


ORIGINAL RESEARCH

Monitoreo de contaminantes y detección de genes *alkB* en la Zona Común de Pesca Argentino-Uruguaya

SILVIA R. PERESSUTTI^{1,*} y PABLO A. ZORZOLI²

¹Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero (INIDEP), Paseo Victoria Ocampo N° 1, Escollera Norte, B7602HSA - Mar del Plata, Argentina. ²Servicio de Hidrografía Naval, Av. Montes de Oca 2124, C1270ABV - Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina. ORCID *Silvia R. Peressutti*  <https://orcid.org/0000-0001-5691-0917>



RESUMEN. En este estudio se determinó la presencia de diversos contaminantes en muestras de sedimentos en el Río de la Plata y la Zona Común de Pesca Argentino-Uruguaya (ZCPAU, 35° S-38° S). Además, se analizó la ocurrencia de genes *alkB* microbianos, utilizados como biomarcadores funcionales para determinar el potencial de degradación de hidrocarburos a lo largo de este ambiente marino. Se detectaron metales pesados en las estaciones UY1, RdP4 y AR2. El Cr se encontró en un rango entre < 5,0 y 20,7 mg kg⁻¹, y el Pb entre no detectable (ND) y 26,0 mg kg⁻¹. Tanto el Cd como el Hg mostraron valores por debajo de los límites de detección (< 0,2 mg kg⁻¹ y < 0,01 mg kg⁻¹, respectivamente). El Cu varió entre ND y 24,6 mg kg⁻¹, y fue el único metal que sobrepasó los valores recomendados por la ISQG (Interim Sediment Quality Guideline), en los niveles guía en sedimentos para la protección de la biota (CCME, Canadian Council of Ministers of the Environment). Los valores de hidrocarburos, atrazina, glifosato + AMPA (ácido aminometil fosfónico) y pesticidas estuvieron por debajo del límite de cuantificación, mientras que los PCBs (desde < 20,0 a 77,7 μg kg⁻¹) excedieron el nivel de acción A de las “Recomendaciones para la Gestión del Material de Dragado en los Puertos Españoles”. Se obtuvo ADN genómico microbiano purificado en ocho de las nueve muestras analizadas y se logró la amplificación del gen catabólico *alkB* en las estaciones UY2, UY1, RdP4, AR2 y AR1. Es necesario realizar estudios adicionales para evaluar el potencial de biodegradación microbiana en esta área. Estas investigaciones representan un valioso aporte para evaluar el impacto de las alteraciones antropogénicas sobre los ecosistemas marinos y para comprender los mecanismos de la atenuación natural.



*Correspondence:
silviap_ar@inidep.edu.ar

Received: 22 August 2022
Accepted: 19 December 2022

ISSN 2683-7595 (print)
ISSN 2683-7951 (online)

<https://ojs.inidep.edu.ar>

Journal of the Instituto Nacional de
Investigación y Desarrollo Pesquero
(INIDEP)



This work is licensed under a Creative
Commons Attribution-
NonCommercial-ShareAlike 4.0
International License

Palabras clave: Ambiente marino, contaminantes persistentes, genes catabólicos.

Contaminant monitoring and detection of *alkB* genes in the Argentine-Uruguayan Common Fishing Zone

ABSTRACT. In this study, the presence of diverse pollutants in sediments samples was determined in the Río de la Plata and the Argentine-Uruguayan Common Fishing Zone (AUCFZ 35° S-38° S). In addition, the occurrence of microbial genes *alkB*, used as functional markers, was analyzed in order to determine the hydrocarbon degradation potential along this marine environment. Heavy metals were detected in sampling sites UY1, RdP4 and AR2. Cr was found in a range from < 5.0 to 20.7 mg kg⁻¹, and Pb from not detectable (ND) to 26.0 mg kg⁻¹. Both Cd and Hg showed values under detection limits (< 0.2 mg kg⁻¹ and < 0.01 mg kg⁻¹, respectively). Cu varied between ND and 24.6 mg kg⁻¹, and it was the only metal that overcame the values recommended by the ISQG (Interim Sediment Quality Guideline), in the guide levels for biota protection in sediments (CCME, Canadian Council of Ministers of the Environment). Hydrocarbons, atrazine, glyphosate + AMPA (aminomethyl phosphonic acid) and pesticides values were under the quantification limits, while

PCBs (from < 20.0 to $77.7 \mu\text{g kg}^{-1}$) exceeded the action level A for the 'Recommendations for the Management of Dredging Material in Spanish Ports'. Purified microbial genomic DNA was obtained in eight from the nine analyzed samples, and the catabolic gen *alkB* was amplified in sampling sites UY2, UY1, RdP4, AR2 and AR1. Further studies are needed to evaluate the microbial biodegradation potential in this area. These researches mean a valuable input in order to investigate the impact of anthropogenic disturbances on marine ecosystems and to understand the mechanisms of natural attenuation.

Key words: Marine environment, persistent contaminants, catabolic genes.

INTRODUCCIÓN

El Río de la Plata y la Zona Común de Pesca Argentino-Uruguaya (ZCPAU) representa un ambiente muy productivo, que sostiene pesquerías artesanales y costeras tanto en la Argentina como en Uruguay (Acha et al. 2008). En esta área también se llevan a cabo pesquerías demersales multiespecíficas asociadas a diferentes tipos de flotas comerciales (Militelli et al. 2013), así como a *stocks* de especies costeras que utilizan la zona como área de reproducción y cría (Mianzan et al. 2001; Jaureguizar et al. 2003).

A pesar del gran flujo de masas de agua y el poder de dilución de las aguas marinas y estuariales, el ambiente del ZCPAU se ve afectado por un aporte crónico de contaminantes originados por las actividades industriales y de embarcaciones, las cuales producen un impacto significativo sobre estos ecosistemas (Venturini et al. 2015). Existen varias fuentes de contaminación, como derrames accidentales, desechos de refinerías costeras, efluentes pluviales, tráfico de embarcaciones y actividades portuarias. Es ampliamente reconocido que la polución por compuestos tóxicos (hidrocarburos, metales pesados y pesticidas) ha dañado océanos, mares y zonas costeras constituyendo una constante amenaza para la sustentabilidad de los ecosistemas marinos (McGenity et al. 2012). La contaminación crónica en ambientes costeros da lugar a efectos adversos a diferentes niveles de organización biológica. Estos compuestos pueden producir daños fisiológicos a concentraciones subletales y alteraciones genéticas

en peces y otros organismos marinos, como así también se ha observado disminución de crecimiento y fecundidad (White y Triplett 2002; McGenity et al. 2012; Ernst et al. 2018). Además, también se ha demostrado su bioacumulación con posible transferencia a humanos vía alimentos de origen marino (Morales-Caselles et al. 2008). En estudios previos se ha detectado la presencia de hidrocarburos de origen antrópico, pirogénico y petrogénico (Colombo et al. 2004; Venturini et al. 2015), metales pesados y plaguicidas en sedimentos obtenidos en el estuario del Río de la Plata y en la ZCPAU (Carsen et al. 2005) (Figura 1). También se encontraron metales pesados y pesticidas en peces de esta zona (Colombo et al. 2000; Cappelletti et al. 2006).

Por las características físico-químicas de estos contaminantes, tienden a concentrarse en los sedimentos de la zona donde fueron descargados, transformándolos en potenciales sumideros de compuestos tóxicos. Cuando la calidad de las aguas mejora, por control de vertidos, la contaminación crónica en los sedimentos actúa como fuente secundaria de polución a través de procesos de erosión y/o transporte (Salomons y Brils 2004). Por esta razón, el Canadian Council of Ministers of the Environment (CCME) recomienda niveles guía de los diferentes contaminantes en sedimentos para la protección de la vida acuática (CCME 2001), diferenciando entre los niveles de polución que causan efectos crónicos, de los que generan efectos agudos.

