



# **UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

---

## **Trabajo de Tesis Doctoral:**

***Desarrollo de consorcios bacterianos con alta eficiencia de degradación de PAH para su aplicación a la recuperación de suelos crónicamente contaminados***

---

***Lic. Marianela Macchi***

***Directoras:***

***Dra. Irma S. Morelli***

***Dra. Bibiana M. Coppotelli***

***Año 2018***



*El presente trabajo, para optar al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de la Plata, fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI), Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección de la Dra. Irma S. Morelli y la Dra. Bibiana M. Coppotelli.*

*A mi mamá, a mi papá y a Carchus*

Los resultados de este trabajo de tesis han dado origen a las siguientes publicaciones:

### **Publicados**

1. **Macchi M.**, Martinez M., Neme Tauil RM., Valacco MP., Morelli IS., Coppotelli BM. Insights into the genome and proteome of *Sphingomonas paucimobilis* strain 20006FA involved in the regulation of polycyclic aromatic hydrocarbon degradation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* (2018) 34:7.
2. Festa, S., **Macchi, M.**, Cortés, F., Morelli, I. S., & Coppotelli, B. M. (2016). Monitoring the impact of bioaugmentation with a PAH-degrading strain on different soil microbiomes using pyrosequencing. *FEMS Microbiology Ecology*, 2016, Vol. 92, No. 8, fiw125.
3. Sabrina Festa; Bibiana Marina Coppotelli; Laura Madueño; Claudia Lorena Loviso; **Marianela Macchi**; Ricardo Martin Neme Tauil; María Pía Valacco; Irma Susana Morelli. Assigning ecological roles to the populations belonging to a phenanthrene-degrading bacterial consortium using omic approaches. *PLOS ONE* 2017, 12(9): e0184505.

### **En actas de congresos**

4. Festa S., **Macchi M.**, Coppotelli B.M. y Morelli I.S. "Effects of the inoculation with defined and undefined PAH-degrading consortia on soil microbial community and biodegradation in phenanthrene-contaminated soil". Trabajo completo publicado en Actas de la 12th International UFZ-Deltas Conference on Groundwater-Soil-Systems and Water Resource Management, Barcelona Spain 2013 Con referato.

### Participación en Congresos internacionales

*Joint ICGEB-ICTP-APCTP Workshop on Systems Biology and Molecular Economy of Microbial Communities Abdus Salam International Centre for Theoretical Physics (ICTP) – 3 al 7 de julio 2017, Trieste, Italia.*

- 1) "In silico" study of gene products related to the PAH degradation pathway. **Macchi M.**, Morelli I.S. y Coppotelli B.M.

*Ecology of soil Microorganisms 2015 – 29 de Noviembre al 3 de Diciembre de 2015, Prague, Czech Republic*

2) Monitoring the impact of bioaugmentation with a PAH-degrading strain on different soil microbiomes using pyrosequencing. Festa S., **Macchi M.**, Cortés F., Morelli I.S., Coppotelli B.M.

*XXII Congreso Latinoamericano de Microbiología - ALAM 2014 y IV Congreso Colombiano de Microbiología - 4CCM 2014, 4-8 Noviembre de 2014, Cartagena de Indias, Colombia*

3) Estudio de la diversidad genética y las capacidades metabólicas de un consorcio degradador de fenantreno inoculado con una cepa competitiva. **Macchi M.**, Festa S., Morelli I.S., Coppotelli B.M.

*12th International UFZ-Deltas Conference on Groundwater-Soil-Systems and Water Resource Management, 16-19 April 2013 Barcelona Spain*

4) Effects of the inoculation with defined and undefined PAH-degrading consortia on soil microbial community and biodegradation in phenanthrene-contaminated soil. Festa S., **Macchi M.**, Coppotelli B.M. y Morelli I.S.

#### Participación en Congresos nacionales

*XXIII Congreso Latinoamericano de Microbiología y XIV Congreso Argentino de Microbiología ALAM-CAM 2016 – 26 al 30 de septiembre de 2016, Rosario, Argentina.*

1) Proteogenómica de la cepa degradadora de hidrocarburos policíclicos aromáticos *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA. **Macchi M.**, Morelli I.S. y Coppotelli B.M.

*III Congreso Argentino de Microbiología Agrícola y Ambiental - CAMAyA 2015 – 25 al 27 de Noviembre de 2015, Buenos Aires, Argentina*

2) Estudio de la funcionalidad de consorcios definidos durante la degradación de fenantreno. **Macchi M.**, Festa S., Morelli I.S., Coppotelli B.M.

3) Estudio in silico de los productos génicos relacionados con la ruta de degradación de fenantreno de un consorcio bacteriano. **Macchi M.**, Morelli I.S., Coppotelli B.M.

*X Congreso de microbiología general, 2-4 Julio de 2014, Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina*

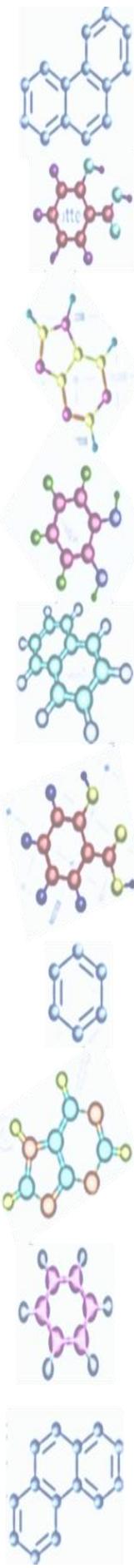
4) Pyrosequencing study of bacterial PAH-degrading consortium and the shifts produced in its composition by inoculation with a competitive strain. Festa S., **Macchi M.**, Morelli I.S., Coppotelli B.M.

*XIII Congreso Argentino de Microbiología, 23 - 26 Septiembre de 2013, Buenos Aires, Argentina*

5) Estudio del metaproteoma y las capacidades metabólicas de un consorcio degradador de fenantreno inoculado con una cepa competitiva. **Macchi M.**, Morelli I.S. y Coppotelli B.M.

## **Agradecimientos**

- ∞ A mis directoras Irma y Bibiana, quienes estuvieron siempre para guiarme, enseñarme y acompañarme, día a día. Cuanto aprendí!
- ∞ Bibi, por estar presente siempre, en lo profesional y en lo humano. Por tu motivación continua y tus ganas de innovar y aprender que contagian y que se logran gracias a tu perseverancia. Fueron años movidos de mucho aprendizaje. Gracias por la contención y la paciencia de todos los días. Y por ayudarme y darme una mano ... o dos!
- ∞ Irma, por tu vocación, compromiso y estímulo. Escuchar todo lo que sabes y trasmítis me deja siempre con la boca abierta. Gracias por tu confianza y dejarme ser parte de este grupo que dirigís y que sin dudas eso lo hace tan lindo.
- ∞ A Tere, por tus palabras siempre en el momento justo, gracias por brindarme tanto cariño.
- ∞ Al CINDEFI por haberme brindado el lugar de trabajo y a todos sus integrantes. Gracias por su compañerismo y predisposición de siempre. Y a las personas de otros institutos por su ayuda.
- ∞ A mis papas, Carlitos y la Peti, mis pilares de vida, mis ejemplos. Por el amor incondicional, por haberme dado la oportunidad de estudiar y por el aliento constante que llega hasta mi corazón y que a pesar de la distancia, es como tenerlos al lado siempre. Gracias por ser quienes son.
- ∞ A mi hermano y familia, por su amor y por darme el regalo que te llena el alma, mis sobris!
- ∞ A mi abu Aida y a mis tíos y primas que confían en mí y están siempre alentando y apoyando cada decisión. Gracias por interesarse en mi trabajo y darme tanto afecto.
- ∞ A Nacho por bancar tanta locura, escucharme, aconsejarme y acompañarme con tanto amor. Por confiar siempre, por tus abrazos y decirme día a día que no baje los brazos.
- ∞ A Mari, gracias por tanto amiga, saber que estás siempre me hace feliz y a Pablete!
- ∞ A Sabri, por enseñarme tanto, tanto y estar siempre con su predisposición y en cada detalle. Junto a Berni estuvieron siempre, para todo, todo y trasmitiéndome las mejores vibras. Buena dupla!
- ∞ A Marti, por estar presente siempre. Gracias amiga por tus oídos y mucho más por tus abrazos!
- ∞ A Lau, por ser compañera, ayudarme siempre y resolver mis dudas... y por tantas charlas
- ∞ Al L5... Las semanas son mejores porque están ustedes. Gracias por compartir estos años de experimentos y charlas. Vivi, Nati, Lina, Vero, Pau, Esteban, Caro, Marina, Juli, Marti y ex Ro y Clau, cada uno con su personalidad hace el equilibrio.
- ∞ A mis amig@s de cerca, y a mis amig@s de más lejos y maipuenses. Qué bien se siente tenerlos. Marietta, tenés mención especial por el aguante y todos los momentos de diversión. Pani, siempre estás ahí amiga.



## *Indice*

**Indice**

I. Introducción.....	9
I.1 La contaminación ambiental con hidrocarburos policíclicos aromáticos .....	9
I.1.1 Biorremediación de ambientes contaminados con PAH.....	9
I.1.2 Bioaumento .....	11
I.2 Consorcios microbianos en biorremediación.....	11
I.2.1 Estudios de consorcios sintéticos como base para la comprensión del funcionamiento de comunidades microbianas complejas .....	13
I.3 Degradación bacteriana del fenantreno .....	15
I.4 Enzimas que participan en las rutas degradativas de PAH .....	17
I.4.1 Enzimas hidroxilantes de anillo aromático (RHO) y su clasificación.....	18
I.4.2 Enzimas extradiol dioxigenasas (EXDO) y su clasificación .....	19
I.4.3 Clasificación de dioxigenasas basadas en las bases de datos RHObase y Aromadeg.....	20
I.5 Reguladores de ruta de degradación de compuesto policíclicos aromáticos.....	22
I.6 Estudio de las interacciones entre microorganismos.....	23
I.7 CON.....	24
II. Objetivos e hipótesis .....	26
II.1 Objetivos Generales .....	26
II.2 Objetivos Específicos.....	26
II.3 Hipótesis .....	26
III. Materiales y métodos .....	29
III.1 Materiales .....	29
III.1.1 Consorcio bacteriano .....	29
III.1.2 Cepas aisladas .....	29
III.1.2.1 Cepa utilizada para la inoculación de CON .....	29
III.1.2.2 Cepas aisladas del consorcio.....	29
III.1.3 Medios de cultivo .....	30
III.1.4 Medios de cultivo para pruebas bioquímicas .....	32
III.1.5 Reactivos.....	33
III.1.6 Buffers y soluciones.....	35

---

III.1.6.1 Buffers y soluciones para PCR .....	35
III.1.6.2 Buffers y soluciones para DGGE.....	35
III.1.6.3 Buffers y soluciones para la extracción de DNA para secuenciación por técnicas de nueva generación .....	36
III.1.7 Reactivos para PCR en tiempo real .....	36
III.1.8 Buffers y soluciones para proteómica .....	37
III.1.9 Programas utilizados para el análisis de genomas .....	39
III.2 Metodología .....	41
III.2.1 Aislamiento y caracterización de los microorganismos presentes en el consorcio .....	41
III.2.1.1 Aislamientos de nuevos géneros bacterianos a partir de CON.....	41
III.2.1.2 Pruebas bioquímicas.....	41
III.2.1.3 Identificación genotípica de las cepas aisladas .....	42
III.2.1.4 PCR del gen 16S rRNA completo .....	42
III.2.2 Preparación de los cultivos usados como inóculo .....	43
III.2.2.1 Reactivación del consorcio.....	43
III.2.2.2 Preparación de los inóculos .....	43
III.2.2.3 Preparación de los consorcios sintéticos a partir de las cepas aisladas de CON .....	43
III.2.3 Cinética de degradación de fenantreno.....	44
III.2.3.1 Determinación de la concentración de fenantreno y ácido 1-hidroxi-2-naftoico .....	44
III.2.4 Determinación de la concentración de diferentes PAH .....	44
III.2.5 Cinética de degradación de ácido 1-hidroxi-2-naftoico.....	45
III.2.5.1 Preparación de los cultivos .....	45
III.2.5.2 Determinación de la concentración de ácido 1-hidroxi-2-naftoico.....	45
III.2.6 Estudios cualitativos de degradación de PAH e intermediarios metabólicos .....	45
III.2.6.1 Estudio cualitativo de crecimiento y degradación de PAH en los cultivos.....	45
III.2.6.2 Estudio cualitativo de crecimiento y degradación de intermediarios de la ruta de degradación de fenantreno en cultivos de las cepas aisladas y CS .....	45
III.2.6.3 Determinación cualitativa de la degradación de los intermediarios de la vía baja de degradación de fenantreno: catecol y 2,3-dihidroxibifenilo .....	46

---

III.2.7 Estudio de la dinámica de las poblaciones bacterianas durante la degradación de fenantreno y ácido 1-hidroxi-2-naftoico .....	46
III.2.7.1 Recuento de bacterias heterótrofas totales .....	46
III.2.7.2 Recuento de bacterias degradadoras de PAHs mediante la técnica del número más probable (NMP).....	47
III.2.7.3 Recuento diferencial para los distintos morfotipos .....	47
III.2.8 Determinación de la estructura, dinámica y diversidad de los consorcios a nivel molecular.....	47
III.2.8.1 Extracción de DNA total de CON, CON-I y CS.....	47
III.2.8.2 Determinación de los perfiles del 16S rRNA y separación mediante DGGE..	48
III.2.8.2.a Reacción de PCR .....	48
III.2.8.2.b Purificación del producto de PCR de las cepas aisladas .....	48
III.2.8.2.c Análisis de la estructura mediante Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (PCR-DGGE) .....	48
III.2.8.3 Estudio de la composición bacteriana de CON-I mediante 454-Pirosecuenciación.....	49
III.2.8.3.a Análisis del set de datos de pirosecuenciación .....	49
III.2.9 Aplicación de estrategias ómicas .....	50
III.2.9.1 Análisis genómico de las cepas aisladas .....	50
III.2.9.1.a Extracción de DNA de alto peso molecular.....	50
III.2.9.1.b Ensamble y anotación de la secuenciación del genoma completo.....	50
III.2.10 Reconstrucción de la red metabólica guiada por los datos genómicos.....	51
III.2.11 Análisis transcriptómico .....	54
III.2.11.1 PCR Real Time .....	54
III.2.11.1.a Selección de los set de primers para los ensayos de RT-qPCR .....	54
III.2.11.1.b Amplificación de los genes dioxigenasa y optimización de la temperatura de hibridación.....	55
III.2.11.1.c Obtención de los cultivos para la extracción de RNA.....	56
III.2.11.1.d Extracción de RNA total mediante kit comercial.....	56
III.2.11.1.e Evaluación de la cantidad y calidad de RNA.....	57
III.2.11.1.f Síntesis de cDNA .....	58
III.2.11.1.g Amplificación mediante RT-qPCR.....	58

---

III.2.12 Análisis proteómico .....	59
III.2.12.1 Obtención de proteínas de la cepa <i>Sphingomonas paucimobilis</i> 20006FA .	59
III.2.12.2 Obtención de proteínas del consorcio inoculado (CON-I).....	60
III.2.12.3 Preparación del lisado celular para estudios proteómicos .....	60
III.2.12.4 Determinación de la concentración de proteínas.....	60
III.2.12.5 Precipitación de proteínas.....	60
III.2.12.6 SDS-PAGE .....	61
III.2.12.7.a Análisis de las imágenes de los geles .....	61
III.2.12.8 Isoelectroenfoque .....	61
III.2.12.9 Segunda dimensión .....	62
III.2.12.9.a Análisis de las imágenes de los geles .....	62
III.2.12.9.b Identificación de proteínas .....	62
III.2.13 Análisis estadístico .....	63
IV. Diseño de consorcios bacterianos con alta eficiencia de degradación de PAH: Estrategia I.....	65
IV.1 Consorcio natural CON.....	65
IV.2 <i>Sphingomonas paucimobilis</i> 20006FA.....	66
IV.3 Resultados .....	67
IV.3.1 Caracterización de la cepa <i>Sphingomonas paucimobilis</i> 20006FA .....	67
IV.3.1.1 Estudio de la capacidad de degradación de fenantreno en cultivos líquidos de <i>Sphingomonas paucimobilis</i> 20006FA .....	67
IV.3.1.2 Estudio del potencial de degradación de <i>Sphingomonas paucimobilis</i> 20006FA .....	70
IV.3.1.3 Análisis genómico de <i>Sphingomonas paucimobilis</i> 20006FA y estudio “ <i>in silico</i> ” de los genes relacionados con la ruta de degradación de fenantreno.....	72
IV.3.1.3.a Extracción de DNA, secuenciación, ensamblaje y anotación del genoma de 20006FA .....	72
IV.3.1.3.b Clasificación de enzimas dioxigenasas de la cepa <i>S. paucimobilis</i> 20006FA implicadas en la vía superior e inferior de la degradación de fenantreno	76
IV.3.1.3.c Reguladores transcripcionales de los genes de la ruta de degradación de hidrocarburos .....	78

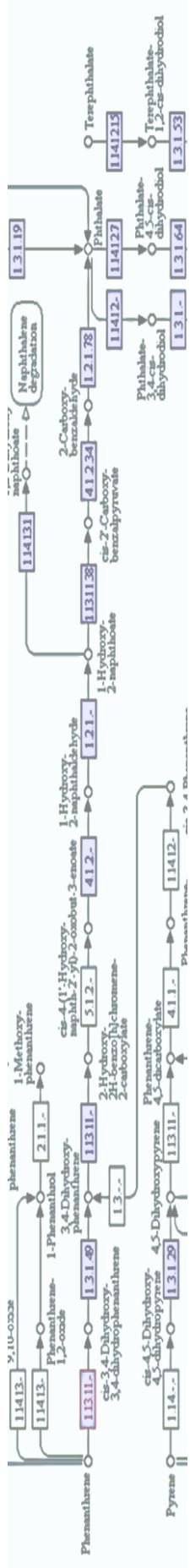
---

IV.3.1.4 Análisis del proteoma de la cepa <i>Sphingomonas paucimobilis</i> 20006FA mediante electroforesis bidimensional .....	80
IV.3.2 Construcción de un consorcio conformado por el consorcio natural CON y la cepa <i>Sphingomonas paucimobilis</i> 20006FA .....	88
IV.3.2.1 Cinética comparativa de degradación de fenantreno y generación de AHN en CON y CON-I.....	88
IV.3.2.2 Efecto de la inoculación con la cepa <i>Sphingomonas paucimobilis</i> 20006FA sobre la dinámica de las poblaciones cultivables del consorcio durante la degradación de fenantreno .....	89
IV.3.2.2.a Recuento de bacterias heterótrofas totales en CON y CON-I.....	89
IV.3.2.2.b Recuento de bacterias degradadoras de PAH en CON y CON-I .....	92
IV.3.2.3 Efecto de la inoculación con la cepa 20006FA sobre la estructura y diversidad del consorcio natural CON mediante métodos moleculares .....	93
IV.3.2.3.a Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE).....	93
IV.3.2.4 Pirosecuenciación del DNA total de CON y CON-I .....	95
IV.3.2.5 Estudio del metaproteoma de CON y CON-I mediante SDS-PAGE durante la degradación de fenantreno .....	97
IV.3.2.6 Degradación de ácido 1-hidroxi-2-naftoico de CON y CON-I .....	100
IV.3.2.6.a Recuento de bacterias heterótrofas totales en ácido 1-hidroxi-2-naftoico .....	101
IV.3.2.6.b Evaluación de la estructura y dinámica bacteriana de los consorcios durante la degradación de AHN .....	103
IV.3.2.7 Determinación del espectro de degradación de CON y CON-I .....	104
IV.3.2.7.a Degradación de distintos Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos.....	104
IV.3.2.7.b Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE).....	104
IV.4 Discusión.....	106
V. Diseño de consorcios bacterianos con alta eficiencia de degradación de PAH: Estrategia II.....	119
V.2 Resultados .....	120
V.2.1 Aislamiento, caracterización e identificación de cepas del consorcio natural degradador de fenantreno (CON) para ser utilizadas en el diseño de consorcios sintéticos con alta eficiencia de degradación de PAH.....	120
V.2.1.1 Aislamiento y caracterización .....	120

---

V.2.1.2 Identificación de cepas mediante secuenciación del gen 16S rRNA .....	122
V.2.2 Estudio de la capacidad degradadora de PAH de las cepas.....	123
V.2.2.1 Degradación de fenantreno y metabolitos intermedios de su vía de degradación.....	123
V.2.2.2 Cinética comparativa de degradación de fenantreno en las cepas <i>Sphingobium</i> sp. AM y <i>Burkholderia</i> sp. Bk .....	125
V.2.2.3 Determinación del espectro de degradación de las cepas AM y Bk .....	128
V.2.3 Análisis genómico de las cepas aisladas de CON y estudio “ <i>in silico</i> ” de los genes relacionados con la ruta de degradación de fenantreno.....	129
V.2.3.1 Extracción de DNA, secuenciación y ensamblaje de los genomas de las cepas de CON .....	129
V.2.3.2 Anotación .....	131
V.2.3.3 Análisis “ <i>in silico</i> ” del genoma de las cepas de CON en relación con la degradación de PAH.....	132
V.2.3.3.a Análisis genómico de la cepa <i>Sphingobium</i> sp. AM .....	132
V.2.3.3.b Análisis genómico de la cepa <i>Klebsiella aerogenes</i> B.....	133
V.2.3.3.c Análisis genómico de la cepa <i>Pseudomonas</i> sp. Bc-h.....	134
V.2.3.3.d Análisis genómico de la cepa <i>Pseudomonas</i> sp. T.....	135
V.2.3.3.e Análisis genómico de la cepa <i>Inquilinus limosus</i> I .....	136
V.2.3.3.f Análisis genómico de la cepa <i>Burkholderia</i> sp. Bk .....	137
V.2.3.4 Análisis comparativo con los scaffolds de la librería metagenómica funcional de CON .....	139
V.2.3.5 Análisis comparativo de los genomas de las cepas <i>Sphingobium</i> sp. AM y <i>Sphingomonas paucimobilis</i> 20006FA .....	140
V.2.3.6 Clasificación de enzimas dioxygenasas implicadas en la vía superior e inferior de la degradación de fenantreno .....	141
V.2.3.6.a Clasificación de dioxygenasas de la cepa <i>Sphingobium</i> sp. AM.....	142
V.2.3.6.b Clasificación de enzimas dioxygenasas de la cepa <i>Klebsiella aerogenes</i> B .....	144
V.2.3.6.c Clasificación de enzimas dioxygenasas de la cepa <i>Pseudomonas</i> sp. Bc-h .....	145
V.2.3.6.d Clasificación de enzimas dioxygenasas de la cepa <i>Pseudomonas</i> sp. T146 .....	146
V.2.3.6.e Clasificación de enzimas dioxygenasas de la cepa <i>Inquilinus limosus</i> I .....	147

V.2.3.6.f Clasificación de enzimas dioxigenasas de la cepa <i>Burkholderia</i> sp. Bk .148	
V.2.3.7 Estudio filogenético de las enzimas dioxigenasas pertenecientes a las cepas aisladas de CON.....	150
V.2.3.8 Reguladores transcripcionales de los genes de la ruta de degradación de hidrocarburos.....	153
V.2.3.9 Reconstrucción de la red metabólica guiada por los datos genómicos y filogenéticos.....	154
V.2.4 Diseño y caracterización de consorcios microbianos sintéticos .....	158
V.2.4.1 Estudio del potencial de degradación de los consorcios sintéticos .....	159
V.2.4.2 Cinética de degradación de fenanreno de los consorcios sintéticos .....	160
V.2.4.3 Determinación de la dinámica de las poblaciones bacterianas de los consorcios sintéticos.....	165
V.2.4.3.a Recuento de bacterias heterótrofas totales .....	165
V.2.4.3.b Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE) .....	167
V.2.4.4 Estudio de la expresión de genes de la cepa AM regulados diferencialmente entre el cultivo puro y el consorcio CS-1 mediante RT-qPCR .....	169
V.2.4.4.a Eficiencia de primers .....	170
V.2.4.4.b Cuantificación de la expresión relativa normalizada mediante RT-qPCR .....	171
V.3 Discusión.....	177
VI. Conclusiones Generales y perspectivas.....	190
VI.1 Conclusiones Generales.....	190
VI.2 Perspectivas .....	192
VII. Bibliografía .....	194
VII. Material Suplementario.....	221



# CAPÍTULO I

## *Introducción*

## I. Introducción

### I.1 La contaminación ambiental con hidrocarburos policíclicos aromáticos

La contaminación ambiental es uno de los desafíos más relevantes de nuestro tiempo, en términos de su potencial efecto adverso sobre la biodiversidad y la salud humana (Megharaj y col., 2011). Los hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH) constituyen contaminantes que plantean serios problemas ambientales a escala mundial; son muy perjudiciales para la salud humana, han sido clasificados como contaminantes de preocupación emergente (Vandermeersch y col., 2015) y pueden afectar dramáticamente la biodiversidad de los ecosistemas naturales (Zhang y col., 2015).

Los PAH son altamente resistentes a la degradación, se encuentran en sitios asociados con la industria del petróleo, la producción de gas, la producción minera, instalaciones de tratamiento de madera y la incineración de desechos (Kim y col., 2003; Kanaly y Harayama, 2000).

Representan un amplio grupo de moléculas individuales fisicoquímicamente diferentes formadas por dos o más anillos de benceno no sustituidos fusionados entre sí donde un par de átomos de carbono se comparte (Kuppusamy y col., 2016a; Okoure y Semple, 2011; Mohan y col., 2006). Son contaminantes orgánicos hidrofóbicos altamente persistentes en el suelo y en los sedimentos (Cébron y col., 2008), muestran una fuerte tendencia a adsorberse a las superficies, produciendo una baja biodisponibilidad (que desciende a medida que el número de anillos aromáticos aumenta) (Lafortune y col., 2009) y por lo tanto una gran dificultad para su biodegradación y una importante acumulación en la cadena trófica (Clements y col., 1994).

Aunque existen varios cientos de PAH, la mayoría de los estudios se han centrado en los 16 PAH prioritarios de la EPA (*Environmental Protection Agency*), siete de ellos podrían ser mutagénicos, carcinógenos y teratogénicos (Keith, 2015; Pieper y col., 2004; Ahlf y Förstner, 2001). En general los suelos contaminados con petróleo contienen mezclas complejas de hidrocarburos, incluyendo los LMW (PAH de bajo peso molecular) y los HMW (PAH de alto peso molecular) (Lafortune y col., 2009).

#### I.1.1 Biorremediación de ambientes contaminados con PAH

Varias tecnologías de remediación han sido probadas para eliminar estos contaminantes ambientales. Entre ellos, la biorremediación tiene hoy en día gran aceptación como tratamiento para la recuperación de suelos contaminados con PAH, por ser una técnica que se considera segura, respetuosa con el medio ambiente y económica (Kuppusamy y col.,

2017; Kuppusamy y col., 2016d; Mohan y col., 2006). La biorremediación aborda las limitaciones asociadas con la mayoría de los procesos fisicoquímicos, al destruir muchos contaminantes orgánicos a un costo reducido en condiciones ambientales, por lo que se ha convertido hoy en día en una alternativa de remediación popular para la eliminación de contaminantes, entre ellos los PAH (Ghosal y col., 2016; Megharaj y col., 2011; Andreoni y Gianfreda, 2007; Lovley, 2001; Kastner, 2000).

Casi todos los seres vivos están dotados con algún nivel mínimo de habilidades tales como la desintoxicación, mineralización, transformación y/o inmovilización de contaminantes. Sin embargo, los microorganismos y en particular, las bacterias y los hongos, han sido extensamente estudiados y utilizados para llevar a cabo las actividades de transformación y mineralización (Seo y col., 2009; Peng y col., 2008; Rieger y col., 2002; Watanabe y Baker, 2000). Las bacterias contienen una enorme diversidad metabólica que les permite utilizar compuestos químicos complejos como fuente de carbono y de energía (Seo y col., 2009; Rieger y col., 2002).

