j	<i>Oceanicola nitratireducens</i>	Especie tipo	EU581832
	<i>Leisingera aquimarina</i>	Especie tipo	AM900415
	<i>Leisingera methylohalidivorans</i>	Especie tipo	AY005463
	<i>Phaeobacter caeruleus</i>	Especie tipo	AM943630
k	<i>Phaeobacter daeponensis</i>	Especie tipo	DQ981486
	<i>Phaeobacter gallaeciensis</i>	Especie tipo	Y13244
l	<i>Phaeobacter inhibens</i>	Especie tipo	AY177712
	<i>Antarctobacter heliothermus</i>	Especie tipo	Y11552
i	<i>Ponticoccus litoralis</i>	Especie tipo	EF211829
	<i>Mameliella alba</i>	Especie tipo	EU734592

Anexo

Grupo	Secuencia	Tipo de secuencia	Nº acceso
l	<i>Pelagibaca bermudensis</i>	Especie tipo	DQ178660
	<i>Tropicibacter naphthalenivorans</i>	Especie tipo	AB302370
	<i>Pontibaca methylaminivorans</i>	Especie tipo	AJ505788
	<i>Orientalimare eburneum</i>	Especie tipo	DQ667965
	<i>Donghicola xiamenensis</i>	Especie tipo	DQ120728
m	12DN1	Filotipo microcosmos (10 clones)	HE981660
	<i>Nereida ignava</i>	Especie tipo	AJ748748
	32ANDMAR09	Filotipo puertos (4 clones)	HE981339
	4ANDMAR09	Filotipo puertos (4 clones)	HE981505
	20D1	Filotipo microcosmos (8 clones)	HE981654
	126FIGMAR09	Filotipo puertos (122 clones)	HE981399
	149ALCMAR09	Filotipo puertos (3 clones)	HE981503
	130FIGMAR09	Filotipo puertos (5 clones)	HE981597
o	<i>Sulfitobacter brevis</i>	Especie tipo	Y16425
	<i>Sulfitobacter marinus</i>	Especie tipo	DQ683726
	<i>Sulfitobacter litoralis</i>	Especie tipo	DQ097527
p	<i>Roseobacter denitrificans</i>	Especie tipo	EF512126
	<i>Roseobacter litoralis</i>	Especie tipo	X78312
	<i>Seohicola saemankumensis</i>	Especie tipo	EU221274
q	49DF1	Filotipo microcosmos (3 clones)	HE981690
	53DF1	Filotipo microcosmos (1 clon)	HE981692
	41ANDMAR09	Filotipo puertos (2 clones)	HE981460
	19DF2	Filotipo microcosmos (3 clones)	HE981702
	30DF1	Filotipo microcosmos (25 clones)	HE981686
	30DF2	Filotipo microcosmos (1 clon)	HE981708
	89ANDMAR09	Filotipo puertos (34 clones)	HE981454
	94ANDMAR09	Filotipo puertos (4 clones)	HE981464
	111ADRMAR09	Filotipo puertos (1 clon)	HE981480
	57DN1	Filotipo microcosmos (3 clones)	HE981668
	7C1	Filotipo microcosmos (6 clones)	HE981624
	71CONMAR09	Filotipo puertos (18 clones)	HE981477
	89ADRMAR09	Filotipo puertos (4 clones)	HE981482
	23CONMAR09	Filotipo puertos (1 clon)	HE981510
	<i>Pacifibacter maritimus</i>	Especie tipo	AB558927