Una herramienta para la remediación de este tipo de sumideros es el dragado de sedimentos y su posterior reubicación (CEDEX 1994). Por otro lado, los procesos de descontaminación de los

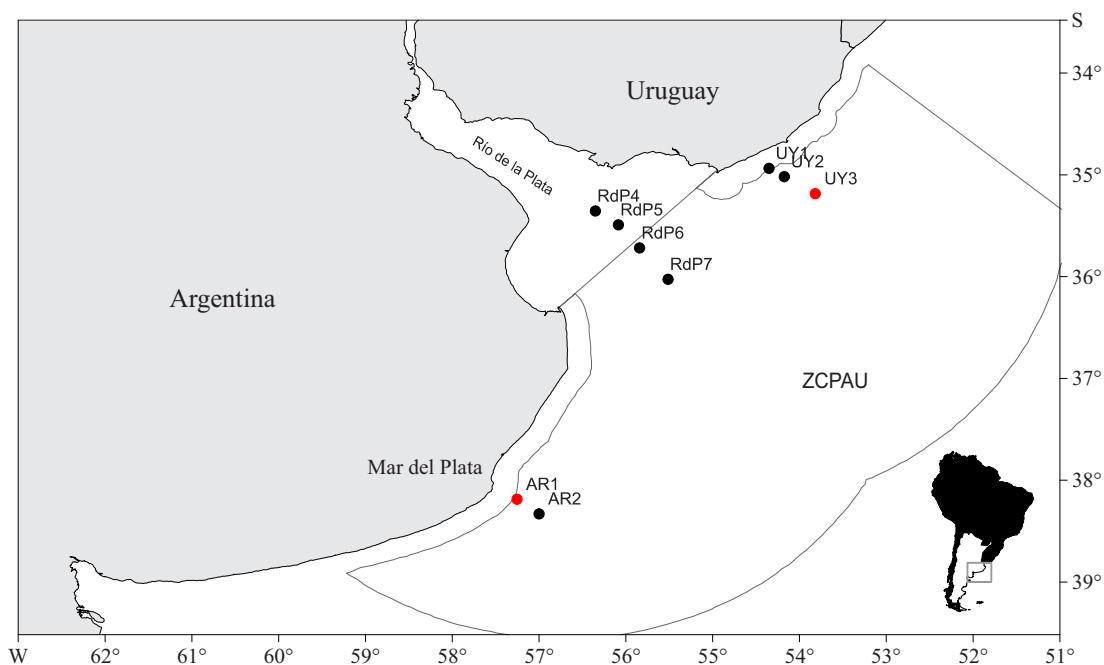


Figura 1. Localizaciones de sitios de muestreo en el Río de la Plata y la Zona Común de Pesca Argentino-Uruguaya (ZCPAU). Puntos rojos: análisis microbiológico. Puntos negros: análisis químico y microbiológico.
 Figure 1. Sampling sites locations in the Río de la Plata and the Argentine-Uruguayan Common Fishing Zone (ZCPAU). Red dots: microbiological analysis. Black dots: chemical and microbiological analysis.

ecosistemas marinos dependen primariamente de las comunidades microbianas presentes en el ambiente (Leahy y Colwell 1990). Gracias al desarrollo de nuevas técnicas moleculares, se han realizado estudios en diferentes ambientes sobre composición de comunidades bacterianas y genes que codifican enzimas claves involucradas en la degradación de contaminantes. Dentro de las mezclas complejas de compuestos oleosos hidrocarbonados, los alcanos constituyen más del 50% de la fracción orgánica. Estos residuos son hidrocarburos (HC) saturados con diferentes tamaños moleculares y estructuras químicas, y muchos de ellos son persistentes en el ambiente pudiendo volverse recalcitrantes debido a sus moléculas no polares químicamente inertes (Li et al. 2013).

Para las comunidades bacterianas degradadoras de alcanos, el gen *alkB* es considerado el mejor biomarcador funcional, ya que codifica las enzimas alcano monooxigenasas AlkB, que son

cruciales en las vías metabólicas involucradas en la degradación de alcanos de cadena corta, media y larga (< C10, C10-C16, C20-C40, respectivamente) (Wang y Shao 2012). Estos genes se encuentran ampliamente distribuidos y han sido utilizados para la descripción de la composición de comunidades degradadoras de alcanos y para calcular la abundancia de bacterias degradadoras de hidrocarburos en diversos ambientes (Smith et al. 2013; Nie et al. 2014; Corti-Monzón et al. 2021).

Los *clusters* de genes *alkB* codifican todas las proteínas necesarias para convertir los alcanos en los correspondientes ácidos grasos, dotando a los microorganismos con la habilidad de utilizar alcanos como única fuente de carbono y energía (Wang et al. 2022). Usualmente, existe un gen por genoma, aunque en algunas especies se han hallado dos o más genes *alkB* redundantes (Whyte et al. 2002). A pesar de que las secuencias de *alkB*

pueden ser muy divergentes, ellas comparten una región conservada que permite el diseño de cebadores aplicables para la amplificación de genes filogenéticamente distantes (Kloos et al. 2006; Viggor et al. 2013), permitiendo así la detección de los mismos en ambientes contaminados.

El presente estudio fue llevado a cabo con el fin de detectar la presencia de diversos contaminantes en muestras de sedimentos obtenidas en el Río de la Plata y la ZCPAU, así como la ocurrencia de genes *alkB* en las comunidades microbianas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Entre los días 4 al 14 de diciembre de 2019 se llevó a cabo una campaña de investigación multidisciplinaria de la Comisión Técnica Mixta del Frente Marítimo (CTMFM) (35° S-38° S) VA12/2019, denominada “Salud ambiental en la Zona Común de Pesca Argentino-Uruguay (ZCPAU) en un escenario de Cambio Global”, a bordo del buque BIP “V́ctor Angelescu” (INIDEP, Argentina). Se tomaron muestras de sedimento a lo largo de tres transectas que incluyeron nueve estaciones de muestreo, desde la costa hacia el Frente Marítimo (Figura 1).

El muestreo se realizó mediante un extractor tipo Snapper (EPA 2001). La extracción de muestras para metales pesados se llevó a cabo con una espátula de plástico realizando enjuagues de la misma con agua del sitio de muestreo. Una vez extraído el sedimento, se lo colectó en una bolsa de polipropileno y se conservó a 4 ± 2 °C hasta su medición en el laboratorio de análisis químicos ambientales Induser (Ciudad Autónoma de Buenos Aires). Posteriormente, se efectuó un segundo lance de Snapper para la extracción de muestras destinadas a compuestos orgánicos, las cuales se obtuvieron con una espátula de acero inoxidable, enjuagada previamente con agua del sitio de muestreo. Las mismas fueron acondicionadas en papel de aluminio previamente muflado a 400 °C

utilizado como envase primario, y luego alojadas en una bolsa de polipropileno y conservadas en freezer (-18 ± 2 °C) hasta su medición en el laboratorio de análisis químicos ambientales Fares Taie (Mar del Plata).

Para estudios microbiológicos se extrajeron entre 100 y 200 g de muestras de sedimento que fueron almacenadas en bolsas de polietileno y refrigeradas a 4 ± 2 °C hasta su procesamiento.

Detección de contaminantes

Los sedimentos extraídos para la determinación de contaminantes fueron procesados según las metodologías estándar o correspondientes a cada elemento (Tabla 1).

Los resultados obtenidos se cotejaron con los niveles guía de sedimentos para la protección de la biota en ambientes marinos del CCME (2001) y con las “Recomendaciones para la Gestión del Material de Dragado en los Puertos Españoles” (RGMD) (CEDEX 1994), para evaluar la calidad del sedimento de la zona y sus posibles efectos sobre la biota (Tabla 2).

La comparación de las concentraciones medidas de varios contaminantes asociadas a los sedimentos con los valores guía de la CCME proporciona una indicación básica sobre el grado de contaminación y el posible impacto en la ecología.