La biorremediación es una forma sostenible de degradar contaminantes ambientales. Aunque se ha utilizado durante más de 60 años, históricamente se ha implementado como una solución de ingeniería de "caja negra" donde se añaden enmiendas y se monitorea la eliminación de los contaminantes. Este enfoque es a veces exitoso pero en otros casos se han obtenido resultados menos deseables, debido a que no ocurre ninguna degradación del contaminante o incluso se producen intermediarios aún más tóxicos que el contaminante inicial. La clave para una biorremediación exitosa es aprovechar la capacidad catabólica natural de los microorganismos para catalizar las transformaciones de los contaminantes ambientales (Chakraborty y col., 2012).

La biodegradación de PAH se basa en la ruptura de compuestos orgánicos a través de la biotransformación originando metabolitos menos tóxicos o inocuos para el medio ambiente o con el fin de realizar una mineralización generando  $H_2O$ ,  $CO_2$  (aeróbica) o  $CH_4$  (anaeróbico) como productos finales. El alcance y la velocidad de biodegradación depende de muchos factores, incluyendo: pH, temperatura, oxígeno, la población microbiana y su grado de aclimatación, accesibilidad de nutrientes, la estructura química del compuesto, edad de la contaminación (Haritash y Kaushik, 2009; Vázquez-Nuñez y col., 2009; Singh y Ward, 2004). La optimización de las distintas estrategias de biorremediación requiere de un profundo conocimiento de los factores que gobiernan la diversidad, dinámica y versatilidad catabólica de la comunidad microbiana del sitio contaminado.

### I.1.2 Bioaumento

Se ha propuesto que la inoculación de cepas o consorcios microbianos degradadores puede ser beneficiosa para mejorar las tasas de degradación de contaminantes orgánicos en los sitios contaminados (de Lorenzo y col., 2013). Sin embargo, el éxito de las estrategias de bioaumento es en su mayoría circunstancial y la actividad de los microorganismos inoculados en el medio ambiente es todavía relativamente impredecible (Jeon y Madsen, 2013; Mrozika y Piotrowska-Segetb, 2010).

El comportamiento de los microorganismos inoculados en sistemas complejos como el suelo depende de su habilidad para sobrevivir, crecer y establecerse en el nuevo ambiente. Entre los factores que limitarían el éxito del bioaumento podrían nombrarse el estrés causado por el cambio de condiciones de laboratorio a condiciones de campo, el tamaño del inoculo en relación a la biomasa del suelo, la competencia con la microbiota natural del suelo, la predación, la disponibilidad de agua, pH y la accesibilidad al/los contaminante/s blanco u otros sustratos metabolizables (Moreno-Forero y Van Der Meer, 2015).

El uso de medios de enriquecimiento suplementados con PAH, y la condición altamente selectiva de utilizar PAH como única fuente de carbono y energía, han permitido establecer enfoques exitosos para aislar bacterias y consorcios degradadores de PAH de diversas fuentes ambientales (Alegbeleye y col., 2017; Li y col., 2017; Obi y col., 2016; Festa y col., 2013; Madueño y col., 2011; Coppotelli y col., 2008). Sin embargo, en la actualidad poco se entiende de cómo se comportan las cepas puras o los consorcios microbianos en el ambiente blanco y como interactúan con el microbioma nativo. El diseño de estrategias de bioaumento requiere el conocimiento del potencial de los microorganismos inoculados de mejorar la eficiencia de degradación y su influencia en la comunidad microbiana nativa.

Las comunidades microbianas forman redes complejas de especies que interactúan, por lo tanto el establecimiento de un inoculante supone alterar la estructura de estas interacciones (Barberán y col., 2012), competir con la comunidad nativa y participar del flujo central de carbono y energía para mejorar la eliminación de los contaminantes (van Herwijnen y col., 2006).

### I.2 Consorcios microbianos en biorremediación

Los microorganismos que se comunican mediante el intercambio de metabolitos o señales, que les permiten coordinar su actividad a través de la división del trabajo, donde cada individuo detecta y responde a la presencia de otros, conforman un consorcio microbiano (Brenner y col., 2008; Keller y Surette, 2006).

Los consorcios bacterianos poseen ventajas para lograr una biorremediación eficaz (Wanapaisan y col., 2017), ya que crean una red con diferentes niveles de interacción que muestran una mejor adaptación, supervivencia y permanencia (Zafra y col., 2017) que les permite soportar entornos fluctuantes (Brenner y col., 2008), otorgándoles solidez ante los cambios ambientales.

El uso de consorcios microbianos ofrece un modo de vida que promueve la alta diversidad y las interacciones sinérgicas entre especies microbianas que pueden conducir a características de degradación xenobiótica mejoradas como resultado de la coordinación metabólica y la división del trabajo (Demeter y col., 2017; Gupta y col., 2017; Edwards y Kjellerup, 2013). Una característica importante de los consorcios microbianos es su capacidad para realizar funciones que requieren múltiples pasos. La diversidad resultante en las rutas metabólicas le permite realizar tareas más complejas y utilizar de manera más eficiente los recursos disponibles en su entorno (Fu y col., 2009; Sun y Cheng, 2002).

Los consorcios son un buen modelo para estudiar las interacciones que se pueden dar entre las poblaciones bacterianas durante un proceso de biorremediación ya que implican la acción concertada de diferentes microorganismos sobre un sustrato, mediante la combinación de sus actividades metabólicas cooperativas (Desai y col., 2010). Las interacciones entre los miembros pueden abarcar el contacto físico, la señalización química y el intercambio metabólico. Por ejemplo, en una comunidad compuesta de dos especies que cooperan a través del intercambio de metabolitos, la adición exógena de uno o más metabolitos (o la aparición de metabolitos intermediarios) cambiará su relación de cooperación a competencia o comensalismo, lo que también podrá cambiar marcadamente el comportamiento de los otros miembros de la comunidad (Jiménez y col., 2017).

Las interacciones dentro de estas redes ecológicas pueden tener un impacto positivo (es decir, una ganancia), un impacto negativo (es decir, una pérdida) o ningún impacto en las especies involucradas. El sinergismo (es decir, la división del trabajo), la competencia (que resulta en el desplazamiento de las especies) y el comensalismo pueden desempeñar funciones fundamentales (Lindemann y col., 2016; Faust y Raes, 2012). Estos mecanismos no son mutuamente excluyentes ya que existen casos de sinergismo-competencia y sinergismo-comensalismo que ocurren en la misma comunidad, dependiendo de los flujos nutricionales espaciotemporales (Dolinšek y col. 2016). Un mecanismo clave radica en los tipos de enzimas producidas, que pueden ser complementarias entre sí. De este modo, la combinación de especies particulares influye en las interacciones sinérgicas. En este sentido, la naturaleza de la interacción microbiana está potencialmente relacionada con la redundancia funcional y la superposición de nicho (competencia) en el sistema.

A pesar de los impresionantes avances en el conocimiento de la composición de especies de las comunidades microbianas, todavía estamos lejos de alcanzar el nivel de comprensión

fundamental de la dinámica y la función de las comunidades microbianas, que se necesita para predecir y controlar su comportamiento (Widder y col., 2016).

El co-cultivo de poblaciones bacterianas basado en las interacciones presentes en consorcios microbianos naturales proporciona un sistema de menor complejidad para ser estudiado durante la degradación de contaminantes. Estos sistemas posibilitan una mayor reproducibilidad y son más fáciles de conservar. Sin embargo, se sabe poco sobre cómo los microorganismos cooperan entre sí, y sobre el rol que cumple cada uno en la eliminación de contaminantes (Jia y col., 2016).

### ***I.2.1 Estudios de consorcios sintéticos como base para la comprensión del funcionamiento de comunidades microbianas complejas***

La secuenciación de alto rendimiento, la proteómica y metabolómica ahora nos permiten catalogar la diversidad de las comunidades microbianas a un nivel de detalle sin precedentes. Los datos otorgados por estas técnicas revelan la composición instantánea relativamente imparcial de las especies, genes, metabolitos y actividades que están presentes en una comunidad microbiana dada. El desafío clave ahora es convertir este conocimiento empírico en ideas y predicciones comprobables, que pueden usarse para mejorar la función de las comunidades microbianas para propósitos útiles (Widder y col., 2016).

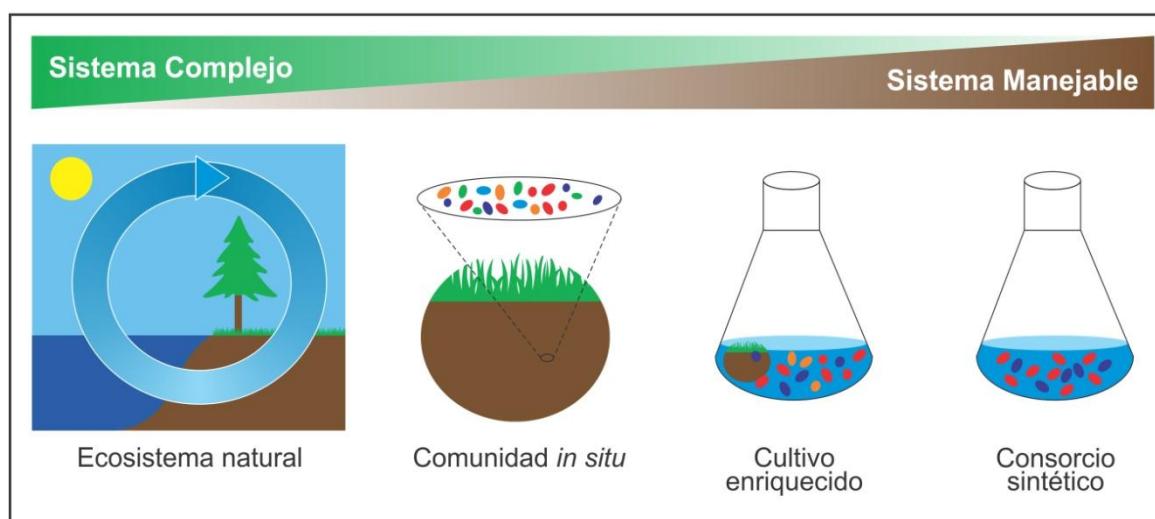
Se puede ganar mucho concentrando los esfuerzos en un conjunto más limitado de “modelos” de comunidades microbianas bien definidas (Estrela y col., 2015; Großkopf y Soyer, 2014; Denef y col., 2010), incluyendo comunidades sintéticas construidas a partir de especies microbianas conocidas cuyos miembros están especializados en ciertas etapas de la biodegradación de un contaminante (Bai y col., 2015; Bodenhausen y col., 2014; Faith y col., 2014).

Los factores y procesos que influyen en el comportamiento y la funcionalidad de un ecosistema son, en gran medida, “cajas negras” cuando se utilizan enfoques convencionales. De este modo, la ecología microbiana sintética ha ganado mucho interés en los últimos años. Esto se debe a que estas comunidades contribuyen a una menor complejidad y a una mayor capacidad de control, y es por eso que a menudo se prefieren sobre las comunidades ambientales que son mucho más complejas a la hora de examinar las teorías ecológicas (De Roy y col., 2014).

La ecología microbiana sintética es un término colectivo para todos los ecosistemas racionalmente diseñados que se crean mediante un enfoque ascendente, donde los microorganismos que se aíslan inicialmente de su entorno natural mediante técnicas

convencionales basadas en el cultivo, se ensamblan en dos o más poblaciones microbianas definidas en un ambiente bien caracterizado y controlado.

Los ecosistemas sintéticos se utilizan (i) para obtener información sobre principios fundamentales, como procesos metabólicos, interacciones, redes, relación diversidad-funcionalidad y ciclo de nutrientes, y (ii) para crear interacciones y comunidades con características y funcionalidades deseadas (De Roy y col., 2014). Las comunidades sintéticas limitan los factores de influencia a un mínimo, lo que permite su fácil manejo (De Roy y col., 2014).



**Figura I.1.** Figura adaptada de Ponomarova y Patil (2015). Sistemas de estudio de comunidad microbiana determinado por el equilibrio entre la complejidad y la capacidad de tratamiento de un sistema manejable.

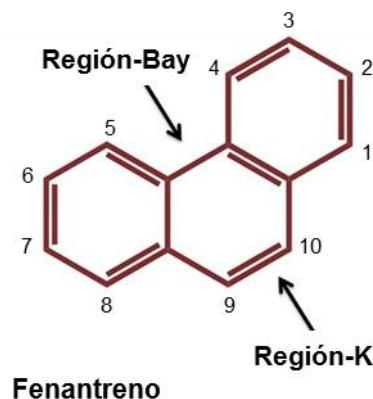
La construcción de un ecosistema artificial simplificado con antecedentes genéticos bien definidos e interacciones celulares identificables, proporciona un sistema modelo simplificado con base genética para comprender mejor cómo evoluciona el ecosistema microbiano en diferentes entornos (Hu y col., 2010). El estudio de la estructura de la comunidad junto con el comportamiento de las especies individuales frente a la degradación del contaminante puede permitir comprender el potencial de complementación funcional durante el proceso de biorremediación (Jia y col., 2016).

Los experimentos de laboratorio con comunidades microbianas bien definidas en condiciones controladas, permiten el control de los parámetros externos claves, tales como la concentración de sustrato, el tamaño del sistema o la temperatura, además de permitir múltiples experimentos de replicación (Widder y col., 2016).

Aunque las comunidades sintéticas no reproducen la diversidad y complejidad completa de las comunidades microbianas naturales, muchos de los principios de organización y dinámica de comunidades, que aprendemos de ellas, podrían ser transferibles a comunidades microbianas más complejas (Widder y col., 2016). Entonces las estrategias de biorremediación se diseñarían basándose en el conocimiento de los microorganismos presentes en los entornos contaminados, sus habilidades metabólicas y su respuesta a los cambios en las condiciones ambientales.

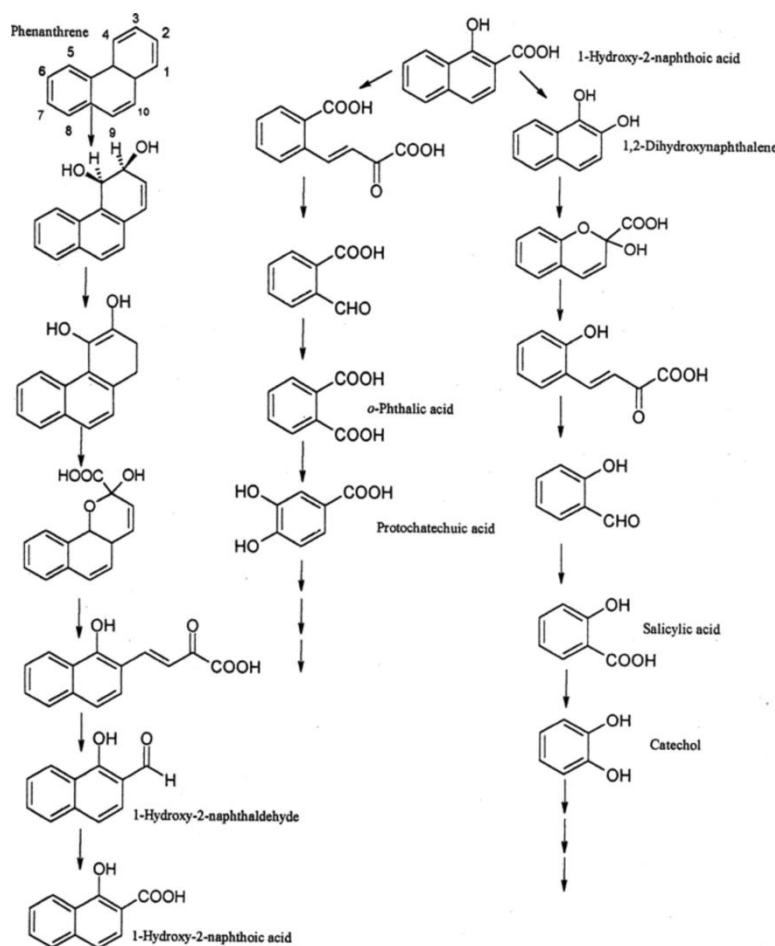
### I.3 Degradación bacteriana del fenantreno

El fenantreno está dentro del grupo de los 16 PAH listados como contaminantes prioritarios (Janbandhu y Fulekar, 2011). Debido a que el fenantreno presenta una solubilidad en agua más alta que otros PAH y sus productos de degradación generan cambios en la coloración de los medios de cultivo (Lee y col., 1992; Treccani, 1965), es un compuesto atractivo para enriquecer los aislados bacterianos ambientales y seguir la degradación de los PAH. Asimismo, el fenantreno es el PAH más pequeño que presenta conformaciones de la región Bay y K, características de muchos PAH de alto peso molecular, que permiten la formación de diferentes especies reactivas, lo que lo convierte en un sustrato modelo para el metabolismo de los PAH (Samanta y col., 2002). En las regiones Bay y K (Figura I.2), se pueden formar las principales especies carcinogénicas, generalmente epóxidos (Amézcua-Allier y col., 2010; Correia y col., 2007).



**Figura I.2.** Estructura química de la molécula de fenantreno y regiones Bay y K (Ghosal y col., 2016).

La vía alta de degradación bacteriana aeróbica del fenantreno comienza con la incorporación de dos átomos de oxígeno en su estructura en una reacción catalizada, por una enzima dioxigenasa (Habe y Omori, 2003). La dioxigenación de la molécula de fenantreno es llevada a cabo en los carbonos 9 y 10 en las bacterias Gram positivas (Vila y col., 2001). En cambio, en las bacterias Gram negativas la dioxigenación se realiza en los carbonos 3,4 o 1,2. El dihidrodiol resultante se convertirá por la acción de la dihidrodiol deshidrogenasa en 3,4-dihidroxifenantreno, el cual será objeto del meta clivaje, y en los pasos posteriores se convierte en ácido 1-hidroxi-2-naftoico (AHN). El AHN es el intermediario principal durante la degradación microbiológica de fenantreno (Peng y col., 2008; Mallick y col., 2007; Balashova y col., 2001). El AHN puede ser degradado por dos vías diferentes reportadas hasta ahora. En una de las rutas, sufre descarboxilación oxidativa para formar 1,2-dihidroxinaftaleno, que posteriormente es metabolizado por la ruta de degradación de naftaleno vía salicilato. En la otra ruta, el AHN es metabolizado a través de la vía del ácido ftálico (Seo y col., 2007; Kiyohara y Nagao, 1978; Evans y col., 1965) (Figura I.3), que dan lugar finalmente a compuestos intermediarios del ciclo de Krebs, como por ejemplo piruvato, fumarato y acetil-CoA (Habe y Omori, 2003), para generar energía en forma de ATP necesaria para los procesos celulares que llevan a cabo los microorganismos (Habe y Omori, 2003).



**Figura I.3.** Rutas propuestas para la degradación de fenanreno por las bacterias (Pinyakong y col., 2000).

#### I.4 Enzimas que participan en las rutas degradativas de PAH

Las oxigenasas bacterianas que participan en las rutas de degradación de PAH pertenecen a una gran familia de enzimas con capacidad de hidroxilar anillos aromáticos. Estas enzimas, que en conjunto se denominan enzimas hidroxilantes de compuestos aromáticos (o RHO, del inglés “*ring hydroxylating oxygenases*”) poseen un rol importante en la mineralización de estos compuestos, debido a que son esenciales para los pasos claves de ataque a los hidrocarburos (Chakraborty y col., 2012).

El primer paso de la ruta aeróbica de degradación de PAH es catalizado por enzimas oxigenasas, que incorporan uno o dos átomos de oxígeno a uno de los anillos aromáticos de la molécula para formar compuestos dioles. Estas oxigenasas iniciales pueden ser dioxigenasas multicomponente que poseen sitio Rieske hierro-azufre (Gibson y Parales, 2000) o monooxigenasas dependientes de flavina (Mallicky col., 2011). Después de la hidroxilación inicial de los PAH, los dioles intermedios generados de la vía alta de

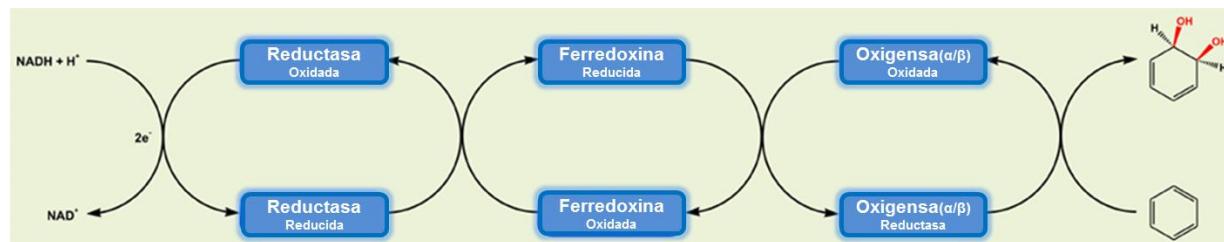
degradación de PAH, pueden ser utilizados como sustratos de otra clase de oxigenasas, las involucradas en la ruptura del anillo aromático (Brennerova y col., 2009; Sipila y col., 2008). Dependiendo del tipo de clivaje que realizan en los anillos aromáticos, estas oxigenasas pueden ser de dos tipos: intradiol dioxigenasas (INDO), las cuales catalizan la ruptura del enlace C-C, entre los carbonos hidroxilados (ortoclivaje); o extradiol dioxigenasas (EXDO), las cuales producen la ruptura entre un carbono hidroxilado y uno no hidroxilado (metaclivaje). Estos compuestos convergen en la formación de intermediarios centrales (Kasuga y col., 2007; Hirose y col., 1994), que conducen al metabolismo de la vía baja de degradación de PAH, para dar lugar a la formación de ácido ftálico y ácido salicílico.

A diferencia de las enzimas intradiol dioxigenasas (INDO), que hasta la fecha parecen pertenecer a la misma superfamilia, las enzimas extradiol dioxigenasas (EXDO) son más versátiles y permiten degradar una amplia variedad de sustratos. Las enzimas EXDO han evolucionado de manera tal que es posible clasificarlas en diferentes familias o tipos (Pérez-Pantoja y col., 2010b, Vaillancourt y col., 2006).

#### I.4.1 **Enzimas hidroxilantes de anillo aromático (RHO) y su clasificación**

Son enzimas de varios componentes con una composición  $\alpha_n\beta_n$  (Ferraro y col., 2005; Karlsson y col., 2003; Parales, 2003). Constan de tres dominios distintos, que son solubles y no están vinculados a la membrana. El centro activo se ubica en un dominio oxigenasa terminal (C-terminal), mientras que una o dos proteínas de transporte de electrones (ET), una reductasa y una ferredoxina (que puede no estar presente) se encargan de transferir electrones al dominio catalítico dioxigenasa terminal procedentes de un NADH.

Las oxigenasas terminales son heteromultímeros que comprenden principalmente dos subunidades separadas. Una grande, la subunidad catalítica ( $\alpha$ ) de aproximadamente 50 kDa, con un dominio catalítico C-terminal que posee un sitio de unión al sustrato y un sitio conservado de unión a  $\text{Fe}^{+2}$  mononuclear, el cual se cree que es el sitio de activación del oxígeno (Chakraborty y col., 2012) y un dominio Fe-S tipo Rieske ubicado en el extremo N-terminal, formado por un centro redox [2Fe-2S] que recibe electrones del sistema transportador de electrones para transferirlos luego al sitio activo (Haddock, 2010). La subunidad estructural pequeña ( $\beta$ ) de aproximadamente 20 KDa, se encuentra en forma hetero-multimérica, estrechamente asociadas una a la otra en una estructura  $\alpha\beta_n$ .



**Figura I.4.** Sistema de transporte de electrones (ET) de los miembros de la familia RHO.

Si bien el mecanismo catalítico de la dihidroxilación de anillos aromáticos no se conoce en detalle, los esquemas de clasificación para las enzimas hidroxilantes de anillo aromático propuestos hasta ahora se basan principalmente en su presencia en bacterias Gram-positivas o Gram-negativas (Cébron y col., 2008), especificidad de sustrato (Iwai y col., 2011; Wackett, 2002) o en cada componente de la enzima y su estructura modular combinada (Kweon y col., 2008; Batie y col., 1992).

Todas estas enzimas comparten características estructurales comunes, incluyendo la estructura cuaternaria y residuos conservados en el dominio Rieske y el dominio catalítico de la subunidad  $\alpha$ , implicados en la unión de los centros metálicos. Sin embargo, difieren considerablemente en términos de secuencia de aminoácidos y de la estructura de los transportadores de electrones asociados.

La clasificación propuesta por Chakraborty y colaboradores (2012), presenta cuatro clases diferentes de oxigenasas (A a D) en base a aspectos evolutivos y funcionales relacionados con la configuración estructural del sustrato y sus sitios de oxigenación.

Sin embargo, el descubrimiento de enzimas hidroxilantes de anillo aromático pertenecientes a microorganismos no cultivables podría dar lugar a la identificación de otros tipos de enzimas aún no descriptos, dado que en la clasificación propuesta por Chakraborty y colaboradores sólo se emplearon secuencias de enzimas de bacterias aisladas.

#### I.4.2 Enzimas extradiol dioxigenasas (EXDO) y su clasificación

Las enzimas EXDO I pertenecen a la superfamilia de proteínas quelantes de oxígenos vecinales (Gerlt y Babbitt, 2001), comprende enzimas que catalizan la escisión de catecol, 2,3-dihidroxibifenilo, 1,2-dihidroxinaftaleno, homoprotocatecuato, 2,3-dihidroxi-benzoato, entre otros (Pérez-Pantoja y col., 2010b, Vaillancourt y col., 2006). Las enzimas EXDO II, forman parte de la superfamilia Lig B, la cual incluye enzimas con una o dos subunidades (Pérez-Pantoja y col., 2010b; Vaillancourt y col., 2006; Sugimoto y col., 1999), cuyos miembros están bien establecidos como responsables de la degradación del protocatecuato y homoprotocatecuato. Finalmente, las EXDO III pertenecen a la superfamilia de las cupinas

(Dunwell y col., 2004), e incluyen enzimas claves tales como gentisato 1,2-dioxigenasa, homogentisato 1,2-dioxigenasa y 3-hidroxiantranilato 3,4-dioxigenasa, involucradas en la degradación de salicilato, fenilalanina y triptófano respectivamente y también, la gentisato 1,2-dioxigenasa participa de la escisión de anillo implicada en la degradación de salicilato o 3-hidroxibenzoato, entre otros compuestos aromáticos (Adams y col., 2006).

#### I.4.3 Clasificación de dioxigenasas basadas en las bases de datos RHObase y Aromadeg

Décadas de estudios bioquímicos junto con nuevos datos de secuenciación de última generación han aumentado exponencialmente la información sobre las vías de degradación aromática aeróbica. La mayoría de las secuencias de proteínas en las bases de datos públicas no se han caracterizado experimentalmente y los métodos basados en la homología siguen siendo el enfoque más utilizado rutinariamente para asignar la función de la proteína en genomas secuenciados.

La clasificación reciente de enzimas hidroxilantes de anillo aromático (RHO) se ha centrado en los esquemas basados en las secuencias de aminoácidos de las subunidades  $\alpha$  de estas enzimas, debido a su mayor plasticidad evolutiva en comparación con otros componentes y al hecho de que contienen los centros de metal catalíticamente relevantes (Vilchez- Vargas y col. 2013; Wackett, 2002).