Grupo	Secuencia	Tipo de secuencia	Nº acceso
q	<i>Roseovarius marinus</i>	Especie tipo	GQ243422
	52FIGMAR09	Filotipo puertos (2 clones)	HE981509
	62ANDMAR09	Filotipo puertos (2 clones)	HE981508
r	<i>Litoreibacter janthinus</i>	Especie tipo	AB518880
	18C1	Filotipo microcosmos (1 clon)	HE981628
	<i>Litoreibacter albidus</i>	Especie tipo	AB518881
	<i>Thalassobacter arenae</i>	Especie tipo	EU342372
s	<i>Leisingera nanhaiensis</i>	Especie tipo	FJ232451
	<i>Litorimicrobium taeanense</i>	Especie tipo	GQ232737
t	<i>Loktanella fryxellensis</i>	Especie tipo	AJ582225
	<i>Loktanella salsilacus</i>	Especie tipo	AJ440997
	<i>Loktanella atrilutea</i>	Especie tipo	AB246747
	<i>Loktanella agnita</i>	Especie tipo	AY682198
	<i>Loktanella vestfoldensis</i>	Especie tipo	AJ582226
u	<i>Ketogulonicigenium robustum</i>	Especie tipo	AF136850
	<i>Ketogulonicigenium vulgare</i>	Especie tipo	AF136849
v	<i>Oceanicola granulosis</i>	Especie tipo	AY424896
	<i>Roseisalinus antarcticus</i>	Especie tipo	AJ605747
w	<i>Jannaschia helgolandensis</i>	Especie tipo	AJ438157
	<i>Jannaschia rubra</i>	Especie tipo	AJ748747
	<i>Jannaschia pohangensis</i>	Especie tipo	DQ643999
	<i>Jannaschia seohaensis</i>	Especie tipo	EU156067
	<i>Jannaschia seosinensis</i>	Especie tipo	AY906862
x	<i>Maribius pelagius</i>	Especie tipo	DQ514326
	<i>Maribius salinus</i>	Especie tipo	AY906863
	<i>Hwanghaeicola aestuarii</i>	Especie tipo	FJ230842
y	<i>Rubellimicrobium mesophilum</i>	Especie tipo	EF547368
	<i>Pararubellimicrobium aerilata</i>	Especie tipo	EU338486
	<i>Rubellimicrobium thermophilum</i>	Especie tipo	AJ844281
z	<i>Rhodobacter capsulatus</i>	Especie tipo	D16428
	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	Especie tipo	X53853

Tabla A4: Tabla de similitudes de secuencia de 16S ADNr de los aislados estudiados en el capítulo 3.