Las pautas consisten en niveles de efecto umbral (ISQG/TEL, por sus siglas en inglés Interim sediment quality guideline/threshold effect levels) y niveles de efecto probable (PEL, por sus siglas en inglés probable effect level), siendo los TEL y PEL utilizados para identificar tres rangos de concentraciones químicas con respecto a los efectos biológicos. Si los valores se encuentran por debajo del ISQG/TEL, se refiere al rango mínimo dentro del cual rara vez ocurren efectos adversos; valores entre el ISQG/TEL y el PEL representa un rango dentro del cual ocurren ocasionalmente efectos adversos y valores por encima del PEL producen frecuentemente efectos adversos.

Tabla 1. Descripción de los parámetros analizados y los métodos empleados.* Σ 23 congéneres (Endrin cetona, Metoxiclor, α -BHC, β -BHC, Lindano, δ -BHC, Aldrin, Dieldrin, Endosulfán I, Endosulfán II, Endosulfán sulfato, Endrin, Heptaclor, Heptaclor epoxi, Hexaclorobenceno, CIS Nonaclor, 4,4'-DDE, 4,4'-DDT, 4,4'-DDD, α -Clordano, γ -Clordano, TRANS Nonaclor, Mirex).

Table 1. Description of analyzed parameters and used methods.* Σ 23 congeners (Endrin Ketone, Methoxychlor, α -BHC, β -BHC, Lindane, δ -BHC, Aldrin, Dieldrin, Endosulfan I, Endosulfan II, Endosulfan sulfate, Endrin, Heptachlor, Heptachlor epoxide, Hexachlorobenzene, CIS Nonachlor, 4,4'-DDE, 4,4'-DDT, 4,4'-DDD, α -Chlordane, γ -Chlordane, TRANS Nonachlor, Mirex).

Parámetro	Método	Unidad	Límite de detección	Límite de cuantificación
Cr	EPA SW 846 3050 B/ 6010 D	mg kg ⁻¹	0,4	5,0
Cd	EPA SW 846 3050 B/ 6010 D	mg kg ⁻¹	0,2	0,5
Cu	EPA SW 846 3050 B/ 6010 D	mg kg ⁻¹	0,3	5,0
Pb	EPA SW 846 3050 B/ 6010 D	mg kg ⁻¹	0,4	20,0
Hg	EPA 7471 B	mg kg ⁻¹	0,01	0,1
HC totales (HC _{tot})	EPA SW 846 M 3540 C / EPA SW 846 M 8015 B GC-FID	mg kg ⁻¹	2,0	5,0
PCBs totales (PCBs)	ASTM D 4059:2000	μ g kg ⁻¹	7,0	20,0
Atrazina (ATZ)	Método Interno ALT09117	mg kg ⁻¹	0,0003	0,001
Glifosato + AMPA (GLY + AMPA)	Método interno basado en Quppe- EURL-SRM V11.1	μ g kg ⁻¹	3,0	10,0
Pesticidas totales (PS _{tot})*	EPA SW 846 M 8081 B	μ g kg ⁻¹	3,0	10,0

Según las RGMD, los sedimentos que se encuentran por debajo de los límites del nivel de acción A, pueden ser vertidos sin perjuicio a la flora y fauna, teniendo en cuenta solo los efectos mecánicos. Los sedimentos cuyos valores sobrepasen el nivel de nivel de acción A pero sean inferiores al nivel de acción B son considerados con baja probabilidad de efectos nocivos, por lo que este tipo de material podrá ser vertidos de forma controlada, y los mismos deben ser monitoreados periódicamente. Aquellos sedimentos que sobrepasan el nivel de acción B o C serán considerados como de alta probabilidad de que produzcan impactos adversos y deberán ser sometidos a un aislamiento subacuático o donde se permita la fuga de lixiviados. Finalmente, aquellos que sobrepasen el umbral de peligrosidad serán considerados residuos peligrosos y tratados como tales (CEDEX 1994; Buceta et al. 2015).

Detección de genes catabólicos en bacterias degradadoras de hidrocarburos

Extracción de ADN total

Con el fin de purificar el ADN total a partir de las muestras de sedimentos, se incluyó un protocolo de pre-extracción y luego se probaron dos protocolos de extracción.

Pre-extracción

Las muestras fueron sometidas a un procedimiento que consistió en tres pasos de pre-extracción con el fin de remover los compuestos orgánicos presentes en las muestras, según el protocolo modificado a partir de Purohit et al. (2003):

1. Se tomó 1 g de sedimento y se agregó 1 ml de una solución estéril con 50 mM Tris HCl pH 8,0; 200 mM ClNa; 5 mM EDTA y 0,05% (v/v)

Tabla 2. Valores guía para cada normativa. CCME: Canadian Council of Ministers of the Environment. RGMD: Recomendaciones para la Gestión del Material de Dragado en Puertos Españoles. ISQG/TEL: Pautas provisionales de calidad de sedimentos marinos (ISQG)/niveles de efecto umbral (TEL), tomando como referencia sedimentos no contaminados. PEL: niveles de efecto probable.

Table 2. Guide values for each normative. CCME: Canadian Council of Ministers of the Environment. RGMD: Recommendations for the Management of Dredging Material in Spanish Ports. ISQG/TEL: Interim sediment quality guideline/threshold effect level (TEL), taking uncontaminated sediments as reference. PEL: probable effect level.

Parámetro	Unidad	CCME		RGMD			Umbral de peligrosidad
		ISQG/TEL	PEL	Nivel de acción A	Nivel de acción B	Nivel de acción C	
Cr	mg kg ⁻¹	52,3	160	140	340	1.000	1.000
Cd	mg kg ⁻¹	0,7	4,2	1,2	2,4	9,6	72
Cu	mg kg ⁻¹	18,7	108	70	168	675	2.500
Pb	mg kg ⁻¹	30,2	112	80	218	600	1.000
Hg	mg kg ⁻¹	0,13	0,7	0,35	0,71	2,84	17
HC totales	mg kg ⁻¹	-	-	-	-	-	2.500
PCBs	µg kg ⁻¹	-	-	50	180	540	4.000

Triton x-100. Se agitó en vórtex y se centrifugó a 12.000 g por 15 min. Si el residuo contenía mucha carga oleosa se repitió este paso.

2. El sobrenadante se desechó y al *pellet* se le agregó 1 ml de una solución estéril con 50 mM Tris HCl pH 8,0; 200 mM NaCl y 5 mM EDTA. Se agitó en vórtex y se centrifugó a 12.000 g por 15 min.
3. El sobrenadante fue desechado y al *pellet* se le agregó 1 ml de una solución estéril con 10 mM Tris HCl pH 8,0 y 0,1 mM EDTA. Se agitó en vórtex y centrifugó a 12.000 g por 15 min. Este último paso se repitió una vez más antes de la extracción del ADN.