La base de datos Ring-Hydroxylating Oxygenase, abreviada como "**RHObase**" (<http://bicresources.jcbose.ac.in/ssaha4/Rhobase/>), es una base de datos en línea, curada manualmente y con capacidad de búsqueda que proporciona información exhaustiva sobre todos los RHO bacterianos estudiados y caracterizados bioquímicamente. La versión actual de la base de datos compila ~ 1000 entradas que incluyen 196 subunidades  $\alpha$  de oxigenasa, 153 subunidades  $\beta$  de oxigenasas, 92 ferredoxinas y 110 reductasas, distribuidas entre 131 cepas bacterianas diferentes. Las proteínas están vinculadas a las estructuras PDB disponibles y los dominios conservados correspondientes (y motivos). La base de datos también incluye información sobre más de cien compuestos aromáticos y los mecanismos de oxigenación seguidos por diferentes RHO que implementan un total de 318 reacciones de oxigenación. Además de la recuperación de datos, también hay herramientas analíticas integradas en las que los usuarios también pueden realizar una búsqueda en blast contra la base de datos para predecir los supuestos sustratos para sus secuencias de oxigenasa de consulta o buscar posibles RHO candidatos capaces de transformar un compuesto deseado (Chakraborty y col., 2014).

Clasificación RHO	Sustratos potenciales
A	Fenanreno, naftaleno, antraceno, fluoreno y o anillos aromáticos con sustituyentes como fenilo, alquilo, carboxilato y cloro
B	Benzoatos, toluatos, clorobenzoatos y compuestos aromáticos monocíclicos sustituidos
C	Salicilato y antranilato
D	Ftalato, clorobenzoato, tolueno e hidrocarburos heterocíclicos

**Tabla I.1.** Clasificación de la subunidad  $\alpha$  de oxigenasas hidroxilantes de anillo aromático mediante la base de datos RHObase y los sustratos potenciales por cada categoría.

Hasta el momento, no hay un único recurso que proporcione una consulta basada en la información de secuencia de proteínas y extracción de datos a través de un enfoque filogenético. Tomando estas consideraciones, Duarte y colaboradores (2014) crearon **AromaDeg**, una interfaz web que se enfoca en la degradación aeróbica de compuestos aromáticos que comprende bases de datos actualizadas y curadas manualmente, construidas en base a un enfoque filogenético (Duarte y col., 2014). Fundamentado en análisis filogenéticos de secuencias de proteínas de familias clave de proteínas catabólicas y de proteínas de función documentada, AromaDeg permite la consulta y extracción de datos de nuevos conjuntos de datos genómicos, metagenómicos o metatranscriptómicos. Utiliza secuencias de proteínas catabólicas que se asocian a un grupo específico en un árbol filogenético determinado. De esta manera, AromaDeg puede inferir una función adicional de anotación y/o especificidad de sustrato a partir de los miembros del grupo vecino en el árbol, con función validada experimentalmente. Esto permite una caracterización detallada de superfamilias de proteínas individuales, así como clasificaciones funcionales con alto rendimiento. Por lo tanto, AromaDeg aborda las deficiencias de la predicción de la función proteica basada en la homología, combinando la construcción del árbol filogenético y la integración de datos experimentales para obtener anotaciones más precisas de nuevos datos biológicos relacionados con las vías de biodegradación aromáticas aeróbicas. URL de la base de datos: <http://aromadeg.siona.helmholtz-hzi.de>.

La clasificación se centra en enzimas catabólicas claves para la degradación aromática: subunidades  $\alpha$  de oxigenasas Rieske de hierro no hemo (RHO) que tienen actividad contra sustratos como bifenil, benzoato, ftalato y salicilato, y enzimas extradiol dioxigenasas (EXDO), que constituyentes familias de tipo I, II y III (Pérez-Pantoja y col., 2010b,

Vaillancourt y col., 2006). Utilizando AromaDeg se puede obtener una descripción detallada del potencial catabólico de los microorganismos en estudio.

Clasificación AromaDeg (superfamilias)	Sustratos potenciales
Oxigenasas de activación del anillo (RHO)	Bifenilo, benzoato, ftalato y salicilato
EXDO I quelantes de oxígenos vecinales	Catecol y gentisato
EXDO II LigB	Protocatecuato y homoprotocatecuato
EXDO III Cupinas	Salicilato, gentisato

**Tabla I.2.** Clasificación de oxigenasas hidroxilantes de compuestos aromáticos mediante la base de datos AromaDeg y los sustratos potenciales por cada categoría.

### I.5 Reguladores de ruta de degradación de compuestos policíclicos aromáticos

La capacidad de una bacteria de intervenir en una determinada ruta catabólica depende de la regulación de los promotores que controlan la expresión de genes codificantes para las enzimas requeridas. Cuando se utiliza un determinado sustrato como nutriente, las proteínas reguladoras y los promotores son elementos claves que aseguran un rendimiento adecuado (Díaz y Prieto, 2000). No obstante, la transcripción no sólo depende de la actuación de un regulador específico que responde a una determinada señal, sino que implica mecanismos de regulación global que conectan la actividad de los promotores con el estado energético y global de la célula, silenciando las funciones catabólicas especializadas menos favorables energéticamente hasta que sean necesarias (Cases y de Lorenzo, 1998).

Existen distintas familias de reguladores transcripcionales que pueden controlar la expresión de las rutas de degradación de compuestos aromáticos. La mayoría de estos reguladores que pueden estar implicados en la regulación de la degradación de PAH, actúan como activadores transcripcionales y pertenecen a las familias NtrC (Tropel y van der Meer, 2004). El subgrupo de reguladores denominado NtrC/XylR se caracteriza por detectar y responder a moléculas efectoras a diferencia de otros miembros de la familia que forman parte de sistemas de dos componentes (Shingler, 1996).

Los reguladores transcripcionales de la familia LysR forman el grupo más amplio de reguladores bacterianos que intervienen en rutas de degradación de contaminantes orgánicos y controlan la expresión génica de las rutas de orto clivaje de catecol (CatR) y

clorocatecol (ClcR y CbnR) (Tropel y van der Meer, 2004; Shingler, 2003; Díaz y Prieto, 2000) o vías de protocatecuato (Wischgoll y col., 2005). Todos los reguladores LysR implicados en la degradación de aromáticos actúan activando la transcripción de los genes de la ruta de degradación en presencia de un inductor, y reprimiendo su propia expresión. Reguladores pertenecientes a las familias AraC, IclR, FNR, MarR, GntR, incluyen la mayoría de los represores descritos en el catabolismo de compuestos aromáticos.

El miembro de la familia AraC, la proteína XylS, es el que tiene mayor capacidad de respuesta aromática. La activación transcripcional por XylS es estimulada por los alquilbenzoatos (inductores) y modulada por el nivel intracelular de la proteína.

Los activadores transcripcionales de tipo IclR responden tanto a compuestos aromáticos como no aromáticos y muestran una estructura de dominio lineal similar a la de los reguladores de tipo LysR (Schell, 1993). Habitualmente, los reguladores de tipo IclR se transcriben de forma divergente con respecto a los genes que controlan y los promotores correspondientes se superponen en un segmento corto de ADN.

La mayoría de los miembros de la familia GntR se comportan como represores en ausencia de efecto (Cravo-Laureau y col., 2017; Durante-Rodríguez y col., 2016), mientras que casi todos los reguladores ejercen sus efectos como activadores de la expresión génica (Gerischer, 2002).

La mayoría de los sistemas reguladores que controlan la expresión de enzimas para el metabolismo de PAH no están caracterizados, esta es una brecha de conocimiento clave en nuestra comprensión de la biodegradación de PAH, que tiene una importancia práctica en el desarrollo de estrategias de biorremediación (Cravo-Laureau y col., 2017).

### I.6 Estudio de las interacciones entre microorganismos

Un desafío importante en los procesos de biodegradación ha sido vincular las reacciones metabólicas microbianas específicas con los microorganismos que realmente median tales procesos (de Menezes y col., 2012).

Las nuevas tecnologías de secuenciación de alto rendimiento junto con la transcriptómica nos proporcionan la oportunidad de obtener una visión global del potencial evolutivo de microorganismos específicos y conocimientos sobre la forma en que el genoma es utilizado por un organismo durante la degradación de PAH, reflejando más exactamente el grupo de enzimas que son activos dentro de una comunidad en una determinada condición (Helbling y col. 2012). Los estudios transcriptómicos (RT-qPCR) permiten la cuantificación de la expresión de los genes involucrados en los distintos pasos de la cadena trófica vinculada con el catabolismo de los PAH y estudiar la regulación metabólica frente a distintas variables bióticas y abióticas.

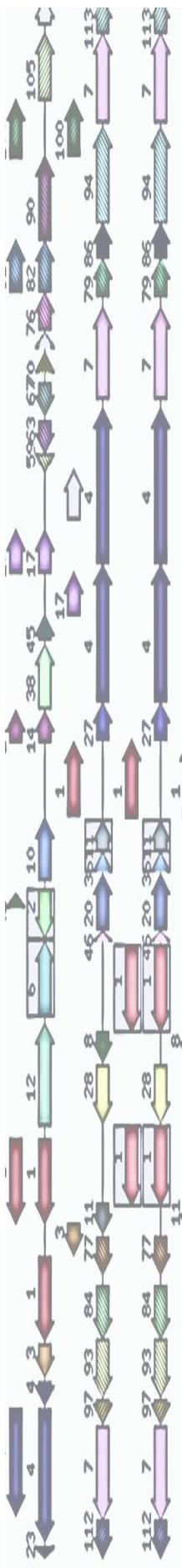
El desarrollo de la metaproteómica ha resultado técnicamente complejo, principalmente porque los métodos de extracción de proteínas a partir de muestras ambientales resultan difíciles y han sido escasamente desarrollados, y porque no hay información suficiente en las bases de datos de secuencias para permitir la identificación de proteínas a través de espectrometría de masa (Bastida y col., 2014). Los consorcios definidos, donde es posible contar con el genoma completo de cada una de las poblaciones podrían resultar modelos de estudio adecuados para desafiar los alcances de la proteómica para revelar las enzimas claves en la degradación de PAH, los microorganismos que la producen y como alteran estos sus metabolismos en respuesta a la presencia de otros organismos o frente a cambios en las condiciones ambientales.

Estos enfoques "ómicos" integradores emergentes, como (meta) genómica, (meta) transcriptómica y (meta) proteómica, abren nuevas oportunidades para descifrar los mecanismos moleculares de la degradación de los PAH, tanto en especies individuales como a nivel de la comunidad (El Amrani y col., 2015).

El análisis de los datos obtenidos a través de las estrategias ómicas mediante la aplicación de métodos computacionales permite integrar las diferentes vías metabólicas y construir un marco general para la interpretación de la funcionalidad de la comunidad microbiana (Röling y col., 2010). Este conocimiento puede conducirnos a la optimización de las estrategias de biorremediación.

## I.7 CON

En nuestro laboratorio se obtuvo un consorcio bacteriano degradador de fenantreno de un suelo crónicamente contaminado con hidrocarburos al que se denominó CON (Festa y col., 2013). Mediante pirosecuenciación de fragmentos del gen 16S rRNA del DNA total de CON se pudo revelar que la composición bacteriana del consorcio estaba constituida por 7 órdenes bacterianos. De CON se aislaron e identificaron cinco cepas bacterianas diferentes, pero solo una mostró la capacidad de degradar PAH, a pesar de que varios aislados pertenecen a géneros de bacterias degradadoras de fenantreno. Durante el estudio de cinética de degradación de fenantreno, se observó que el consorcio no logró reducir completamente el hidrocarburo suministrado durante los primeros siete días de incubación y produjo la acumulación de metabolitos intermedios. El estudio de interacciones fisiológicas relacionadas con la degradación de fenantreno entre las cepas aisladas del consorcio demostró que la degradación incompleta de fenantreno por CON podría deberse a la existencia de interacciones negativas en la compleja diversidad del consorcio (Festa y col., 2013). Este trabajo de tesis se desarrolla sobre la base de esos estudios.



# CAPÍTULO II

## ***Objetivos e Hipótesis***

## II. Objetivos e hipótesis

### II.1 Objetivos Generales

Contribuir al desarrollo de estrategias biotecnológicas que permitan optimizar los procesos de biorremediación de suelos crónicamente contaminados con hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH).

Producir un aporte a los conocimientos relacionados con la ecología microbiana de consorcios bacterianos degradadores de PAH y las rutas metabólicas cooperativas presentes en ellos.

### II.2 Objetivos Específicos

- Obtener y diseñar consorcios bacterianos que muestren una alta eficiencia de degradación de PAH
- Abordar, a través del uso de herramientas genómicas y proteómicas, el estudio del rol que cumple cada población bacteriana presente en los consorcios durante la degradación de PAH mediante la búsqueda de enzimas vinculadas a la degradación
- Incursionar en la aplicación de estrategias transcriptómicas para evaluar la expresión de genes catabólicos y la respuesta funcional frente a la degradación de fenantreno en medio líquido de las cepas que conforman los consorcios más eficientes.

### II.3 Hipótesis

1. La inoculación de un consorcio natural con una cepa con alta eficiencia de degradación de PAH resulta un modelo adecuado para estudiar la capacidad de la cepa de establecerse y participar en el flujo del carbono, incrementando las capacidades metabólicas del consorcio.
2. Los consorcios sintéticos diseñados a partir de poblaciones genética y fisiológicamente caracterizadas constituyen una oportunidad única para dilucidar algunos de los principios generales que determinan las propiedades funcionales de una comunidad en cuanto a la degradación de PAH
3. La aplicación de estrategias génomicas, transcriptómicas y proteómicas al estudio de la dinámica funcional de consorcios bacterianos degradadores de PAH proporcionará conocimientos sobre su potencial degradador y sobre la relación entre diversidad genética y funcional de los mismos y nos permitirá optimizar las condiciones del

diseño de consorcios degradadores de PAH para ser utilizados como inoculantes en suelos o sedimentos contaminados

4. Los consorcios sintéticos diseñados a partir de microorganismos completamente caracterizados y del conocimiento de las interacciones entre los mismos, limitarían al mínimo los factores de influencia sobre su funcionamiento, lo que facilitaría su manipulación para su utilización en procesos biotecnológicos.



## CAPÍTULO III

# *Materiales y Métodos*

### **III. Materiales y métodos**

#### **III.1 Materiales**

##### **III.1.1 Consorcio bacteriano**

El consorcio microbiano degradador de fenantreno (CON) se obtuvo mediante técnicas de cultivos batch en medio mineral líquido (MML) con fenantreno, a partir de un suelo crónicamente contaminado del barrio Mosconi (Buenos Aires, Argentina) ubicado en la zona de influencia del polo petroquímico Ensenada (Festa y col., 2013). El consorcio obtenido se conservó fraccionado a -80°C.

##### **III.1.2 Cepas aisladas**

###### **III.1.2.1 Cepa utilizada para la inoculación de CON**

La cepa *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA (DQ400860) fue aislada a partir de microcosmos de suelo de la ciudad de La Plata, contaminados artificialmente con 2 g/Kg de fenantreno (Coppotelli y col., 2008) e incubados a temperatura ambiente ( $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ). Esta cepa ampliamente caracterizada en nuestro laboratorio, fue seleccionada de acuerdo a su capacidad para degradar un amplio rango de PAH (fenantreno, dibenzotifeno y antraceno), e identificada mediante la secuenciación del gen 16s ribosomal como *Sphingomonas paucimobilis* (Coppotelli y col., 2010). La misma fue crecida en caldo R3 a 28°C y en agitación a 150rpm. Alícuotas de 1 ml fueron almacenadas con glicerol al 20% (v/v) a -80°C para su preservación (Coppotelli y col., 2008).

###### **III.1.2.2 Cepas aisladas del consorcio**

Las cepas aisladas de CON a partir de las placas de R2A del recuento de bacterias heterótrofas cultivables identificadas por secuenciación del gen 16S rRNA como *Sphingobium* sp., (AM) ( $\alpha$ -Proteobacteria), *Pseudomonas* sp. (Bc-h y T) y *Klebsiella aerogenes* (B) ( $\delta$  -Proteobacteria) (Festa y col., 2013). Estas bacterias se conservaron en glicerol al 40% a -80°C, y al momento de ser utilizadas se crecen en R3 líquido 24 horas.

### III.1.3 *Medios de cultivo*

Todos los medios y soluciones se esterilizaron en un autoclave a 121°C y 1 atmósfera extra de presión durante 20 minutos. La composición de los medios de cultivo utilizados en este trabajo se expresa en gramos por 1000 ml de agua destilada. El pH de los medios se ajustó por agregado de NaOH o HCl al 10% según corresponda.

Caldo R2 (Reasoner y Geldreich 1985)

0,5 g Extracto de levadura

0,5 g Proteasa peptona

0,5 g Ácido casamino

0,5 g Glucosa

0,5 g Almidón

0,3 g Ácido Pirúvico

0,3 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

0,05 g MgSO<sub>4</sub>

El pH se ajustó a 7,2

Agar R2 (Reasoner y Geldreich 1985)

Se agregan 15 g/L de agar (Difco) al medio de cultivo caldo R2.

Caldo R3 (Reasoner y Geldreich 1985)

1 g Extracto de levadura

1 g Proteasa peptona

1 g Ácido casamino

1 g Glucosa

1 g Almidón

0,5 g Piruvato de sodio

0,6 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

0,1 g MgSO<sub>4</sub>

El pH se ajustó a 7,2

Agar R3 (Reasoner y Geldreich 1985)

Se agregan 15 g/L de agar (Difco) al medio de cultivo caldo R3.

Medio mineral líquido (MML) (Vecchioli y col., 1990)

5 g NaCl

1 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

1 g (NH<sub>4</sub>)H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

1 g (NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

0,2 g MgSO<sub>4</sub>

3 g KNO<sub>3</sub>

El pH se ajustó a 7,2

MML con fenantreno: El medio fue preparado agregando fenantreno (Carlo Erba, Milano, Italy, > 99,5% pureza) (2000 mg/L ó 200 mg/L) luego de su esterilización utilizando lámpara de luz UV durante 30 minutos.

Agar Mueller Hinton

2,0 g Extracto de carne

17,5 g Hidrolizado ácido de caseína

1,5 g Almidón

17 g Agar

Caldo EMA (Vincent, 1970)

10 g Manitol

0,5 g Extracto de levadura

0,5 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

0,2 g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O

0,1 g NaCl

1 gota de una solución 10% FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O

1 gota de una solución 10% SO<sub>4</sub>Mn

5 ml Rojo Congo

Se agregan 15 g/L de agar (Difco) al medio de cultivo caldo EMA.

Medio BAz Semisólido libre de nitrógeno (Estrada-De Los Santos y col. 2001)

0,2 g Ácido azelaico

0,4 g K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

0,4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

0,2 g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O

0,02 g CaCl<sub>2</sub>

0,002 g Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O

0,01 g FeCl<sub>3</sub>

0,075 g Azul de Bromotimol

2,3 g Agar

Preparado en viales de 20 ml de capacidad. El pH se ajustó a 5,2.

LGI (Stephan y col., 1991)

5,0 g Glucosa

0,6 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

0,2 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

2,6 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

0,2 g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O

0,2 g Ácido cítrico

0,01 g FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O

0,02 g CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O

0,002 g NaMoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O

El pH se ajustó a 6,0 por el agregado de KOH 0,1 N ó HCl 0,1 N.

BSCA (Henry, D., et. al. 1997)

10,0 g Tripteína

1,5 g Extracto de levadura

10,0 g Lactosa

10,0 g Sacarosa

5,0 g Cloruro de sodio

0,008 g Rojo de Fenol

0,0008 g Cristal Violeta

0,05 g Ampicilina

0,05 g Polimixina

0,04 g Gentamicina

15,0 g Agar

El pH se ajustó a 7,2 a 25°C.

### **III.1.4 Medios de cultivo para pruebas bioquímicas**

Triple azúcar hierro (TSI)

Composición en g/L de agua destilada

15,0 g Peptona de caseína

5,0 g Peptona de carne

3,0 g Extracto de levadura

5,0 g NaCl

10,0 g Lactosa  
10,0 g Sacarosa  
1,0 g Glucosa  
0,3 g Citrato férrico y amonio  
0,3 g Tiosulfato de sodio  
0,024 g Rojo fenol  
12,0 g Agar  
El pH se ajustó a 7,4

Caldo Nitrato  
Composición en g/L de agua destilada  
3,0 g Extracto de carne  
5,0 g Peptona  
1,0 g NO<sub>3</sub>K

Caldo nutritivo (Presencia de la enzima catalasa)  
5,0 g Peptona de carne  
3,0 g Extracto de carne  
Gotas de agua oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)  
El pH se ajustó a 7,0 ± 0,2

Caldo Triptona (Indol)  
Composición en g/L  
20,0 g Triptona  
5,0 g Peptona  
3,0 g Extracto de carne  
2-3 gotas de reactivo Kovacs  
El pH se ajustó a 7,1 ± 0,2

### **III.1.5 Reactivos**

Reactivos para la coloración de Gram  
Colorantes: Cristal violeta (Solución Britania) y Safranina (Solución Britania).  
Soluciones diluidas: Las soluciones de colorantes de diluyeron 1 /10 en agua destilada.  
Lugol: 10 g de Yodo y 20 g de ioduro de potasio (IK) en 1 litro de agua destilada.  
Decolorante: etanol 70%, acetona 30%.

Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos (PAH)

Acenaftileno

Antraceno

Benzo[*a*]antraceno

Criseno

Dibenzo[*a,h*]antraceno

Dibenzotiofeno

Fenantreno

Fluoranteno

Fluoreno

Pireno

Intermediarios de rutas de degradación de fenantreno:

Ácido 1-hidroxi-2-naftoico (AHN)

Ácido salicílico (AS)

Ácido ftálico

Mezcla de hidrocarburos policíclicos aromáticos en pentano

La mezcla contiene 0,005 g de fenantreno (Carlo Erba, Milano, Italy, >99.5% pureza), 0,005 g de fluoreno (Carlo Erba, Milano, Italy, >99.5% pureza), 0,005 g de antraceno (Carlo Erba, Milano, Italy, >99.5% pureza) y 0,005 g de dibenzotiofeno (Carlo Erba, Milano, Italy, >99.5% pureza) cada 13 ml de solvente (pentano).

Antibiótico:

Alficitin Colistina 100 mg (Argentia, Industria Argentina)

Solución fisiológica (SF)

0,85 % p/v

8,5 g/L NaCl

Kits utilizados para la extracción y purificación de DNA

QIAGEN genomic tip 20G Cat Nº 10223

QIAGEN Kit de purification Cat Nº 28104

**III.1.6 Buffers y soluciones****III.1.6.1 Buffers y soluciones para PCR**

Buffer TAE 40X

Composición en 0,5 L

96,8 g Tris

22,85 ml Acético Glacial

7,445 g EDTA

500 ml Agua destilada

Gel de Agarosa

0,96 g Agarosa

80 ml Buffer TAE 1X

**III.1.6.2 Buffers y soluciones para DGGE**

Buffer TAE 40X

Solución de acrilamida –bisacrilamida 40%

Composición en 1 L

389,30 g Acrilamida

10,70 g Bisacrilamda

Solución desnaturizante 0%

Composición en 1 L

25 ml de TAE pH=7,4; 1X

150 ml de solución acril-bisacrilamida 40%

825 ml de agua destilada

Solución desnaturizante 80%

Composición en 1 L

25 ml TAE pH=7,4; 1X

150 ml Solución de acril-bisacrilamida 40 %

338 g Urea

320 ml Formamida

505 ml Agua destilada

**III.1.6.3 Buffers y soluciones para la extracción de DNA para secuenciación por técnicas de nueva generación**

Buffer Tris-EDTA-Sucrosa (20%)

10 mM Tris

1 mM EDTA

20% p/v Sucrosa

El pH se ajustó a 8.

Buffer de extracción

100 mM Tris-HCl

100 mM EDTA

100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

1,5 M NaCl

1% p/v Dodecil Sulfato de Sodio (SDS)

Reactivos

RNasa 1 mg/ml

Proteinasa K 1 mg/ml

Sarcosyl 5 % p/v

Fenol/Cloroformo/Isoamil Alcohol (50/49/1)

AcNH<sub>4</sub> 7M

Etanol 96%

**III.1.7 Reactivos para PCR en tiempo real**

Kits utilizados para la extracción y purificación de RNA

RNeasy Protect Bacteria Mini Kit (Qiagen)

Reactivos y buffers utilizados para la RT-qPCR

β-Mercaptoetanol

Lisozima 20 mg/ml en H<sub>2</sub>O DEPC

Cat. No. 04 913 850 001. FastStart Universal SYBR Green Master (Rox), Roche, Germany.

Buffer TE

10mM TrisHCl

10mM EDTA pH=8

### III.1.8 Buffers y soluciones para proteómica

#### Isoelectroenfoque

Buffer de solubilización

Para un volumen final de 25 ml

10,25 g Urea (7M)

3,8 g Tiourea (2M)

1% (p/v) Amberlite

0,25 g Ditiotreitol (DTT) (65mM)

500 µl Tritonx100 2% (v/v)

Buffer de rehidratación

A 0,5 ml de muestra en buffer de solubilización se le agregan:

1,04% (v/v) Pharmalite pH 3-10 (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden)

0,01% (p/v) Azul de Bromofenol

0,52% (v/v) Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF)

1,2% (p/v) DTT 20% (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden)

0,52% (v/v) IPG Buffer con agente reductor (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden)

Buffer de equilibrio pH=8,8

Para un volumen final de 50 ml

2,5 ml Tris 50 mM

18,0 g Urea 6 M

15 ml Glicerol 30 % (v/v)

10 ml SDS 2%

Buffer Tris- Glicina-SDS pH=8,3

Composición en g/L en agua bidestilada

15,1 g Tris (25mM)

94 g Glicina (250mM)

50 ml de solución SDS 10 %

**SDS-PAGE**

Solución de resolución 10%

1,67 ml Acrilamida-bisacrilamida

1,875 ml Tris-HCl pH 8,8

1,38 ml Agua bidestilada

50 µl Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) 10%

2,7 µl N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina (Temed)

27 µl Persulfato de Amonio (PAS) (10%)

Solución de concentración 4%

325 µl Acrilamida-bisacrilamida

312,5 µl Tris-HCl pH 8,8

1875 µl Agua bidestilada

25 µl SDS 10%

2,5 µl Temed 12,5 µl PAS (10%)

Buffer de carga (2x) pH=6,8

1 ml Tris-HCl 4 ml SDS 10%

2 ml Glicerol (al 20%)

0,4 ml EDTA (0,1M)

2,6 ml Agua bidestilada

0,08 g Azul de bromofenol

Buffer de corrida Tris- Glicina-SDS 5x pH=8,3

Composición en g/L en agua bidestilada

15,14 g Tris (125 mM)

72,06 g Glicina (965mM)

5 g de solución SDS 0,5 %

**Segunda Dimensión (2-DE)**

Gel resolución

3,1 ml Agua bidestilada

4,7 ml Acrilamida-bisacrilamida (39 – 0,8 %)

2,5 ml Tris-HCl 1,5M pH=8,8

100 µl SDS 10%

100 µl PAS 10%

10 µl Temed

0.5 ml n-butanol

Tinción coomasie coloidal

Solución fijadora

30% Etanol

2% Ácido fosfórico (N.B. De stock de 85%, ie 2,35 ml/100)

Solución de tinción

18% (v/v) MeOH

17 % (w/v) sulfato de amonio

2% (v/v) ácido fosfórico

0,5 g/L Coomassie Brilliant Blue G-250

Kits utilizados para la determinación de la concentración de proteínas

2-DE Quant (GE Healthcare Bio-sciences, USA).

Reactivos colorantes para ensayos de cuantificación de proteínas por el método de Bradford (Bio Rad Life Science, USA).

### **III.1.9 Programas utilizados para el análisis de genomas**

RAST: Rapid Annotation using Subsystem Technology es un servicio totalmente automatizado para anotar genomas bacterianos y arcaicos completos o casi completos. Proporciona anotaciones genéticas de alta calidad para estos genomas en todo el árbol filogenético. Este sistema utiliza un programa de predicción que mejora la identificación de genes microbianos (Glimmer), realizando la búsqueda y ubicación de genes mediante patrones estadísticos basados en la información intrínseca de DNA (Aziz y col., 2008, Hemmerich y col., 2010).

KEGG: es un recurso de base de datos para comprender las funciones y utilidades de alto nivel del sistema biológico, como la célula, el organismo y el ecosistema, a partir de la información a nivel molecular, especialmente los conjuntos de datos moleculares a gran escala generados por la secuenciación del genoma y otras tecnologías experimentales de alto rendimiento (Kanehisa y col., 2014).

