

Departament de microbiologia. Facultat de biologia.

Universitat de Barcelona

BIODEGRADACIÓ I BIOREMEDIACIÓ DE FUEL DEL *PRESTIGE*

CARACTERITZACIÓ QUÍMICA
I COMUNITATS MICROBIANES IMPLICADES

Memòria de tesi presentada per Núria Jiménez García.

Dirigida per:

Dra. Anna Maria Solanas
Cánovas
Professora titular
Dpt. de Microbiologia
Facultat de Biologia
Universitat de Barcelona

Dr. Josep Maria Bayona
Térmens
Professor d'investigació
Institut de diagnosi
ambiental i estudis de
l'aigua
CSIC

Dr. Joan Albaigés Riera
Professor d'investigació
Institut de diagnosi
ambiental i estudis de
l'aigua
CSIC

Programa de doctorat: "Microbiologia Ambiental i Biotecnologia".

Bienni 2004-2006.

PART II



Capítol 3

Metodologia

3.1. Disseny experimental

3.1.1. Assaig de biodegradació in vitro de fuel del *Prestige* per part de dos consorcis microbians al·lòctons

Els assajos de biodegradabilitat del fuel s'han efectuat amb *chapapote* procedent de la xarxa de vigilància de la Sociedad de Salvamento y Seguridad Marítima (SASEMAR). S'ha utilitzat la mostra PR-030530-02 (posteriorment codificada com a M81), recollida el 30 de maig del 2003 a la ria d'Ortigueira (A Coruña).

Consortis microbians

S'han utilitzat dos consorcis microbians, TD i AM, del mateix grup de recerca, que s'han anat subcultivant cada 20 dies des de la seva obtenció, fa més de 10 anys i que han estat caracteritzats taxonòmicament i catabòlica (Viñas et al., 2002).

El consorci TD es va obtenir d'una mostra de sòl exposada al degoteig intermitent de gasoil procedent d'un tanc, la qual es va sotmetre a un procés d'enriquiment en medi mineral i gasoil (0,1% v/v) *BP* (Barcelona).

El consorci AM s'obtingué d'un sòl sorrenc contaminat amb cru de petroli. Es va enriquir en medi mineral amb una mescla de cinc HAP: fluorè, fenantrè, pirè, antracè i fluorantè, a una concentració final de 0,1% m/m (0,02% de cada compost).

Estratègia experimental

Els experiments s'han dut a terme en erlenmeyers de 250 ml amb 50 ml de brou Bushnell-Haas (*Difco*, Detroit, EUA), amb 50 mg de *chapapote* introduïts mitjançant un cobreobjectes. Els matrassos s'han agitat a 150 rpm a 25 °C durant 24 hores abans de la inoculació.

Els inòculs emprats corresponen als cultius de manteniment dels consorcis AM i TD del mateix grup de recerca, obtinguts amb anterioritat a aquest treball, incubats durant 6 dies a 200 rpm i 25 °C.

S'han inoculat els medis amb fuel, amb cada consorci (0,5 ml) i amb nutrients hidrofílics (NH_4NO_3 5 mM i K_2HPO_4 0,35 mM). A més, per tal de comprovar l'efecte d'un nutrient lipofílic, s'han preparat erlenmenyers amb consorci i 5 µl de nutrient *S200*, que consisteix en una microemulsió d'aigua, urea, èter glicol, àcids grassos i èster fosfat (*IEP Europe*) i que conté un 7,9% de nitrogen i 0,6% de fòsfor. També s'han preparat erlenmeyers de control amb medi i fuel sense inòcul (figura 3.1). L'experiment s'ha dut a terme per duplicat. Els microcosmos s'han incubat a 150 rpm a 25 °C durant 40 dies.

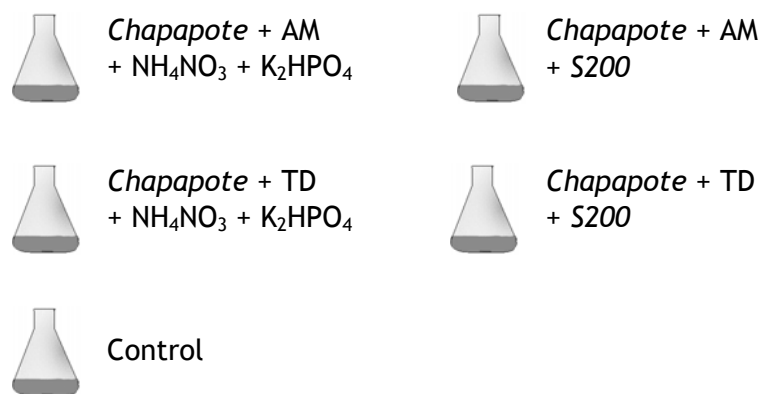


Figura 3.1. Esquema de l'experiment.

Tots els microcosmos s'han analitzat químicament. Així mateix, dels microcosmos amb consorci s'han fet comptatges de microorganismes heteròtrofs i potencialment degradadors d'hidrocarburs aromàtics i alcans (vegeu 3.3.2).

Proves d'esterilitat del chapapote

Per tal de comprovar l'existència de microbiota potencialment degradadora d'hidrocarburs al *chapapote* s'ha dut a terme un segon experiment, seguint la metodologia descrita anteriorment. Aquesta vegada, però, no s'ha inoculat cap consorci, únicament s'han emprat *chapapote* i S200 estèrils i sense esterilitzar, segons l'esquema de la figura 3.2.



Figura 3.2. Esquema de l'experiment.

Extracció i processament de les mostres

Cada mostra s'ha extret 3 vegades consecutives amb 15 ml de CH_2Cl_2 , acidificant amb HCl 0,5 N, fins a pH inferior a 2,5. Cada extracte s'ha deshidratat percolant a través de Na_2SO_4 anhidre. Seguidament, s'ha rotavaporat fins a un volum aproximat de 2 ml i s'ha transferit a un vial per efectuar un canvi de dissolvent, de diclorometà a hexà, i s'ha evaporat sota un flux suau de nitrogen fins a un volum aproximat d'uns 100 μl .

El fraccionament s'ha dut a terme emprant la metodologia desenvolupada per Alzaga et al. (2004), consistent a utilitzar cartutxos de SPE de sílice-cianopropil prèviament condicionats amb 6 ml d'hexà. Els 100 μl de mostra s'han transferit al cartutx i s'han eluït primerament amb hexà (4 ml) i després amb hexà-diclorometà (50%) (5ml), per obtenir les fraccions I (alifàtica) i II (aromàtica), respectivament.

Cada fracció s'ha concentrat fins a un volum de 500 μl i a cadascuna s'han afegit 25 μl de trifenilamina $8 \mu\text{g g}^{-1}$ en hexà, com a patró intern per a la posterior anàlisi per GC-MS (vegeu 3.2.1).

3.1.2. Assaig de bioremediació a una platja contaminada

S'ha dut a terme un experiment de bioremediació a la cala Virgen del Mar, situada al límit del terme municipal de Santander ($3^{\circ}52'53''\text{W}$; $43^{\circ}28'35''\text{N}$) (figura 3.3), durant un període de 220 dies. La temperatura ambiental durant l'experiment s'ha mantingut entre una mínima de $3,8 \text{ }^{\circ}\text{C}$ i una màxima de $22,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (mitjana de $13,8 \text{ }^{\circ}\text{C}$). La humitat relativa mitjana ha estat del 53%.

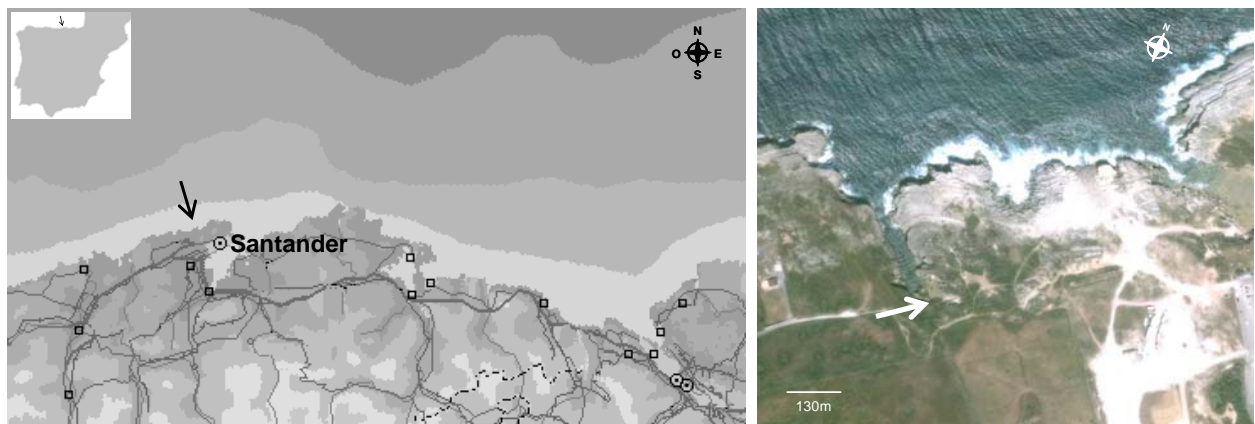


Figura 3.3. Ubicació de la cala on s'ha dut a terme l'experiment.

Disseny de les parcel·les i del mostreig i presa de les mostres

S'han delimitat dues parcel·les d'uns 12 m^2 (2×6) a la zona intermareal. Una de les dues s'ha sotmès a un tractament de bioestimulació consistent en l'addició, per aspersion, del fertilitzant oleofílic S200 (vegeu 3.1.1). El producte s'ha aplicat dues vegades, diluït amb aigua marina, seguint les recomanacions del fabricant, per assolir una relació C:N:P d'aproximadament 120:10:1 ($15,8 \text{ g N m}^{-2}$ i $1,37 \text{ g P m}^{-2}$). L'altra parcel·la s'ha mantingut com a control.

Cadascuna de les parcel·les s'ha dividit en 12 sectors dels quals se n'han pres mostres en quatre campanyes diferents (als 0, 30, 60 i 220 dies) per a l'anàlisi química (nou per campanya) i l'anàlisi microbiològica (tres per campanya).

Les mostres s'han obtingut rasant les roques amb una espàtula. Cadascuna de les destinades a l'anàlisi química (GC-MS) s'ha dipositat en un vial de vidre de 20 ml, degudament retolat i s'ha traslladat al laboratori, on s'ha mantingut a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ fins a ser processada. Les mostres per a l'anàlisi microbiològica (DGGE) s'han conservat a $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Extracció i processament de les mostres

Emprant la metodologia desenvolupada per Alzaga et al. (2004), esquematitzada a la figura 3.4, s'ha percolat un gram (aproximadament) de fuel dissolt en 5 ml de CH_2Cl_2 per 2 g de

Na_2SO_4 anhidre, per tal d'extreure'n l'aigua. Després de concentrar l'eluent sota un cabal suau de nitrogen, se n'ha determinat el contingut en fuel per gravimetria de 250 μl evaporats a sequedat.