Extracción

Protocolo 1. El ADN genómico fue extraído de acuerdo con un protocolo estándar (Ellis et al. 2003) modificado. Se inició con la adición de 1 ml de buffer CTAB [por 100 ml: CTAB 2% (CINa 1,4 M, EDTA 20 mM, TRIS-CIH 100 mM, pH 8,0)]; 20 µl de lisozima (1 mg ml⁻¹) y 20 µl de proteinasa K (20 mg ml⁻¹), al tubo Eppendorf con la muestra

de sedimento sometida a la pre-extracción. Se mezcló por agitación en bandeja a máxima velocidad por 20 min, se agregó 200 µl de SDS 10% y se incubó por 30 min a 65 °C en baño termostático. El lisado fue recuperado y trasvasado a un tubo limpio, manteniendo en hielo por 2 min y luego centrifugado a 12.000 rpm por 2 min. Luego, el sobrenadante fue transferido a un tubo limpio y se repitió la extracción a partir del precipitado obtenido, con 300 µl de buffer CTAB. Se juntaron los sobrenadantes de ambas extracciones y se agregaron aproximadamente 0,5 ml de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1; pH 8), centrifugando luego 5 min a 12.000 rpm. Se agregó al sobrenadante igual volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), mezclando con vortex y centrifugando 5 min a 12.000 rpm. Posteriormente, se trasvasó la fase acuosa superior (sin arrastrar interfase) a un tubo limpio y se agregó isopropanol en relación de volumen 1:1. Los tubos fueron guardados en freezer a -20 °C 12 h. Luego de una centrifugación durante 30 min a 12.000 rpm, el sobrenadante fue eliminado (por volcado) y el

precipitado de ADN fue lavado con 200 μl de etanol al 80% frío. Los tubos se mantuvieron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 min y se centrifugaron 30 min a 12.000 rpm. El precipitado de ADN fue secado en estufa a $55\text{ }^{\circ}\text{C}$, re-suspendido en 30 μl de agua MiliQ estéril y almacenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. El ADN extraído fue analizado por electroforesis de geles de agarosa al 0,8% (p/v) en buffer TBE 0,5X (Tris: 0,044M; Ácido bórico: 0,044M; EDTA- $\text{Na}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,001M; pH $8,3 \pm 0,2$), a 110 V durante 35 min. Se utilizó 4 μl de una solución 1:3 de Lamda ADN/Hind III Markers (PROMEGA) y agua libre de ADNasas como marcador de PM y 5 μl del extracto de ADN. Los geles fueron visualizados bajo UV por tinción con bromuro de etidio y el ADN purificado fue cuantificado con el QuantiFluor® dsDNA system (Promega), produciendo concentraciones entre 35 and 50 $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$.

Protocolo 2. En el segundo protocolo ensayado, la extracción de ADN genómico se realizó utilizando el kit comercial *PureLink Genomic DNA Kit* (Invitrogen) siguiendo las recomendaciones del proveedor. El ADN extraído fue visualizado y cuantificado como se indica en el Protocolo 1, produciendo concentraciones entre 50 and 100 $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$.

*Amplificación del gen catabólico *alkB* mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)*

El ADN genómico extraído fue utilizado como molde para la amplificación de fragmentos de genes que codifican enzimas monoxigenasas involucradas en las vías catabólicas de hidrocarburos lineales, usando los sets de cebadores *alkB* 484F (5'-GGKCAYYTCTWCRTYGARCA-3') y *alkB* 824R (5'-CCGTAGTGYTCRABRTARTT-3') (Olivera et al. 2009). Las amplificaciones por PCR fueron llevadas a cabo en reacciones de 25 μl que contenían 50 mM de KCl; 10 mM de Tris-HCl, pH 9,0; 0,1% (v/v) de Triton X-100; 1,5 mM de Cl_2Mg ; 0,2 μM de dNTPs; 0,5 μM de cada cebador y 1 U de ADN polimerasa T-Plus (Inbio-Highway, Tandil) siguiendo las recomendaciones de los proveedores para la preparación de la mez-

cla de reacción, y 5 μl del ADN. Las amplificaciones se realizaron en un Ciclador Térmico Life Express TC-96/G/H(b) con el siguiente programa: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 4 min; 30 ciclos de 30" a $94\text{ }^{\circ}\text{C}$; 45" a $45\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30" a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ y una elongación final de 10 min a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$. Los productos de PCR fueron verificados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,2% (p/v), con marcador de peso molecular (100 pb, Inbio-Highway). La técnica de PCR fue optimizada utilizando las siguientes temperaturas de *annealing*: 45; 45,9; 47,2; 48,1 y $49,4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

RESULTADOS

Detección de contaminantes

Metales pesados

El cromo fue encontrado en un rango de valores entre $< 5,0$ y $20,7\text{ mg kg}^{-1}$ y el máximo se observó en el sitio Rdp4. Ninguno de los valores medidos sobrepasó los niveles guía en sedimentos para la protección de la biota del CCME, ni los recomendados para la RGMD en sus distintos niveles de acción (Figura 2).

El cobre se halló entre no detectable y $24,6\text{ mg kg}^{-1}$, y el valor máximo fue encontrado en el sitio Rdp4. Este es el único metal que sobrepasó el ISQG (directrices provisionales sobre la calidad de los sedimentos) de niveles guía en sedimentos para la protección de la biota del CCME, pero no superó los valores recomendados para la RGMD en sus distintos niveles de acción (Figura 3).

El plomo se determinó en un rango de valores entre no detectable y $26,0\text{ mg kg}^{-1}$, y el máximo fue observado en el sitio Rdp4 (Figura 4). Ninguno de los valores medidos sobrepasó los niveles guía en sedimentos para la protección de la biota del CCME, ni los recomendados para la RGMD.

Para cadmio y mercurio los resultados obtenidos se encontraron por debajo de los límites de detección ($< 0,2\text{ mg kg}^{-1}$ y $< 0,01\text{ mg kg}^{-1}$, respectivamente), en todos los sitios de muestreo. En

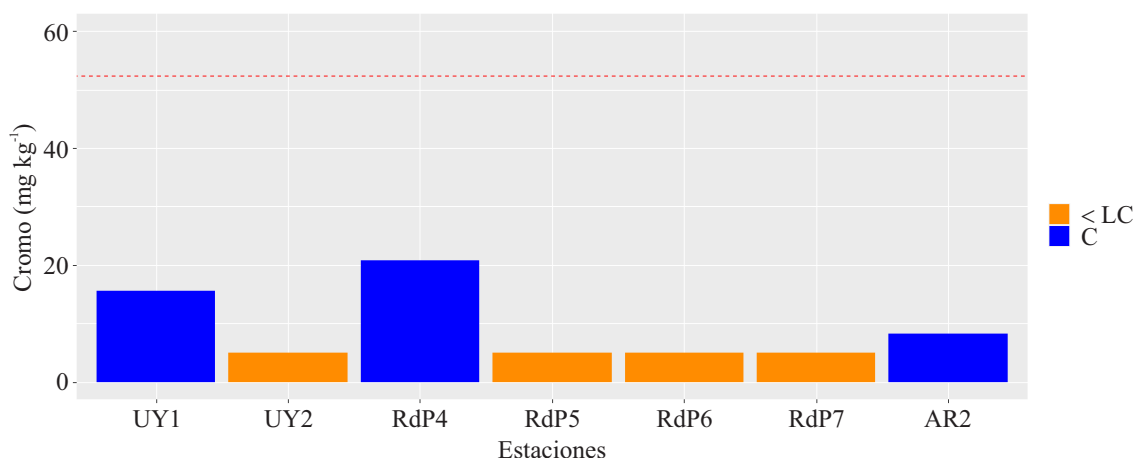


Figura 2. Niveles de cromo. Nivel guía ISQG/TEL, recomendado por CCME (línea roja). < LC: menor al límite de cuantificación, C: cuantificable.

Figure 2. Chrome levels. Guide level ISQG/TEL, recommended by CCME (red line). < LC: lower than quantification limit, C: quantifiable.