EC-PDB: Enzyme Structures Database es una base de datos que contiene las estructuras enzimáticas conocidas que se han depositado en el Protein Data Bank (PDB). Las estructuras enzimáticas se clasifican por su número E.C. (Laskowski y col., 1997).

MetaCyc: Metabolic Pathway Database es una base de datos curada de vías metabólicas experimentalmente elucidadas de todos los dominios de la vida. MetaCyc contiene 2491 vías de 2816 organismos diferentes, además de vías implicadas en el metabolismo tanto primario como secundario, así como metabolitos, reacciones, enzimas y genes asociados. El objetivo de MetaCyc es catalogar el universo del metabolismo almacenando una muestra representativa de cada vía experimentalmente elucidada (Caspi y col., 2013).

AmiGO: El proyecto Gene Ontology proporciona vocabularios controlados de términos definidos que representan las propiedades del producto génico. Estos cubren tres dominios: el componente celular, la función molecular, y el proceso biológico. La ontología GO está estructurada como un grafo acíclico dirigido donde cada término tiene relaciones definidas con uno o más términos en el mismo dominio y a veces con otros dominios. El vocabulario GO está diseñado para ser agnóstico de especies, e incluye términos aplicables a procariotas y eucariotas, y organismos únicos y multicelulares (Carbon y col., 2009).

Artemis: es un explorador genómico libre, visualizador de secuencias de DNA y una herramienta de anotación que permite la visualización de las características de secuencias y los resultados de los análisis dentro del contexto de la secuencia, y también su traducción de sus seis marcos de lectura. Está escrito en Java, lee secuencias de formato EMBL o GENBANK y tablas de características, y puede trabajar en secuencias de cualquier tamaño (Rutherford y col., 2000).

RHObase: una abreviatura de la base de datos de oxígeno de Anillo Hidroxilante, es una base de datos basada en web, curada manualmente y de búsqueda que proporciona información completa sobre las oxigenas hidroxilantes de anillo aromático de tipo Rieske RHOs en una sola plataforma, junto con herramientas analíticas para realizar búsqueda blast contra la base de datos para la predicción de sustrato putativo para la secuencia o secuencias de oxigenas o para buscar posibles candidatas RHO capaces de transformar un compuesto deseado (Chakraborty y col., 2014).

AromaDeg: es una base de datos de enzimas degradadoras de compuestos aromáticos manualmente curada por el grupo de investigación del Profesor Dietmar Pieper. La base de datos se compone de entradas fasta con la secuencia de aminoácidos de las enzimas. Los

encabezados de fasta incluyen el nombre del gen, el nombre del organismo y un código que describe, si está presente, la evidencia de la especificidad del sustrato.

La base de datos está disponible como una colección única de secuencias no alineadas en formato fasta, o como 10 archivos de alineación múltiples, que comprenden conjuntos de enzimas funcionalmente relacionadas, dentro de las dos grandes categorías: oxigenasas de hierro no hemo de Rieske y extradiol dioxigenasas (Duarte y col., 2014).

## **III.2 Metodología**

### **III.2.1 Aislamiento y caracterización de los microorganismos presentes en el consorcio**

#### **III.2.1.1 Aislamientos de nuevos géneros bacterianos a partir de CON**

Para el aislamiento de la cepa *Inquilinus limosus*, perteneciente a CON, se preparó un medio Agar Mueller Hinton suplementado con una concentración de 6 mg/L del antibiótico colistina, que se agregó una vez atemperado el medio fundido. Luego se sembró por duplicado 100µl de una dilución 1/100 de CON y se esparció sobre la superficie del medio con una espátula de Drigalsky. Se incubó durante 10 días a ± 22°C. Luego de este tiempo de incubación se pudo observar la presencia de un solo tipo de colonia de igual aspecto y morfología. Estas bacterias se conservaron en glicerol al 40% a -80°C, y al momento de ser utilizadas se crecen en R3 líquido 24 horas.

Para el aislamiento de la cepa *Burkholderia* sp., perteneciente a CON, se sembró sobre la superficie de un medio EMA una dilución 1/10 de CON y se esparció con la ayuda de una espátula de Drigalsky. Se incubó durante 10 días a ± 22°C. Luego de la incubación se pudo observar la presencia de un solo tipo de colonia de igual aspecto y morfología. Estas bacterias se conservaron en glicerol al 40% a -80°C, y al momento de ser utilizadas se crecen en R3 líquido 24 horas.

#### **III.2.1.2 Pruebas bioquímicas**

A partir de cultivos de 24 horas en R3 líquido y R3A en agar inclinado de las nuevas cepas aisladas de CON, se realizaron una serie de pruebas bioquímicas tales como: movilidad (observación de una gota de un cultivo de 24 horas entre porta y cubre), coloración de Gram, enzima citocromo oxidasa, reducción de nitrato y nitrito, actividad catalasa, indol y TSI. La pureza de los cultivos fue controlada microscópica y macroscópicamente.

### III.2.1.3 Identificación genotípica de las cepas aisladas

#### Extracción de DNA

A partir de los cultivos puros de las cepas a las 24 horas en caldo R3 se llevó a cabo el método del hervor (Sambrook y col., 1989) para la extracción del DNA. Se centrifugó 1 ml a 13.000 rpm durante 5 minutos y se resuspendió el pellet en 0,5 ml de agua destilada estéril. Esta suspensión de células se llevó a cabo en baño María 100°C durante 10 minutos. Por último se centrifugó nuevamente a 13.000 rpm por 5 minutos y se recogió el sobrenadante. Luego se conservó a -20°C hasta su utilización.

#### III.2.1.4 PCR del gen 16S rRNA completo

Para obtener el producto amplificado del gen 16S rRNA completo de las nuevas cepas aisladas (I y Bk) se realizó una amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los primers universales 27-F (5'-AGAGTTGATCCTGGCTCAG-3') (Edwards y col., 1989) y 1492-R (5'-TACGGCTACCTTACGACTT-3') (Weisburg y col., 1991). La reacción de PCR se realizó en 50 µl de volumen de reacción con 200 µM de cada dNTP, 200 mM de BSA, 5 µM de cada primer, 1 U de GoTaq DNA Polymerase (Promega, Madison, WI) y su Buffer de reacción 1x. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Mastercycler® Eppendorf (Eppendorf, Hamburg, Germany) y el programa consistió en un paso de desnaturización inicial a 95°C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos a 95°C por un minuto, 60°C por 30 segundos, 72°C por 35 segundos y un paso de extensión final a 72°C por 5 minutos. Los productos de amplificación se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa 1,2 % con buffer de corrida TAE, a 100 V durante 30 minutos. A continuación se tiñó el gel con Bromuro de Etidio (10 mg/ml) y los productos de amplificación se visualizaron en un transiluminador UV (National Labnet Company, Modelo TM-26).

Los amplicones se purificaron usando un kit de purificación (Qiagen) y fueron secuenciados por el servicio de secuenciación Macrogen Inc. por el método de Sanger (Sanger y col., 1977). Las secuencias de nucleótidos fueron comparadas con las que se encontraron en el banco de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank utilizando el algoritmo BLAST® (Basic Local programa BLAST alignment Search Tool) disponible en la página web del NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Las secuencias obtenidas fueron depositadas en el NCBI con los siguientes números de acceso: *Inquilinus limosus* (I): LN995702.1 y *Burkholderia* sp. (Bk): GQ478264.1.

### **III.2.2 Preparación de los cultivos usados como inóculo**

#### **III.2.2.1 Reactivación del consorcio**

Una alícuota del consorcio bacteriano, obtenido a partir del suelo del barrio Mosconi (coordenadas S34°52'31" W57°55'10"), situado en la ciudad de Ensenada, perteneciente al polo petroquímico del partido de La Plata, Argentina (Festa y col., 2013) conservado en glicerol 40% a -80°C (solución stock) (Ruberto y col., 2009) fue reactivado en MML suplementado con 200 mg/L de fenantreno como única fuente de carbono y energía, y se incubó durante 7 días a 28°C con agitación, se filtró posteriormente para eliminar los cristales de fenantreno, se centrifugó, se lavó con agua destilada y se resuspendió en 0,85% de solución fisiológica (SF).

Al consorcio luego de esta incubación se lo llamo "CON".

#### **III.2.2.2 Preparación de los inóculos**

Para algunos de los ensayos se inoculó el consorcio (CON) con la cepa *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA, y se llamó a este consorcio inoculado CON-I. Para ello una alícuota de la cepa criopreservada se creció toda la noche en R3 líquido a 28°C con agitación. A continuación, se lavó tres veces con SF 0,85 % p/v (para eliminar fuentes de carbono). Se midió la densidad óptica, y sabiendo que 2.23 unidades de DO580 equivalen a  $1 \times 10^{10}$  ufc/ml, se calculó el volumen necesario para obtener la concentración de  $1 \times 10^8$  ufc/ml en cada experimento.

#### **III.2.2.3 Preparación de los consorcios sintéticos a partir de las cepas aisladas de CON**

Para obtener los consorcios sintéticos (CS) de interés, se cultivaron las cepas aisladas de CON (*Sphingobium* sp. (AM), *Enterobacter* sp. (B), *Pseudomonas* sp. (T y Bc-h), *Inquilinus limosus* (I), *Burkholderia* sp. (Bk) y la cepa exógena a CON, *Sphingomonas paucimobilis* (20006FA), taxonómica y filogenética relacionada con la cepa AM, individualmente en medio R2 líquido durante 24 horas a 28°C. Luego de ese tiempo se lavaron con SF 0,85 % p/v (para eliminar cualquier fuente de carbono remanente) y se inocularon conjuntamente combinándose según el CS que se quiso diseñar. La cantidad inoculada se determinó por medida de la densidad óptica. Se inocularon 100 µl de un cultivo con 0,2 de absorbancia a 580 nm. Los consorcios sintéticos se incubaron en MML con 200 mg/L de fenantreno como única fuente de carbono y energía y se monitorearon durante 15 días a 28 °C y 250 rpm.

### **III.2.3 Cinética de degradación de fenantreno**

#### **III.2.3.1 Determinación de la concentración de fenantreno y ácido 1-hidroxi-2-naftoico**

La degradación de fenantreno (Carlo Erba, Milano, Italy) y la producción de ácido 1-hidroxi-2-naftoico (AHN) por parte de las cepas aisladas, el consorcio CON-I y los consorcios sintéticos CS se determinó en MML con 200 mg/L de fenantreno como única fuente de carbono y energía. Se eligió esta concentración porque permitía el crecimiento de las cepas, y al mismo tiempo el método utilizado para medir la eliminación del PAH mostró ser más sensible en este rango de concentraciones de PAH. Para la extracción química, el volumen total de los cultivos se mezcló tres veces con acetato de etilo (1:2 acetato de etilo/cultivo), se agitó durante 30 minutos a 150 rpm y se conservó la fase orgánica. La misma fue guardada en frascos color caramelo a -20°C. Posteriormente para la extracción del AHN se llevó a cabo, sobre la fase acuosa remanente, una acidificación a pH=2,5 con HCl concentrado y se realizaron otra serie de extracciones con el mismo solvente utilizado en las extracciones neutras. El análisis se realizó por triplicado y en cada tiempo de muestreo se sacrificaron los frascos para la extracción química. Se utilizaron triplicados de frascos sin inóculo como control para evaluar la pérdida abiotíca. La concentración de fenantreno y la generación de AHN se determinó a los 0, 4, 7 y 15 días de incubación para todos los cultivos y a tiempos cortos (6 horas, 1, 2 y 3 días) para los CS y las cepas AM y 20006FA. El análisis de los extractos se llevó a cabo mediante Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) en fase reversa utilizando un cromatógrafo Waters® España, con una columna Symmetry Waters® España C18 (15 cm, 4.6 mm i.d., tamaño de perla 5 mm, tamaño de poro 100 Å) con un gradiente lineal metanol: ácido fosfórico (20:80 hasta los 15 minutos de corrida, 5:95 durante 2 minutos y posteriormente 20:80 hasta llegar a los 19 minutos de corrida) y un flujo de 1ml/min (Coppotelli y col. 2010). Los espectros de absorción al UV (250,9 nm) se obtuvieron utilizando un detector 2996 photodiode array (Waters®, España) y se analizaron con el software Empower.

#### **III.2.4 Determinación de la concentración de diferentes PAH**

La degradación de diferentes PAH (Antraceno, Dibenzotifeno, Fluoreno y Pireno) por parte de la cepa 20006FA y los consorcios CON y CON-I se determinó en MML con 200 mg/L de cada PAH como única fuente de carbono y energía. El ensayo se realizó por triplicado. Para determinar la concentración de los PAH remanente se realizó la extracción secuencial descripta en el inciso III.2.3.1

### **III.2.5 Cinética de degradación de ácido 1-hidroxi-2-naftoico**

#### **III.2.5.1 Preparación de los cultivos**

Se adicionaron a frascos de 55 ml de capacidad una solución 0,75 g/L de AHN (Sigma-Aldrich, USA) en acetato de etilo, de modo de lograr una concentración final en cada frasco de 0,05 g/L, y se dejó evaporar el solvente bajo campana. A continuación, se agregan 10 ml de MML suplementado con 0,05 g/L de extracto de levadura. A los frascos de un ensayo se agregaron 1 ml del consorcio CON y se inocularon con  $1 \times 10^6$  ufc/ml de la cepa *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA mientras que los frascos para el segundo ensayo no se inocularon con la cepa. Se utilizaron frascos sin inóculo como control abiótico. Los cultivos se incubaron en agitación constante a 150 rpm y a 28°C, durante 15 días. Este ensayo fue realizado por triplicado.

#### **III.2.5.2 Determinación de la concentración de ácido 1-hidroxi-2-naftoico**

Para determinar la concentración de AHN remanente se realizó la extracción ácida secuencial descripta en el inciso III.2.3.1. El análisis se llevó a cabo mediante una Cromatografía Líquida de Alta Presión/Resolución (HPLC) en fase reversa con un cromatógrafo Waters®, en una corrida isocrática utilizando metanol y ácido fosfórico (9:1).

### **III.2.6 Estudios cualitativos de degradación de PAH e intermediarios metabólicos**

#### **III.2.6.1 Estudio cualitativo de crecimiento y degradación de PAH en los cultivos**

Se prepararon frascos de 55 ml de capacidad con 10 ml de MML suplementado con 1 g/L de cada PAH como única fuente de carbono y energía y se inocularon los cultivos de CON, CON-I, CS y cepas aisladas el día 0 de tratamiento. Los cultivos se incubaron a 28°C y 150 rpm, y se observó aparición de turbidez y/o coloración al cabo de 15 días de incubación.

#### **III.2.6.2 Estudio cualitativo de crecimiento y degradación de intermediarios de la ruta de degradación de fenantreno en cultivos de las cepas aisladas y CS**

Se prepararon frascos de 55 ml de capacidad con 10 ml de MML suplementado con 0,1 g/L y 0,05 g/L según el ensayo, de algunos intermediarios de las rutas de degradación de PAH (AHN, ácido salicílico o ácido ftálico) como única fuente de carbono y energía y se

inocularon el día 0 de tratamiento. Los cultivos se incubaron a 28°C y 150 rpm y se observó aparición de turbidez y/o coloración al cabo de 15 días de incubación.

### ***III.2.6.3 Determinación cualitativa de la degradación de los intermediarios de la vía baja de degradación de fenantreno: catecol y 2,3-dihidroxibifenilo***

Se crecieron estrías de las cepas AM, Bk, I, B, Bc-h y T aisladas del consorcio en medio R3A diluido 1/10 y se incubaron a 28°C entre 2 y 5 días. Se realizó la inducción de las cepas con cristales de fenol durante 6 horas.

Se realizaron ensayos para la determinación cualitativa de la actividad de enzimas involucradas en la degradación de 1) catecol y 2) 2,3-dihidroxibifenilo.

En el primer ensayo se rociaron las estrías del cultivo con una solución de catecol como sustrato (Nelson y col., 1987). La enzima catecol 2,3-dioxigenasa es la responsable de romper el anillo aromático del catecol generando 2-hidroximucónico semialdehído, un compuesto ocre que puede ser sencillamente detectado a simple vista en la estría luego de 30 minutos de incubación (Nelson y col., 1987).

En el segundo ensayo se utilizó una solución de 20 mg/ml de 2,3-dihidroxibifenilo en acetona como sustrato. Este compuesto es clivado por la enzima 2,3-dihidroxibifenilo 1,2-dioxigenasa, que forma un compuesto meta clivado también de coloración ocre, luego de 30 minutos de incubación.

### ***III.2.7 Estudio de la dinámica de las poblaciones bacterianas durante la degradación de fenantreno y ácido 1-hidroxi-2-naftoico***

#### ***III.2.7.1 Recuento de bacterias heterótrofas totales***

Las bacterias heterótrofas cultivables se determinaron tomando 100 µl de cada cultivo, a los diferentes tiempos de incubación y se realizaron diluciones seriadas (1/10) en SF (Reasoner y Geldreich, 1985). Luego se sembraron por duplicado 100 µl de cada dilución en la superficie del medio de cultivo R2A utilizando una espátula de Drigalsky. Se incubó durante 10 días a ± 22°C. Los resultados se expresan como UFC/ml.

**III.2.7.2 Recuento de bacterias degradadoras de PAHs mediante la técnica del número más probable (NMP)**

El NMP de bacterias degradadoras de PAH se determinó en placas de microtitulación de 96 pocillos. Se utilizó como sustrato la mezcla de PAH en pentano (Wrenn y Venosa, 1996) que se incorporó a razón de 20 µl por pocillo.

Se tomaron 100 µl de cada cultivo inoculado a los diferentes tiempos y se realizaron diluciones seriadas (1/10) en SF. Posteriormente, una vez evaporado el pentano, dejando una fina capa de PAH en el fondo de cada pocillo, se cargaron los pocillos con 180 µl de MML y con 20 µl de las diluciones de los cultivos por octuplicado.

Las placas fueron incubadas a  $\pm 22^{\circ}\text{C}$  durante 21 días. Luego del período de incubación, los pocillos positivos se observan con una coloración amarilla, naranja al marrón debido a la acumulación de los productos parciales de oxidación de los sustratos aromáticos. El resultado se expresó como el NMP de bacterias degradadoras de PAH/ml.

**III.2.7.3 Recuento diferencial para los distintos morfotipos**

Durante el ensayo de recuento de bacterias heterótrofas totales, en cada tiempo de incubación se registró el número de los distintos morfotipos de colonias encontrados.

**III.2.8 Determinación de la estructura, dinámica y diversidad de los consorcios a nivel molecular****III.2.8.1 Extracción de DNA total de CON, CON-I y CS**

A partir de un cultivo de CON, CON-I y los distintos CS en MML con 200 mg/L de fenantreno, de CON y CON-I con 50 mg/L de AHN y con 200 mg/L de antraceno, dibenzotifeno, fluoreno y pireno a los 0, 4, 7 y 15 días de incubación, se extrajo el DNA con el Kit Qiagen Genomic-tips Kit (20G) (Qiagen Inc., Chatsworth, CA, USA) según las instrucciones del fabricante. Luego el DNA se conservó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

**III.2.8.2 Determinación de los perfiles del 16S rRNA y separación mediante DGGE****III.2.8.2.a Reacción de PCR**

El DNA de las cepas y de los distintos cultivos se amplificó utilizando un set de primers para eubacteria dirigidos a una región conservada del gen 16S rRNA, primer GC-341F (5'CGCCCGCCGCCGCAGCCGGCCGCCGCCCCCTCCTACGGGAGGC AGCAG-3') y primer 907R (5'-CCGTCAATTCTTTG AGTTT) (Muyzer y col., 1998). La PCR se realizó en un volumen final de 30 µl de mezcla de reacción utilizando como molde 1 µl de muestra del DNA extraído, 1 U de GoTaq DNA Polimerasa (Promega, Madison, WI), Buffer de reacción 1x recomendado por el fabricante de la enzima, 200 mM de BSA, 0,2 mM de cada dNTPs y 5 µM de cada primer y se completa con agua destilada estéril hasta volumen final. La amplificación fue realizada en un termociclador Mastercycler® Eppendorf (Eppendorf, Hamburg, Germany). El programa de PCR consistió en 1 ciclo de 4 minutos a 94°C, 10 ciclos de 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 62°C y 1 minuto a 72°C; 25 ciclos de 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 57°C y 1 minuto a 72°C con una extensión final de 10 minutos a 72°C. Se evidencia la amplificación de cada muestra mediante electroforesis en gel de agarosa 1,2% a 90 volts por 30 minutos, utilizando TAE 1X como buffer de corrida y Bromuro de Etidio (10 mg/ml) para colorear el gel. Los productos amplificados se visualizaron en un transiluminador UV (National Labnet Company, Model TM-26).

**III.2.8.2.b Purificación del producto de PCR de las cepas aisladas**

Los productos de amplificación provenientes de cepa pura se purificaron utilizando el kit NucleoSpin ®Extract II (Macherey-Nagel, GmbH & Co. KG, Alemania) según las instrucciones del fabricante.

**III.2.8.2.c Análisis de la estructura mediante Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (PCR-DGGE)**

Las electroforesis se realizaron en una cuba DGGE-2000 System (C.B.S. Scientific Company). Los productos de PCR fueron directamente sembrados sobre geles de poliacrilamida 6% p/v. El gel contenía un gradiente lineal de 40-70% para CON y CON-I y 45-70% para los CS de desnaturizante (100% desnaturizante corresponde a la mezcla de urea 7 M y formamida 40% v/v). La electroforesis se realizó en buffer de corrida TAE 1X a una temperatura de 60°C, aplicando un voltaje constante de 100 volts durante 16 horas.

Para evidenciar los productos obtenidos, el gel se tiñó con SybrGold® (1X) (Invitrogen) durante 30 minutos. El gel fue documentado por GelDoc EQ (Bio-Rad, Hercules, CA).

### **III.2.8.3 Estudio de la composición bacteriana de CON-I mediante 454-Pirosecuenciación**

Todo el proceso de pirosecuenciación, basado en protocolos establecidos y validados, se llevó a cabo en el laboratorio de investigación molecular MrDNA (Shallowater, TX) (<http://www.mrdnalab.com/>).

Se realizó una amplificación por PCR sobre la muestra de DNA total de CON-I extraído a los 4 días de incubación para obtener un fragmento de 568 pb del gen 16S rRNA conteniendo las regiones V3 y V4. Se utilizaron primers universales para bacterias, modificados con un código de barras. Los primers utilizados fueron 341Fbac (CCTACGGGAGGCAGCAG) (Muyzer y col., 1993) y 909R (CCCCGYCAATTCTTTTRAGT) (Tamaki y col., 2011). La reacción de PCR se llevó a cabo utilizando HotStarTaq Plus Master Mix Kit (Qiagen, Valencia, CA) bajo las siguientes condiciones: 1 ciclo de 94°C por 3 minutos, seguido de 28 ciclos a 94°C por 30 segundos; 53°C por 40 segundos y 72°C por 1 minuto; una extensión final a 72°C durante 5 minutos. La muestra se secuenció utilizando los instrumentos y reactivos de Roche 454 FLX titanium siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### **III.2.8.3.a Análisis del set de datos de pirosecuenciación**

Los datos de secuenciación generados por el procesamiento de alto rendimiento se analizaron utilizando un pipeline desarrollado en el laboratorio de investigación molecular MrDNA. Se eliminaron en primer lugar los códigos de barras y los primers de las secuencias obtenidas. Posteriormente se eliminaron aquellas secuencias cortas <200 pb con bases ambiguas y las secuencias con homopolímeros mayores a 6 pb. Se eliminó el ruido de las secuencias y las quimeras utilizando un software personalizado (Dowd y col., 2008a, 2008b) y el software B2C2 Black Box Chimera Check (disponible en <http://www.researchandtesting.com/B2C2.html>). Se chequeó la alta calidad de las secuencias basándose en el criterio utilizado por RDP versión 9 (Cole y col., 2009).

Los datos de secuenciación se agruparon en Unidades Taxonómicas Operacionales (OTU) con un 3% de divergencia utilizando uClust. Los OTUs se clasificaron taxonómicamente utilizando el algoritmo BLASTn.NET (Dowd y col., 2005) contra una base de datos de alta calidad de secuencias del gen 16S rRNA derivada de GreenGenes (10-2011 version) (Edgar, 2010). Los resultados se compilaron y se validaron utilizando métodos taxonómicos basados en distancias (Dowd y col., 2008b, 2008c).

La taxonomía se definió en base a los siguientes porcentajes: >97%, especie; entre 97% y 95%, género sin clasificar; entre 95% y 90%, familia sin clasificar ; entre 90% y 85%, orden sin clasificar; entre 85% y 80%, clase sin clasificar; entre 80% y 77%, filo sin clasificar; <77%, sin clasificar.

Para el análisis estadístico de los datos, se calcularon los números de Hill. Los números de Hill se definen por el orden “q” ( $qD$ ), donde el parámetro “q” indica el peso dado a especies raras o comunes. Estos números comprenden la riqueza de especies [ $^0D$ ], el exponencial de la entropía de Shannon [ $^1D$ ] y la inversa del índice de Simpson [ $^2D$ ] (Hill, 1973).  $^0D$  es insensible a las frecuencias relativas, y por lo tanto se pondera hacia especies raras.  $^1D$  se pondera hacia especies comunes, y  $^2D$  se pondera hacia especies abundantes. La riqueza de especies ( $^0D$ ) se estimó mediante Chao1-bc, una forma corregida de Chao1 (Chao, 2004). Las curvas de rarefacción y las medidas riqueza y la diversidad se calcularon utilizando el programa EstimateS (versión 9) (Colwell, 2013). El índice de Good estima el porcentaje total de OTUs bacterianos representados en la muestra, da información sobre la cobertura del análisis. Cuando su valor se acerca a 1.0 indica que las secuencias obtenidas representan la mayoría de las secuencias bacterianas presentes en la muestra (Rungrassamee y col., 2013).

### **III.2.9 Aplicación de estrategias ómicas**

#### **III.2.9.1 Análisis genómico de las cepas aisladas**

##### **III.2.9.1.a Extracción de DNA de alto peso molecular**

Se preparó un cultivo de cada la cepa en caldo R3 y se incubó a 28°C y 150 rpm. A las 24 horas de incubación se realizó la extracción de DNA genómico con el fin de obtener fragmentos mayores a 23 kb. El protocolo utilizado fue el descripto por Entcheva y col., (2001). La calidad del DNA extraído se corroboró mediante electroforesis en gel de agarosa 0,8 % en TAE 1X a 70 v durante 90 minutos.

##### **III.2.9.1.b Ensamble y anotación de la secuenciación del genoma completo**

Se realizó la secuenciación y ensamble parcial de los genomas de las cepas aisladas de CON utilizando el método whole genome shotgun (WGS), mediante un secuenciador Illumina HiSeq1500 generando lecturas tipo paired-end (PE) 2 x 100 pares de lectura (INDEAR, Rosario, Argentina).

Los datos de la secuencia Raw Illumina fueron recortados y filtrados con el protocolo Nextera® XT Illumina. El ensamblaje de novo de estas lecturas se llevó a cabo con la plataforma A5-miseq Assembly Pipeline (v. 2.0) de Illumina (Tritt y col., 2012). Se utilizaron dos estrategias para analizar los genomas. En primer lugar, se utilizó la versión 2.0 del servidor RAST (Rapid Annotation Subsystem Technology) (Aziz y col., 2008) para predecir y anotar los genes relacionados a la degradación de PAH. Luego, se trabajó con el servidor SEED Viewer (Overbeek y col., 2005) para categorizar los genes predichos en subsistemas funcionales. La asignación funcional de los genes se realizó mediante la búsqueda en diferentes bases de datos como KEGG, MetaCyc y EC-PDB, seguida de la curación manual utilizando el explorador genómico Artemis (Rutherford y col., 2000) (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Artemis>). Para determinar cada secuencia codificante de proteínas (CDS, por la abreviatura de coding sequences en inglés) se realizó una alineación BLASTX por la base de datos NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Las secuencias de los genomas de todas las cepas se anotaron y curaron por NCBI staff y se depositaron en GenBank WGS.