	6PALISEP08	5ANDIMAR09	2ALCIMAR09	8ALCIMAR09	11ANDIMAR09	3SOLIMAR09	1FIGIMAR09	6ADRIMAR09	4SOLISEP08	2ANDIMAR09	16PALIMAR09	1CONIMAR09	7PALIMAR09	1ANDIMAR09	5RATIMAR09	3ANDIMAR09	3RATIMAR09	4RATIMAR09	10RATIMAR09	V4	V9	V3	V6R	V13	V357	V329	V366	
6PALISEP08 ^a	100																											
5ANDIMAR09	95,8	100																										
2ALCIMAR09	93,9	93,1	100																									
8ALCIMAR09	93,9	93,1	100	100																								
11ANDIMAR09	94,1	95,6	92,9	92,9	100																							
3SOLIMAR09	95,4	94,3	93,4	93,4	93,6	100																						
1FIGIMAR09	94,9	95,4	93,7	93,7	94,9	97,9	100																					
6ADRIMAR09	93,4	93,8	93,5	93,5	94,6	96,8	97,6	100																				
4SOLISEP08	92,8	93,3	92,9	92,9	95,5	96,1	97,3	97,6	100																			
2ANDIMAR09	93,8	95,4	93,1	93,1	95,1	94,5	95,6	94,8	94,5	100																		
16PALIMAR09	93,2	93,4	93,2	93,2	93,4	93,4	93,7	93,3	94,5	95	100																	
1CONIMAR09	93,1	93,4	93,2	93,2	93,5	93,4	93,7	93,4	94,8	95,2	99,8	100																
7PALIMAR09	93,2	93,6	93,3	93,3	93,6	93,6	93,8	93,6	94,5	95,3	99,7	99,8	100															
1ANDIMAR09	95	93,8	93,3	93,3	95,5	95,5	95,5	93,9	94,8	93,8	94,3	94,3	94,5	100														
5RATIMAR09	95	93,8	93,3	93,3	95,5	95,5	95,5	93,9	94,8	93,8	94,3	94,3	94,5	100	100													
3ANDIMAR09	92,3	92,1	91,6	91,6	93,6	93,1	93,8	93,3	94,3	92,5	91,7	91,7	91,5	94,7	94,7	100												
3RATIMAR09	93	92,5	91,2	91,2	94	92,9	92,8	92,6	92,4	92	91,4	91,6	91,4	94,6	94,6	100												
4RATIMAR09	91,1	91,5	93	93	91,2	91,6	91,2	91,7	92,7	92,2	93,8	93,9	94,1	92,6	92,6	92,7	93,1	100										
10RATIMAR09	91	91,4	92,9	92,9	91,2	91,5	91,1	91,6	92,7	92,1	93,7	93,8	94	92,5	92,5	92,7	93,1	99,9	100									
V4	94,1	93,8	92,3	92,3	95,4	93,8	94,6	94,1	93,9	95,3	94,3	94,3	94,4	95,8	95,8	93,9	93,2	92,1	92,1	100								
V9	95,2	95,8	93,3	93,3	94,5	94,5	94,4	94,2	94,3	95,9	95	95	94,8	93,5	93,5	91,6	93,2	92,5	92,5	94,9	100							
V3	94,1	93,8	92,3	92,3	95,4	93,8	94,6	94,1	93,9	95,3	94,3	94,3	94,4	95,8	95,8	93,9	93,2	92,1	92,1	100	94,9	100						
V6R	95,4	94,2	93,6	93,6	95	94,5	95,2	94,9	94,4	95,8	94,5	94,6	94,8	93,6	93,6	91,1	92,2	92	91,9	95,4	96,4	95,4	100					
V13	94	93,3	93,1	93,1	93,3	95,4	96,2	95,1	94,4	95,3	93,8	93,9	93,7	93,4	93,4	91,6	91,7	90,7	90,6	94,4	94,7	94,4	94,8	100				
V357	94,8	95,1	93,2	93,2	95,7	93,4	93,8	92,8	92,7	93,9	92,7	92,8	92,6	94,6	94,6	92,4	94,9	90,8	90,8	93,6	93,6	93,6	93,3	93,8	100			
V329	95	94,9	93,6	93,6	95	93,5	93,8	92,9	93	93,7	92,7	92,8	92,6	94,2	94,2	91,5	94,5	90,9	90,9	93,3	93,7	93,3	93,4	93,9	99,3	100		
V366	93,6	94	93,7	93,7	93,8	97	97,4	99,2	96,8	94,6	93,4	93,6	93,4	93,8	93,8	93,9	93	91,5	91,4	93,8	94,3	93,8	94,6	95,1	93,1	93,2	100	

^a Aparecen sombreados aquellos valores de similitud superiores al 98,7% considerado el valor mínimo para pertenecer a la misma especie (Stackebrandt y Ebers, 2006).

Tabla A5: Listado de genomas del grupo *Roseobacter* analizados en el capítulo 3.