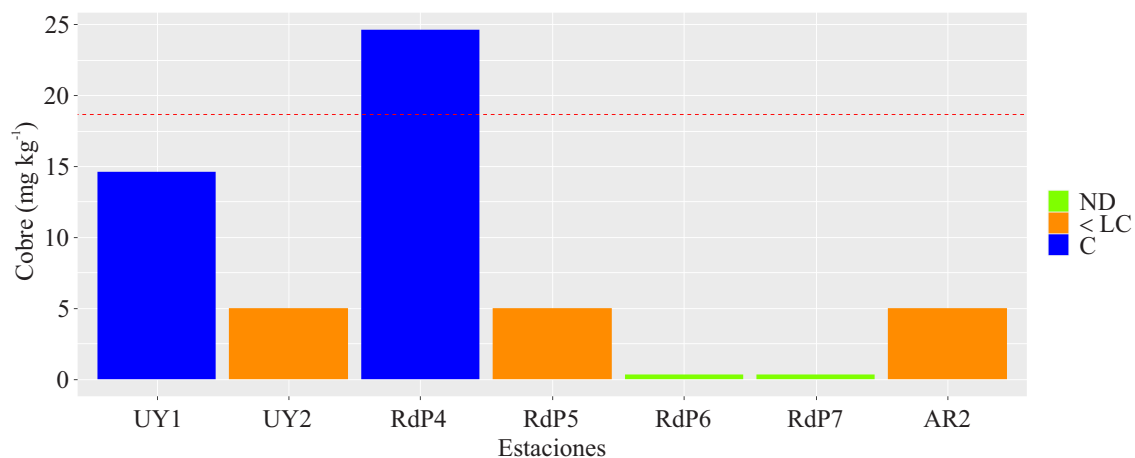


Figura 3. Niveles de cobre. Nivel guía ISQG/TEL, recomendado por CCME (línea roja). ND: no detectable, < LC: menor al límite de cuantificación, C: cuantificable.

Figure 3. Copper levels. Guide level ISQG/TEL, recommended by CCME (red line). ND: non detectable, < LC: lower than quantification limit, C: quantifiable.

consecuencia, ninguno de los valores medidos para estos elementos sobrepasó los niveles guía en sedimentos para la protección de la biota del CCME, ni los recomendados para la RGMD.

Compuestos orgánicos

Los únicos parámetros de la familia de los compuestos orgánicos por encima de los límites

de cuantificación fueron los PCBs totales (Figura 5). Estos se encontraron en un rango de valores entre $< 20,0$ y $77,7 \mu\text{g kg}^{-1}$ y el máximo se observó en el sitio 2A. Cabe destacar que esta familia de compuestos carece de niveles guía en sedimentos para la protección de la biota del CCME y sobrepasa el nivel de acción A recomendado para la RGMD en un 55%.

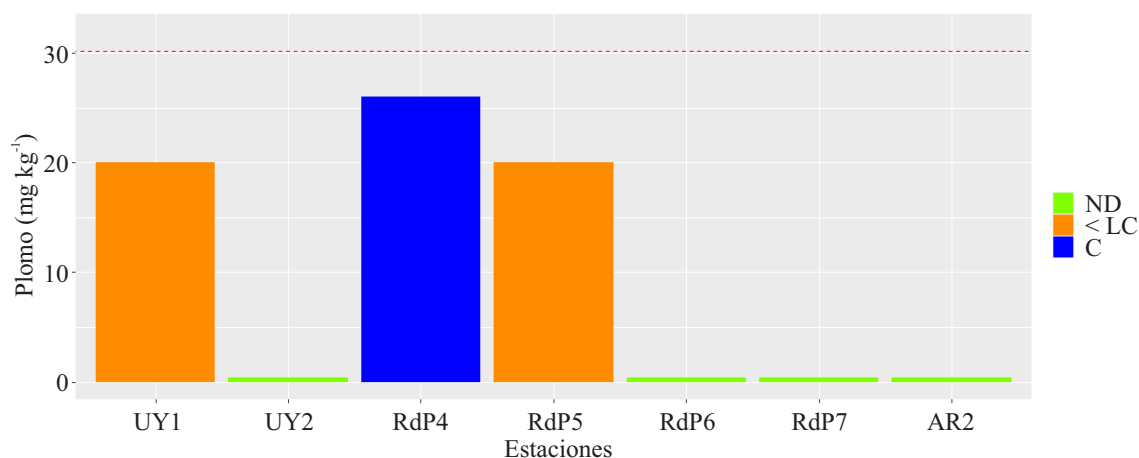


Figura 4. Niveles de plomo. Nivel guía ISQG/TEL, recomendado por CCME (línea roja). ND: no detectable, < LC: menor al límite de cuantificación, C: cuantificable.

Figure 4. Lead levels. Guide level ISQG/TEL, recommended by CCME (red line). ND: non detectable, < LC: lower than quantification limit, C: quantifiable.

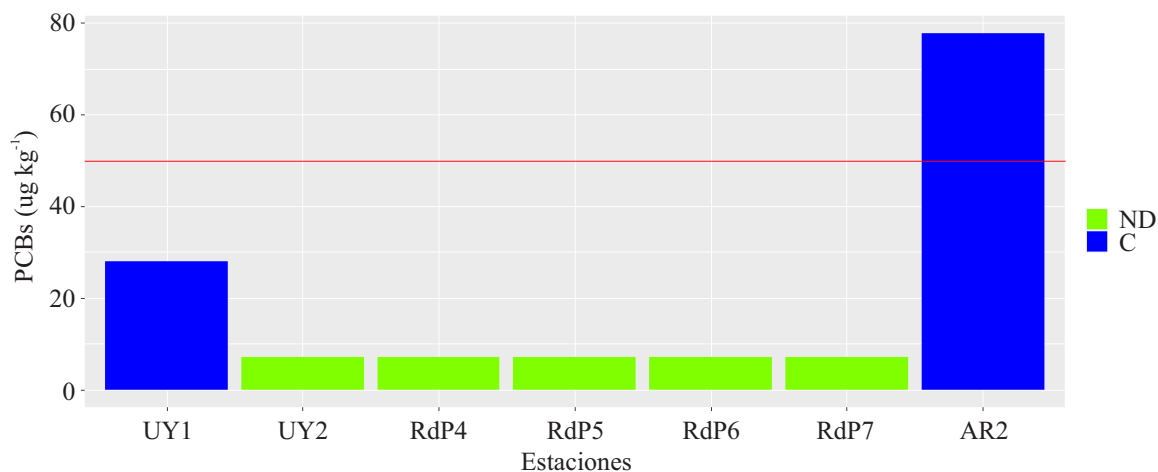


Figura 5. Niveles de PCBs. Nivel guía recomendado por RGMD (línea roja).

Figure 5. PCBs levels. Guide level recommended by RGMD (red line).

Los resultados obtenidos para hidrocarburos totales, atrazina, glifosato + AMPA (GLY + AMPA) y pesticidas totales se encontraron por debajo del límite de cuantificación. Por ende, no sobrepasaron los recomendados para la RGMD en sus distintos niveles de acción. No se cotejaron los resultados de éstos con los niveles guía en sedimentos para la protección de la biota del

CCME, ya que para dichos compuestos no existe un nivel propuesto por este organismo.

Análisis de genes catabólicos en bacterias degradadoras de hidrocarburos

Extracción de ADN genómico

A partir de la purificación de ADN genómico,

se obtuvieron bandas en ocho de las nueve muestras con ambas metodologías, pero en mayor concentración cuando se utilizó el kit comercial (Figura 6).

*Amplificación por PCR del gen *alkB**

Las amplificaciones de este gen a partir del ADN genómico purificado con el kit comercial de Invitrogen, se realizó con la temperatura de *annealing* óptima de 45 °C (Figura 7). El mismo fue detectado en las estaciones UY2, UY1, RdP4, AR2 y AR1. Cabe destacar, que a pesar de que los HC totales fueron hallados con valores menores a 5,0 mg kg⁻¹, en los sitios de muestreo UY1, RdP4 y AR2 se determinaron metales pesados y en el sitio UY1 se hallaron PCBs.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El Río de la Plata y la ZCPAU representan un ambiente altamente productivo que incluye una zona estuarial. Los estudios de contaminación por compuestos tóxicos en estuarios son muy relevantes ya que comprenden áreas de transición entre el ambiente terrestre y marino, donde se producen flujos de agua, nutrientes, partículas y organismos desde y hacia las márgenes continentales (Elliott y Quintino 2007).