De cada mostra, se n'ha pres una alíquota (50 μl , 5-10 mg) de la qual s'ha canviat el dissolvent a hexà. Cadascuna de les alíquotes s'ha fraccionat en un cartutx de sílice-cianopropil preconditionat amb 6 ml d'hexà, per obtenir una primera fracció (FI, alifàtica), eluint amb 4 ml d'hexà, i una segona fracció (FII, aromàtica), eluint amb 5 ml d'hexà-diclorometà 1:1. S'han concentrat ambdues fraccions fins a un volum de 500 μl i se'ls han afegit 25 μl de trifenilamina ($8 \mu\text{g g}^{-1}$ en hexà) com a patró intern per a la posterior anàlisi per cromatografia de gasos-espectrometria de masses (GC-MS) (vegeu 3.2.1).

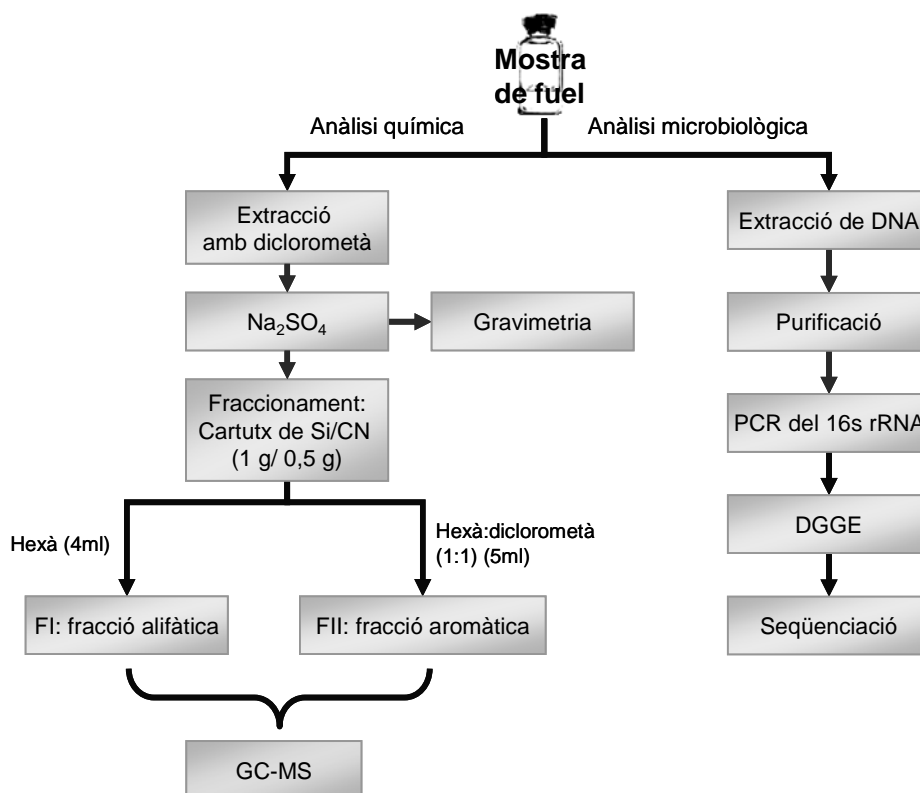


Figura 3.4. Esquema del processament de les mostres.

3.1.3. Obtenció d'un consorci autòcton degradador del fuel del *Prestige* i assaig de biodegradació

Inòcul i procés d'enriquiment

S'ha obtingut un consorci degradador de fuel de la mostra M81 (vegeu 3.1) per enriquiment en cultius discontinus en aigua de mar artificial (*Scharlau Chemie*, Barcelona), utilitzant el mateix *chapapote* estèril (50 o 100 mg) com a font de carboni i energia. Com a font de nitrogen i fòsfor s'han utilitzat NH_4NO_3 (5 mM) i K_2HPO_4 (0,35 mM).

El consorci s'ha subcultivat cada 20 i 30 dies durant dos anys, període durant el qual s'ha fet un seguiment de la comunitat microbiana per DGGE, s'han efectuat recomptes dels microorganismes heteròtrofs i potencialment degradadors d'hidrocarburs i s'ha estudiat

l'evolució de la capacitat degradadora del consorci fent anàlisis químiques per cromatografia de gasos amb detecció per ionització en flama o espectrometria de masses (GC-FID i GC-MS).

Avaluació de la capacitat degradadora del consorci autòcton M81 sobre el fuel del Prestige

Els experiments s'han dut a terme en erlenmeyers de 250 ml amb 50 ml d'aigua de mar artificial (*Scharlau Chemie*), amb 100 mg de fuel introduïts mitjançant un cobreobjectes. Com a font de nitrogen i fòsfor s'han utilitzat NH_4NO_3 (5 mM) i K_2HPO_4 (0,35 mM).

La majoria dels erlenmeyers (figura 3.5) s'han inoculat amb 500 μl de consorci M81 en creixement (al setè dia). Així mateix, se n'han mantingut sense inocular, com a controls abiòtics. S'han incubat a 150 rpm a temperatura ambient durant dos mesos, al llarg dels quals s'han pres mostres per triplicat, als 0, 5, 10, 20, 40 i 60 dies per a l'anàlisi microbiològica, i als 0, 5, 10, 20 i 60 per a la química, sacrificant cada cop els microcosmos.

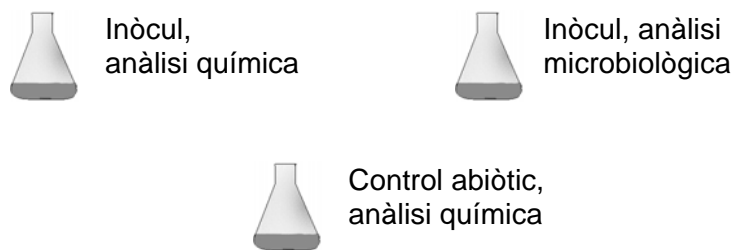


Figura 3.5. Esquema de l'experiment.

Extracció i processament de les mostres

Les mostres s'han extret amb CH_2Cl_2 (3 x 15 ml), acidificant amb HCl 0,5 N, fins a pH inferior a 2,5. Cada extracte s'ha deshidratat percolant a través de Na_2SO_4 anhidre i després s'ha rotavaporat fins a un volum aproximat de 2 ml, evaporat sota un flux suau de nitrogen i ajustat a 1 ml final amb CH_2Cl_2 .

L'extracte s'ha dividit en tres alíquotes. La primera s'ha usat per fer una gravimetria (figura 3.6). La segona s'ha ajustat a una concentració aproximada de 18 mg ml^{-1} i s'ha analitzat per cromatografia de capa fina acoblada a un detector de ionització en flama (TLC-FID) (vegeu 3.2.1).

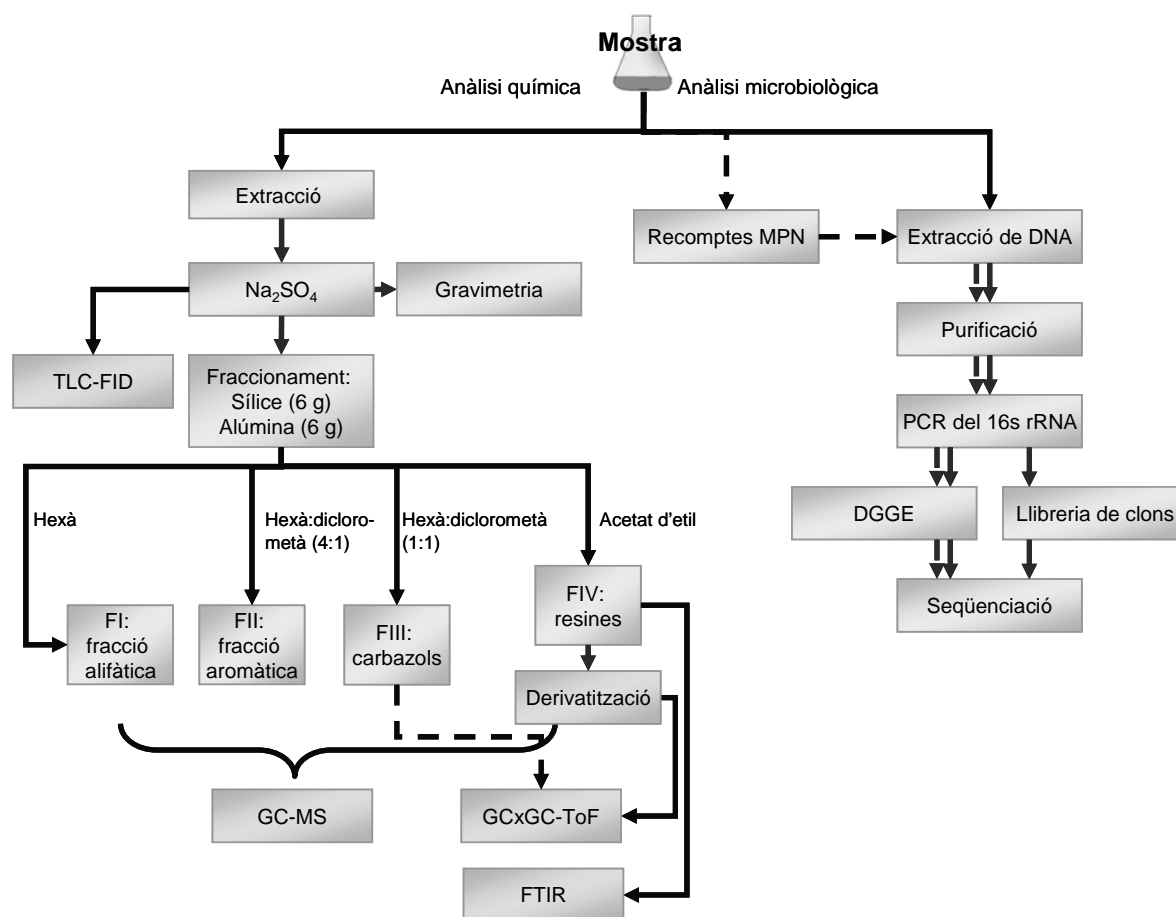


Figura 3.6. Esquema del processament de les mostres.

La tercera alíquota de l'extracte (uns 30 mg) s'ha fraccionat utilitzant columnes de vidre (45 x 1,2 cm) reblertes amb sílice (6 g, part inferior) i alúmina (6 g, part superior), desactivades al 5% en pes, i Na_2SO_4 anhidre (figura 3.6).

S'han eluït 4 fraccions:

- F1: 20 ml d'hexà 20: Alifàtics.
- FII: 25 ml d'hexà:diclorometà 4:1: Aromàtics.
- FIII: 30 ml d'hexà:diclorometà 1:1: Carbazols.
- FIV: 20 ml d'acetat d'etil: Resines.

Totes les fraccions s'han analitzat per GC-MS (vegeu 3.5), emprant decafluorobifenil ($\sim 3,66 \mu\text{g ml}^{-1}$ en vial, *Sigma Aldrich*) com a patró intern en el cas de les F1 i II i dibromocarbazol ($\sim 1,00 \mu\text{g ml}^{-1}$ en vial, *Sigma-Aldrich*) en la FIII. En el cas de les resines, ha calgut derivatitzar prèviament amb TMSH. Les fraccions III i IV, a més, s'han analitzat per GCxGC-ToF, prèvia derivatització amb BSTFA (Jover et al., 2005). Per últim, les fraccions IV s'han analitzat per espectroscòpia d'infraroig amb transformada de Fourier (FTIR) (vegeu 3.2.2).