### **III.2.10 Reconstrucción de la red metabólica guiada por los datos genómicos**

A partir de la ruta propuesta de degradación de fenanreno, se buscaron en la base de datos KEGG (Kanehisa y col., 2014) todas las reacciones que la componen y las enzimas que participan en cada etapa (Tabla III.1).

Paso	Mapa (KEGG)	Reacción (KEGG)	Número de EC	Código Enzima (KEGG)
S1	624	R05843	1.13.11.-	K11943, K11944
S2	624	R04151	1.3.1.49	K18257
S3	624	R05650	1.13.11.-	K11945
S4	624	R05642	5.1.2.-	none
S5	624	R05648	4.1.2.-	K11946
S6	624	R05649	1.2.1.-	K11947
S7	624	R07657	1.13.11.38	K11948
S8	624	R07713	4.1.2.34	K11949
S9	624	R05643	1.2.1.78	K18275
S10	624	R09227	1.14.12.-	K18251, K18252, K18253, K18254
S11	624	R09228	1.3.1.-	K18255
S12	624	R01634	4.1.1.69	K18256
S13	624	R01631	1.13.11.3	K00448, K00449
S14	624	R05632	1.14.13.1	K00480
S15	626	R04117	1.13.11.56	K14583
S16	626	R05137	5.99.1.4	K14584
S17	626	R05136	4.1.2.45	K14585
S18	626	R02941	1.2.1.65	K00152
S19	626	R07709	1.14.13.172	K14578, K14581, K18242, K18243
S20	350	R02656	1.13.11.4	K00450
S21	626	R00818	1.14.13.1	K00480
S22	362	R00817	1.13.11.1	K03381
S23	362	R00816	1.13.11.2	K00446, K07104

**Tabla III.1.** Pasos de la ruta de degradación de fenanreno con el código de la reacción y el código de la enzima que cataliza la reacción (KEGG).

Una vez identificadas todas las reacciones y las enzimas que formaban la ruta, se descargaron todas las secuencias de aminoácidos. En primer lugar, se utilizó la base de datos RHObase (Chakraborty y col., 2014), que contiene información específica sobre oxigenasas del tipo Rieske. La búsqueda en esta base de datos se hizo en base al código de reacción de KEGG. Sólo se encontraron secuencias para los pasos 1, 14 y 19.

La siguiente base de datos consultada fue UniProt (UniProt Consortium, 2014), ya que incluye secuencias de alto nivel de anotación. Se realizaron dos búsquedas, primero utilizando el código de KEGG y luego el número de EC. Dado que RHObase es muy específica, es posible que secuencias que correspondiesen a oxigenasas no sean aceptadas por falta de evidencia fisiológica. Es por ello que la búsqueda en UniProt incluyó todos los pasos de la ruta. Esta búsqueda se hizo en 2 etapas, primero contra las secuencias de RHObase, porque los resultados eran más confiables, y después contra

UniProt, para intentar ampliar un poco más la búsqueda. Así aparecieron candidatos para el paso 14, en el que había evidencia fisiológica pero no encontrábamos las secuencias usando sólo RHObase.

Una vez descargadas todas las secuencias, se usó la herramienta BLAST+ (Camacho y col., 2009) para compararlas contra los seis genomas del consorcio. Se estableció un umbral de 70% de identidad de secuencia y 70% de cobertura. De esta forma se encontraron genes candidatos para los pasos 4, 8, 13, 15, 16, 17, 18, 20, 21, 22 y 23. Como para los restantes pasos no se encontró ninguna secuencia que cumpla con esas condiciones, se decidió cambiar la estrategia de búsqueda.

En primer lugar, se usó la base de datos Interpro (Finn y col., 2017), que contiene información sobre dominios conservados. Esta base de datos es menos confiable porque no contiene la secuencia completa de la enzima como tienen UniProt y RHObase. Además un mismo dominio puede llegar a formar parte de enzimas con diferentes funciones. El código de KEGG y el número de EC son más confiables, pero dado que no hay información por ese lado, es necesario abrir más la búsqueda a riesgo de ser menos específicos. Se descargó la secuencia de los dominios para todos los pasos restantes y se los comparó contra los genomas, usando nuevamente BLAST+, filtrando los resultados con porcentajes de identidad y cobertura menores a 70%. De esta forma, se encontraron genes candidatos para los pasos 3, 10 y 12, además de candidatos en *Inquilinus* para el paso 23, que poseía evidencia funcional pero no se habían encontrado las enzimas *in silico*.

El siguiente paso fue utilizar la base de datos de ortólogos OrthoDB (Waterhouse y col., 2012). Estas secuencias de enzimas tienen un ancestro en común, funcional y filogenéticamente relacionadas, pero podrían catalizar distintas reacciones. Así, se recuperaron genes candidatos para los pasos 5, 11 y 19.

Para los pasos 6 y 9 se recurrió a la base de datos Pfam (Bateman y col., 2004), que posee información sobre familias de proteínas. Ambos reacciones pertenecen a la familia de las “Aldehído deshidrogenasas”, por lo que las secuencias utilizadas para la búsqueda fueron las mismas.

Finalmente, los pasos 2 y 7 no presentaban ningún candidato que cumpliese las condiciones de porcentajes de identidad y de cobertura mayores a 70%, por lo que se decidió fijar el umbral de identidad en 50%. De esta forma, se pudieron encontrar genes candidatos para el paso 2 en UniProt y para el paso 7 en InterPro.

Una vez realizadas todas las búsquedas, se reconstruyó la red metabólica usando Cytoscape (Shannon y col., 2003), variando el ancho de las uniones según el número de *hits* en cada genoma y el tipo de línea según el porcentaje de identidad.

Este análisis se realizó en base al trabajo de Bargiela y Ferrer (2017) con la colaboración del Dr. Ariel Amadio y el licenciado José Matías Irazoqui (Estación Experimental Agropecuaria Rafaela, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Santa Fe, Argentina).

### **III.2.11 Análisis transcriptómico**

#### **III.2.11.1 PCR Real Time**

##### **III.2.11.1.a Selección de los set de primers para los ensayos de RT-qPCR**

Para los ensayo de RT-qPCR se utilizaron distintos set de primers. Un set para genes de referencia (housekeeping) dirigidos a una región conservada del gen 16S rRNA de *Sphingobium* sp. Además, se utilizaron set de primers dirigidos a secuencias de genes de la vía superior e inferior de degradación de fenantreno de ese género. En la tabla III.2 se muestran todos los primers utilizados en las reacciones de RT-qPCR, el nombre del gen, la secuencia (5'→3') y las Temperaturas de hibridación (Tm).

La especificidad de los primers se verificó *in silico* mediante Artemis sobre el genoma de la cepa *Sphingobium* sp. AM. Además, también se realizó el mismo análisis para confirmar que estos primers no hibridan con los genomas de las otras cepas del consorcio.

Gen	Nombre del set de primers utilizados	Secuencia del primer (5'- 3')	Tm (°C)
<i>Sphingobium</i> housekeeping 16S rRNA	16S rRNA_ RT_F	GTTAGGCCGGCGATTTAAGTC	62
	16S rRNA_ RT_R	ACAAATCGTCCAGTGAGCC	
Catechol 2,3-dioxygenase ( <i>xylE</i> )	<i>xylE</i> _ RT_F	CGTGGATATGCCAGTTCG	60
	<i>xylE</i> _ RT_R	TACCGCTTCGGGATAGC	
Naphthalene dioxygenase ( <i>ahdA1f</i> )	<i>ahdA1f</i> _ RT_F	ACAAGGGCTTCATTTCG	55
	<i>ahdA1f</i> _ RT_R	CTCGGTGGGACTTTCC	
Aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase ( <i>ahdA1b</i> )	<i>ahdA1b</i> _ RT_F	GCCTCAAGAACGTCGC	62
	<i>ahdA1b</i> _ RT_R	ACCGACTTGATGCAGCC	
Benzoate 1,2-dioxygenase subunit alpha ( <i>ahdA1c</i> )	<i>ahdA1c</i> _ RT_F	CTGAGACAGTTACGCACCG	58
	<i>ahdA1c</i> _ RT_R	AAGCTCCAATTCCCGC	
Benzoate 1,2-dioxygenase subunit alpha ( <i>ahdA1d</i> )	<i>ahdA1d</i> _ RT_F	AGCATTGCTGGAGCG	58
	<i>ahdA1d</i> _ RT_R	ATAGCCCAGAACCTTGACC	
(2Fe-2S)-binding protein ( <i>ahdA1e</i> )	<i>ahdA1e</i> _ RT_F	AATGGCATCCGGTTGC	55
	<i>ahdA1e</i> _ RT_R	TTGTTACCCATTACCGCAG	
Benzoate 1,2-dioxygenase subunit alpha ( <i>xyIIX</i> )	<i>xyIIX</i> _ RT_F	AAGTCCGGCGATGTCG	55
	<i>xyIIX</i> _ RT_R	ATGCTCTCATCGGTGACG	
(2Fe-2S)-binding protein ( <i>ahdA3</i> )	<i>ahdA3</i> _ RT_F	GCAGTATATAATGTTGATGGCG	55
	<i>ahdA3</i> _ RT_R	ATCGCCCACTGGCAGG	
Ferredoxin reductase ( <i>ahdA4</i> )	<i>ahdA4</i> _ RT_F	AACGTGCATTACCTGCG	55
	<i>ahdA4</i> _ RT_R	TCATAGGCGCGGCAAG	
(2Fe-2S)-binding protein ( <i>ahdB</i> )	<i>ahdB</i> _ RT_F	GATGTCGCATTATGTCG	55
	<i>ahdB</i> _ RT_R	CTTTACGTTGACGCCGAAG	
2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase ( <i>ahdC</i> )	<i>ahdC</i> _ RT_F	ATGACCTGGCCTACATGG	55
	<i>ahdC</i> _ RT_R	GATCTCGTCGGATTGCC	
2-hydroxychromene-2-carboxylate isomerase ( <i>nahD</i> )	<i>nahD</i> _ RT_F	GTCTTGCCCAAGATCAAGG	51
	<i>nahD</i> _ RT_R	CGGTCACAAATGCCTCG	
TetR family transcriptional regulator ( <i>orf781</i> )	<i>orf781_19</i> _ RT_F	GAGAGTGGCTACGATAATGTCAC	58
	<i>orf781_19</i> _ RT_R	TTATACTACTACATTGGAAATATCGAG	
Catechol 1,2-dioxygenase ( <i>catA</i> )	<i>catA</i> _ RT_F	GCTTCCATTGAAAGATGC	53
	<i>catA</i> _ RT_R	CTGCGTCGTAGCGTG	

**Tabla III.2.** Nombre del Gen, set de primers elegidos para RT-qPCR, secuencias de cada primer y sus respectivas Temperaturas de hibridación (Tm) en grados centígrados. Set de primers (Khara y col., 2014).

### III.2.11.1.b Amplificación de los genes dioxygenasa y optimización de la temperatura de hibridación

Las reacciones de amplificación se realizaron a partir de las muestras de DNA del cultivo puro de la cepa AM siguiendo la reacción de PCR: 1 ciclo a 95°C por 10 minutos, 45 ciclos de 10 minutos a 95°C, 15 segundos a la Tm de cada primer, 15 segundos a 72°C y por último un ciclo de 5 minutos a 72°C. Esta PCR se realizó en gradiente variando el rango de

Tm entre 55°C y 62°C, en un termociclador Mastercycler® epgradient (Eppendorf, Hamburg, Germany). La presencia y el tamaño de los fragmentos de amplificación se verificaron mediante corridas electroforéticas en gel de agarosa. Luego las secuencias fueron analizadas en Macrogen para chequear el tamaño del inserto y especificidad de producto.

### **III.2.11.1.c Obtención de los cultivos para la extracción de RNA**

Se prepararon cultivos independientes de la cepa *Sphingobium* sp. AM y de las cepas que conforman el consocio sintético CS-1 (elegido para realizar el análisis transcriptómico) en 100 ml de R3 líquido y se incubaron 24 horas en agitación. Se centrifugaron 10 minutos a 6000 rpm y se inocularon  $1.10^9$  ufc/ml del cultivo de la cepa pura y del CS-1, determinados por medida de densidad óptica ( $DO_{580nm}$ ), en 100 ml de MML sin fuente de carbono. Los cultivos se incubaron en agitación durante 7 días. Se realizó un recuento de bacterias heterótrofas cultivables el día 0 y al finalizar los 7 días de incubación.

Los cultivos se centrifugaron 10 minutos a 6000 rpm y se resuspendieron en SF. Se midió la  $DO_{580nm}$  y se inocularon  $1.10^9$  UFC totales en 100 ml de MML suplementado con 200 mg/L de fenantreno por duplicado. Los cultivos se filtraron para descartar restos de cristales de fenantreno, se centrifugaron y los pellet se lavaron con agua ultra pura milli-Q.

Se tomaron muestras de AM y CS-1 a los tiempos de incubación de 2, 8, 24, 72 y 96 horas. Las muestras obtenidas en cada condición fueron resuspendidas en RNA later® (Sigma Aldrich) y almacenadas a -80 °C para la conservación del RNA (o para prevenir la degradación del mismo).

### **III.2.11.1.d Extracción de RNA total mediante kit comercial**

Para todo el trabajo de laboratorio con RNA se utilizó siempre material libre de RNAsas (de fábrica y por esterilización rigurosa). La extracción de RNA se llevó a cabo con RNeasy Protect Bacteria Mini Kit (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se descongeló el cultivo bacteriano en hielo y se centrifugó a 10000 rpm 15 minutos a 4°C para eliminar el RNA later®. Previo a la lisis, se agregó 1 ml de Tioisocianato de guanidina (Trizol® Invitrogen) para mejorarla lisis celular. Se llevó a cabo una incubación por 5 minutos a temperatura ambiente. Se agregaron 200 µl de cloroformo, y una vez separadas las fases por centrifugación a 11.300 rpm durante 15 minutos a 4°C, se transfirió la fase acuosa a una columna y se centrifugó a 8000-10000 rpm hasta obtener todo el lisado. Se lavaron las columnas con 700 µl de buffer RW1. Se trataron dos veces con 500 µl de RPE y se llevó a cabo una última centrifugación de 2 minutos para eliminar el etanol. Se eluyó el RNA en dos

pasos adicionando 30-50 µl RNAse Free water e incubando 1 minuto a temperatura ambiente.

Se midió la concentración del RNA extraído en el NanoDrop 2000 (Thermo-Scientific<sup>TM</sup>). Se almacenó en fracciones con 1 µg de muestra y se conservó a -80°C. Para comprobar la integridad del RNA total extraído y verificar la presencia de las tres bandas de ácidos nucleicos correspondientes al RNA ribosómico 23S, 5S y 16S se realizó una electroforesis en geles de agarosa desnaturizantes durante 10 minutos a 120-140 V.

### **III.2.11.1.e Evaluación de la cantidad y calidad de RNA**

La cuantificación de la cantidad de RNA obtenido en cada muestra se llevó a cabo midiendo la absorbancia con un espectrofotómetro (NanoDrop 2000, Thermo-Scientific<sup>TM</sup>), que permite la determinación de la concentración a partir de pequeños volúmenes de muestra (1 µl), utilizando la relación DO<sub>260nm</sub>/DO<sub>280nm</sub> como estimadora de la pureza del material genético extraído. Valores de la relación por debajo de 1,8 indican contaminación por proteínas o fenol. Valores cercanos a 1,8 – 2 indican una baja contaminación de la muestra.

La calidad del RNA se evaluó en geles de agarosa al 1%. Se consideró que el RNA estaba degradado (descartándose la muestra) si no se podían distinguir nítidamente las bandas correspondientes al RNA ribosomal 16S.

En la tabla III.3 se muestran las concentraciones de RNA obtenidas para AM y CS en los distintos tiempos.

Muestras	Tiempo (horas)	RNA (ng/µl)
AM	2	13,6-31,9
	8	22,9-171,1
	24	23,4-87,1
	72	20,2-84,1
	96	14,0-135
CS-1	2	27,8-37,3
	8	12,1-25,1
	24	35,5-56,5
	72	47,1-51,8
	96	34,8-36,2

**Tabla III.3.** Rango de concentraciones de RNA obtenidas para los cultivos de la cepa AM y el CS-1.

### **III.2.11.1.f Síntesis de cDNA**

Para la obtención de RNA completamente libre de DNA, se realizó la digestión del RNA con DNase I. Para ello se trató 1 µg de cada muestra de RNA con DNase I (Promega RQ1) durante 45 minutos a 37°C. El RNA libre de DNA se usó como molde para sintetizar el cDNA utilizando la Transcriptasa Inversa M-MLV (Invitrogen) y el primer Hexamerol Random (Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras la síntesis del cDNA, se eliminó el RNA añadiendo RNase (40U/µl). El cDNA obtenido se conservó a -80°C.

Tanto la extracción de RNA como la síntesis de cDNA se realizaron por duplicado de cultivos independientes en cada condición.

### **III.2.11.1.g Amplificación mediante RT-qPCR**

La RT-qPCR (PCR en tiempo real con transcriptasa inversa) es una variante de PCR convencional que permite cuantificar la expresión génica. A diferencia de la PCR, la inclusión en la reacción de un intercalante y la tecnología adecuada para la detección de la intensidad de fluorescencia en cada ciclo, la convierte en una herramienta cuantitativa y no solo cualitativa. La síntesis de cDNA que precede la RT-qPCR nos capacita para evaluar los niveles de un determinado RNA mensajero presente en la muestra.

La reacción de RT-qPCR se realizó en 10 µl de mezcla de reacción con 1 µl de molde de cDNA, 1 µM de cada set de primers forward y reverse, 0,2 µl de BSA (Sigma) 2x SYBR Green PCR Master Mix (Promega) (en presencia del buffer suministrado por el fabricante que contiene 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM dNTPs, una dilución 1:10000 de Sybr Green y 0,5 U de Taq Platinum polimerasa) y agua milli-Q ultrapura hasta alcanzar el volumen final de reacción. La amplificación se llevó a cabo en un qTOWER 2.2 - Real-Time PCR Thermal Cycler, Analytik Jena, y el programa consistió en un paso de desnaturación inicial a 95°C por 10 minutos, seguido de 45 ciclos de desnaturación a 95°C por 10 segundos, alineamiento a 55°C por 15 segundos, elongación a 72°C por 15 segundos y un paso de extensión final a 72°C por 5 minutos. La especificidad de la amplificación de la RT-qPCR se determinó mediante el análisis de la curva de fusión (Tm) para detectar la presencia de dímeros de primers. Después del paso de extensión final, se adicionó este ciclo final a la amplificación de 1 minuto a 95°C, 30 segundos a 55°C y 30 segundos a 95°C.

Se utilizaron placas de 96 pocillos, evitando la formación de burbujas y procurando que todo el material se encuentre en el fondo del pocillo, en caso contrario se obtendrían lecturas anómalas de la fluorescencia. El ensayo de RT-qPCR se realizó por triplicado de muestras y controles negativos. Los controles negativos consistieron en blancos de PCR con la mezcla de reacción y de blancos de PCR que contenían la mezcla y 1 µl de agua milli-Q ultrapura.

Las diferencias entre Cts se calcularon en cada muestra para cada gen de interés de la siguiente manera: Ct gen de interés – Ct de gen 16S rRNA como gen marcador de referencia. Este control interno (16S rRNA) permite eliminar la variación debida a posibles diferencias producidas por la degradación parcial del RNA en alguna muestra, distinta eficiencia en la transcripción inversa, errores de pipeteo, etc., y que no son causadas por diferencias en la expresión (Hernandez y col., 1994). Los cambios relativos en el nivel de expresión de un gen específico se calcularon mediante el método Delta-Delta Ct desarrollado por PE Applied Biosystems (Perkin Elmer, Forster City, CA) en base a la fórmula  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Se obtuvieron las relaciones de expresión para los diferentes genes dividiendo los valores de potencia normalizados en las diferentes condiciones, utilizando la condición de 2 horas de cada cultivo como referencia, y el 16S como gen reportero.

Las eficiencias de los pares de primers seleccionados se verificaron mediante RT-qPCR utilizando como molde diluciones seriadas de una mezcla equimolar de cDNA de todas las condiciones ensayadas. El cálculo de la eficiencia siguió la fórmula: % Eficiencia de la PCR:  $E = 10^{(\text{-}1/\text{pendiente})} - 1 \times 100$ .

### **III.2.12 Análisis proteómico**

#### **III.2.12.1 Obtención de proteínas de la cepa *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA**

Se prepararon 6 cultivos independientes de la cepa *Sphingomonas paucimobilis* en 500 ml de MML suplementado con 0.05 g/L de extracto de levadura. Se prepararon cultivos con 0,2 g/L de glucosa o 0,84 g/L de fenantreno como única fuente de carbono y energía. El fenantreno fue agregado al medio en forma de cristales. Se inoculó  $1 \times 10^7$  ufc/ml de la cepa en cada experimento y se mantuvo en agitación constante de 150 rpm a 28°C durante los ensayos estudiados. Los cultivos se cosecharon, y para los cultivos de fenantreno también se filtraron para eliminar los cristales de fenantreno, a dos tiempos de incubación diferentes, en la fase logarítmica de 24 horas y en la fase estacionaria de 96 horas. Los filtrados se centrifugaron a 6000 rpm durante 10 minutos, y el pellet se lavó tres veces con agua bidestilada estéril. Las células resuspendidas en agua bidestilada, se concentraron hasta llegar a una  $DO_{580}$  mayor a 20 unidades, y se mantuvieron a -80°C para la posterior determinación de proteínas presentes. Cada condición de crecimiento evaluada se realizó por triplicado.

### **III.2.12.2 Obtención de proteínas del consorcio inoculado (CON-I)**

Se prepararon cultivos con 500 ml de MML suplementado con 200 mg/L de fenantreno y se inocularon con 10 ml de CON inoculado con  $1 \times 10^7$  ufc/ml de la cepa *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA. Se incubaron a 28°C con agitación constante de 150 rpm. Los cultivos se cosecharon y filtraron para obtener las proteínas de CON-I a los 4 y 15 días de incubación. Se procedió con la obtención de proteínas al igual que en el inciso III.2.12.1.

Los cultivos se centrifugaron a 6000 rpm durante 10 minutos, y el pellet se lavó tres veces con agua bidestilada estéril. Las células resuspendidas en agua bidestilada, se concentraron hasta llegar a una DO<sub>580nm</sub> mayor a 20 unidades. Se mantuvieron a -80°C para posterior determinación de proteínas. Cada condición de crecimiento evaluada se realizó por triplicado.

### **III.2.12.3 Preparación del lisado celular para estudios proteómicos**

A cada muestra se le agregaron 2,5 µl, por cada 4 ml de muestra, de un cóctel de inhibidores de proteasas y 5 mM de fluoruro de fenilmetsulfonilo (PMSF). La suspensión de células se rompió utilizando un agitador mecánico Precellys R 24 (Bertin Technologies, France) y perlas hasta clarificación (tres veces 30 segundos, 6500 rpm). Luego de la ruptura los restos celulares se lavan centrifugando 10 minutos dos veces a 6000 g, reteniendo el sobrenadante. Se adicionaron 3 volúmenes del buffer de solubilización suplementado con fenilmetsulfonilfluoruro (PMSF) 5 mM e inhibidor de proteasa (recién preparado). Se sometieron a agitación suave durante 60 minutos en esa solución de solubilización y se centrifugan a 13.000 g durante 10 minutos.

### **III.2.12.4 Determinación de la concentración de proteínas**

La determinación de la concentración de proteínas en el sobrenadante fue determinada mediante el Kit 2-DE Quant (GE Healthcare Bio-sciences, USA) y el reactivo de Bradford (Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent).

### **III.2.12.5 Precipitación de proteínas**

Cuando fue necesario obtener una concentración mayor de proteínas, a 1 ml de la muestra se adicionaron de a gotas y en frío 278 µl de ácido tricloroacético al 50%, se mezcló con vortex y se incubó toda la noche (ON) a 4°C. Se centrifugó 10 minutos a 16.000 g, y el

precipitado se lavó dos veces con acetona fría al 90%. Luego se dejó secar a temperatura ambiente y se agregó buffer de solubilización hasta concentración deseada.

### **III.2.12.6 SDS-PAGE**

Se prepararon los geles de acrilamida concentración y separación (10 %) y se sembraron las proteínas solubilizadas con el buffer de carga en la parte superior. La electroforesis se realizó utilizando un Mini-PROTEAN Tetra Cell, 4 gel System (Bio-Rad) a 100V durante 2 horas (se aumenta el voltaje de 50V a 100V una vez que las muestras hayan llegado al final del gel concentración) hasta que la migración frontal en el gel llega al final del mismo. Los geles SDS-PAGE se calibraron con un marcador de peso molecular PageRuler™ Presence Protein Ladder (10-170 kDa) (Pierce Endogen) y se tiñeron con Coomassie blue G 250.

#### **III.2.12.7.a Análisis de las imágenes de los geles**

Las imágenes de los geles se capturaron usando el documentador Universal Hood II gel documentation system, (Bio-Rad laboratories Inc., Hercules, CA, USA) y el análisis se realizó con el software Proteome Weaver (Bio-Rad, Hercules, CA., Munich, Alemania). Cada condición de crecimiento evaluada se realizó por triplicado de geles.

### **III.2.12.8 Isoelectroenfoque**

Para el enfoque isoeléctrico (IEF), se utilizaron tiras de IPG prefabricadas de 7 y 18 cm en el rango de pH 4-7 (Immobiline DryStrips, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suecia). Las muestras de proteínas solubilizadas se mezclaron con buffer de rehidratación recién preparado para obtener una concentración final de proteínas de 250 µg en 125 µl y se cargaron sobre las tiras IPGs pH 4-7 como se describió en Sanchez y col., (1999). A continuación, las tiras se cubrieron con 3 ml de IPG Cover Fluid para evitar la evaporación y la cristalización de urea y se rehidrató a temperatura ambiente durante la noche (ON).

El isoelectroenfoque se realizó en una unidad Ettan IPGphor 3 IEF (GE Healthcare Bio-Science) empleando el siguiente perfil de voltaje: un aumento lineal de 0 a 500 V para eliminar sales y contaminantes cargados, seguido de una rampa lineal de tensión 1 hora a 1000 V. En el paso de enfoque final, se mantuvo la tensión máxima de la rampa (hasta 5000 Vh) y la corriente no excedió los 50 uA/banda. Las tiras enfocadas se utilizan inmediatamente para la segunda dimensión o se almacenaron a -80°C hasta su uso.

Para la preparación para la segunda dimensión, las tiras IPG fueron incubadas 1 hora en 3 ml de buffer de equilibrio suplementado con ditiotreitol (DTT) 20 mM (PlusOne) seguido por una incubación (1 hora) en la misma solución pero reemplazando DTT por 20 mM de Iodoacetamida (IAA) (GE Healthcare).

### **III.2.12.9 Segunda dimensión**

Después de la etapa de reducción/alquilación, las tiras de IPG se colocaron en la parte superior de un gel al 10% de acrilamida SDS-PAGE y se sellaron con agarosa al 0,5% en buffer de electroforesis con azul de bromofenol 0,002% (p/v). La separación en la segunda dimensión se llevó a cabo en una unidad de electroforesis Mini PROTEAM Tetra Cell (Bio-Rad, Hercules, CA) a 40 V a 20 °C hasta que el frente del colorante alcanzó el extremo inferior del gel. Los geles se calibraron con un marcador de peso molecular PageRuler™ (10-170 kDa) (Pierce Endogen) y se tiñeron con Coomassie blue G 250. Las imágenes de los geles 2-DE se capturaron usando el Universal Hood II (Bio-Rad, Hercules, CA).