Se realizaron análisis químicos preliminares de metales pesados y compuestos orgánicos nocivos en sedimentos, ya que dicha matriz constituye el principal repositorio de contaminantes en los ambientes marinos (Marcos et al. 2012). Los resultados mostraron valores cuantificables de metales pesados en los sitios UY1, RdP4 y AR2; y en el resto de las estaciones se observaron valores entre detectables y no cuantificables. Dentro de los distintos contaminantes orgánicos analizados, se cuantificaron PCBs en los sitios UY1 y AR2. Cabe destacar, que los sedimentos muestreados en la estación AR2 sobrepasaron el nivel de acción A, pero no el

nivel B, siendo recomendable su monitoreo periódico. Si bien los valores de metales pesados se encontraron por debajo de los niveles guía, con excepción de la estación RdP4 para cobre, algunos de ellos no estuvieron distantes de éstos. Paralelamente, en el caso de los compuestos orgánicos la mayoría no fueron detectables por las técnicas de laboratorio utilizadas convencionalmente; sin embargo, aquellos que estuvieron presentes exceden los niveles guía o límites recomendados en al menos un sitio de muestreo.

En estudios previos se observó que en la zona de máxima turbidez del Río de la Plata (entre Punta Piedras y Montevideo, Barra del Indio), prevalecieron los aportes de materia orgánica, donde se acumularon contaminantes antropogénicos como PCBs y metales pesados (Tatone et al. 2006). Asimismo, Carsen et al. (2005) detectaron concentraciones de cobre, plomo y cadmio en el Río de la Plata fluvial que superaron los niveles guía sugeridos para la protección de la biota acuática, mientras que en las zonas del Río de la Plata fluvio-marino y el Frente Marítimo fueron levemente mayores a este nivel guía. Díaz Jaramillo et al. (2018) también confirmaron el contenido de metales pesados en sedimentos a lo largo del gradiente fluvio-marino del Río de la Plata, y observaron aportes sostenidos y elevados de PCBs en la Franja Costera Sur.

Por otro lado, a pesar de que no fueron detectados HC totales, existe una fuerte evidencia en trabajos anteriores de la presencia de estos contaminantes en la zona de estudio. Así, Venturini et al. (2015) hallaron mezclas complejas de HC alifáticos y policíclicos, evidenciando contribuciones naturales y antropogénicas (petrogénicas y pirogénicas) en las costas del estuario del Río de la Plata. A su vez, se encontraron n-alcanos y aromáticos en sedimentos de la zona de máxima turbidez de la Bahía Samborombón y en Barra del Indio (entre Punta Piedras y Montevideo) (Colombo et al. 2005, 2006). En la Bahía Samborombón se observó la presencia de HC poliaromáticos con potencial tóxico y/o carcinogénico,

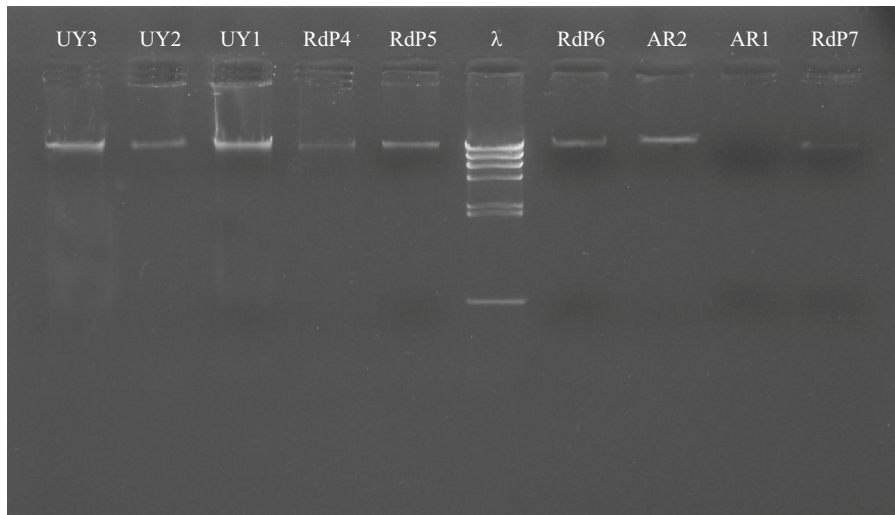


Figura 6. Detección de ADN genómico de sedimento colectado en la ZCPAU, utilizando el Protocolo 2, con el kit comercial *PureLink® Genomic DNA Kit*. λ : marcador de ADN λ /HindIII (Thermo Scientific).

Figure 6. Genomic DNA detection from sediment collected in the AUCFZ, using Protocol 2, with commercial PureLink® Genomic DNA Kit. λ : DNA ladder λ /HindIII (Thermo Scientific).

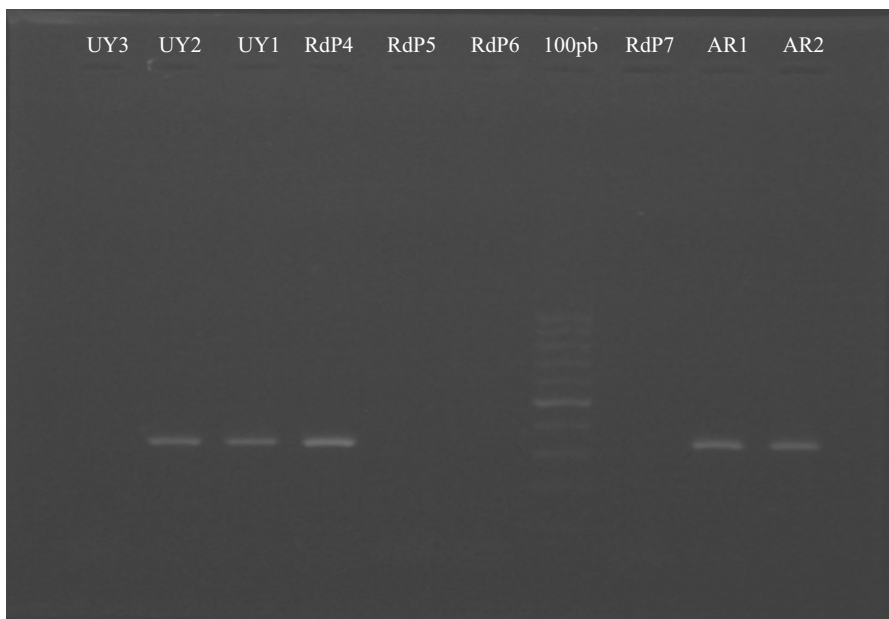


Figura 7. Detección del gen *alkB*, utilizando el Protocolo 2 de extracción de ADN genómico (kit comercial Invitrogen), con el set de cebadores *alkB848Fy alkB824R*. 100pb: marcador de ADN (Inbio Highway). Electroforesis en gel de agarosa 0,8%, 110 V- 35 min, tinción con bromuro de etidio.

*Figure 7. *alkB* gene detection using genomic DNA extraction Protocol 2 (commercial kit Invitrogen), with the primer set *alkB848Fy alkB824R*. 100pb: 100pb DNA ladder (Inbio Highway). Electrophoresis in agarose gel 0.8%, 110 V- 35 min, ethidium bromide staining.*

generados por actividades productivas cercanas a este ambiente estuarino, principalmente producidas por la combustión de petróleo (Colombo et al. 2006). Esto confirma la necesidad de abarcar mayor número de sitios de muestreos en futuros estudios.

Con la finalidad de controlar la evolución de compuestos tóxicos en los sitios contaminados, es esencial analizar las comunidades microbianas indígenas y su contribución en los procesos de biodegradación (Heiss-Blanquet et al. 2005). Este objetivo puede ser alcanzado utilizando abordajes moleculares, los cuales tienen la ventaja de ser independientes de cultivo bacteriano y muy específicos. Considerando que los alcanos representan los principales componentes de los contaminantes oleosos en el ambiente, durante este trabajo se realizó un estudio preliminar acerca de la ocurrencia del gen *alkB* en el área del Río de la Plata y la ZCPAU.