3.1.4. Assaig de marcatge amb isòtops estables (SIP)

S'han dut a terme experiments emprant un compost marcat amb ^{13}C (*n*-hexadecà) per tal de determinar quins dels integrants del consorci microbià tenen un paper en la degradació dels alcans.

Per fer el cultiu s'han utilitzat erlenmeyers de 500 ml amb 100 ml de medi (aigua de mar artificial més petroli com a font de carboni i energia), suplementat amb NH_4NO_3 (5 mM) i K_2HPO_4 (0,35 mM).

Experiment per a la detecció del DNA marcat

S'ha dut a terme un primer experiment d'anàlisi del DNA marcat de la següent manera: S'han diluït 12,5 ml de cultiu de consorci M81 en creixement amb 87,5 ml (dilució 1/8) d'aigua de mar artificial estèril. En alguns dels microcosmos s'han emprat com a substrat 45 µl de ^{13}C -*n*-hexadecà 99% ^{13}C d'*Isotec* (Miamisburg, OH, EUA) (figura 3.7). Com a control molecular i per tal de fer el seguiment de la degradació produïda i de la població microbiana, s'ha utilitzat microcosmos amb 45 µl de ^{12}C -*n*-hexadecà de *Fluka* (*Sigma-Aldrich Chemie GmbH*, Buchs, Alemanya). Addicionalment s'han incubat matrassos com a controls abiòtics, afegint azida sòdica (*Merck*, Darmstadt, Alemanya) fins a una concentració de 6 mM (Singleton et al., 2005).

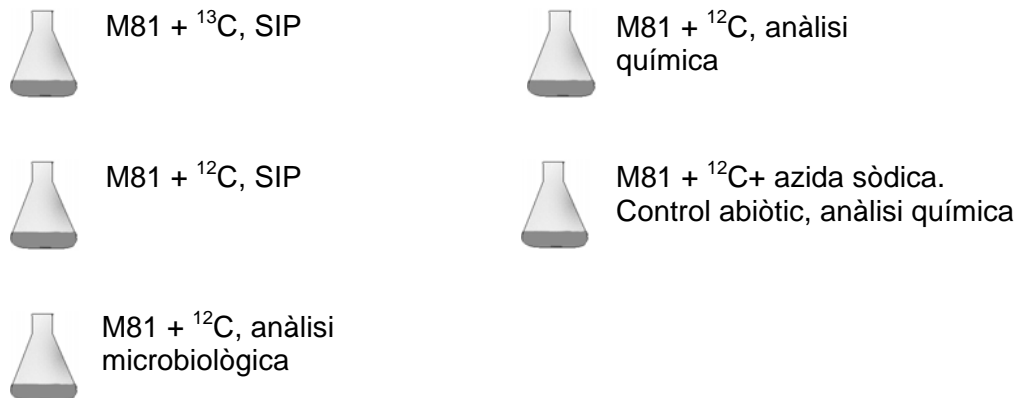


Figura 3.7. Esquema de l'experiment, on ^{12}C correspon a ^{12}C -*n*-hexadecà, ^{13}C a ^{13}C -*n*-hexadecà i M81 és l'inòcul.

Els microcosmos s'han incubat a 25 °C durant 4 dies a 150 rpm, durant els quals s'ha mesurat la densitat òptica a 600 nm utilitzant com a blanc el control abiòtic amb azida sòdica.

Experiment per a la detecció del RNA marcat

S'ha repetit l'experiment anterior, en les mateixes condicions d'incubació i els mateixos tipus de microcosmos, però amb algunes modificacions. En primer lloc, s'han utilitzat 20 ml de medi de cultiu en creixement com a inòcul en 100 ml finals (dilució 1/5). En segon lloc, els microcosmos s'han suplementat únicament amb 5 µl d'*n*-hexadecà. Per últim, s'han pres mostres a les 0, 6, 12, 24 i 48 hores. En aquest cas s'ha analitzat l'RNA.

Extracció i processament de les mostres

Les mostres s'han extret i processat seguint la metodologia ja descrita (vegeu 3.1.4), aquesta vegada, però, únicament s'ha recollit una fracció eluint amb 6 ml d'hexà:diclorometà al 50% (figura 3.8).

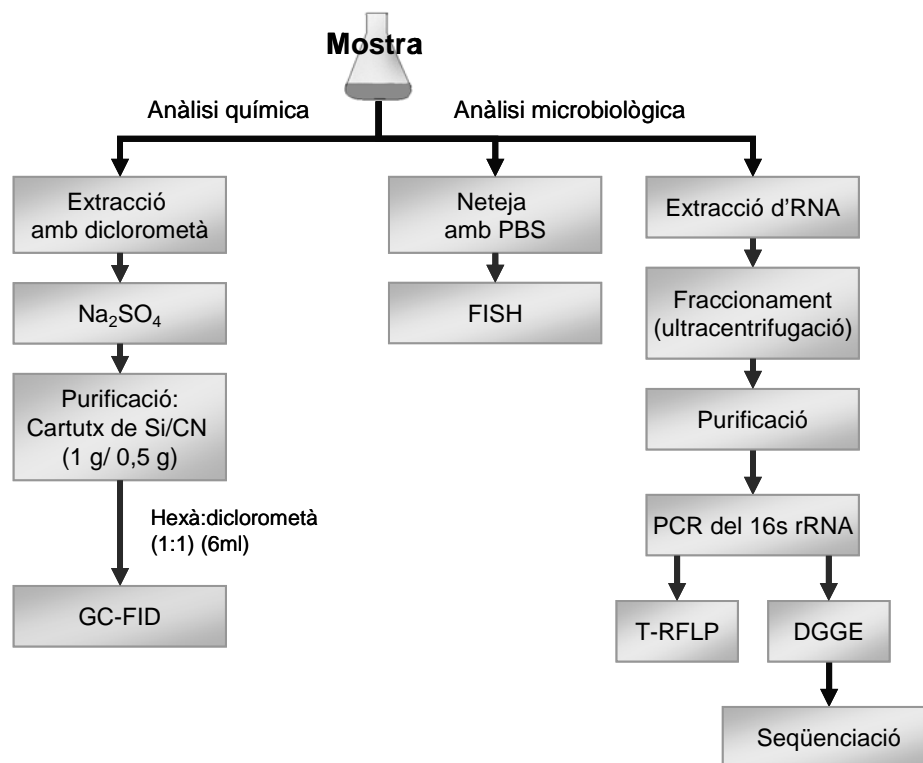


Figura 3.8. Esquema del processament de les mostres.

3.1.5. Avaluació de la interacció entre la fotooxidació i la degradació microbiana

S'ha dut a terme un experiment in vitro per avaluar les interaccions entre la fotooxidació i la biodegradació en la transformació química del petroli. Les mostres s'han incubat i posteriorment processat seguint la metodologia descrita a l'apartat 3.1.3. Aquesta vegada, però, únicament s'ha fet un seguiment químic de la degradació. I s'han inclòs microcosmos amb fuel irradiat (fotooxidat), amb inòcul i sense (controls abiòtics).

Irradiació del fuel

El fuel s'ha irradiat durant 12 hores en un simulador de llum solar *Suntest® CPS, Atlas* (Chicago, IL, EUA) equipat amb una làmpada de xenó 1500B NrB4 a una potència de 507,5 W m⁻². L'espectre de llum obtingut és molt similar al de la llum solar. L'equip disposa d'un ventilador que ajuda a equilibrar l'augment de temperatura que provoca la làmpada i la manté propera als 40 °C.

3.2. Mètodes d'anàlisi química

Tant les tècniques extractives com de separació ja han estat explicitades en apartats anteriors, aquest apartat està centrat, doncs, en les tècniques de determinació, i en la quantificació i tractament de les dades.

3.2.1. Determinació cromatogràfica

GC-FID

Les fraccions s'han injectat en un cromatògraf de gasos *Carlo Erba HRGC 5300 Mega Series* (*Carlo Erba Instruments*, Milà, Itàlia), acoblat a un detector de ionització en flama (GC-FID), equipat amb una columna capil·lar *HP 5MS* (*J&W Scientific*, Folsom CA, EUA) 5% fenilmetilpolisiloxà de 30 m x 0,25 mm de diàmetre intern x 0,25 µm de gruix de pel·lícula. Com a gas portador s'ha usat hidrogen d'elevada puresa a una velocitat mitjana de 40 cm s⁻¹.

La temperatura de l'injector s'ha fixat a 310 °C i s'ha operat sense partició de cabal (*splitless*), mantenint les vàlvules tancades 0,80 min. El programa tèrmic ha consistit en: 60 °C inicials durant 1 min més dues rampes, la primera de 15 °C min⁻¹ fins a 150 °C i la segona a 6 °C min⁻¹ fins a 320 °C, amb una isoterma final de 10 min.

GC-MS-EI

S'han analitzat les mostres usant un cromatògraf de gasos *TRACE-MS Thermo Finnigan TRACE GC 2000* (Dreieich, Alemanya) equipat amb un injector *split/splitless* (temps de *splitless*: 0,80 min, cabal 50 ml min⁻¹), programat per injectar un volum de 2 µl. El gas portador ha estat heli amb un cabal constant de 1,2 ml min⁻¹.

La columna analítica emprada ha estat una columna capil·lar *HP 5MS* de 30 m x 0,25 mm de diàmetre intern x 0,25 µm de gruix de pel·lícula, i les rampes de temperatura s'han programat en funció de les fraccions a analitzar (taula 3.1). La temperatura de l'injector, en canvi, s'ha fixat a 310 °C.

Taula 3.1. Programes de temperatura.

Programa	T ₀ (°C) [temps (min)]	Rampa ₁ (°C min ⁻¹)	T ₁ (°C) [temps (min)]	Rampa ₂ (°C min ⁻¹)	T ₂ (°C) [temps (min)]
FI i FII	60 (1)	15	150 (0)	6	320 (10)
FIII	60 (1)	15	150 (0)	6	310 (10)
FIV	60 (1)	10	200 (0)	4,8	320 (10)

Les dades s'han adquirit en mode *full scan* amb un interval de masses de 50 a 490 daltons (2,4 escombrats s⁻¹) a una energia de 70 eV, amb un retard de dissolvent de 5 minuts i s'han processat amb el programari *Xcalibur*.

TLC-FID

S'ha utilitzat la cromatografia en capa fina acoblada a un detector de ionització de flama (TLC-FID) per analitzar la composició global de les mostres, a fi de detectar els possibles canvis deguts a la fotooxidació i la biodegradació. Es tracta d'una tècnica analítica que permet separar i quantificar una gran diversitat de famílies químiques en mescles complexes, com ara el petroli (Bharati, 1997; Karlsen, 1991).

La separació s'ha dut a terme en columnes de sílice *Chromarods SIII* (*Iatron Laboratories Inc.*, Tòquio, Japó), prèviament netejades i activades a la flama. S'ha aplicat la quantitat apropiada de mostra (1 µl aproximadament d'una dilució d'uns 18 mg ml⁻¹), i s'ha eluït de la següent manera:

- 10 cm amb hexà.
- 5 cm amb hexà:toluè 20:80.
- 2 cm amb metanol:diclorometà 5:95.