Cepa	Subgrupo
<i>Jannaschia</i> sp. CCS1	Costera
<i>Rhodobacterales</i> bacterium HTCC2083	Costera
<i>Rhodobacterales</i> bacterium HTCC2150	Costera
<i>Roseobacter</i> sp. CCS2	Costera
<i>Roseobacter</i> sp. GAI101	Costera
<i>Roseobacter</i> sp. MED193	Costera
<i>Roseobacter</i> sp. R2A57	Costera
<i>Roseovarius</i> sp. 217	Costera
<i>Ruegeria pomeroyi</i> DSS-3	Costera
<i>Thalassibium</i> R2A62	Costera
<i>Loktanella</i> sp. SE62	Degradadora de lignina
<i>Phaeobacter</i> sp. Y4I	Degradadora de lignina
<i>Sagittula stellata</i> E-37	Degradadora de lignina
<i>Sulfitobacter</i> sp. EE-36	Degradadora de lignina
<i>Maritimibacter alkaliphilus</i> HTCC2654	Oceánica
<i>Oceanibulbus indoliflex</i> HEL45	Oceánica
<i>Oceanicola batsensis</i> HTCC2597	Oceánica
<i>Oceanicola granulosus</i> HTCC2516	Oceánica
<i>Pelagibaca bermudensis</i> HTCC2601	Oceánica
<i>Sulfitobacter</i> NAS-14.1	Oceánica
<i>Octadecabacter arcticus</i> 238	Oceánica
<i>Octadecabacter antarcticus</i> 307	Oceánica
<i>Roseobacter</i> sp. SK209-2-6	Oceánica
<i>Dinoroseobacter shibae</i> DFL 12	Simbionte
<i>Citreicella</i> sp. SE45	Simbionte
<i>Phaeobacter gallaeciensis</i> BS107	Simbionte
<i>Phaeobacter gallaeciensis</i> 2.10	Simbionte
<i>Rhodobacterales</i> bacterium KLH11	Simbionte
<i>Roseovarius</i> sp. TM1035	Simbionte
<i>Ruegeria</i> sp. TM1040	Simbionte
<i>Ruegeria</i> sp. TrichCH4B	Simbionte
<i>Ruegeria</i> sp. R11	Simbionte
<i>Roseobacter litoralis</i> Och 149	Simbionte
<i>Roseobacter</i> sp. AzwK-3b	Sedimento
<i>Roseobacter denitrificans</i> OCh114	Sedimento
<i>Ruegeria lacuscaerulensis</i> ITI-1157	Lago salobre
<i>Loktanella vestfoldensis</i> SKA53	Lago salado