#### **III.2.12.9.a Análisis de las imágenes de los geles**

La detección de spots, la cuantificación de abundancia coincidente, y la normalización de las imágenes se realizó con el software ProteomeWeaver 4.0 (Bio-Rad, Hercules, CA). Después de normalizar la intensidad de los spots con el mismo programa, las proteínas con cambios significativos en la expresión se procesaron para el análisis posterior por espectroscopia de masas (MS). Todos los estudios se realizaron por triplicado.

#### **III.2.12.9.b Identificación de proteínas**

Los spots de proteínas de interés fueron extirpados manualmente del gel con un tip de micropipeta y se colocaron en un eppendorf con 50 µl de agua bidestilada. Posteriormente se analizaron en el Centro de Estudios Químicos y Biológicos por Espectrometría de Masa (CEQUIBIEM) en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires. Se llevó a cabo una digestión tríptica en gel y se analizaron los péptidos extraídos en un UV-MALDI-TOF/TOF (UltraflexII Bruker Daltonics). Los softwares utilizados para la visualización de espectros y la identificación de proteínas fueron Flex Analysis (v. 3.3) y BioTools (Bruker Daltonics), vinculados a MASCOT (Matrix Science, Boston, MA © 2016 <http://www.matrixscience.com/>) y el algoritmo NCBIInr para búsqueda en las bases de datos de secuencias de proteínas. El score de las proteínas se calculó como  $-10 * \log(P)$ , donde  $P$  es la probabilidad de que un match observado fuera un evento aleatorizado.

La identificación de proteínas se realizó con la colaboración de la Dra. María Pía Valacco (IQUIBICEN, FCEN-UBA, Buenos Aires, Argentina).

### **III.2.13 Análisis estadístico**

Se calcularon los valores promedios y las desviaciones estándar de tres réplicas en diferentes ensayos. Los valores promedio se compararon mediante el test de análisis de varianza (ANOVA)  $P<0,05$ . Se realizó un análisis de two-way ANOVA post-hoc test Tukey (HSD) utilizando el paquete estadístico XLStat-Pro versión 7.5.2 (Addinsoft SARL, France).



**CAPÍTULO IV**

***Diseño de consorcios  
bacterianos con alta  
eficiencia de degradación  
de PAH:  
Estrategia I***

#### **IV. Diseño de consorcios bacterianos con alta eficiencia de degradación de PAH: Estrategia I**

Con el desafío de diseñar consorcios que puedan resultar inoculantes eficientes en la degradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH) en suelos contaminados, y de analizar un sistema más simple para estudiar la competitividad de un microorganismo introducido dentro de una comunidad bacteriana, se decidió inocular el consorcio natural CON obtenido en nuestro laboratorio (Festa y col., 2013), con una cepa con alta eficiencia de degradación. Se seleccionó a la cepa *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA aislada a partir de un microcosmo de suelo prístico de La Plata artificialmente contaminado con 2000 mg/kg fenantreno (Coppotelli y col., 2008). Esta cepa se designó como buen candidato para ser utilizada como inoculante en la remediación de suelos contaminados con PAH, debido a sus propiedades ecológicas y su capacidad para mineralizar fenantreno (Coppotelli y col., 2010).

##### **IV.1 Consorcio natural CON**

El consorcio CON fue obtenido a partir de un suelo crónicamente contaminado con PAH (Festa y col., 2013). Se estudió su diversidad, estructura y funcionalidad durante la degradación de fenantreno en medio líquido por métodos clásicos y moleculares (Festa y col., 2013; Festa y col., 2016a).

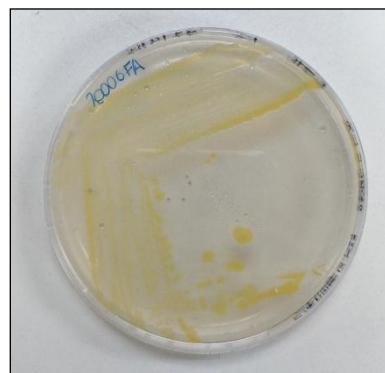
Por métodos moleculares, se estudió la diversidad mediante pirosecuenciación de los fragmentos de PCR del gen 16S rRNA a partir del DNA total de CON extraído el día 4 de incubación en MML con fenantreno como única fuente de carbono y energía. La frecuencia relativa de filotipos reveló la presencia de 7 órdenes bacterianos pertenecientes al filo *Proteobacteria*: *Sphingomonadales* (87,2%), *Rhodospirillales* (1,2%), *Rhizobiales* (0,3%) (pertenecientes a la clase *Alphaproteobacteria*), *Xanthomonadales* (0,7%), *Pseudomonadales* (0,6%), *Enterobacteriales* (7,6%) (pertenecientes a la clase *Gammaproteobacteria*) y *Burkholderiales* (2,5%) (pertenecientes a la clase *Betaproteobacteria*). A nivel de género se observaron las siguientes abundancias relativas en orden decreciente: *Sphingobium* (86,6%), *Klebsiella* (7,6%), *Burkholderia* (2,5%), *Inquilinus* (1,2%), *Luteibacter* (0,7%), *Sphingomonas* (0,6%), *Pseudomonas* (0,6%) y *Bradyrhizobium* (0,3%). Estos datos fueron actualizados en 2017 según la base de datos SILVA (Quast y col., 2012) (<http://www.arb-silva.de>).

A partir de los ensayos de la cinética de degradación de fenantreno en MML suplementado con 200 mg/L como única fuente de carbono y energía se demostró que CON degrada un 59% de fenantreno y acumula  $28 \pm 10$  mg/L de ácido 1-hidroxi-2-naftoico (AHN) luego de 7 días de incubación (Festa y col. 2013).

#### **IV.2 *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA**

En trabajos previos, se demostró que la cepa 20006FA (con una morfología de colonia amarilla, Figura IV.1) exhibe mecanismos para favorecer la biodisponibilidad del fenantreno como la producción de biosurfactantes y la adhesión de las células a la superficie de cristales de fenantreno. También acumula AHN y ácido salicílico como metabolitos principales, y tiene la capacidad de crecer en salicilato de sodio como única fuente de carbono y energía, demostrando que *S. paucimobilis* 20006FA poseería por lo menos una de las vías completa de degradación de fenantreno (Coppotelli y col, 2010).

En este trabajo se profundizó el estudio de la cepa 20006FA mediante ensayos de degradación de PAH y análisis ómicos. Se evaluó la capacidad de degradar fenantreno en distintas concentraciones y diferentes PAH, junto a los metabolitos generados durante el proceso de degradación. Se estudió el genoma para identificar genes de la vía de degradación de fenantreno y posibles reguladores de las vías de degradación de PAH. Mediante geles 2-DE, se analizó el proteoma a diferentes tiempos de la degradación de fenantreno y se integraron estos resultados para mostrar una ruta de degradación de fenantreno propuesta para 20006FA.



**Figura IV.1.** Fotografía del aislamiento de la cepa *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA en R3A.

## IV.3 Resultados

### IV.3.1 Caracterización de la cepa *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA

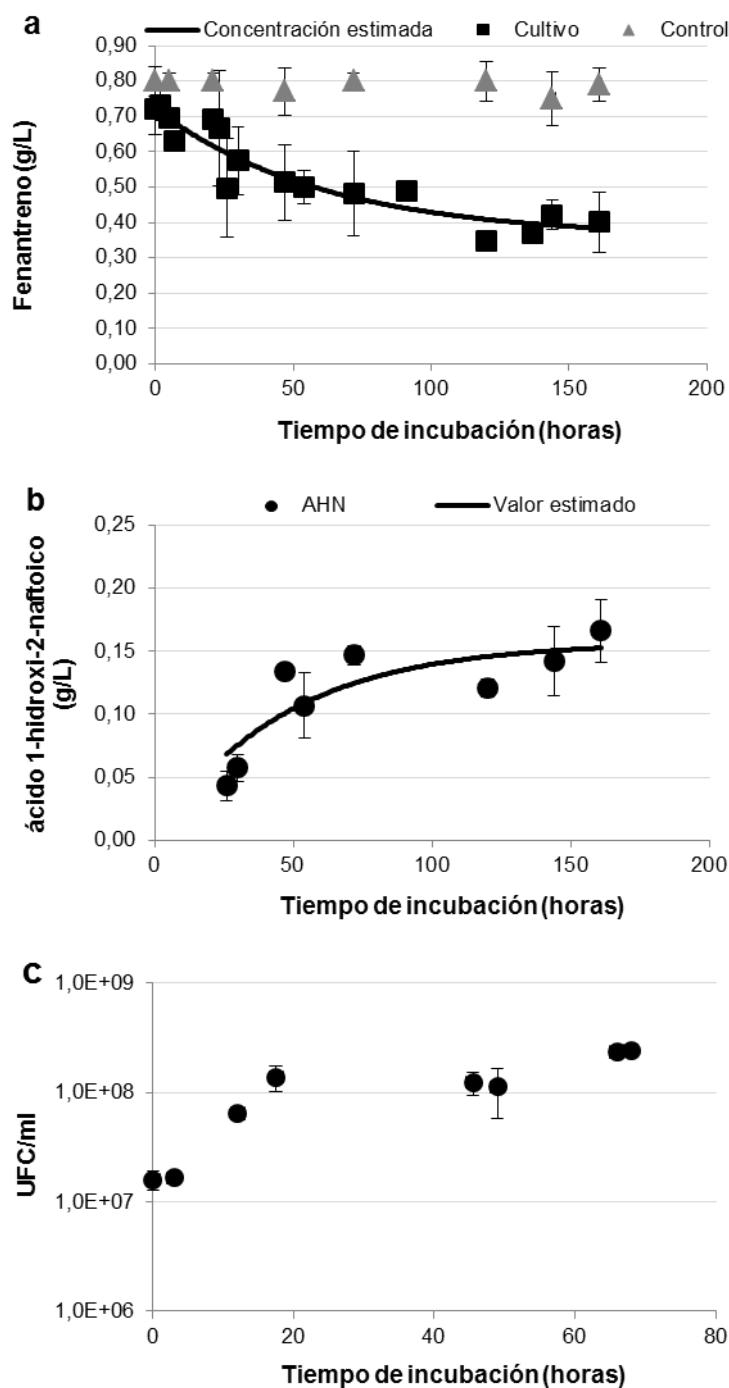
#### IV.3.1.1 Estudio de la capacidad de degradación de fenantreno en cultivos líquidos de *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA

Para determinar y cuantificar la degradación de fenantreno y la producción del principal metabolito intermedio, el AHN, se prepararon cultivos de 20006FA con distintas concentraciones de fenantreno como única fuente de carbono y energía y se realizó un análisis químico por HPLC.

Las figuras IV.2 a y b representan, respectivamente, el fenantreno remanente y el AHN producido en el cultivo de cepa 20006FA en MML suplementado con 0,84 g/L de fenantreno durante 161 horas de incubación.

La biodegradación de fenantreno (Figura IV.2 a) se modeló utilizando una función logística de tres parámetros descrita por la ecuación:  $\text{PHN} = P + ae^{-bt}$  (donde t es el tiempo de tratamiento y PHN es la concentración de fenantreno en el tiempo t, y a y b son constantes que definen la curva de acuerdo con los datos de entrada). En esa ecuación, el parámetro (P) modula la tasa de eliminación de fenantreno a lo largo del tiempo. Ese parámetro podría estar representado por una influencia que depende de la concentración de fenantreno (PHN) y, por lo tanto, podría entonces involucrar al menos uno de los metabolitos acumulados (Figura IV.2 b).

A partir de las curvas de degradación en 0,84 g/L de fenantreno y generación de AHN, se observó que la tasa de eliminación de fenantreno disminuyó significativamente a lo largo del tiempo (Figura IV.1 a), simultáneamente con la acumulación del AHN (después de 24 horas; Figura IV.1 b). El AHN se acumuló durante el período de incubación alcanzando una concentración máxima de 0,166 g/L en 161 horas. Para la producción de AHN (Figura IV.2 b), la curva de ajuste se obtuvo utilizando una función logística de dos parámetros  $Y = a(1 - e^{-bt})$ , que muestra un aumento exponencial hasta un máximo, donde t es el tiempo de tratamiento y a y b son constantes que definen la curva de acuerdo con los datos de entrada.



**Figura IV.2.** Concentración de fenantreno (a), ácido 1-hidroxi-2-naftoico (AHN) (b) y recuentos de bacterias heterótrofas totales (c) en el cultivo de cepa 20006FA en MML suplementado con 0,84 g/L de fenantreno como única fuente de carbono y energía durante 161 horas de incubación. Se grafican los valores promedio de tres réplicas biológicas y su respectiva desviación estándar. El ajuste de las curvas a las ecuaciones fue obtenido por SigmaPlot V10, Systat software, Inc., San José, CA. Las curvas de los gráficos a y b son las concentraciones estimadas según las funciones que mejor se ajustan a los datos.

La figura IV.1 c muestra la cinética de crecimiento de la cepa 20006FA en el cultivo con 0,84 g/L de fenantreno; el crecimiento se determinó mediante recuentos de UFC en placas de R2A. En esas condiciones, la tasa de crecimiento fue de  $0,146 \text{ h}^{-1}$  ( $r^2 = 0,995$ ) y el tiempo de duplicación 4,72 h. Se observó que luego de 20 horas el cultivo entró en fase estacionaria, sin embargo, a ese tiempo, la tasa de degradación aún se mantenía elevada (Figura IV.1 a). En la tabla IV.1 se muestran los porcentajes de degradación de fenantreno y la concentración de AHN (g/L) producida durante 15 días de incubación en MML conteniendo 0,84 g/L y 0,2 g/L de fenantreno. Al medir el fenantreno remanente en los cultivos de 0,84 g/L, se observó que la degradación alcanzó un  $60 \pm 11\%$  después de 15 días incubación. En cambio, cuando la cepa se cultivó con una concentración menor de fenantreno (0,2 g/L), fue capaz de degradar el  $98,45 \pm 0,03\%$  en 15 días. Este resultado confirmaría que el parámetro P de la ecuación  $\text{PHN} = P + ae^{-bt}$  depende de la concentración inicial de fenantreno. En los cultivos de mayor concentración, la cepa acumuló  $0,08 \pm 0,01$  g/L de AHN el día 15 y en los cultivos de 0,2 g/L, alcanzó una concentración de  $0,08 \pm 0,02$  g/L el día 2, que no se detectó al final del ensayo. Cuando 20006FA crece en la mayor concentración de fenantreno, produce concentraciones de AHN significativamente más altas (a las 161 horas de incubación), y aunque posteriormente se observó la eliminación del mismo, la degradación de fenantreno se vio limitada.

Concentración de Fenantreno (g/L)	Tiempo de incubación	% de Degradación de Fenantreno	Acumulación de AHN (g/L)
0,84	24 h	15 ± 2	0,07 ± 0,01
	96 h	44 ± 5	0,138 ± 0,007
	161 h	49 ± 1	0,17 ± 0,03
	15 días	60 ± 11	0,08 ± 0,01
0,20	48 h	89,8 ± 0,7	0,08 ± 0,02
	7 días	91,8 ± 0,1	ND
	15 días	98,45 ± 0,03	ND

**Tabla IV.1.** Porcentaje de degradación de fenantreno y concentración de AHN en g/L en cultivos de 20006FA en MML suplementados con fenantreno 0,84 g/L después de 24, 96, 161 horas y 0,2 g/L después de 48 horas 7 y 15 días de incubación. Los valores corresponden al promedio de tres réplicas biológicas y su respectiva desviación estándar. ND: no determinado.

#### IV.3.1.2 Estudio del potencial de degradación de *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA

Se estudió cualitativamente la capacidad de degradar diferentes compuestos aromáticos, entre ellos algunos de los 16 PAH incluidos en la lista de contaminantes prioritarios de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA 2001; 2010) y tres de los metabolitos intermedios de la degradación de PAH de 20006FA. La cepa se cultivó en MML suplementando con los distintos compuestos durante 15 días en agitación a 28°C (Tabla IV.2). El resultado se consideró positivo con la aparición de color amarillo/naranja en el medio de cultivo, propio de los productos intermedios de la degradación, que indica la ruptura del anillo, y turbidez como indicio del crecimiento microbiano. El espectro de degradación de la tabla IV.2 mostró que la cepa pudo degradar sólo tres PAH, aunque mostró crecimiento en cinco de los siete PAH ensayados.

PAH y metabolitos intermedios	Color	Turbidez
Acenaftileno*	-	-
Antraceno*	+	+
Benzo[a]antraceno*	-	+
Criseno*	-	+
Dibenzo[a,h]antraceno*	-	-
Dibenzotifeno	+	+
Fluoreno*	+	+
Pireno*	-	+
Ácido 1-hidroxi-2-naftoico	+	+
Ácido salicílico	+	+
Ácido ftálico	+	+

**Tabla IV.2.** Degradación y crecimiento en 1 g/L de diferentes hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH) y 0,05 g/L de intermedios de la degradación de PAH por la cepa *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA. +: degradación /crecimiento, -: no detectado. \*: Hidrocarburos policíclicos aromáticos incluidos en la lista de contaminantes prioritarios de la USEPA.

Se observó un resultado positivo en los 3 intermediarios estudiados. En trabajos previos se evidenció que la cepa puede metabolizar el ácido salicílico (Coppotelli y col., 2010), y en esta nueva caracterización se pudo observar que también puede metabolizar el ácido ftálico que se manifiesta por el crecimiento bacteriano y color en el medio de cultivo (Figura IV.3), lo que indicaría que la cepa 20006FA podría seguir a partir del AHN tanto el meta como el orto clivaje de la ruta de degradación de fenanreno (Figura señalador) ya que degrada los intermediarios correspondientes a las dos vías.



**Figura IV.3.** Fotografía de los cultivos de la cepa *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA en MML suplementados con 0,05 g/L de ácido ftálico y un control abiótico luego de 15 días de incubación.

Como se conoce que la cepa acumula AHN, metabolito clave durante la degradación de fenanreno, y se observó crecimiento cuando se inoculó en cultivos con AHN como única fuente de carbono y energía, se cuantificó la degradación en MML suplementado con 0,05 g/L. Se eligió esta concentración ya que en estudios previos se demostró que no es inhibitoria para la cepa además de producir el menor tiempo de latencia y mayor recuento celular (Martínez, 2010). Se determinó una degradación de  $94 \pm 10\%$  luego de 15 días.

A partir de los resultados positivos de color y turbidez para algunos PAH, se cuantificó la concentración de antraceno, fluoreno, pireno y dibenzotifeno remanente en cultivos con 0,2 g/L de cada compuesto (Tabla IV.3).

PAH	% de degradación
Antraceno	13 ± 11
Dibenzotiofeno	76 ± 3
Fluoreno	-
Pireno	-

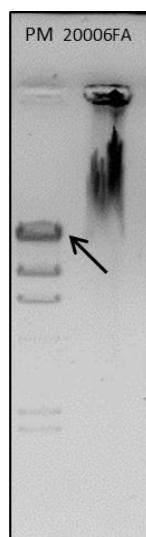
**Tabla IV.3.** Porcentaje de degradación de cultivos de la cepa *Sphingomonas paucimobilis* en MML suplementados con 0,2 g/L de diferentes hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH) luego de 15 días de incubación. -: no detectado.

Luego de 15 días, se determinó un 13 ± 11% y 76 ± 3% de degradación para antraceno y dibenzotiofeno, respectivamente. No se detectó degradación para fluoreno y pireno, a pesar de haber observado turbidez en el medio de cultivo.

#### **IV.3.1.3 Análisis genómico de *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA y estudio “in silico” de los genes relacionados con la ruta de degradación de fenantreno**

##### **IV.3.1.3.a Extracción de DNA, secuenciación, ensamblaje y anotación del genoma de 20006FA**

Se realizó la extracción del ADN total de 20006FA siguiendo el protocolo explicado por Entcheva y col. (2001) para obtener fragmentos mayores a 23 kpb y de buena calidad, que se corroboró en un gel de agarosa 0,8% (Figura IV.4). La concentración fue de 279,4 ng/ µl y la pureza de DNA de 1,94 (relación 260/280).



**Figura IV.4.** Fotografía del gel de agarosa de la corrida de DNA de alto peso molecular extraído de cultivos de 20006FA. PM: marcador de peso molecular. Con la flecha se indica la banda de 23130 pb del marcador de peso molecular ( $\lambda$  DNA/Hind III)

Para comprender los mecanismos implicados durante la degradación de fenantreno por *S. paucimobilis* 20006FA, se secuenció el genoma utilizando el método WGS (de las siglas en inglés “*Whole Genome Shotgun*”) en el Instituto de Agrobiotecnología Rosario (INDEAR-CONICET, Rosario, Argentina) y fue curado y anotado en la base de datos mundial del NCBI (de las siglas en inglés “*National Center for Biotechnology Information*”) GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), con un número de acceso público WGS. En el ensamble parcial se obtuvieron un total de 144 scaffolds y se estimó una longitud de 540971 pb (N50 = 140995 pb; tamaño medio del scaffold = 36843 pb;) con un contenido de GC de 64,30% (Tabla IV.4). En base a la asignación funcional de los genes identificados en RAST (del inglés *Rapid Annotation using Subsystem Technology*) y la anotación automática del genoma procariota NCBI (PGAAP) (Angiuoli y col. 2008) se identificaron 435 subsistemas, algunos de los cuales participan de la ruta periférica o central del metabolismo de compuestos aromáticos, y un total de 4975 secuencias codificantes (CDS: *Coding sequence*), 4860 secuencias codificantes de proteínas, 56 genes tRNAs, 3 rRNAs y 115 pseudogenes.

Muestra	BioProject:	BioSample:	Número de acceso WGS	Tamaño (Mb)	% GC	Sub-sistemas	Genes (total)	CDS (total)	CDS (coding)	Genes (RNA)	tRNAs	ncRNAs	Pseudo-Genes (total)
20006FA <i>Sphingomonas paucimobilis</i>	PRJNA322169	SAMN05049676	LYMJ01	5.41	64.30	435	5.031	4.975	4.860	56	49	3	115

**Tabla IV.4.** Datos generales del ensamble del genoma de la cepa 20006FA curada por el National Center for Biotechnology Information GenBank.

La secuenciación y ensamble parcial del genoma de 20006FA nos permitió identificar “*in silico*” genes codificantes relacionados con la vía de degradación de fenantreno (Tabla IV.5), y se confirmaron las potenciales funciones de los genes identificados por diferentes bases de datos como MetaCyc, Protein Data Bank, AmiGo. Se estudiaron en detalle los genes involucrados en la degradación de PAH y especialmente en reacciones que pudieran catalizar las enzimas codificadas por estos genes dentro de la ruta de degradación de fenantreno hasta entrar al ciclo de Krebs, tomando como referencia la base de datos de la Enciclopedia de Kioto de Genes y Genomas (KEGG) PATHWAY (<http://www.kegg.jp/>) (Kanehisa y col., 2014). La degradación aeróbica del fenantreno, al igual que con otros PAH, se inicia por la adición de dos átomos de oxígeno al anillo aromático, catalizado por una dioxigenasa (Figura señalador). Las moléculas de cis-dihidrodiol generadas se deshidrogenan posteriormente y se escinden por enzimas deshidrogenasa y dioxigenasa, respectivamente, para formar el metabolito intermedio AHN (pasos 1 al 6). Este metabolito puede ser degradado adicionalmente por dos rutas diferentes. Puede ser procesado por dioxigenasas y deshidrogenasas (ruta de orto-clivaje) para generar ftalato, que posteriormente se metaboliza a través del protocatecuato para generar intermediarios del ciclo de Krebs (Figura señalador, pasos 7 al 13). Alternativamente, el AHN es descarboxilado para generar 1,2-dihidroxinaftaleno (ruta de meta-clivaje), que se procesa en serie por actividades de dioxigenasa, isomerasa, aldolasa y deshidrogenasa para producir ácido salicílico (Figura señalador, pasos 14 a 18), que se degrada posteriormente a través de las vías de gentisato (pasos 19 y 20) o catecol (pasos 21, 22 y 23), para generar intermediarios del ciclo de Krebs.

Enzimas predichas - <i>Sphingomonas paucimobilis</i> 20006FA			
Enzimas de vía alta	CDS	Enzimas de vía baja	CDS
Aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase α y β subunits	4	Anthranilate 1,2-dioxygenase (EC 1.14.12.1)	2
Biphenyl dioxygenase (EC 1.14.12.18)	1	Naphthalene 1,2-dioxygenase (EC 1.14.12.12)	1
2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase (EC 1.13.11.39)	1	Catechol 1,2-dioxygenase (EC 1.13.11.1)	2
3-phenylpropionate dioxygenase (EC 1.14.12.19)	1	Catechol 2,3-dioxygenase (EC 1.13.11.2)	2
Benzoate 1,2-dioxygenase α y β subunits (EC 1.14.12.10)	1	2,3-dihydroxybenzoate-2,3-dehydrogenase (EC 1.3.1.28)	2
Monooxygenase	9	Homogentisate 1,2-dioxygenase (EC 1.13.11.5)	1
Salicylate hydroxylase (EC 1.14.13.1)	1	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (EC 1.13.11.27)	1
Ciclohexanone monooxygenase (EC 1.14.13.22)	1	Maleylacetoacetate isomerase (EC 5.2.1.2)	1
(2Fe-2S)-binding protein	15	Muconate cycloisomerase (EC 5.5.1.1)	1
		Isoquinoline 1-oxidoreductase alpha subunit (EC 1.3.99.16)	1
		4-hydroxy-2-oxovalerate aldolase (EC 4.1.3.39)	3
		Muconolactone delta-isomerase (EC 5.3.3.4)	1
		1,6-dihydroxycyclohexa-2,4-diene-1-carboxylate dehydrogenase (EC 1.3.1.25)	2
		5-carboxymethyl-2-hydroxymuconate semialdehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.60)	2
		4-carboxymuconolactone decarboxylase (EC 4.1.1.44)	1
		Carboxymuconolactone decarboxylase (EC 4.1.1.44)	4
		4-oxalocrotonate decarboxylase (EC 4.1.1.77)	4
		3-isopropylmalate dehydratase subunit beta (EC 4.2.1.33)	1
		2-keto-4-pentenoate hydratase (EC 4.2.1.80)	2
		4-hydroxy-2-oxovalerate aldolase (EC 4.1.3.39)	3
		Cysteine dioxygenase (EC 1.13.11.20)	1
		3,4-dihydroxybenzoate decarboxylase (EC 4.1.1.63)	1
		4-hydroxy-2-ketovalerate aldolase (EC 4.1.3.39)	1
		Salicylate hydroxylase (EC 1.14.13.1)	1
		Alcohol dehydrogenase (EC 1.1.1.1)	12
		Aldehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.3)	8
		Acetaldehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.10)	4
		2-hydroxymuconic semialdehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.32)	2
		5-carboxymethyl-2-hydroxymuconate semialdehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.60)	2

**Tabla IV.5.** Enzimas pertenecientes a las vías de degradación de PAH en el genoma de *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA, predichas por RAST, KEGG y NCBI. CDS: número de secuencias de codificación para esa proteína en el genoma. Los genes en las tablas se nombran en inglés debido a que se obtiene del dato crudo proveniente de la base de datos.

En la tabla IV.5 se muestran los productos de las secuencias de codificación (CDS) seleccionados que podrían estar implicados en las vías superior e inferior de degradación de fenanreno (los genes en las tablas se nombran en inglés debido a que se obtiene del dato crudo proveniente de la base de datos y así facilitar su búsqueda).

Se encontraron 9 CDS que compartieron una identidad significativa con componentes de las enzimas dioxigenasas que catalizarían el paso inicial de la degradación y ataque de algunos metabolitos intermedios, como las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de dioxigenasas hidroxilantes de anillo aromático, bifenil dioxigenasa, salicilato hidroxilasa, entre otras. Asimismo, se encontraron algunos CDS que participarían de la degradación de alkanos, como alcano-1 monooxigenasa (EC 1.14.15.3) y alcanosulfonato monooxigenasa (EC 1.14.14.5) (Tabla IV.S.1).