Després de cada elució cal assecat les columnes a 40 °C durant 10 minuts i deixar-les temperar durant 10 minuts més.

L'anàlisi s'ha dut a terme en un *Iatroscan MK-5 TLC/FID Analyser*, amb un aplicador automàtic *Sample Spotter SES 3202/IS-01* (Nielder-Olm, Alemanya) i un analitzador de *Iatron Laboratories Inc.*, amb uns cabals de 2.000 ml min⁻¹ d'aire i 160-180 ml min⁻¹ d'hidrogen. S'ha escombrat a 2-3 mm s⁻¹ durant 0,5 min.

GCxGC ToF

S'ha utilitzat un cromatògraf de gasos *HP 6890N* (*Agilent Technologies*, Palo Alto, CA, EUA) equipat amb un injector *split/splitless* (treballant sense partició de cabal), un forn secundari per ubicar-hi la segona dimensió i un modulador tèrmic de dos passos *Zoex ZX1* (Houston, TX, EUA), acoblat a un espectròmetre de masses *Pegasus 4D ToF* (*LECO*, St. Joseph, MI, EUA) que ha operat a -70 eV, amb la línia de transferència a 240 °C, la font de ionització a 200 °C, escombrant de 50 a 500 m/z a 100 espectres per segon.

S'ha treballat amb una configuració ortogonal: Com a primera dimensió s'ha usat una columna capil·lar *TRBd-MS 5%* fenil-polidimetilsiloxà de *Tecknokroma* (Sant Cugat del Vallès) de 30 m x 0,25 mm de diàmetre intern x 0,25 µm de gruix de pel·lícula. La segona dimensió consisteix en una columna *TRB-50 HT 50%* fenil-polidimetilsiloxà de 2 m x 0,10 mm de diàmetre intern i una pel·lícula de 0,10 µm de gruix.

El gas portador ha estat heli a un cabal constant de 1,2 ml min⁻¹. La temperatura inicial del forn primari ha estat de 70 °C, mantinguda durant 1 minut. Després s'ha anat incrementant a 5 °C min⁻¹ fins a 320 °C, temperatura que s'ha mantingut 5 minuts. La temperatura del forn secundari s'ha mantingut sempre 10 °C per sobre de la del forn primari. S'ha modulad cada 7 segons.

3.2.2. Determinació espectroscòpica

FT-IR

Les anàlisis per espectroscòpia infraroja s'han dut a terme en un espectròmetre *Nicolet Avatar 360 FT-IR (Thermo)* treballant a 32 scans per mostra i a una resolució de 4 cm^{-1} . Les mostres s'han aplicat sobre una pastilla transparent de KBr i exposat a llum infraroja per tal d'eliminar-ne el dissolvent, abans d'introduir-les a l'aparell. Els espectres d'IR s'han adquirit mitjançant un sistema computat de processament de dades.

3.2.3. Quantificació

La degradació de les mostres s'ha avaluat relacionant les àrees (obtingudes per GC-MS) dels diversos compostos (alcans i HAP) amb la del $17\alpha(\text{H}),21\beta(\text{H})$ -hopà, emprat a bastament per la seva resistència a la biodegradació (Caldwell et al., 1998; Prince et al., 2004) i a la fotooxidació (Garrett et al., 1998).

Així mateix, d'acord amb la metodologia seguida per Daling et al. (2001), s'han calculat diverses relacions entre diferents hidrocarburs (taula 3.2), utilitzades com a índexs tant per distingir petrolis de diverses procedències (en el cas de les mostres preses in situ), com per avaluar-ne l'envelliment. La selecció s'ha fet atenent tant a criteris d'especificitat i diversitat, com de resistència a l'envelliment i de precisió i complexitat analítica (per exemple, no s'utilitzen relacions amb diferents m/z).

Taula 3.2. Relacions de diagnòstic emprades com a índex.

<i>m/z</i>	Índex	Definició	Estructures
85	C17/pr		C17: <i>n</i> -heptadecà
85	C18/ft		C18: <i>n</i> -octadecà
85	pr/ft		
191	%27Ts	$100 \cdot \text{Ts} / (\text{Ts} + \text{Tm})$	Ts: $18\alpha(\text{H})$ -22,29,30-trisnorneohopà Tm: $17\alpha(\text{H})$ -22,29,30-trisnorhopà
191	%29 $\alpha\beta$	$100 \cdot 29\alpha\beta / (29\alpha\beta + 30\alpha\beta)$	29 $\alpha\beta$: $17\alpha(\text{H}),21\beta(\text{H})$ -30-norhopà 30 $\alpha\beta$: $17\alpha(\text{H}),21\beta(\text{H})$ -hopà
191	%31 $\alpha\beta\text{S}$	$100 \cdot 31\alpha\beta\text{S} / (31\alpha\beta\text{S} + 31\alpha\beta\text{R})$	31 $\alpha\beta$: $17\alpha(\text{H}),21\beta(\text{H})$ -homohopà (22S i 22R)
191	%32 $\alpha\beta\text{S}$	$100 \cdot 32\alpha\beta\text{S} / (32\alpha\beta\text{S} + 32\alpha\beta\text{R})$	32 $\alpha\beta$: $17\alpha(\text{H}),21\beta(\text{H})$ -bishomohopà (22S i 22R)
217	%27dia	$100 \cdot 27\text{d}(\text{R}+\text{S}) / [27\text{d}(\text{R}+\text{S}) + 27\text{BB}(\text{R}+\text{S})]$	27d: $13\beta(\text{H}),17\alpha(\text{H})$ -diacolestà (20S i 20R) 27BB: $14\beta(\text{H}),17\beta(\text{H})$ -colestà (20R i 20S)
217	%29 $\alpha\alpha\text{S}$	$100 \cdot 29\alpha\alpha\text{S} / (29\alpha\alpha\text{S} + 29\alpha\alpha\text{R})$	29 $\alpha\alpha$: 24-etil- $14\alpha(\text{H}),17\alpha(\text{H})$ -colestà (20S i 20R)
217	%29BB(R+S)	$100 \cdot 29\text{BB}(\text{R}+\text{S}) / [29\text{BB}(\text{R}+\text{S}) + 29\alpha\alpha(\text{R}+\text{S})]$	29BB: 24-etil- $14\beta(\text{H}),17\beta(\text{H})$ -colestà (20R i 20S)

Taula 3.2. Continuació.

Ío de diagnòstic <i>m/z</i>	Índex	Definició	Estructures
218	%27BB	100*[27BB(R+S)]/[27BB(R+S)+28BB(R+S)+29BB(R+S)]	27BB: 14B(H),17B(H)-colestà (20R i 20S)
218	%28BB	100*[28BB(R+S)]/[27BB(R+S)+28BB(R+S)+29BB(R+S)]	28BB: 24-metil-14B(H),17B(H)-colestà (20R i 20S)
218	%29BB	100*[29BB(R+S)]/[27BB(R+S)+28BB(R+S)+29BB(R+S)]	29BB: 24-etil-14B(H),17B(H)-colestà (20R i 20S)
231	%26TA	100*26TAS/(26TAS+28TAS)	colestà aromatitzat (20S) i 24-etilcolestà (20S)
206/212	D2/P2	100*D2/(D2+P2)	D2: C2-alquildibenzotiofens P2: C2-alquilfenantrens
220/226	D3/P3	100*D3/(D3+P3)	D3: C3-alquildibenzotiofens P3: C3-alquilfenantrens
212/256	D2/C2	100*D2/(D2+C2)	C2: C2-alquilmisens
226/270	D3/C3	100*D3/(D3+C3)	C3: C3-alquilmisens
256/230	C2/Py2	100*C2/(C2+Py2)	Py2: C2-alquilpirèns
270/244	C3/Py3	100*C3/(C3+Py3)	Py3: C3-alquilpirèns
206/256	P2/C2	100*P2/(P2+C2)	
220/270	P3/C3	100*P3/(P3+C3)	
194/212	D2/F2	100*D2/(D2+F2)	F2: C2-alquilfluorens
208/226	D3/F3	100*D3/(D3+F3)	F3: C3-alquilfluorens
194/208	F2/F3	100*F2/(F2+F3)	
206/220	P2/P3	100*P2/(P2+P3)	
212/226	D2/D3	100*D2/(D2+D3)	
230/244	Py2/Py3	100*Py2/(Py2+Py3)	
256/270	C2/C3	100*C2/(C2+C3)	
206	2MP/1MP	100*2MP/(2MP+1MP)	1MP: 1-metilfenantrè 2MP: 2-metilfenantrè
206	3MP/1MP	100*3MP/(3MP+1MP)	3MP: 3-metilfenantrè
206	9+4MP/1MP	100*(9+4)MP/(9+4MP+1MP)	9+4MP: 9- i 4-metilfenantrè
206	1MP/MA	100*1MP/(1MP+MA)	MA: metilantracè
212	2+3MD/1MD	100*(2+3)MD/(2+3MD+1MD)	1MD: 1-metildibenzotiofè 2+3 MD: 2- i 3-metildibenzotiofè
212	4MD/1MD	100*4MD/(4MD+1MD)	4MD: 4-metildibenzotiofè
216	2MF/4MPy	100*2MF/(2MF+4MPy)	2MF: 2-metilfluorantè 4MPy: 4-metilpirè
216	B(b+c)F/4MPy	100*B(b+c)F/(B(b+c)F+4MPy)	B(b+c)F: Benzo[b] i Benzo[c]-fluorè
216	1MPy/4MPy	100*1MPy/(1MPy+4MPy)	1MPy: 1-metilpirè
216	2MPy/4MPy	100*2MPy/(2MPy+4MPy)	2MPy: 2-metilpirè

Les figures 3.9 i 3.10 mostren les traces iòniques de les famílies dels triterpens i esterans.