Anexo

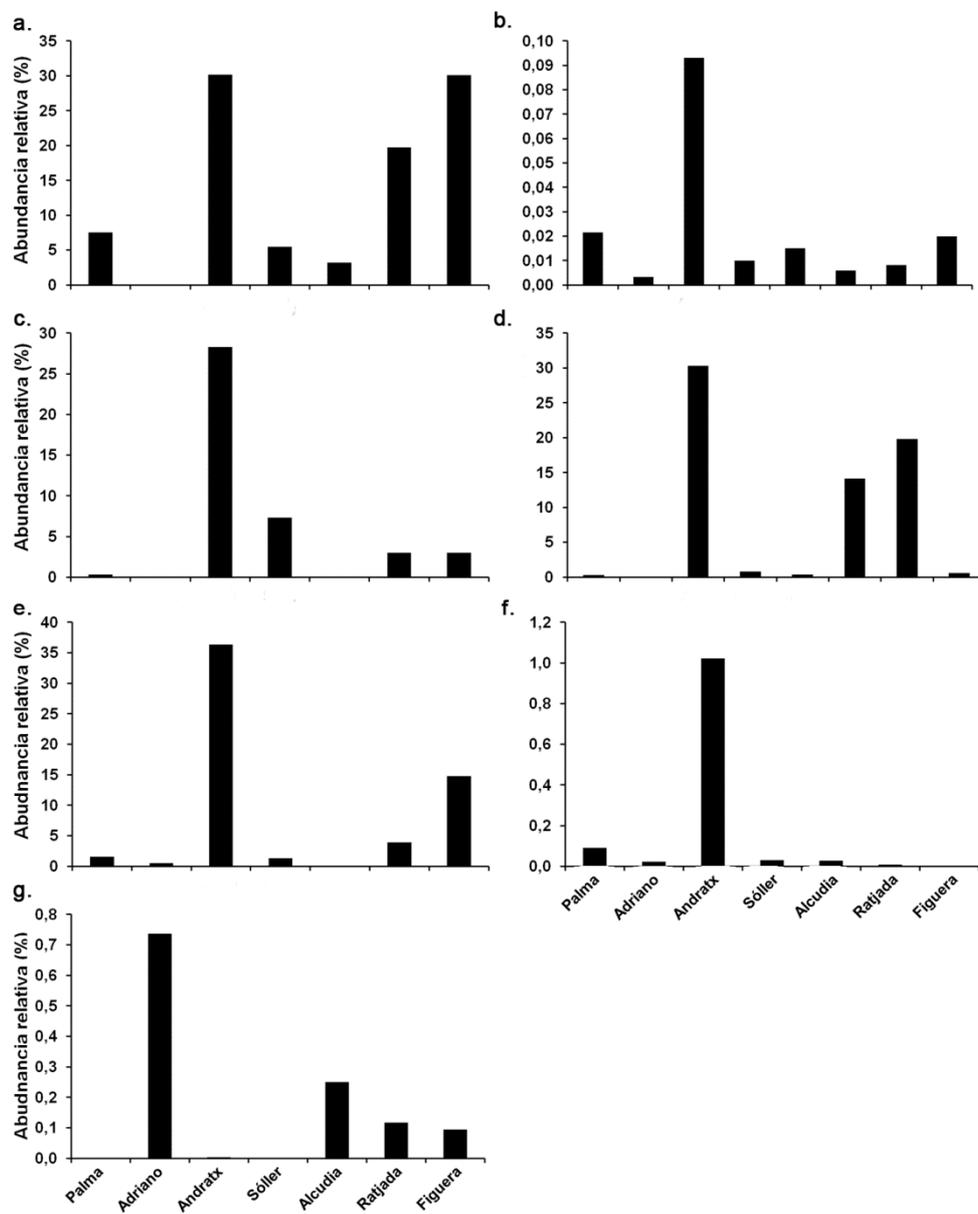


Figura A1: Abundancia relativa del filotipo 2 en puertos a lo largo de todo el periodo de muestreo: septiembre 2008 (a), marzo (b), julio (c), octubre (d), noviembre 2009 (e), marzo (f) y mayo 2010 (g). Hay que tener en cuenta que la escala de los gráficos varía de un muestreo a otro.