Se identificaron un total de 108 CDS que codificaron para enzimas pertenecientes a la vía degradación de fenantreno (Figura señalador y Tabla IV.5), sugiriendo que la cepa podría seguir el orto y meta-clivaje. Algunos estudios fisiológicos previos (Coppotelli, 2010) y de este trabajo de tesis indicaron que 20006FA puede degradar AHN, ácido salicílico y ácido ftálico (Tabla IV.2). Este resultado coincide con las capacidades metabólicas predichas que indican que la cepa podría mineralizar el fenantreno, a pesar de acumular concentraciones elevadas de AHN durante la degradación. La cepa posee además múltiples homólogos de CDS para enzimas con funciones similares implicadas en la degradación de diferentes PAH. Estos genes están distribuidos a lo largo del genoma y también organizados en grupos de genes dentro de un scaffold, que podrían estar formando parte de un mismo operón. Se encontró una región particular, correspondiente al scaffold número 19 (NZ\_LYMJ01000019.1), con una alta frecuencia de CDS para enzimas degradadoras de PAH. El alineamiento en blastn mostró el 92% de similitud y 76% de cobertura con un E-Valor de 0.0, con la secuencia del plásmido pNL1 de *Novosphingobium* (antes *Sphingomonas*) *aromaticivorans* F199 (Romine y col., 1999). Asimismo, esta región se encuentra flanqueada por elementos genéticos móviles que promueven la transferencia de los genes.

#### **IV.3.1.3.b Clasificación de enzimas dioxigenasas de la cepa *S. paucimobilis* 20006FA implicadas en la vía superior e inferior de la degradación de fenantreno**

Se realizó la clasificación de las enzimas dioxigenasas presentes en el genoma de 20006FA, en diferentes clases funcionales, mediante las bases de datos específicas para genes dioxigenasas RHObase y AromaDeg, mencionada en el capítulo I sección I.4.3. Se utilizaron las secuencias homólogas a la subunidad  $\alpha$  de enzimas hidroxilantes de anillo aromático y también secuencias de proteínas catabólicas que pueden incluir extradiol dioxigenasas para el caso de AromaDeg. Las secuencias de aminoácidos analizadas en formato FASTA extraídas de la base pública NCBI se muestran en material suplementario (Tabla IV.S2).

Mediante la clasificación en cuatro tipos de clases de la base de datos RHObase, se pretendió asignar una especificidad de sustrato a las enzimas predichas para 20006FA que se muestran en la tabla IV.5. Sólo se lograron clasificar 7 de las 20 secuencias de subunidades alfa de enzimas dioxigenasas presentes en el genoma de 20006FA, que se muestran en la tabla IV.6.

Nombre de la proteína - 20006FA	Longitud (aa)	Presencia del gen de la subunidad β	Clase	Possible paso de la ruta catalizado
Aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase alpha (4 copias)	438	sí	A	1
Benzoate 1,2-dioxygenase alpha (EC 1.14.12.10)	472	sí	B	10, 15
Aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase alpha	469	sí	C	10, 15
(2Fe-2S)-binding protein (2 copias)	426	no	C	19, 21
(2Fe-2S)-binding protein (2 copias)	447	no	D	10, 15

**Tabla IV.6.** Clasificación de las secuencias de la subunidad α de enzimas dioxigenasas de la cepa 20006FA, longitud de la secuencia (aa), presencia de gen codificante para la subunidad β contiguo al gen codificante para la subunidad α de la enzima dioxigenasa encontrado, clasificación funcional y posible paso de la ruta catalizado de la Figura señalador.

Las dioxigenasas hidroxilantes de anillo aromático (presente en cuatro copias; Tabla IV.5) pertenecieron a la clase A. Las dioxigenasas referentes a esta clase tienen como sustratos potenciales compuestos policíclicos aromáticos como fenantreno y naftaleno. Las cuatro copias de dioxigenasas hidroxilantes de anillo aromático presentaron un gen adyacente y codireccional correspondiente a la subunidad beta de enzimas dioxigenasas, lo cual confirmaría que posee los genes para expresar las dos subunidades alfa/beta que típicamente poseen estas enzimas, con estructura cuaternaria hetero-multimérica  $\alpha\beta\beta\alpha$  (Chakraborty y col., 2012). La benzoato 1,2 dioxigenasa perteneció a la clase B, también con el gen de la subunidad β adyacente, y atacaría compuestos carboxilados como benzoatos y toluatos, mientras que las proteínas de unión rieske (2Fe-2S) y otras subunidades de dioxigenasas hidroxilantes de anillo aromático se clasificaron en C y D (Tabla IV.6), con especificidad de sustratos como salicilatos, antranilatos (clase C) y ftalatos (clase D). Las enzimas analizadas actuarían en diferentes pasos de la vía superior e inferior

de degradación de fenanreno de la figura señalador, atacando a un mismo sustrato, o diferentes sustratos según la demanda.

Utilizando AromaDeg, se logró obtener una clasificación en diferentes superfamilias asociadas en un árbol filogenético: subunidades  $\alpha$  de oxigenasas con sitios Rieske no hemo (RHO), extradiol dioxigenasas (EXDO) de la superfamilia de: I) quelatos vecinales; II) LigB y III) cupinas. En la tabla IV.7 se muestran los resultados de esta clasificación. Las cuatro copias de dioxigenasas hidroxilantes de anillo aromático clasificaron en la superfamilia de las oxigenasas que poseen sitio Rieske no hemo (RHO), que conseguirían atacar compuestos como bifenilo, benzoato, ftalato y salicilato. Conjuntamente, esta base nos permitió clasificar las enzimas dioxigenasas que tienen especificidad por compuestos dioles como las extradiol, que no se clasifican en RHObase. Las enzimas catecol 2,3-dioxigenasa y 2,3-dihidroxibifenil 1,2-dioxigenasa clasificaron en la familia de las enzimas extradiol dioxigenasas que pertenecen a proteínas quelantes de oxígenos vecinales (EXDO I) que tienen típicamente una preferencia por los sustratos monocíclicos y bicíclicos respectivamente.

Nombre de la proteína - 20006FA	Clasificación (superfamilias)
Aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase alpha (four copies)	RHO
Catechol 2,3-dioxygenase	EXDO I
2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase	EXDO I

**Tabla IV.7.** Clasificación de las secuencias de la subunidad  $\alpha$  de enzimas dioxigenasas y extradiol dioxigenasas de la ruta de degradación de fenanreno en la cepa 20006FA en superfamilias mediante AromaDeg.

#### IV.3.1.3.c Reguladores transcripcionales de los genes de la ruta de degradación de hidrocarburos

Los genes que codifican para enzimas o proteínas reguladoras que intervienen en una vía catabólica suelen encontrarse agrupados en clusters. Estos clusters suelen estar organizados de manera que una zona promotora regula a la vez la transcripción de varios genes relacionados de una vía catabólica. A veces en lugar de encontrar solo una unidad transcripcional, podemos encontrar varias unidades transcripcionales. Analizando los scaffolds y la organización de genes de la cepa 20006FA, se encontraron muchos

reguladores transcripcionales que se encuentran flaqueando a genes que participarían de uno o varios pasos de la vía de degradación de PAH. En la tabla IV.8 se muestran los reguladores presentes en la cepa 20006FA, que podrían actuar en la regulación de la ruta catabólica de fenantreno y su número de copias en el genoma.

Reguladores transcripcionales para 20006FA- Genbank NCBI	nº de copias de los genes
NtrC/XyIR	-
LysR/CatR	35
AraC/XylS	10
IclR	4
TetR/MarR/FNR	61
GntR	10

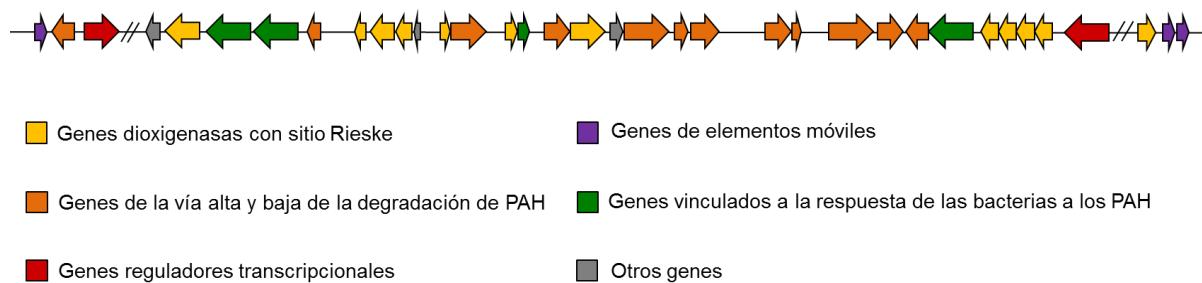
**Tabla IV.8.** Reguladores transcripcionales encontrados en el genoma de la cepa *S. paucimobilis* 200006FA.

Se encontraron un gran número de copias de genes LysR distribuidos en diferentes posiciones del genoma. Los reguladores de tipo LysR encontrados en 35 copias, implicados en las vías de degradación de aromáticos (como CatR) actúan como activadores transcripcionales sobre sus operones metabólicos en presencia de un inductor, que es generalmente un metabolito intermediario de la vía (muconatos sustituídos) o compuestos aromáticos (salicilato, catecol y nitrotolueno) (Tropel y van der Meer, 2004). Se encontraron 10 copias de reguladores tipo AraC/XylS, que son inducidos por alquilbenzoatos, y que junto a los reguladores IclR (4 copias), responden tanto a compuestos aromáticos como no aromáticos.

Los reguladores TetR (61 copias) y GntR (10 copias) son represores transcripcionales que poseen como ligandos diferentes intermediarios de la vía de degradación de fenantreno (Chubiz y col., 2010).

La ausencia de un regulador tipo NtrC podría deberse a que el genoma de 20006FA está incompleto, y de esta manera se pudo haber perdido información.

En la figura IV.5 se muestra la organización génica de una región del scaffold 19 de la cepa 20006FA. Esta región con alta homología con el plásmido pNL1 (Romine y Stillwell, 1999) flanqueada por genes reguladores transcripcionales (regulador transcripcional de la familia IclR, regulador transcripcional de la familia GntR), muestra genes codificantes para enzimas dioxigenasas (subunidades mayores de los genes *naph* y *bph*, subunidad α y β de la benzoato/toluato dioxigenasa, 2,3-dihidroxibifenil 1,2-dioxigenasa), genes involucrados en la vía alta y baja de degradación de PAH (dihidrodiol deshidrogenasa, aldehído deshidrogenasa, 4-oxalocrotonato descarboxilasa, 4-hydroxy-2-oxovalerate aldolase, subunidades ferredoxinas), genes de enzimas vinculadas a la respuesta de las bacterias a los hidrocarburos y elementos móviles. Las flechas indican los productos génicos encontrados (Figura IV.5).



**Figura IV.5.** Esquema de organización génica encontrada en una región del scaffold 19 de 20006FA. Cada secuencia codificante (CDS) se muestra con flechas y se colorea dependiendo de la función de sus productos génicos.

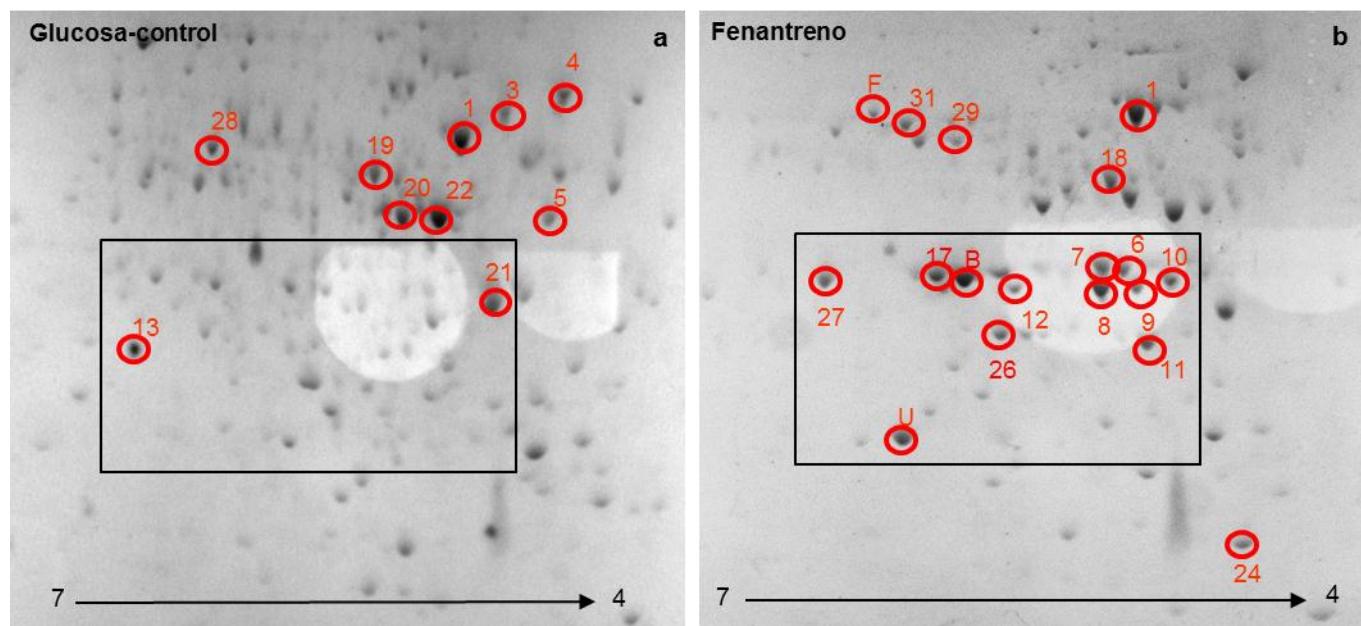
#### IV.3.1.4 Análisis del proteoma de la cepa *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA mediante electroforesis bidimensional

Debido a que el análisis genómico es más bien predictivo, se continuó con el estudio del proteoma de la cepa *S. paucimobilis* 20006FA, con el fin de obtener información sobre el efecto del fenantreno en la respuesta celular.

Las proteínas obtenidas a partir de los lisados bacterianos de cultivos en glucosa o en fenantreno con el mismo aporte de carbonos de cada compuesto como única fuente de carbono se analizaron a través de electroforesis bidimensional (2-D) en el rango de pH 4-7 y de peso molecular de 6.5 a 200 kDa. Bajo estas condiciones, las electroforesis resolvieron alrededor de 250 spots de proteínas (Figuras IV.6 y IV.7). Los spots expresados

diferencialmente y otros de mayor intensidad en alguna condición, se cortaron del gel manualmente y se analizaron usando MALDI-TOF/TOF (MS/MS) y el programa MASCOT para la identificación de proteínas mediante la base de datos NCBIInr. Algunos *spots* se analizaron por duplicado del set de geles (los duplicados de geles con los *spots* marcados se muestran en el material suplementario Figura IV.S1) y también se seleccionaron *spots* encontrados en la misma posición del gel 2-DE en las diferentes condiciones estudiadas, con el objetivo de confirmar que pertenecían a la misma proteína. Posteriormente, las proteínas identificadas se sometieron a análisis bioinformático utilizando el software ARTEMIS (v1.6 <http://www.sanger.ac.uk/Software/Artemis>), realizando una búsqueda de similitud con las proteínas predichas del genoma de 20006FA en NCBI.

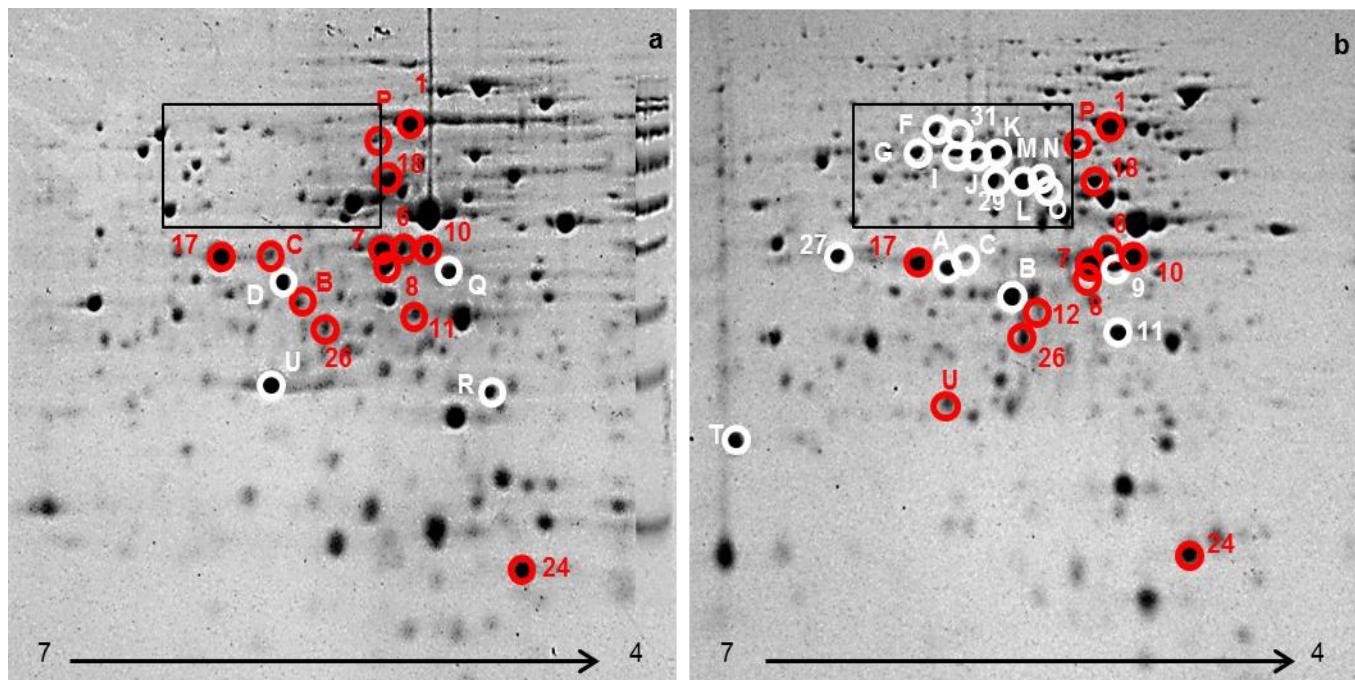
Las curvas de crecimiento en glucosa o fenantreno como única fuente de carbono indicaron que los cultivos alcanzaron la fase estacionaria de crecimiento después de 96 horas (Figuras IV.S2 y IV.S3). En ese momento, el análisis cuantitativo de la biodegradación (Figura IV.2) reveló que más del 40% del fenantreno inicial había sido eliminado y que el metabolito intermediario AHN había alcanzado una concentración de 0,138 g/L. Sobre la base de la información de la fase de crecimiento y el grado de degradación de fenantreno ilustrados en la Figura IV.2, se establecieron las condiciones de cultivo óptimas para el análisis del proteoma comparativo de la cepa 20006FA a las 96 horas. Los perfiles proteicos revelaron una sobreexpresión de múltiples genes pertenecientes a la vía catabólica de PAH en los cultivos con fenantreno en comparación con el perfil correspondiente a los cultivos control (células cultivadas con glucosa). Las diferencias más pronunciadas se remarcán con un rectángulo en la Figura IV.6 a y b. Se analizaron todos los *spots* de proteínas marcados con círculo rojo en la figura IV.6. En la Tabla IV.9 se detalla la identificación de esas proteínas.



**Figura IV.6.** Electroforesis en gel 2-D de fracciones solubles de los cultivos de la cepa *S. paucimobilis* 20006FA en a) glucosa y b) fenantreno a las 96 horas de incubación. Los spots marcados en círculo rojo se analizaron por MALDI-TOF/TOF (MS/MS).

Los spots de proteínas que fueron identificados en el gel del cultivo en glucosa pertenecieron principalmente a proteínas del metabolismo general de la cepa 20006FA (Tabla IV.9). Bajo la influencia de fenantreno se pudieron identificar 15 proteínas diferenciales (Figura IV.6) que mostraron similitud con proteínas de otras cepas de la familia *Sphingomonadaceae*. Se incluyeron una *NahA1f* (la subunidad alfa de naftaleno dioxygenasa; spot 29, clasificada como clase B), una catecol 2,3-dioxigenasa (spot 8), una *BphA1d* (2,3-dihidroxibifenil 1,2-dioxigenasa; spot B), dos glutatión S-transferasas (spots U y 24), y enzimas de la vía metabólica baja, 2-hidroximucónico semialdehído hidrolasa (spots 12, 17 y 26), 4-oxalocrotonato descarboxilasa (spot 11), entre otras (Tabla IV.9).

Las proteínas reguladas positivamente involucradas en la degradación de fenantreno incluyen las enzimas de la vía catabólica superior (spots 6, 7, 11, 27, 29, 31, B), de la vía catabólica inferior (spots 8, 10, 12, 17, 26) y otras enzimas involucradas en la desintoxicación celular (spots U y 24). La mayoría de las enzimas que se sobreexpresaron en fenantreno corresponden a enzimas de la vía de degradación de PAH.



**Figura IV.7.** Electroforesis en gel 2-D de fracciones solubles de los cultivos en fenanreno de la cepa *S. paucimobilis* 20006FA luego de a) 24 horas y b) 96 horas. Los *spots* marcados se analizaron por MALDI-TOF/TOF (MS/MS): círculos blancos: proteínas diferenciales en cada condición; círculos rojos: proteínas presentes en ambas condiciones. El recuadro negro marca una zona diferencial en la degradación a los distintos tiempos de incubación.

Teniendo en cuenta la cinética de la formación de AHN, determinamos las condiciones de cultivo óptimas para la comparación de los proteomas de la cepa 20006FA durante la degradación de fenanreno en 24 y 96 horas. En los geles de la figura IV.7, se observaron diferencias significativas entre los perfiles de proteínas de los cultivos en los distintos tiempos. En la condición de 96 horas (Figura IV.7 b) se observó un mayor número de *spots* y de mayor intensidad que en el gel correspondiente a las 24 horas (Figura IV.7 a). La mayoría de estas proteínas se remarcán con el recuadro de la figura IV.7 b.

Los *spots* marcados con círculos blancos y rojos fueron analizados por MALDI-TOF/TOF (MS/MS). Los círculos blancos corresponden a proteínas diferenciales en cada condición y los círculos rojos a proteínas presentes en ambas condiciones, algunos coincidentes con el gel de la Figura IV.6 b.

Utilizando el software Artemis, se pudo evidenciar que todos los *spots* de proteínas que pudieron identificarse también coincidieron con un gen dentro del genoma de la cepa 20006FA (Tablas IV.5 y IV.10).

Spot	Descripción de Proteínas	GLU	FEN	FEN	NCBI no.	Migración Teórica		Score	Cobertura (%)	CDS	
			24 h	96 h		M (Da)	PI			Start	Stop
1	chaperonin GroEL [Sphingomonas sp. SKA58]	✓	✓	✓	gi 94497512	52427	5.15	138	36	3E+06	3E+06
3	ribosomal protein S1 [Sphingomonas sp. SKA58]	✓			gi 94497990	61616	5.01	89	32	5E+06	5E+06
4	Chaperone DnaK [Sphingomonas sp. SKA58]	✓			gi 94496879	67507	4.77	173	7	3E+06	3E+06
5	DNA-directed RNA polymerase, alpha subunit [Sphingomonas sp. SKA58]	✓			gi 94496225	37939	4.94	115	28	5E+06	5E+06
13	3-hydroxybutyrate dehydrogenase [Sphingomonas wittichii RW1]	✓			gi 14855633	27479	6.51	150	26	2E+06	2E+06
19	dihydrolipoamide succinyl transferase [Sphingomonas sp. SKA58]	✓			gi 94496913	43776	5.33	68	5	4E+06	4E+06
21	electron transfer flavoprotein alpha-subunit [Sphingomonas sp. SKA58]	✓			gi 94498756	31569	4.98	237	10	4E+06	4E+06
A	succinyl-CoA synthetase subunit alpha [Sphingobium]			✓	gi 49032167	29976	5.51	62	5	4E+06	4E+06
B	2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase [Sphingobium chungbukense]		✓	✓✓	gi 4007893	33421	5.54	120	10	3E+06	3E+06
F	ATP synthase subunit alpha [Sphingomonadaceae]			✓	gi 29401266	54727	5.60	188	40	5E+06	5E+06
J	ring-hydroxylating dioxygenase large subunit [uncultured bacterium]			✓	gi 40671820	35464	5.64	164	12	4E+06	4E+06
L	BphA1d (Biphenyl dioxygenase large subunit)[Sphingomonas sp. LH128]			✓	gi 15834688	47324	5.57	173	19	3E+06	3E+06
M	MULTISPECIES: (2Fe-2S)-binding protein [Sphingomonadaceae]			✓	gi 49610361	47477	5.31	92	35	3E+06	3E+06
P	ubiquinone biosynthesis protein UbiD [Novosphingobium]		✓	✓✓	gi 50024628	52942	5.17	103	10	4E+06	4E+06
6	4-hydroxy-2-oxovalerate aldolase [Sphingomonas chungbukensis]		✓	✓	gi 4007416	37010	5.10	181	42	3E+06	3E+06
7	Putative 2-hydroxy-benzylpyruvate aldolase [Sphingomonas sp. P2]		✓	✓	gi 28971850	35759	5.12	187	15	3E+06	3E+06
8	catechol 2,3-dioxygenase [Sphingomonas agrestis]		✓	✓✓	gi 151128	34543	5.11	337	82	3E+06	3E+06
10	2-hydroxypent-2,4-dienoate hydratase [Sphingomonas chungbukensis]		✓	✓	gi 2316027	28142	5.09	354	32	3E+06	3E+06
11	4-oxalocrotonate decarboxylase [Sphingomonas chungbukensis]		✓	✓✓	gi 4091975	27280	5.02	147	57	3E+06	3E+06
12	2-hydroxymuconic semialdehyde hydrolase [Sphingobium chungbukense]			✓	gi 1923245	31340	5.40	178	63	3E+06	3E+06
17	XylF (2-hydroxymuconic semialdehyde hydrolase) [Sphingomonas sp. LH128]		✓	✓	gi 15834688	30953	5.50	311	26	3E+06	3E+06
18	translation elongation factor [Sphingomonas sp. SKA58]	✓	✓✓	✓	gi 94498474	42980	5.21	85	31	3E+06	3E+06
24	glutathione S-transferase [Sphingobium chungbukense]		✓	✓	gi 15834688	21470	5.34	156	51	3E+06	3E+06
26	2-hydroxymuconic semialdehyde hydrolase [Sphingobium chungbukense]		✓	✓✓	gi 1923245	27695	5.28	178	87	3E+06	3E+06
27	acetaldehyde dehydrogenase (acylating) [Sphingobium chungbukense]			✓✓	gi 4007415	33138	5.64	241	80	3E+06	3E+06
28	dihydrolipoamide dehydrogenase [Sphingobium japonicum UT26S]		✓		gi 29401241	48666	5.68	148	32	4E+06	4E+06
29	NahA1f (naphthalene dioxygenase alpha subunit) [Sphingomonas sp. LH128]			✓	gi 15834689	52139	5.47	162	39	4E+06	4E+06
31	benzaldehyde dehydrogenase [Sphingobium chungbukense]			✓	gi 6136053	54650	5.98	270	51	3E+06	3E+06
C	acetaldehyde dehydrogenase [Sphingobium sp. C100]		✓	✓	gi 56604342	34452	5.28	86	34	3E+06	3E+06
R	glutamate-cysteine ligase, partial [Xanthomonas euvesicatoria]		✓✓		gi 73344497	27612	5.29	86	16		
U	BphK (glutathione S-transferase) [Sphingomonas sp. LH128]		✓	✓✓	gi 2316034	21518	5.52	148	63	3E+06	3E+06

**Tabla IV.9.** Proteínas identificadas mediante MASCOT (Alto score y/o una alta cobertura de secuencia). Proteínas con algoritmo de coincidencia en MASCOT con scores iguales o superiores a 62 son significativas ( $p < 0,05$ ). Blanco: pertenecientes al metabolismo central. Gris: pertenecientes a la vía de degradación de fenantreno. ✓: Corresponde a proteínas expresadas en cada condición. ✓✓: Corresponde a proteínas sobreexpresadas en cada condición \*:

Ciertas proteínas sobreexpresadas se encontraron en los cultivos a las 24 horas con respecto a los niveles presentes a las 96 horas; pero sólo dos de estas proteínas pudieron identificarse, una glutamato-cisteína ligasa (Spot R) y una glutatión S-transferasa (GST; Spot U; Figura IV.7 y Tabla IV.9)

Mientras que algunas proteínas pertenecientes a la vía de degradación de fenantreno se encontraron ya expresadas en la condición de 24 horas, muchas se sobreexpresaron a las 96 horas (Figura IV.7 b). Entre las enzimas sobreexpresadas a las 96hs se encontró una subunidad alfa de dioxigenasas hidroxilantes de anillo aromático (spot J) que clasificó como

clase A en RHObase, indicando que interviene en el ataque de fenantreno (primer paso de la ruta; 1); una 2,3-dihidroxibifenil 1,2-dioxigenasa (*spot B*) y una *NahA1f* (*spot 29*) clasificadas como clase B, que podría catalizar los pasos 10 y 15, la bifenil dioxigenasa (*BphA1*) (*spot L*) y

proteínas de unión (2Fe-2S) (*spot M*) clasificadas como clase C, que catalizarían los pasos 19 y 21, la catecol 2,3-dioxigenasa, clasificada como EXDO I, que catalizaría los pasos 22 y 23 (Figura IV.8 y Tabla IV.9); una 4-oxalocrotonato descarboxilasa (*spot 11*), una 2-hidroxi muconato hidrolasa (*spot 12*), una acetaldehído deshidrogenasa (*spot 27*), una benzaldehído deshidrogenasa (*spot 31*) y otras enzimas del metabolismo general como una subunidad alfa de la succinil-CoA sintetasa (*spot A*) y la proteína de biosíntesis de ubiquinona UbiD (*spot P*) (Tabla IV.9 y Figura IV.7).