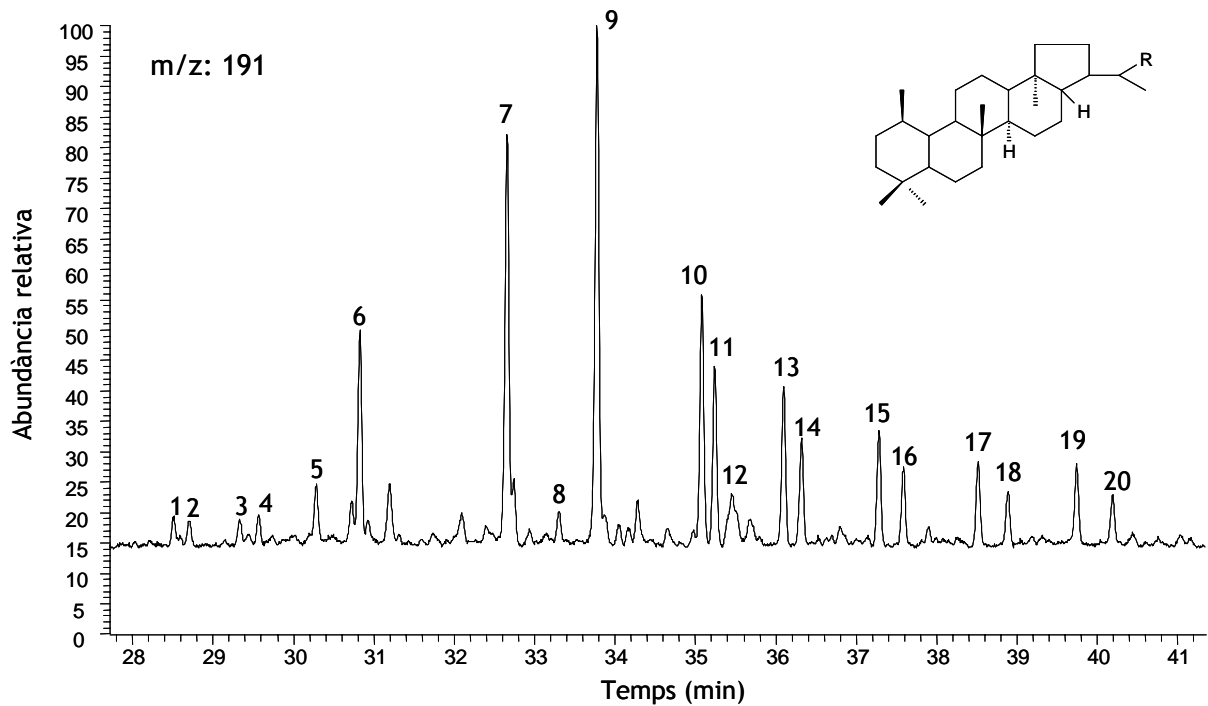


Figura 3.9. Triterpens emprats en la determinació de l'origen de les mostres. 1) C28 (22R), 2) C28 (22S), 3) C29 (22R), 4) C29 (22S), 5) 27Ts, 6) 27Tm, 7) 29 α B, 8) 29B α , 9) 30 α B, 10) 31 α BS, 11) 31 α BR, 12) 30G, 13) 32 α BS, 14) 32 α BR, 15) 33 α BS, 16) 33 α BR, 17) 34 α BS, 18) 34 α BR, 19) 35 α BS, 20) 35 α BR.

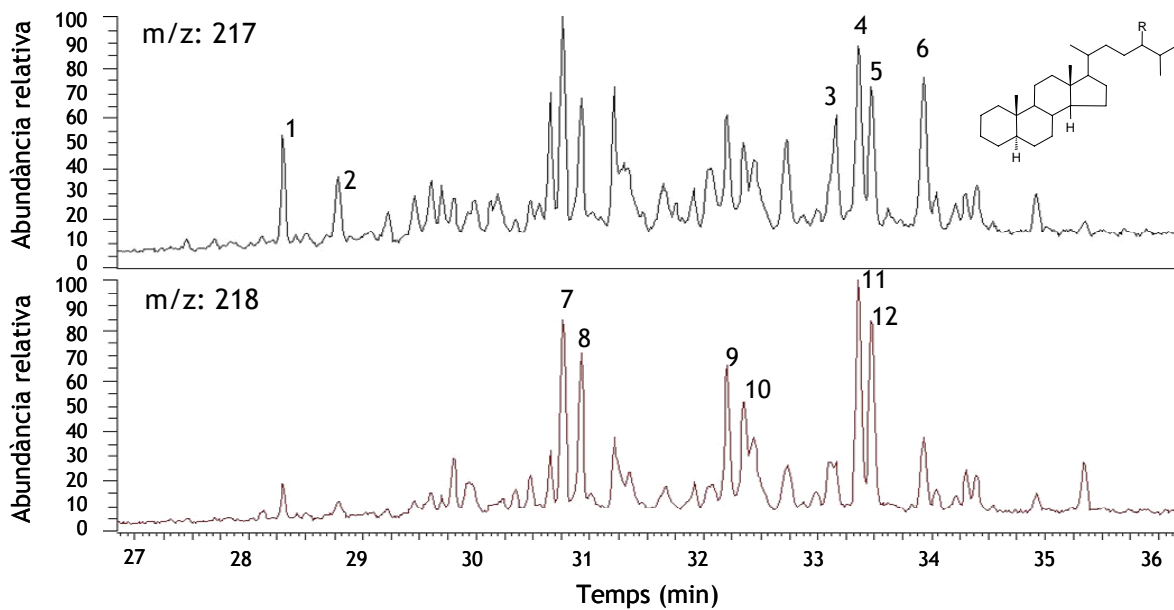


Figura 3.10. Esterans i diasterans emprats en la determinació de l'origen de les mostres. m/z 217: 1) 27dBS, 2) 27dBR, 3) 29 $\alpha\alpha$ S, 4) 29B β R, 5) 29B β S, 6) 29 $\alpha\alpha$ R. m/z 218: 7) 27B β R, 8) 27B β S, 9) 28B β R, 10) 28B β S, 11) 29B β R, 12) 29B β S.

Altres índexs es basen en la degradació preferencial de certs isòmers de metilfenantrens i metildibenzotiofens (Bayona et al., 1986; Wang i Fingas, 1995) (figura 3.11) i també dels metilpirens. Així doncs, s'han calculat relacions basades en diversos dels isòmers d'aquests compostos (taula 3.2). També, com que la susceptibilitat a la degradació varia d'uns compostos a uns altres i amb el grau d'alquilació (per exemple els dibenzotiofens són més biodegradables que els crisens i els C3-alquilcrisens es fotooxiden més que els C2), s'han calculat relacions basades en diversos HAP amb el mateix grau d'alquilació o en compostos de la mateixa família però grau d'alquilació diferent (taula 3.2).

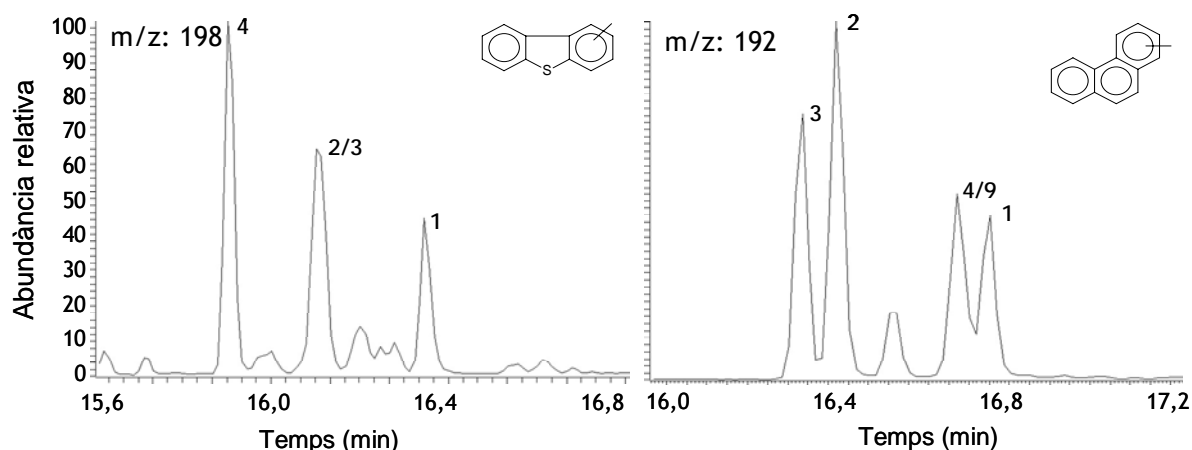


Figura 3.11. Cromatogrames dels metilfenantrens (m/z 192) i dels metildibenzotiofens (m/z 198), els nombres indiquen cadascun dels isòmers.

Així mateix, s'han calculat índexs a partir de relacions entre diversos isòmers de metil o dimetilcarbazzols (figura 3.12).

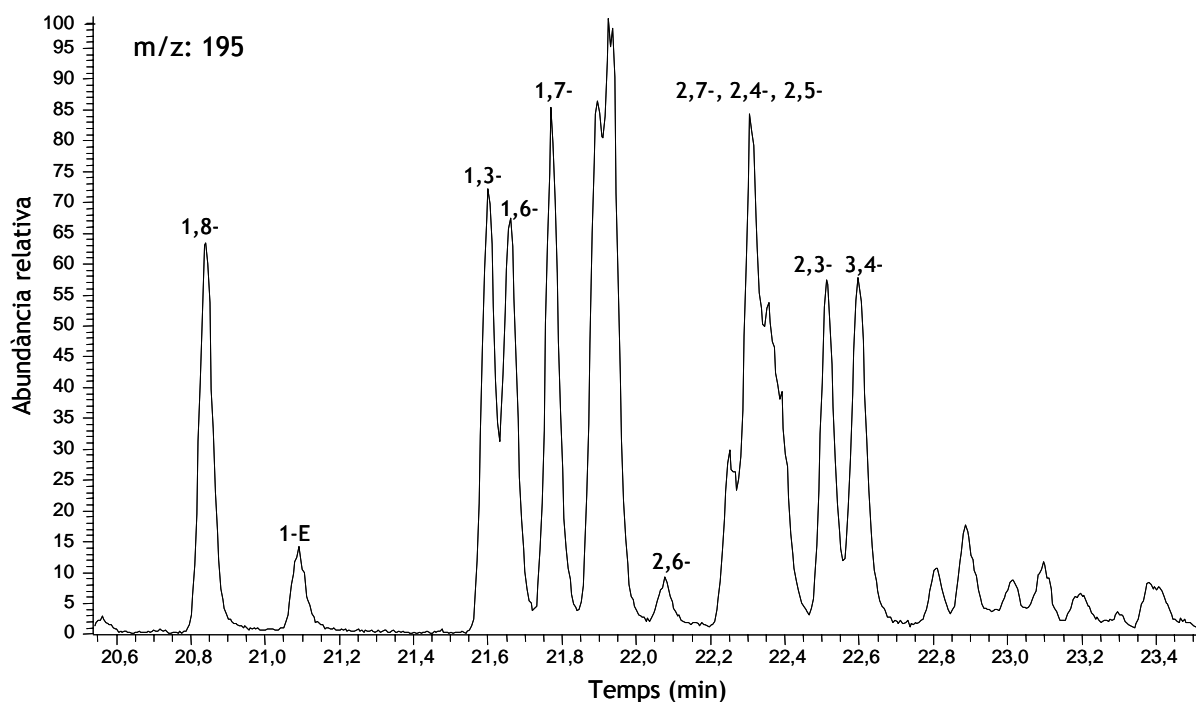


Figura 3.12. Dimetilcarbazzols emprats en el càlcul d'índexs. Els nombres indiquen cadascun dels isòmers.

3.2.4. Tractament estadístic

Per tal de confirmar (o descartar) l'existència de diferències estadísticament significatives entre la parcel·la tractada i la no tractada i al llarg del temps (en el cas de l'assaig de bioremediació de la platja contaminada) o entre les mostres biodegradades, fotooxidades i sotmeses als dos processos (en cas dels experiments in vitro), s'han realitzat tests ANOVA de comparació de mitjanes, utilitzant el paquet estadístic *SPSS 12.0* (*SPSS Inc.*, Chicago, IL, EUA).

3.3. Mètodes microbiològics

3.3.1. Medis de cultiu i reactius

Si no s'indica el contrari, les sals amb què s'han preparat els medis són de *Merck KGaA*. Els medis de cultiu preparats (TSB, agar marí, brou marí, extracte de llevat, triptona) els agars i les agaroses són de *Conda* (Torrejón de Ardoz). Tots els medis, llevat que s'indiqui el contrari, s'han preparat en aigua milliQ.