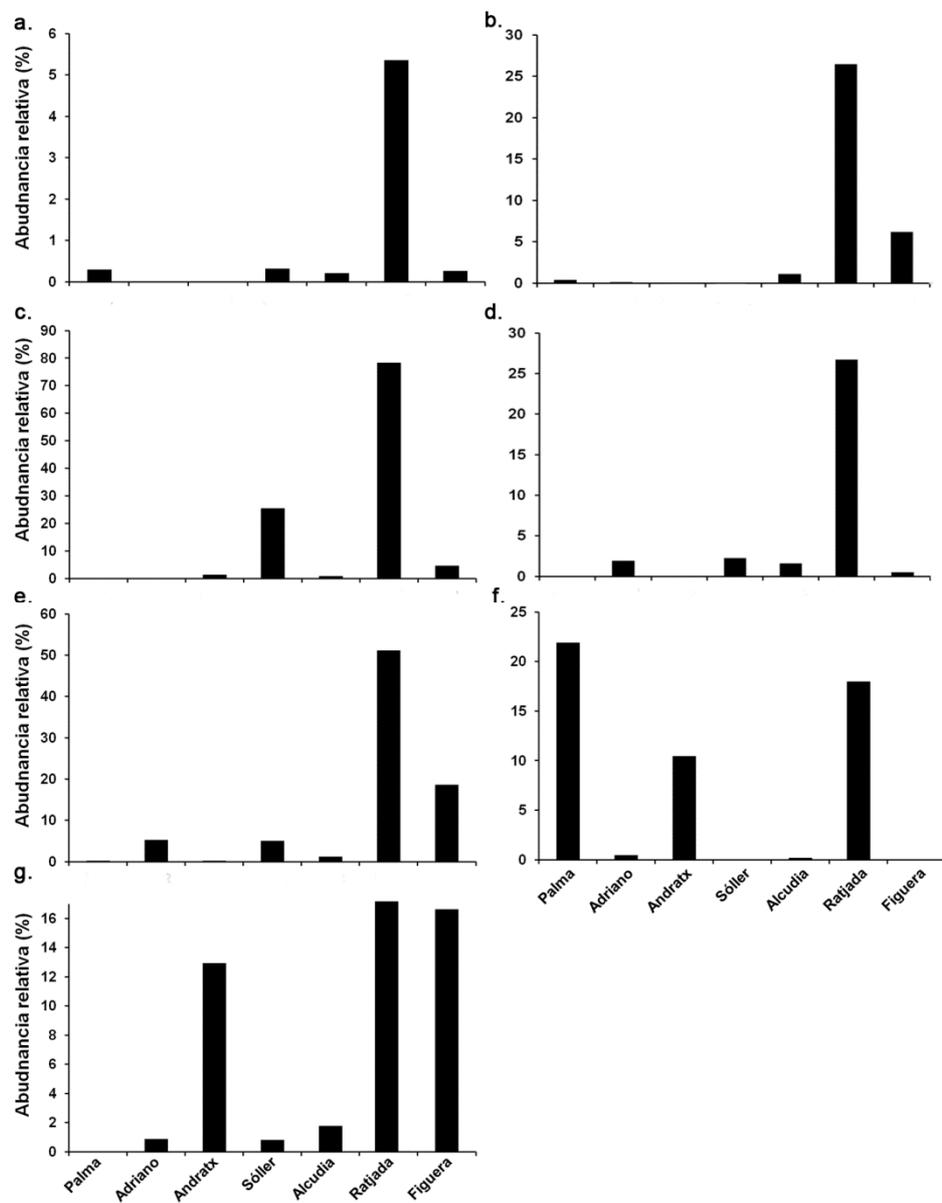


Figura A2: Abundancia relativa del filotipo 6 en puertos a lo largo de todo el periodo de muestreo: septiembre 2008 (a), marzo (b), julio (c), octubre (d), noviembre 2009 (e), marzo (f) y mayo 2010 (g). Hay que tener en cuenta que la escala de los gráficos varía de un muestreo a otro. El valor de abundancia relativa de Cala Ratjada de mayo 2010 sale de escala (294%).

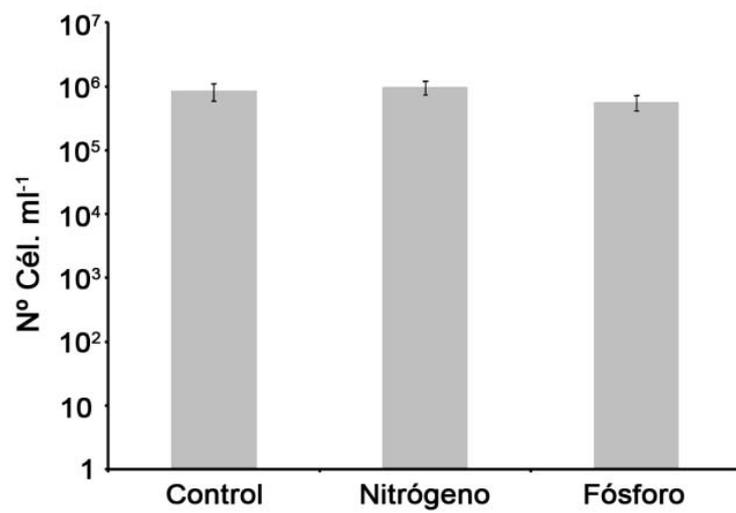


Figura A3: Recuentos de número total de procariotas pasadas 24 horas de incubación. Se representa la media de los valores obtenidos de los dos experimentos.