El primer paso en los análisis moleculares involucra la extracción del ADN, que en el caso de muestras de sedimento puede ser dificultosa ya que aún trazas de ácidos húmicos o químicos tóxicos actúan luego como inhibidores en análisis enzimáticos de ADN o en la amplificación de genes específicos (Sharma et al. 2012). La mayoría de los métodos reportados no contemplan la remoción de estos compuestos, que implica el principal problema antes de los procedimientos de extracción de ADN (Purohit et al. 2003). En el presente estudio, la adición de tres pasos de pre-extracción permitió una purificación más eficaz del ADN genómico.

A partir de este ADN purificado se amplificaron genes *alkB*. Los genes que codifican para diversas enzimas catabólicas, como alcano mono-oxigenasas o dioxigenasas relacionadas con el metabolismo de aromáticos (Iwai et al. 2011; Guibert 2012), han sido ampliamente usados para determinar la prevalencia de bacterias involucradas en la degradación de hidrocarburos. El estudio de estos genes es clave para evaluar la posibilidad de biodegradación en ambientes contamina-

dos (Djahnit et al. 2019). Anteriormente, se han reportado microorganismos con capacidad de degradar alcanos e hidrocarburos poliaromáticos en sedimentos de la Bahía Samborombón (Izzo et al. 2018); sin embargo, éste es el primer trabajo sobre genes catabólicos en la ZCPAU.

La presencia del gen *alkB* sugiere que el uso de alcanos como sustrato así como el potencial para la degradación de HC representan atributos microbianos ampliamente distribuidos en los ambientes marinos contaminados, lo cual posibilita una rápida adaptación de las comunidades bacterianas degradadoras de alcanos y de otros hidrocarburos (Catania et al. 2018). La detección preliminar de genes *alkB* durante el presente estudio indica su selección y el rol en la adaptación en ecosistemas afectados por contaminantes de origen antropogénico. También, demuestra que estos genes catabólicos podrían ser usados como marcadores funcionales, tanto en un contexto aplicado como lo son las tecnologías de biorremediación, o para el monitoreo de procesos de atenuación natural.

Dado el hallazgo de metales pesados y contaminantes orgánicos como PCBs en algunas de las muestras analizadas, es recomendable contemplar la inclusión de nuevas matrices como agua y biota, así como la medición de otros parámetros ambientales, para tener un cabal conocimiento del estado de este ecosistema marino, que tenga como finalidad proveer herramientas útiles en materia de gestión para una certera toma de decisiones. Asimismo, la evidencia de la prevalencia de HC en trabajos previos, confirma la necesidad de estudios más exhaustivos, no solo de HC totales sino de las fracciones alifáticas y aromáticas.

Los resultados permitieron confirmar la presencia de genes *alkB* en las muestras analizadas, lo que representa el primer paso para el análisis de genes catabólicos en ambientes marinos contaminados de la ZCPAU. Es importante continuar con los estudios sobre el potencial genético, la funcionalidad de los microorganismos y los procesos relacionados con la remediación de conta-

minantes en el ambiente con objeto de relacionarlos con la presencia de distintos contaminantes. Este tipo de investigaciones representan un valioso aporte para evaluar el impacto de las alteraciones antropogénicas sobre los ecosistemas marinos y para comprender los mecanismos de la atenuación natural.

Contribución INIDEP N° 2272.

BIBLIOGRAFÍA

- ACHA EM, MIANZAN H, GUERRERO R, CARRETO J, GIBERTO D, MONTOYA N, CARIGNAN M. 2008. An overview of physical and ecological processes in the Río de la Plata Estuary. *Cont Shel Res.* 28: 1579-1588.
- BUCETA JL, LLORET A, ANTEQUERA M, OBISPO R, SIERRA J, MARTÍNEZ-GIL M. 2015. Nuevo marco para la caracterización y clasificación del material dragado en España. *Ribagua*, 2 (2): 105-115.
- CAPPELLETTI N, MIGOYA C, SKORUPKA CN, TORANZO S, LASCI J, COLOMBO JC. 2006. Hidrocarburos alifáticos, aromáticos, hopanos y PCBs en sedimentos superficiales de la zona de máxima turbidez del Río de la Plata. En: VI Jornadas Nacionales de Ciencias del Mar, Puerto Madryn, Argentina. p. 13.
- CARSEN AE, PERDOMO A, ARRIOLA M. 2005. Contaminación de aguas, sedimentos y biota. En: Documento Técnico, Proyecto PNUD/GEF RLA/99/G31 "Protección Ambiental del Río de la Plata y su Frente Marítimo: Prevención y Control de la Contaminación y Restauración de Hábitats" FREPLATA. Montevideo: Fondo para el Medio Ambiente Mundial (FMAM), Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo (PNUD). p. 57-88.
- CATANIA V, CAPPELLO S, DI GIORGI V, SANTISI S, DI MARIA R, MAZZOLA A, VIZZINI S, QUATRINI P. 2018. Microbial communities of polluted sub-surface marine sediments. *Mar Pollut Bull.* 131: 396-406.
- [CCME] CANADIAN COUNCIL OF MINISTERS OF THE ENVIRONMENT. 2001. Canadian Environmental Quality Guidelines (CEQGs) provide science-based goals for the quality of aquatic and terrestrial ecosystems, summary table. CCME. [accessed 2022 March]. <https://ccme.ca/en/summary-table>.
- [CEDEX] CENTRO DE ESTUDIOS Y EXPERIMENTACIÓN DE OBRAS PÚBLICAS. 1994. Recomendaciones para la gestión del material dragado en los puertos españoles. Madrid: Ministerio de Obras Públicas, Transportes y Medio Ambiente. 45 p.
- COLOMBO JC, BARREDA A, BILOS C, CAPPELLETTI N, DEMICHELIS S, LOMBARDI P, MIGOYA MC, SKORUPKA CN, SUAREZ G. 2004. Oil spill in the Río de la Plata estuary, Argentina: 1. Biogeochemical assessment of waters, sediments, soils and biota. *Environ Pollut.* 134: 277-289.
- COLOMBO JC, BARREDA A, BILOS C, CAPPELLETTI N, MIGOYA MC, SKORUPKA CN. 2005. Oil spill in the Río de la Plata estuary, Argentina: 2-hydrocarbon disappearance rates in sediments and soils. *Environ Pollut.* 134: 267-276.
- COLOMBO JC, BILOS C, REMES LENICOV M, COLAUTTI D, LANDONI P, BROCHU C. 2000. Detritivorous fish contamination in the Río de la Plata estuary. A critical accumulation pathway in the cycle of anthropogenic compounds. *Can J Fish Aquat Sci.* 57: 1139-1150.
- COLOMBO JC, SKORUPKA CN, CAPPELLETTI N, MIGOYA MC, TORANZO S, LASCI J, TATONE LM. 2006. Composición elemental y contaminantes persistentes en sedimentos de la zona de máxima turbidez del Río de la Plata. VI Jornadas Nacionales de Ciencias del Mar, Puerto Madryn, Argentina. p. 33.
- CORTI-MONZON G, NISENBAUM M, PERESSUTTI S, JUNCA H, GARCIA-BONILLA E, MURIALDO SE. 2021. Oily Bilge Wastes Harbor a Set of Persistent Hydrocarbonoclastic Bacteria Accompanied by a Variable *alkB* Gene Composition in Marine Vessel Samples from Southwestern