Els medis preparats i els reactius usats han estat els següents:

- Aigua de mar artificial *Scharlau Chemie SA* (Barcelona).
- Aigua DEPC: 0,1% dietilpirocarbonat (DEPC) en aigua milliQ, s'incuba durant 2 hores a 37 °C i s'autoclava.
- Brou Bushnell-Haas (BHB): 0,2 g l⁻¹ MgSO₄, 1g l⁻¹ KH₂PO₄, 0,02 g CaCl₂, 1 g l⁻¹ (NH₄)₂HPO₄, 1 g l⁻¹ KNO₃, 0,05 g l⁻¹ FeCl₃.
- HAP per als recomptes per MPN: 10 mg ml⁻¹ fenantrè, 1 mg ml⁻¹ antracè, 1 mg ml⁻¹ fluorè, 1 mg ml⁻¹ dibenzotiofè en pentà. Tots els hidrocarburs són de *Sigma-Aldrich* excepte el fluorè i el pentà que són de *Fluka*.
- LB (medi Luria-Bertani): 10 g l⁻¹ triptona, 5 g l⁻¹ extracte de llevat, 10 g l⁻¹ NaCl. pH 7,0.
- LB agar: LB + 15 g l⁻¹ agar.
- LB ampicil·lina: LB + 0,1 g l⁻¹ ampicil·lina (*Roche Molecular Biochemicals*, Mannheim, Alemanya).
- LB ampicil·lina agar: LB agar + 0,1 g l⁻¹ ampicil·lina.
- LB AXI agar: LB ampicil·lina agar + 0,1 g l⁻¹ Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranòsid (IPTG, *Merck*), 40 mg l⁻¹ 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranòsid (X-gal, *Merck*).

- Medi mineral (BMTM): 4,25 g l⁻¹ K₂HPO₄·3H₂O, 1 g l⁻¹ NaH₂PO₄·H₂O, 2 g l⁻¹ NH₄Cl, 0,2 g l⁻¹ MgSO₄·7H₂O, 123 mg l⁻¹ nitril triacètic àcid diNa, 12 mg l⁻¹ FeSO₄, 3 mg l⁻¹ MnSO₄·H₂O, 3 mg l⁻¹ ZnSO₄·7H₂O, 1 mg l⁻¹ CoCl₂·6H₂O.
- Medi mineral (BMTM) 3% NaCl: BMTM + 28,3 g l⁻¹ NaCl.
- Tampó de càrrega III (gels d'agarosa): 12,5 mg xilen-cianol, 12,5 mg blau de bromofenol, 1,5 ml glicerol, 3,5 ml blau d'aigua mil·liQ.
- Tampó de gradient: 0,1 M tri-HCl (pH 8,0), 0,1 M KCl, 1 mM EDTA en aigua DEPC, estèril i filtrat.
- TAE 50x: 2 M tris base (*Pharmacia Biotech*, Amersham, GB), 1 M acetat sòdic, 50 mM EDTA *Tritriplex III*. pH 8,0.
- TBE 10x: 0,9 M tris base, 0,9 M, 0,9% àcid bòric (*Sigma-Aldrich*), 20 mM EDTA. pH 8,0.
- TE: 10 mM tris i 1mM EDTA. pH 8,0.
- TSB 3% NaCl: TSB + 25 g l⁻¹ NaCl.

3.3.2. Recomptes de microorganismes

S'han quantificat les poblacions heteròtrofa i degradadores d'alcans, d'alifàtics i d'aromàtics per nombre més probable (MPN), en plaques de microtitulació amb vuit rèpliques per dilució (Wrenn i Venosa, 1996). Els medis utilitzats en els diversos recomptes es troben recollits a la taula 3.3.

Taula 3.3. Composició dels medis per als recomptes de nombre més probable.

Comunitat	Experiment	Medi de cultiu	Font de carboni
Heteròtrofa	Conсорcis al·lòctons	TSB	-
Degradadora d'alcans		BMTM	<i>n</i> -hexadecà
Degradadora d'alifàtics		BMTM	FI
Degradadora d'aromàtics		BMTM	Mescla d'HAP*
Heteròtrofa	Conсорci autòcton (M81)	TSB 3% NaCl	-
Degradadora d'alcans		BMTM 3% NaCl	<i>n</i> -hexadecà
Degradadora d'alifàtics		BMTM 3% NaCl	FI
Degradadora d'aromàtics		BMTM 3% NaCl	Mescla d'HAP

*Vegeu 3.3.1.

3.3.3. Aïllament de microorganismes

Per tal de caracteritzar el consorci M81 s'ha procedit a l'aïllament de soques per purificació en placa a partir de plaques de microtitulació per als recomptes per MPN sembrades a l'inici de l'enriquiment (taula 3.4).

Taula 3.4. Procedència dels inòculs per a les purificacions.

Microorganismes	Procedència (placa de MPN)	Data de sembra	Medi sòlid (agar) de purificació
Heteròtrofs	TSB 3% NaCl	17/06/2004	Agar marí
Heteròtrofs	BMTM 3% NaCl <i>n</i> -hexadecà	17/06/2004	Agar marí
Heteròtrofs	BMTM 3% NaCl + HAP	22/06/2004	Agar marí
Degradadors d'alcans	TSB 3% NaCl	17/06/2004	BMTM 3% NaCl <i>n</i> -hexadecà
Degradadors d'alcans	BMTM 3% NaCl <i>n</i> -hexadecà	17/06/2004	BMTM 3% NaCl <i>n</i> -hexadecà
Degradadors d'HAP	TSB 3% NaCl	17/06/2004	BMTM 3% NaCl fenantrè
Degradadors d'HAP	BMTM 3% NaCl + HAP	22/06/2004	BMTM 3% NaCl fenantrè

S'han sembrat plaques (per extensió i en estria) en agar marí, per obtenir soques heteròtrofes, i en medi mineral enriquit en sal (3% de NaCl), per obtenir soques potencialment degradadores. Per aïllar potencials degradadors d'alcans s'ha usat *n*-hexadecà en fase vapor, posant cotons estèrils impregnats amb l'hidrocarbur a la tapa de la placa. Els d'aromàtics s'han sembrat en agar amb fenantrè dissolt al 0,1%.

3.3.4. Aïllament d'àcids nucleics

S'ha extret el DNA genòmic de tota la comunitat utilitzant el kit d'extracció *Power Soil* (*MoBio Laboratories*, Solano Beach, CA, EUA), seguint les instruccions del fabricant. I se n'han obtingut entre 5 i 20 µg per gram de mostra. Les característiques de les mostres han fet que no calgui purificar per evitar possibles inhibicions en la posterior PCR.

En l'experiment de marcatge de DNA amb isòtops estables (SIP) s'ha utilitzat el kit *G-nome* de *Qbiogene* (Heidelberg, Alemanya), seguint el seu protocol, i s'ha quantificat fluorimètricament utilitzant el reactiu *PicoGreen dsDNA Quantitation Reagent* (*Molecular Probes*, Eugene, OR, EUA) en un *TBS-380 Mini-Fluorometer* (*Turner BioSystems*, Sunnyvale, CA, EUA). Per a la corba de calibratge s'ha usat DNA del fag λ en concentracions de 0 a 2,5 ng µl⁻¹ en TE.

En l'experiment de marcatge amb isòtops estables de RNA, s'ha extret tot l'RNA dels cultius utilitzant el kit *Fast RNA Spin Blue Kit* (*Qbiogene*), s'ha tractat amb *Dnase I* (*Invitrogen*, Karlsruhe, Alemanya) seguint les instruccions del fabricant i s'ha quantificat mitjançant un espectofotòmetre *nanodrop 1000* (*Thermo Scientific*, Wilmington, DE, EUA).

Anàlisi electroforètica del DNA

Les mostres de DNA s'han corregut en gels d'agarosa LE (*Conda*) a concentracions entre 0,8 i 2% en tampó TBE 0,5x amb una font d'alimentació *Power-Pac 300* (*Bio-Rad Laboratories*, Hercules, CA, EUA) a 95-120 V. S'han tenyit durant 15 min en una solució de bromur d'etidi (*Sigma-Aldrich*) a una concentració final de 0,75 µg ml⁻¹ en TBE 0,5x. Els gels s'han observat per transil·luminació en un *ImageMaster* (*Pharmacia Biotech*).

Per a l'estimació de la longitud dels fragments de DNA separats, s'han emprat diversos marcadors: λ -HindIII (*Promega*), que conté fragments d'entre 23 i 0,5 kb, i 100bp ladder de *Gibco BRL* (Rockville, MD, EUA).

3.3.5. Amplificació per PCR

S'han amplificat (completament o només les regions hipervariables V3-V5) els gens 16sRNA tant del DNA genòmic de les mostres extretes (vegeu 3.3.4) com de les bandes escindides i dels plàsmids de les llibreries de clons. Totes les PCR s'han dut a terme en 50 μ l de volum final en un *Mastercycler* (*Eppendorf*, Hamburg, Alemanya), utilitzant 2,5 unitats de la polimerasa *Takara Ex Taq DNA polymerase* (*Takara Bio*, Otsu, Shiga, Japó) (taula 3.5), amb 0,5 μ M de cadascun dels encebadors adients (taula 3.6) i la concentració de DNA motlle adequada, mesurada mitjançant un marcador de baix pes molecular (*Low DNA Mass Ladder*, *Gibco*).

Taula 3.5: Composició de la mescla mare per a PCR per a DGGE o llibreries de clons. En cada reacció cal afegir 1 μ l de DNA motlle.

Mescla mare PCR per a DGGE/llibreries de clons	Volum (μ l)	Concentració a la reacció
Aigua lliure de nucleases	34,75	
Tampó (10x) (20 mM Mg ²⁺)	5	1x (2 mM)
Solució de dNTP (2,5 mM)	4	200 μ M
Encebador F (10 μ M)	2,5	0,5 μ M
Encebador R(10 μ M)	2,5	0,5 μ M
Polimerasa ExTaq Hot Start (10 U μ l ⁻¹)	0,25	2,5 U

Taula 3.6. Característiques dels encebadors emprats.

Encebador	Referència	Posició a <i>E coli</i>	Seqüència 5' - 3'	Bases	Programa
16F341-GC*	Yu i Morrisson,	341-357	CCT ACG GGA GGC AGC AG	17	I
16F357	Lane, 1991		ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG	20	III
16R907	Lane, 1991	907-926	CCG TCA ATT CCT TT(A/G) AGT TT	20	I, III, IV, qPCR
16F27	Weisburg et al., 1991	8-27	AGA GTT TGA TC(A/C) TGG CTC AG	20	II
16R1492	Weisburg et al., 1991		TAC GG (C/T) TAC CTT GTT ACG ACT T	22	II
16R1521	Weisburg et al., 1991		AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA	20	II
16F519	Lane, 1991		G(A/T)A TTA CCG CGG C(G/T)G CTG	18	IV, qPCR

*GC: seqüència de quaranta bases rica en GC unida a l'extrem 5' de l'encebador: 5'-CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC G-3'. **Els programes corresponen als de la taula 3.9.