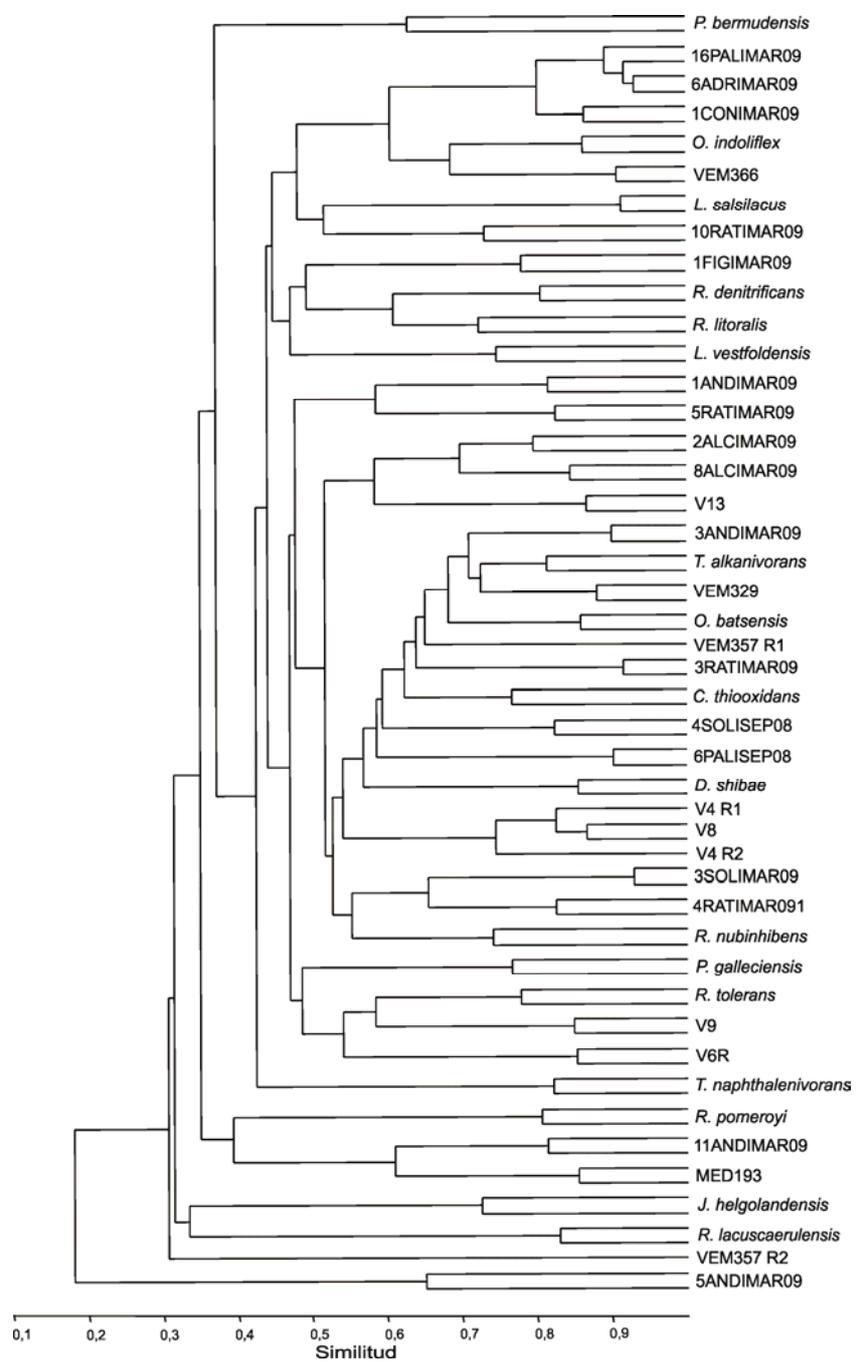


Figura A4: Dendrograma basado en los espectros de MALDI-TOF calculado por UPGMA mediante el coeficiente de Dice, incluyendo las cepas de referencia.