- Atlantic Port of Mar del Plata, Argentina. *Water Air Soil Pollut.* 232: 301.
- DÍAZ JARAMILLO M, GONZALEZ M, PEGORARO CA. 2018. Distribución vertical de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) en sedimentos estuarinos de relevancia biológica. X Jornadas Nacionales de Ciencias del Mar, Buenos Aires, Argentina. p. 410.
- DJAHNIT N, CHERNAI S, CATANIA V, HAMDI B, CHINA B, CAPPELLO S, QUATRINI P. 2019. Isolation, characterization and determination of biotechnological potential of oil-degrading bacteria from Algerian centre coast. *J Appl Microbiol.* 126: 780-795.
- ELLIOTT M, QUINTINO V. 2007. The Estuarine Quality Paradox, environmental homeostasis and the difficulty of detecting anthropogenic stress in naturally stressed areas. *Mar Pollut Bull.* 54: 640-605.
- ELLIS RJ, MORGAN P, WEIGHTMAN AJ, FRY JC. 2003. Cultivation-dependent and -independent approaches for determining bacterial diversity in heavy-metal-contaminated soil. *Appl Environ Microbiol.* 69: 3223-3230.
- [EPA] UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. 2001. Methods for collection, storage, and manipulation of sediments for chemical and toxicological analyses technical manual (EPA 823-B-01-002).
- ERNST F, ALONSO B, COLAZZO M, PAREJA L, CESIO V, PEREIRA A, MÁRQUEZ A, ERRICO E, SEGURA AM, HEINZEN H, PÉREZ-PARADA A. 2018. Occurrence of pesticide residues in fish from South American rainfed agroecosystems. *Sci Total Environ.* 631-632: 169-179.
- GUIBERT LM, LOVISO CL, MARCOS MS, COMMENTATORE MG, DIONISI HM, LOZADA M. 2012. Alkane biodegradation genes from chronically polluted subantarctic coastal sediments and their shifts in response to oil exposure. *Microb Ecol.* 64: 605-616.
- HEISS-BLANQUET S, BENOIT Y, MARÉCHAUX C, MONOT F. 2005. Assessing the role of alkane hydroxylase genotypes in environmental samples by competitive PCR. *J Appl Microbiol.* 99: 1392-1403.
- IWAI S, JOHNSON TA, CHAI B, HASHSHAM SA, TIEDJE JM. 2011. Comparison of the specificities and efficacies of primers for aromatic dioxygenase gene analysis of environmental samples. *Appl Environ Microbiol.* 77: 3551-3557.
- IZZO SA, QUINTANA S, ESPINOSA M, BABAY PA, PERESSUTTI SR. 2018. First characterization of PAH degrading bacteria from Río de la Plata and high resolution melting: an encouraging step towards bioremediation. *Environ Technol.* 40: 1250-1261.
- JAUREGUIZAR AJ, MENNI RC, BREMEC CS, MIANZAN HW, LASTA CA. 2003. Fish assemblage and environmental patterns in the Río de la Plata estuary. *Estuar Coast Shelf Sci.* 56: 921-933.
- KLOOS K, MUNCH JC, SCHLOTTER M. 2006. A new method for the detection of alkane monooxygenase homologous genes (*alkB*) in soils based on PCR-hybridization. *J Microbiol Methods.* 66: 486-496.
- LEAHY JG, COLWELL RR. 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol Rev.* 54: 305-315.
- LI H, WANG XL, MU BZ, GU JD, LIU YD, LIN KF, LU SG, LU Q, LI BZ, LI Y, DU XM. 2013. Molecular detection, quantification and distribution of alkane-degrading bacteria in production water from low temperature oilfields. *Int Biodeterior Biodegrad.* 76: 49-57.
- MARCOS MS, LOZADA M, DI MARZIO WD, DIONISI HM. 2012. Abundance, dynamics, and biogeographic distribution of seven polycyclic aromatic hydrocarbon dioxygenase gene variants in coastal sediments of Patagonia. *Appl Environ Microbiol.* 78: 1589-1592.
- MCGENITY TJ, FOLWELL BD, MCKEW BA, SANNI GO. 2012. Marine crude-oil biodegradation: a central role for interspecies interactions. *Aquat Biosyst.* 8: 1.
- MIANZAN HW, LASTA C, ACHA EM, GUERRERO R,

- MACCHI G, BREMEC C. 2001. The Río de la Plata estuary, Argentina-Uruguay. En: SEELIGER U, DE LACERDA LD, editores. Ecological studies: coastal marine ecosystems of Latin America. Berlin: Springer-Verlag. p. 185-204.
- MILITELLI MI, RODRIGUEZ KA, CORTÉS F, MACCHI GJ. 2013. Influence of environmental factors on spawning of sciaenids from the Buenos Aires Coastal Zone, Argentina. *Cienc Mar.* 39: 55-68.
- MORALES-CASELLES C, RICA A, ABBONDANZI F, CAMPISI T, IACONDI A, RIBA I, DELVALLS A. 2008. Assessing sediment quality in Spanish ports using a green algae bioassay. *Cienc Mar.* 34: 329-337.
- NIE Y, CHI CQ, FANG H, LIANG JL, LU SL, LAI GL, TANG YQ, WU XL. 2014. Diverse alkane hydroxylase genes in microorganisms and environments. *Sci Rep.* 4: 1-11.
- OLIVERA NL, NIEVAS ML, LOZADA M, DEL PRADO G, DIONISI HM, SIMERIZ F. 2009. Isolation and characterization of biosurfactant-producing *Alcanivorax* strains: hydrocarbon accession strategies and alkane hydroxylase gene analysis. *Res Microbiol.* 160: 19-26.
- PUROHIT HJ, KAPLEY A, MOHARIKAR AA, NARDE G. 2003. A novel approach for extraction of PCR-compatible DNA from activated sludge samples collected from different biological effluent treatment plants. *J Microbiol Methods.* 52: 315-323.
- SALOMONS W, BRILS J. 2004. Contaminated sediments in European River Basins. *Eur Sedim Res Net.* 1: 1-79.
- SHARMA N, TANKSALE H, KAPLEY A, PUROHIT HJ. 2012. Mining the metagenome of activated biomass of an industrial wastewater treatment plant by a novel method. *Indian J Microbiol.* 52: 538-543.
- SMITH CB, TOLAR BB, HOLLIBAUGH JT, KING GM. 2013. Alkane hydroxylase gene (*alkB*) phylotype composition and diversity in northern Gulf of Mexico bacterioplankton. *Front Microbiol.* 4: 370.
- TATONE LM, BILOS C, SKORUPKA, CN, TORANZO S, COLOMBO JC. 2006. Metales pesados en sedimentos superficiales de la zona de máxima turbidez del Río de la Plata. VI Jornadas Nacionales de Ciencias del Mar. Puerto Madryn, Argentina. p. 344.
- VENTURINI N, BÍCEGO MC, TANIGUCHI S, SASAKI ST, GARCÍA-RODRÍGUEZ F, BRUGNOLI E, MUNIZ P. 2015. A multi-molecular marker assessment of organic pollution in shore sediments from the Río de la Plata estuary, SW Atlantic. *Mar Pollut Bull.* 91: 461-475.
- VIGGOR S, JUHANSON J, JOESAR M, MITT M, TRUU J, VEDLER E, HEINARU A. 2013. Dynamic changes in the structure of microbial communities in Baltic Sea coastal seawater microcosms modified by crude oil, shale oil or diesel fuel. *Microbiol Res.* 168: 415-427.
- WANG S, LI G, LIAO Z, LIU T, MA T. 2022. A novel alkane monooxygenase (*alkB*) clade revealed by massive genomic survey and its dissemination association with IS elements. *PeerJ.* 10: e14147.
- WANG W, SHAO Z. 2012. Diversity of flavin-binding monooxygenase genes (*almA*) in marine bacteria capable of degradation long-chain alkanes. *FEMS Microbiol Ecol.* 80: 523-533.
- WHITE JC, TRIPLETT T. 2002. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the sediments and fish of the Mill River, New Haven, Connecticut, USA. *Bull Environ Contam Toxicol.* 68: 104-110.
- WHYTE LG, SMITS TH, LABBE D, WITHOLT B, GREER CW, VAN BEILEN JB. 2002. Gene cloning and characterization of multiple alkane hydroxylase systems in *Rhodococcus* strains Q15 and NRRL B-16531. *Appl Environ Microbiol.* 68: 5933-5942.