En el cas de les anàlisis per T-RFLP, les reaccions de PCR s'han efectuat segons els protocols especificats a Lueders et al. (2004) i Whiteley et al. (2007) en 50 µl de volum final, utilitzant els encebadors 16F519 i 16R907 (taula 3.6). El DNA s'ha amplificat utilitzant la polimerasa *AmpliTaq DNA polymerase* d'*Applied Biosystems* (Foster City, CA, EUA) (taula 3.7).

Taula 3.7. Composició de la mescla mare per a PCR per a l'anàlisi de DNA per T-RFLP. En cada reacció cal afegir 1 µl de DNA motlle.

Mescla mare qRT-PCR	Concentració a la reacció
Aigua lliure de nucleases	
Tampó II (<i>Applied biosystems</i>)	1x
MgCl ₂	1,5 mM
BSA (<i>Roche</i>)	0,2 µg µl ⁻¹
dNTPs	100 µM de cada
Encebador F519	0,3 µM
Encebador R907	0,3 µM
Polimerasa <i>AmpliTaq</i> (<i>Applied biosystems</i>)	1,25 U

L'RNA s'ha retrotranscrit i amplificat emprant el kit *AccessQuick RT-PCR System* de *Promega* (Madison, WI, EUA) (taula 3.8). En funció de l'objectiu perseguit en la reacció de PCR s'han utilitzat diferents programes tèrmics, els quals s'especifiquen a la taula 3.9.

Taula 3.8. Composició de la mescla mare per a PCR per a l'anàlisi d'RNA per T-RFLP. En cada reacció cal afegir 1 µl d'RNA motlle.

Mescla mare PCR per a T-RFLP	Volum (µl)	Concentració a la reacció
Aigua lliure de nucleases	21,7	
<i>AccessQuick 2x</i> master mix	25	1x
BSA (20 mg ml ⁻¹)	0,5	0,2 µg µl ⁻¹
Encebador F519 (50 µM)	0,5	0,5 µM
Encebador R907 (50 µM)	0,5	0,5 µM
R-transcriptasa AMV (5 U µl ⁻¹)	0,8	4 U

Taula 3.9. Programes de PCR emprats.

Programa	<i>Touch down</i>	Desnat. inicial	Cicles	Desnat.	Temperatures (temps)			Final
					Híbrid.	Elong.	Elong. Final	
DGGE (I)	Sí*	94 °C (9 min)	20	94 °C (1 min)	55 °C (30 s)	72 °C (1 min)	72 °C (10 min)	4 °C
Llibreries (II)	No	95 °C (5 min)	40	96 °C (30 s)	50 °C (30 s)	72 °C (2 min)	72 °C (10 min)	8 °C
Seqüenciació (III)	No	96 °C (1 min)	25	96 °C (10 s)	55 °C (5 s)	60°C (4 min)	-	8 °C
T-RFLP (IV)**	No	94 °C (5 min)	25-30	94 °C (30 s)	52 °C (30 s)	70 °C (1 min)	70 °C (5 min)	4 °C

* Aquesta tècnica redueix l'amplificació inespecífica durant els primers cicles de la PCR (Roux, 1995).

** En cas que es faci amb RNA, cal una transcripció reversa inicial 20 min a 45 °C.

3.3.6. Anàlisi per DGGE

Els productes de PCR (aproximadament uns 400 ng quantificats utilitzant el marcador *Low DNA Mass Ladder* de *Gibco*) s'han corregut en gels de 75 µm de gruix de poliacrilamida al 6% i amb un gradient desnaturalitzant amb concentracions de formamida-urea creixents en el sentit de migració electroforètica (taula 3.10). Prèviament, ha estat necessari optimitzar el gradient, analitzant les mostres amb un rang menys restrictiu de concentracions (20-80%). El 100% desnaturalitzant està definit amb una concentració d'urea de 7 M i el 40% de formamida desionitzada.

Taula 3.10. Composició de les solucions amb què es preparen els gradients desnaturalitzants.

Reactius	concentració de les solucions mare per al gradient							
	80%	70%	60%	50%	40%	30%	20%	0%
Solució 80% desnaturalitzant (ml)	8,8	7,7	6,6	5,5	4,4	3,3	2,2	0
Solució 0% desnaturalitzant (ml)	0	1,1	2,2	3,3	4,4	5,5	6,6	8
TEMED (µl)	8	8	8	8	8	8	8	7,2
APS (µl)	45	45	45	45	45	45	45	41

Les electroforesis s'han dut a terme en un *DGGE-2001 System* (*CBS Scientific*, Del Mar, CA, EUA) a 100 V i 60°C durant 16 hores. Passat aquest temps, els gels s'han tenyit durant 45 minuts en TAE amb *SybrGold* (*Molecular Probes*) i escanejat utilitzant un *Bio-Rad molecular imager FX Pro Plus* (*Bio-Rad Laboratories*) amb el filtre per a bromur d'etidi en el mode de tinció de DNA a intensitat mitjana.

Les imatges s'han processat amb el programa *Quantity-one 4.5.1* (*Bio-Rad Laboratories*) i les bandes s'han corregit manualment. Per a anàlisis posteriors, s'han emprat totes les bandes que, després de la normalització, tinguessin una intensitat relativa superior al 2%. Un cop escanejats els gels, se n'han escindit les bandes amb un bisturí estèril. Aquestes s'han ressuspès en 50 µl d'aigua pura lliure de DNA i RNAases i s'han deixat reposar tota la nit a 4°C. Passat aquest temps s'ha reamplificat una alíquota (1 µl) del sobrenedant emprant els encebadors F341GC i R907 (vegeu 3.3.5)

Tractament estadístic

Els perfils de DGGE de les diverses mostres estudiades s'han sotmès a una anàlisi de components principals (PCA) segons la metodologia descrita a Viñas et al. (2005b).

3.3.7. Obtenció de llibreries de clons

S'han fet llibreries de clons del gen 16S rRNA de mostres de DNA del cultiu del consorci M81. Aquesta metodologia també ha servit per clonar bandes dels gels de DGGE en els casos en què, d'altra manera, la seqüenciació no hagi estat possible.

Lligació dels productes de PCR

Els amplicons, purificats amb el kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* de *Promega*, s'han lligat al vector *pGEM-T easy* de la mateixa casa comercial, seguint el protocol del fabricant. Les reaccions s'han dut a terme en 10 µl finals (taula 3.11) amb 2 µl d'extracte purificat (relació molar vector insert 1:3), a 4 °C *overnight*.

Taula 3.11. Composició de la mescla mare per a la lligació.

Mescla mare lligació	Volum (µl)
Aigua lliure de nucleases	1
Tampó de lligació 2x	5
Vector <i>pGem-T easy</i> (50 ng)	1
DNA lligasa T4 (3 unitats Weiss µl ⁻¹)	1

Obtenció de cèl·lules competents

S'han inoculat 400 µl d'un cultiu d'*E coli* DH5α en LB a 37 °C en un matràs de 100 ml amb 20 ml de LB fresc. S'ha deixat créixer fins a fase exponencial (A_{600nm} 0,6-0,7). S'ha incubat 10 min en gel i centrifugat a 4 °C a 3.500 rpm. S'ha fet un xoc ressuspenent el *pellet* amb 5 ml de CaCl₂ 50 mM fred (4 °C) i incubant durant 20 minuts en gel. Després s'ha tornat a centrifugat en les mateixes condicions, s'han resuspès els *pellets* en 660 µl de CaCl₂ i s'ha incubat una hora més en gel. Les cèl·lules, competents, s'han conservat a -20 °C amb un 15% de glicerol abans del seu ús.

Transformació i selecció dels clons recombinants

S'han afegit 2 µl de lligació a 100 µl de cèl·lules competents i s'ha sotmès la mescla a un xoc tèrmic de 2 min a 42 °C, seguit d'una incubació de 2 min en gel. Se li ha afegit 1 ml de medi LB fresc i s'ha incubat a 37 °C i 200 rpm durant 1 hora. Com a control de la transformació s'ha usat el vector pUC19. Després s'ha sembrat (400 µl) per extensió en medi LB AXI (vegeu 3.3.1) i s'ha incubat 16 hores a 37 °C.

La detecció de clons recombinants es fa atenent a dos factors: la seva resistència a l'ampicil·lina (capacitat de créixer en LBAXI), la qual cosa indicarà que el clon presenta el vector *pGEM-T easy*, i la inactivació del gen *lacZ* contingut en el vector per la inserció del fragment de DNA clonat, que es veurà reflectida en la coloració de la colònia. Quan no hi ha fragment inserit, *lacZ* serà actiu, de manera que podrà transformar el substrat X-Gal en un compost blau; en canvi, quan el gen estigui truncat, la incapacitat de transformar X-Gal resultarà en l'aparició de colònies blanques.

Purificació dels vectors

Un cop seleccionats els clons, s'han fet créixer en LB ampicil·lina líquid a 37 °C *overnight*. Per extreure'n els vectors s'ha utilitzat el kit *Wizard Plus SV Minipreps DNA purification System* de *Promega*.

Per tal de comprovar que els inserts presentaven la longitud adequada, s'ha fet una anàlisi de restricció, utilitzant l'enzim *EcoRI* (*Roche*) i deixant incubar 2,5 hores a 37 °C.

3.3.8. Detecció de DNA/RNA marcats amb isotops estables (SIP)

Un cop acabat l'experiment amb isotops estables (SIP) cal separar els àcids nucleics que han incorporat ^{13}C d'aquells que no ho han fet. La mostra se centrifuga per tal de generar un gradient de densitats. Al final de la centrifugació el DNA o l'RNA pesants (enriquits en ^{13}C) formarà una banda a la part mitjana-inferior del tub de centrifuga, mentre que el lleuger en formarà una altra a la part mitjana-superior. Les solucions per formar els gradients s'han preparat d'acord a la metodologia especificada a Neufeld et al. (2007a) i Whiteley et al. (2007).

Preparació dels gradients i centrifugació isopícnica

Les solucions per als gradients s'han preparat en tubs estèrils de 15 ml de la següent manera:

- Gradient de DNA: 5 ml de CsCl $1,84 \text{ g ml}^{-1}$ (preparat en tampó de gradient amb CsCl *Calbiochem, Merck KGaA*), fins a 800 μl de tampó de gradient (en funció del volum de DNA afegit), fins a 5 μg de DNA.
- Gradient de RNA: 5,1 ml de CsTFA ($\sim 2 \text{ g ml}^{-1}$, *GE Healthcare*, Buckinghamshire, GB), 185 μl de formamida desionitzada congelada (*Sigma-Aldrich*) (Manfield et al., 2002), fins a 1 ml de tampó de gradient (en funció del volum de RNA afegit), uns 500 ng de rRNA.

A més, s'han preparat blancs sense DNA o RNA com a gradients de referència. Tots els tubs s'han barrejat suaument i s'ha mesurat l'índex de refracció (nD-TC) de les solucions amb un refractòmetre digital *AR200* de *Reichert* (Seefeld, Alemanya), utilitzant 75 μl de cadascuna. Després s'ha ajustat cadascuna de les mostres (afegint tampó de gradient o la sal de Cs corresponent) per tenir índexs de refracció de $1,4040 \pm 0,0002$ (equivalent a uns $1,72 \text{ g ml}^{-1}$ CsCl) en el cas del DNA, i de $1,3727 \pm 0,0002$ (equivalent a uns $1,80 \text{ g ml}^{-1}$ CsTFA) en el cas de l'RNA.

Les mostres s'han transferit amb molta cura a tubs de polialòmer *Quick-Seal Beckman* (München, Alemanya) de 5,1 ml (DNA) i 6 ml (RNA) que s'han segellat tèrmicament. Les centrifugacions s'han dut a terme en un rotor vertical TV865 (*Sorvall*, Newton, CT, EUA) a 20 °C. Per al gradient en CsCl (separació de DNA) s'ha centrifugat durant més de 36 h a 45.000 rpm ($177.000 \text{ g}_{\text{av}}$); el gradient en CsTFA (separació d'RNA), 65 h a 37.000 rpm ($125.000 \text{ g}_{\text{av}}$).

Fraccionament

La recuperació del DNA i l'RNA centrifugats s'ha fet per separació dels gradients en fraccions d'uns 380 μl . Les fraccions es recullen començant per la més densa, desplaçant el líquid del gradient des de la part superior del tub. Amb aquesta finalitat s'hi ha col·locat una agulla estèril de 0,4 mm de diàmetre. L'agulla es connecta a una bomba de xeringa plena d'aigua estèril (figura 3.13). Es perfora la part inferior del tub amb una agulla estèril de 0,4 mm de diàmetre i es bombeja l'aigua a 1 ml min^{-1} . Es recullen les fraccions en tubs de 2 ml estèrils.



Figura 3.13. recuperació dels àcids nucleics després de la centrifugació. Font: Neufeld et al. (2007).

Mesura de les densitats

Un cop fraccionades les mostres, s'han calculat les densitats de cadascuna de les fraccions correlacionant-les amb l'índex de refracció mesurat amb el refractòmetre. Les mesures es fan començant per la fracció més lleugera amb 75 µl de cada fracció.

Precipitació dels àcids nucleics

Després de mesurar la densitat de les fraccions, es precipiten amb dos volums de polietilenglicol al 30% (DNA) i un volum d'isopropanol (RNA) seguint els protocols de Neufeld et al. (2007) i Whiteley et al. (2007). Les fraccions precipitades es poden conservar a -20 °C. En el cas de l'RNA, però, donat que és molt làbil es recomana fer les anàlisis posteriors de manera immediata.

3.3.9. PCR quantitativa

Per tal de quantificar el DNA i l'RNA de cadascuna de les fraccions obtingudes en els experiments de SIP (vegeu 3.3.8) i saber en quines es troben els àcids nucleics, s'ha seguit la metodologia publicada per Lueders et al. (2004) i Whiteley et al. (2007). El DNA s'ha amplificat utilitzant la polimerasa *AmpliAq DNA polymerase* d'*Applied Biosystems* (taula 3.12) amb el programa tèrmic de la taula 3.13.

Taula 3.12. Composició de la mescla mare per a PCR quantitativa amb DNA. En cada reacció cal afegir 2 µl de DNA motlle.

Mescla mare qRT-PCR	Concentració a la reacció
Aigua lliure de nucleases	
Tampó II (<i>Applied biosystems</i>)	1x
MgCl ₂	1,5 mM
BSA	0,2 µg µl ⁻¹
dNTPs	100 µM de cada
<i>SYBR Green</i> (<i>FMC Bioproducts</i> , Rockland, ME, EUA)	0,2x
<i>Rox Dye</i>	0,6x
Encebador F519	0,3 µM
Encebador R907	0,3 µM
Polimerasa <i>AmpliTaq</i>	1,25 U

Taula 3.13. Programa tèrmic per a la PCR quantitativa.

Pas	Temperatura (°C)	Durada (min)	Fluorescència
Retrotranscripció*	45	20	
Desnaturalització inicial	95	5	
35 cicles de:			
Desnaturalització	95	0,5	
Hibridació	52	0,5	SYBR
Elongació	68	0,5	
Elongació final	68	5	
Desnaturalització final	95	1	
Reassociació	55	0,5	
Rampa de dissociació	55-95	30	SYBR
Temperatura final	25	sostinguda	

*Aquest pas no ha estat necessari en la quantificació de DNA.

L'RNA s'ha retrotranscrit i amplificat emprant el kit *AccessQuick RT-PCR System* en un termociclador *Mx3000P* de *Stratagene* (La Jolla, CA, EUA) (taula 3.14), amb el programa tèrmic de la taula 3.13. En ambdós casos s'ha emprat *SYBR Green* com a marcador.

Taula 3.14. Composició de la mescla mare per a PCR quantitativa amb RNA. En cada reacció cal afegir 2 μl d'RNA motlle.

Mescla mare qRT-PCR	Volum (μl)	Concentració a la reacció
Aigua lliure de nucleases	16,4	
<i>AccessQuick</i> 2x master mix	20	1x
BSA (20 mg ml^{-1})	0,4	0,2 $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$
Solució de treball <i>SYBR Green</i> (20x)	0,2	0,1x
Solució de treball <i>Rox Dye</i>	0,6	0,3x
Encebador F519 (50 μM)	0,2	0,25 μM
Encebador R907 (50 μM)	0,2	0,25 μM
R-transcriptasa AMV (5 U μl^{-1})	0,6	3 U

Com a patrons per a la quantificació, s'ha utilitzat rRNA d'*E coli* a concentracions de $7,56 \cdot 10^{-7}$ a $7,56 \cdot 10^8$ ng μl^{-1} .

Anàlisi i interpretació de les dades

La PCR en temps real permet fer un seguiment de la formació de productes d'amplificació a mesura que la reacció té lloc, mesurant la fluorescència emesa per un fluorocrom (Heid et al., 1996), en aquest cas *SYBR Green*. Aquest agent s'intercala a l'estructura secundària de la doble cadena de DNA, de manera que se n'incrementa la taxa de fluorescència. Representant la fluorescència emesa en funció del temps, s'obtenen corbes d'amplificació com les de la figura 3.14.

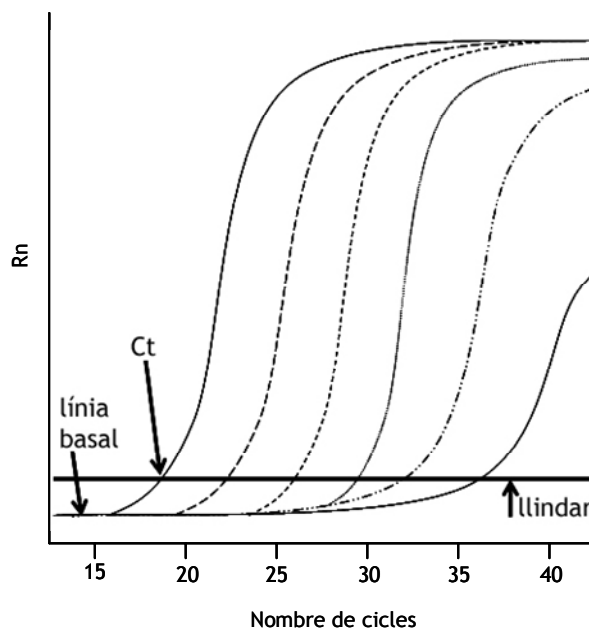


Figura 3.14. Esquema de les corbes d'amplificació dels patrons per a la quantificació (cada patró és una diluïció 1/10 de l'anterior). C_t és el nombre de cicles a partir del qual s'obté fluorescència per sobre del llindar establert.

En cadascuna de les corbes, s'ha mesurat el nombre de cicles a partir del qual s'obté fluorescència per sobre d'un llindar establert (C_t), aquest paràmetre està correlacionat (de manera inversament proporcional) amb el logaritme de la concentració de DNA o RNA motlle,

de manera se n'obté una corba de calibrat, a partir de la qual pot calcular-se la concentració de DNA o RNA a la mostra. Per a tenir una explicació més exhaustiva sobre el càlcul de les concentracions podeu consultar, per exemple, Bustin (2000).

3.3.10. Anàlisi per T-RFLP

Tant el DNA com l'RNA recuperats per fraccionament en els experiments de SIP, s'han analitzat per T-RFLP per tal de comprovar si els patrons de la comunitat microbiana marcada amb ^{13}C diferien dels de la no marcada i poder identificar les bandes diferents en el perfil marcat.

Els amplicons s'han purificat en columnes *MinElute* de *Qiagen* seguint el protocol del fabricant. Les digestions s'han dut a terme amb 60 ng de producte de PCR, mesurats amb *nanodrop*, en 10 μl de volum total que contenen també a 1x i 0,3 μl d'enzim de restricció (*MspI*, *AluI*, *TaqI*), durant 2 h a 37 °C. Els productes de la digestió s'han purificat utilitzant columnes *DyeEx* (fabricant, lloc) seguint les instruccions del fabricant i s'han diluït en formamida amb 1/300 part del marcador *MapMarker-1000* que conté ROX (1 μl de producte de digestió en 13 μl de formamida).

L'electroforesi capil·lar dels productes purificats s'ha dut a terme en un analitzador *ABI3730* (*Applied Biosystems*). Per a l'anàlisi dels electroferogrames resultants s'ha emprat el programa *GenMapper* (*Applied Biosystems*).

Anàlisi dels fragments de restricció obtinguts

Les longituds dels fragments obtinguts s'han comparat amb les generades in silico a partir de la base de dades de *Ribosomal Database Project II* (Cole et al., 2005), emprant l'eina *Virtual Digest* del *Microbial Community Analysis III* (Shyu et al., 2007) disponible a la xarxa.

3.3.11. Seqüenciació

La seqüenciació s'ha efectuat pel mètode de Sanger i col·laboradors (1977), utilitzant un kit *ABI Prism Big Dye Terminator* versió 3.1. (*Perkin-Elmer Applied Biosystems*) i un seqüenciador de DNA *ABI 3700* de la mateixa casa comercial. Totes les reaccions d'amplificació s'han dut a terme en un termodiclador *Mastercycler* d'*Eppendorf*, emprant els volums de reactius especificats a la taula 3.15 i els encebadors i programa de temperatures descrits a l'apartat 3.3.6.

Taula 3.15. Composició de la mescla mare per a PCR de seqüenciació. En cada reacció poden afegir-se fins a 7 μl de DNA motlle en funció de la concentració. L'aigua a afegir serà la necessària per tenir 10 μl finals.

Mescla mare seqüenciació	Volum (μl)	Concentració a la reacció
Aigua lliure de nucleases	fins a 6	
Encebador F (3,2 μM)	1	0,32 μM
Encebador R (3,2 μM)	1	0,32 μM
Polimerasa Big Dye Terminator v 3.1.	1	

Anàlisi de les seqüències de DNA

Les seqüències s'han editat i acoblat amb el programa *BioEdit* versió 7.0.9 (Hall, 2007) i s'han corregit manualment. S'han sotmès a una anàlisi amb el programa *Check Chimera* del *Ribosomal Database Project II* (Cole et al., 2005) i després s'han enviat a les bases de dades NCBI BLAST i RDP (Altschul et al., 1997; Cole et al., 2005) per a la seva comparació. Les anàlisis filogenètiques s'han dut a terme amb el programa *Mega4* (Tamura et al., 2007), que alinea les seqüències mitjançant l'eina *ClustalW* (Thompson et al., 1994).