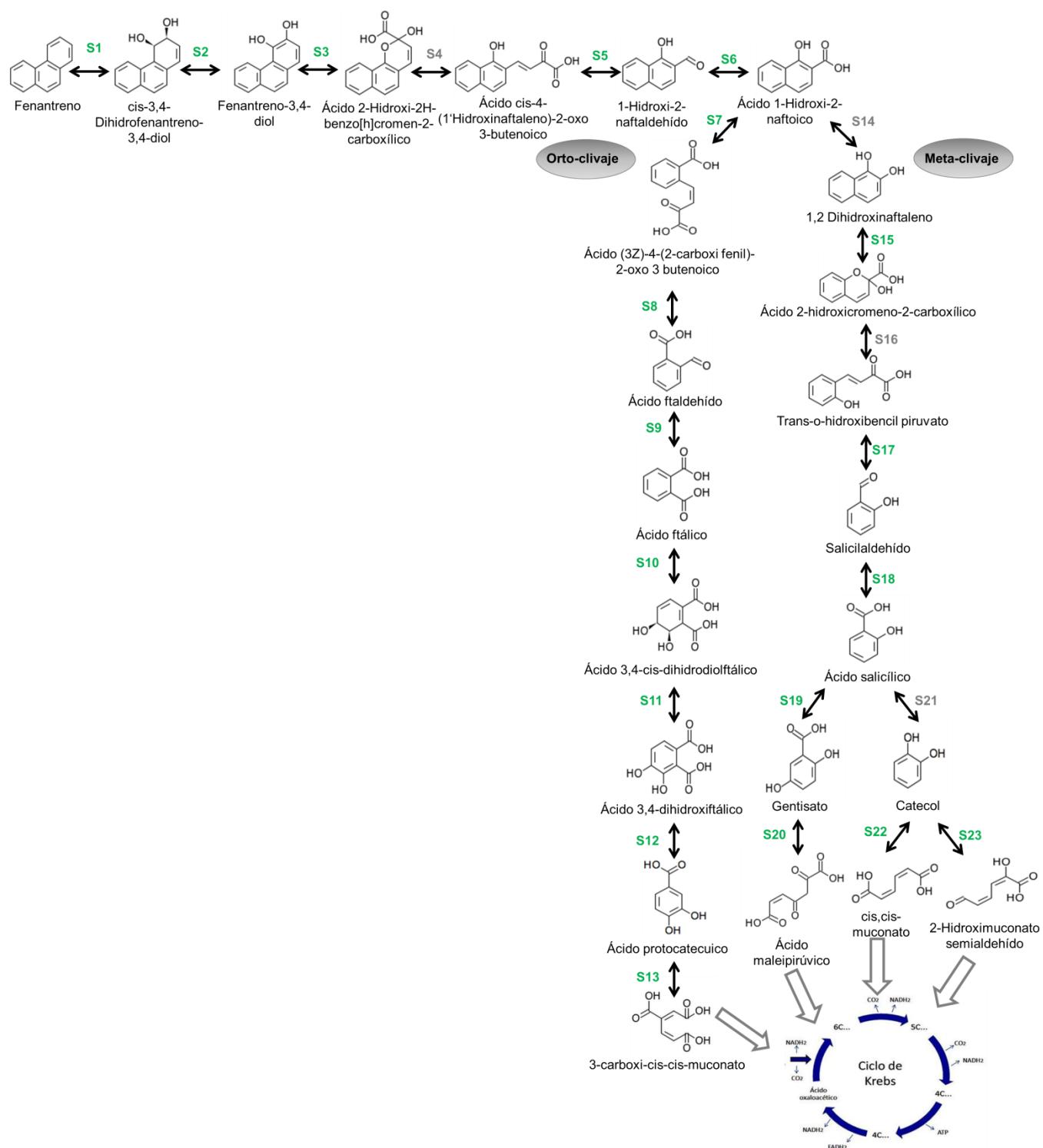
Muchas de las enzimas de la vía baja se expresaron en ambos tiempos estudiados durante la degradación (*spots 6, 7, 10, 17 y C*) (Tabla IV.9). Estas observaciones se deben probablemente a una regulación compleja que controla la expresión de los genes catabólicos implicados en la degradación de los PAH en la cepa 20006FA, lo que sugiere una tasa creciente de expresión a medida que avanza el tiempo de exposición al contaminante.

En la tabla IV.10 se integraron los resultados de la información del genoma de 20006FA, la ruta propuesta para la degradación de fenantreno con los diferentes pasos y el análisis de las proteínas, indicando que genes y *spots* de proteínas pueden estar actuando en los diferentes pasos de la vía superior e inferior de degradación de fenantreno.

Sobre la base de datos genómicos y proteómicos, se confirmaron 19 de los 23 pasos de la ruta completa de degradación del fenantreno en la cepa *S. paucimobilis* 20006FA marcados en verde en la figura IV.8. Estas proteínas incluyeron 10 proteínas para la degradación de fenantreno a AHN; 10 proteínas para la degradación de AHN a salicilato (vía meta-clivaje); 11 proteínas para la degradación de AHN a protocatecuato (vía orto-clivaje) y 3 proteínas que serían responsables de la transformación de salicilato a acetil coenzima A (acetil-CoA) y succinil-CoA. Los resultados coinciden con los CDS asignados en el análisis del genoma descrito en la tabla IV.5.

Pasos enzimáticos	Enzimas predichas de la vía Alta y Baja de degradación de fenantreno en <i>Sphingomonas paucimobilis</i> 20006FA	CDS	Proteínas identificadas (2D-PAGE)
1, 10	aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase alpha and beta subunit (EC 1.14.12.-)	4	J L
1, 3, 7	2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase (EC 1.13.11.39)	1	B 29
1, 3, 10	biphenyl 2,3-dioxygenase (EC 1.14.12.18)	1	B 29 J
2, 11, 18	1,2-dihydroxycyclohexa-3,5-diene-1-carboxylate dehydrogenase (EC 1.3.1.25)	1	31
2, 11, 18	1,6-dihydroxycyclohexa-2,4-diene-1-carboxylate dehydrogenase (EC 1.3.1.25)	1	31
4, 13	maleylacetoacetate isomerase (EC 5.2.1.2)	1	
5, 12, 17	4-carboxymuconolactone decarboxylase (EC 4.1.1.44)	1	11
5	carboxymuconolactone decarboxylase	4	11
5, 8, 17	4-hydroxy-2-oxovalerate aldolase (EC 4.1.3.39)	3	6, 7
6, 18	aldehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.3)	4	27 C
8	carboxymuconolactone decarboxylase	5	11
8	4-oxalocrotonate decarboxylase	4	11
9	acetaldehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.10)	12	31 C 27
9	2-hydroxymuconic semialdehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.60)	2	C 27
10	benzoate 1,2-dioxygenase alpha and beta subunit (EC 1.14.12.10)	1	L
10	anthranilate 1,2-dioxygenase small subunit (EC 1.14.12.1)	2	L
10, 19	naphthalene 1,2-dioxygenase		29
13, 15, 20	homogentisate 1,2-dioxygenase (EC 1.13.11.5)	1	8 B 29
14, 19	salicylate hydroxylase (EC 1.14.13.1)	1	
16	muconolactone delta-isomerase (EC 5.3.3.4)	1	
16, 13	muconate cycloisomerase (EC 5.5.1.1)	1	
17	2-keto-4-pentenoate hydratase (EC 4.2.1.80)	2	10
18	5-carboxymethyl-2-hydroxymuconate semialdehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.60)	2	27
21	salicylate hydroxylase (EC 1.14.13.1)	1	
22, 23	catechol 2,3-dioxygenase (EC 1.13.11.2)	2	8
22	catechol 1,2-dioxygenase (EC 1.13.11.1)	2	8
*	(2Fe-2S)-binding protein	15	M

**Tabla IV.10.** Enzimas predichas en la cepa *S. paucimobilis* 20006FA pertenecientes a la vía de degradación de fenantreno, obtenida utilizando RAST, KEGG y NCBI. CDS: número de secuencias de codificación para cada proteína en el genoma. \*: Componente de los complejos dioxigenasas que actúan en diferentes pasos de la vía. En blanco se marcan los pasos de la vía que fueron identificados por secuencia genómica y en gris los pasos identificados también por análisis proteómico.



**Figura IV.8.** Ruta de degradación de fenantreno, basada en el análisis del genoma y el proteoma propuesta para *S. paucimobilis* 20006FA. Gris: Enzimas predichas a partir del genoma. Verde: enzimas identificadas por 2-DE MALDI-TOF/TOF (MS / MS).

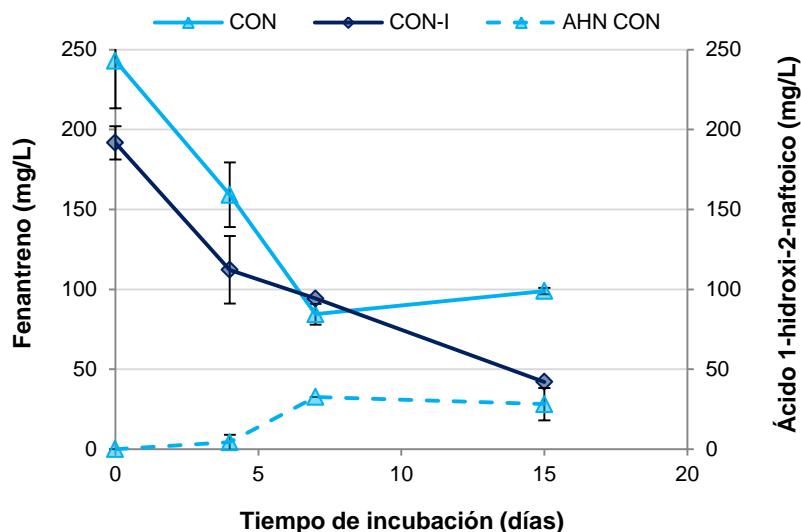
**IV.3.2 Construcción de un consorcio conformado por el consorcio natural CON y la cepa *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA**

Se construyó el consorcio inoculando CON-I, a partir del consorcio natural CON y la cepa *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA. Se prepararon cultivos conteniendo  $1.10^6$  ufc/ml del consorcio reactivado (CON) y la misma proporción de la cepa 20006FA en MML con 200 mg/L del hidrocarburo como única fuente de carbono y energía. Sobre los cultivos se estudió la cinética de degradación de fenantreno, la composición bacteriana mediante recuentos de bacterias heterótrofas cultivables y degradadoras de PAH, los cambios producidos en la estructura y diversidad de especies en CON-I producidos por la inoculación con la cepa mediante pirosecuenciación, y el metaproteoma. También se evaluó la capacidad de degradación de AHN en los dos consorcios y cambios en la estructura durante la degradación del mismo (recuentos y DGGE). Se estudió el espectro de degradación de diferentes PAH y la estructura bacteriana de los consorcios en esos hidrocarburos.

Este nuevo consorcio CON-I nos permitió, continuar con el estudio de la competitividad de la cepa 20006FA como inoculante bacteriano, ahora en un consorcio, para establecer su grado de participación en el flujo central de carbono y energía durante la degradación de fenantreno, como también evaluar el potencial de CON-I como inoculante para ser utilizado en procesos de biorremediación de suelos contaminados con PAH.

**IV.3.2.1 Cinética comparativa de degradación de fenantreno y generación de AHN en CON y CON-I**

Con el fin de comparar el comportamiento de los dos consorcios frente a la degradación de fenantreno se estudió la cinética de CON-I en MML suplementado 200 mg/L de fenantreno a diferentes tiempos (0, 4, 7 y 15 días de incubación) y se relacionó con la de CON (Festa y col. 2013). En la figura IV.9 se puede observar que, si bien al día 7 el porcentaje de fenantreno degradado es similar en ambos consorcios y cercano al 50%, CON-I logró eliminar el 78% luego de 15 días de incubación, lo que resulta significativamente mayor ( $P<0.05$ ) a la eficiencia de degradación de CON, que degradó el 59% (Figura IV.9).



**Figura IV.9.** Concentración de fenantreno y producción de ácido 1-hidroxi 2-naftoico (AHN) en cultivos de CON y CON-I en MML suplementados con 200 mg/L de fenantreno a los 0, 4, 7 y 15 días de incubación. Se grafican los valores promedio de tres réplicas biológicas y su respectiva desviación estándar.

Cuando se cuantificó la concentración de AHN durante la degradación de 200 mg/L de fenantreno en cultivos de CON, se observó un incremento del metabolito intermedio durante los primeros 7 días de incubación llegando a un valor aproximado de  $28 \pm 10$  mg/L, que luego se mantuvo constante hasta el día 15 (Figura IV.9), mientras que en CON-I no se evidenció acumulación.

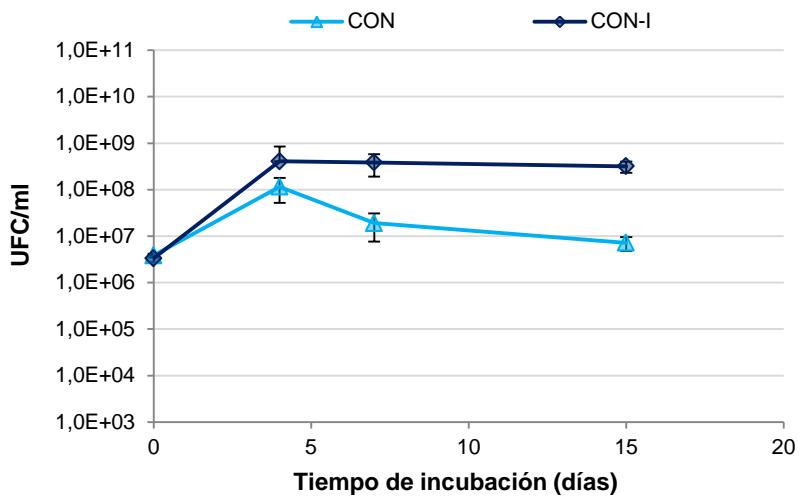
#### **IV.3.2.2 Efecto de la inoculación con la cepa *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA sobre la dinámica de las poblaciones cultivables del consorcio durante la degradación de fenantreno**

El efecto producido por la inoculación sobre la dinámica de las poblaciones cultivables se determinó analizando los cambios en la densidad de las poblaciones bacterianas heterótrofas cultivables en R2A y degradadoras de hidrocarburos en ambos consorcios.

##### **IV.3.2.2.a Recuento de bacterias heterótrofas totales en CON y CON-I**

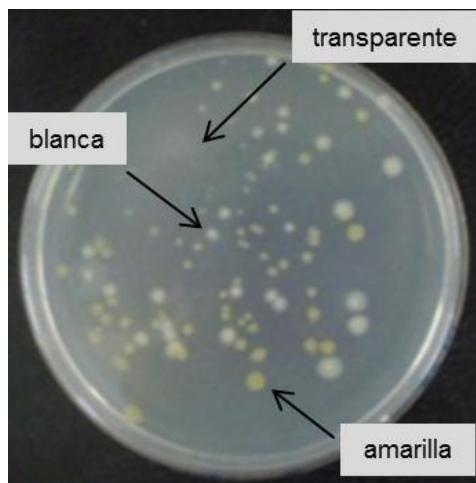
La figura IV.10 muestra la evolución de las poblaciones bacterianas heterótrofas cultivables determinadas por recuento en placas de R2A para CON y CON-I durante 15 días. La inoculación con la cepa 20006FA provocó un aumento significativo en los recuentos de bacterias heterótrofas cultivables que se mantuvo durante todo el ensayo. En CON se

observa que el número de bacterias heterótrofas totales aumentó durante los primeros días de incubación, mostrando su máximo valor el día 4. A partir de ese momento se produce un decaimiento de dos órdenes en el número de colonias hasta el final del ensayo. En CON-I, el comportamiento es similar hasta el día 4 de incubación, alcanzando un orden de magnitud mayor que en CON, que se mantiene constante hasta el final del ensayo, superando a CON en hasta dos órdenes de magnitud.



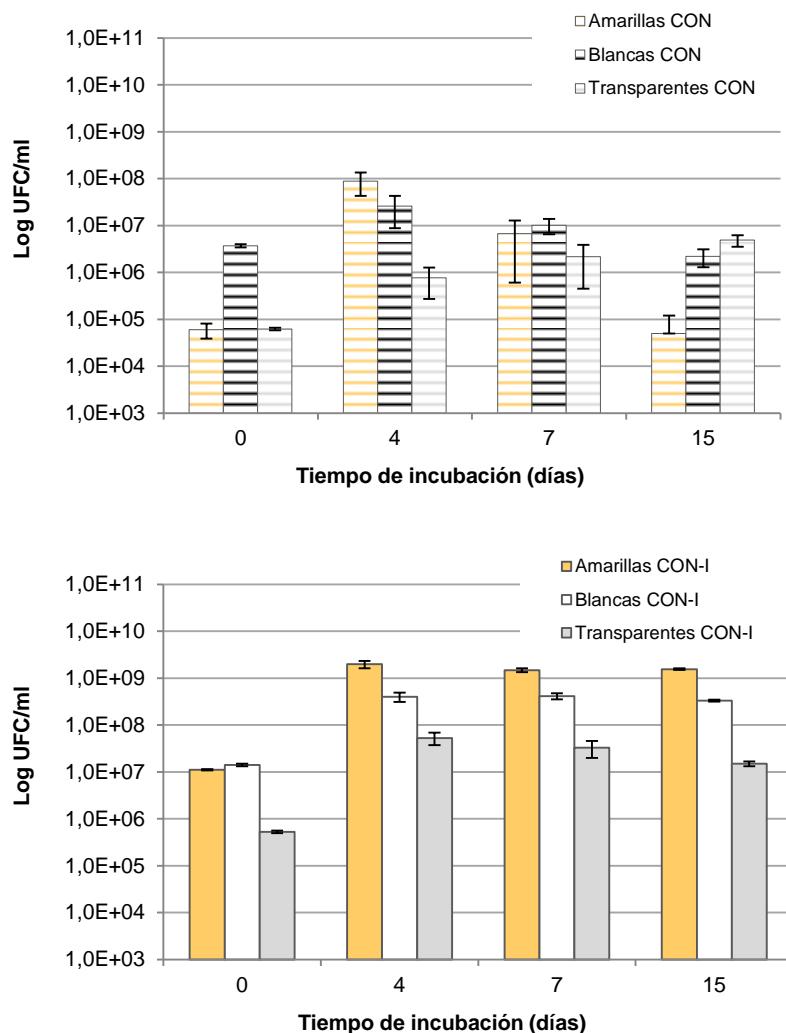
**Figura IV.10.** Recuento en R2A de bacterias heterótrofas totales en cultivos de CON y CON-I en MML suplementados con 200 mg/L de fenanreno durante 15 días de incubación. Se grafican los valores promedio de tres réplicas biológicas y su respectiva desviación estándar.

Durante la realización de los recuentos en CON y CON-I se observó la presencia de 3 morfotipos de colonias diferentes, que se muestran en la figura IV.11.



**Figura IV.11.** Fotografía del recuento de poblaciones heterótrofas cultivables en pacas de R2A en los distintos morfotipos encontrados.

Se llevó a cabo también un recuento diferencial para cada uno de los tipos de colonias presentes durante la degradación de fenantreno. En la figura IV.12 se observó que en CON durante la etapa de degradación de fenantreno el día 4 (Figura IV.9), el consorcio mostró un predominio de colonias amarillas, seguidas en número por las blancas, mientras que las transparentes mostraron el menor recuento. A partir del día 7, cuando la degradación de fenantreno se detuvo, la proporción de los distintos morfotipos es similar en cambio al finalizar el ensayo se observó una importante disminución en las colonias amarillas y un leve incremento en el recuento de colonias transparentes, por lo que la relación entre los distintos morfotipos se invierte (transparente>blancas>>amarillas). En CON-I se observó claramente que el número de colonias de los 3 morfotipos fue mayor que en CON durante todo el ensayo. Asimismo, en CON-I a partir del día 4 y hasta el final del ensayo se mantiene una relación constante entre los distintos morfotipos, siendo las colonias amarillas mayores a las blancas, y estas mayores a las transparentes.

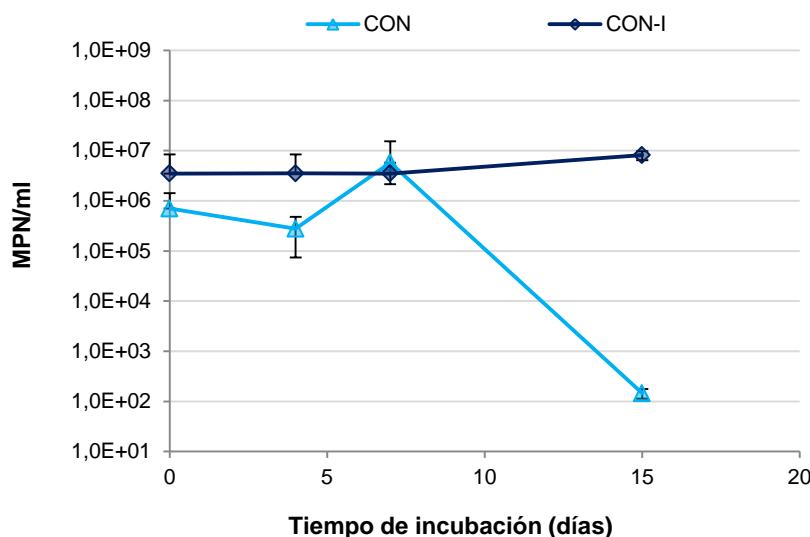


**Figura IV.12.** Recuento diferencial en R2A de bacterias heterótroficas cultivables para los distintos morfolitos encontrados en cultivos de CON y CON-I en MML suplementados con 200 mg/L de fenanreno durante 15 días de incubación. Se grafican los valores promedio de tres réplicas biológicas y su respectiva desviación estándar.

#### IV.3.2.2.b Recuento de bacterias degradadoras de PAH en CON y CON-I

La evolución de las poblaciones degradadoras de PAH de CON y CON-I fue monitoreada durante todo el tratamiento utilizando el método del NMP. En el gráfico de la figura IV.13 se observa que CON presentó un máximo valor de recuento a los 7 días de incubación y luego sufrió una disminución hacia los 15 días, alcanzando valores menores a los iniciales en 4 órdenes de magnitud. Este comportamiento podría relacionarse con el de las colonias amarillas del recuento diferencial de bacterias heterótroficas cultivables (Figura IV.12).

En CON-I se observó que el número de bacterias degradadoras de PAH se mantuvo constante durante todo el ensayo. Este comportamiento se observó también a partir del día 4 en el recuento de bacterias heterótrofas totales (Figura IV.10). Al final del ensayo, CON-I presentó un recuento de cinco órdenes superior a CON (Figura IV.13).



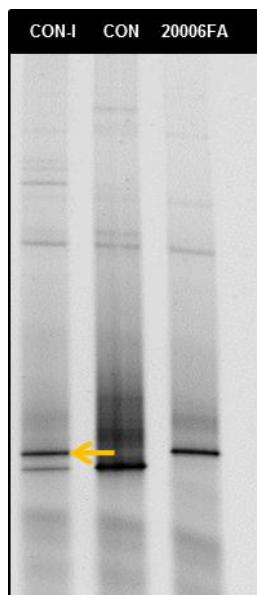
**Figura IV.13.** Recuento de bacterias degradadoras de PAH en los cultivos de CON y CON-I durante 15 días de incubación. Se grafican los valores promedio y las desviaciones estándar de tres réplicas biológicas.

#### IV.3.2.3 *Efecto de la inoculación con la cepa 20006FA sobre la estructura y diversidad del consorcio natural CON mediante métodos moleculares*

##### IV.3.2.3.a *Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE)*

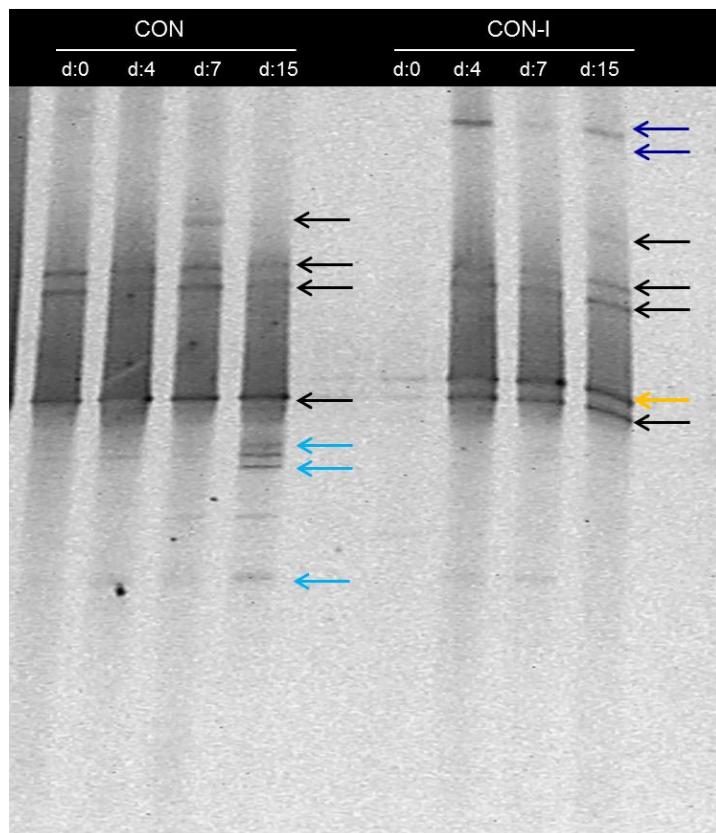
Con el objetivo de estudiar la estructura y la dinámica del consorcio inoculado también por métodos moleculares, se llevó a cabo una PCR con primers específicos para una porción del gen 16S rRNA, a partir del DNA de CON y CON-I a distintos tiempos durante la degradación de fenanreno. Para realizar comparaciones se incluyó el DNA de la cepa 20006FA. Con los productos de amplificación se realizó la electroforesis en gel con gradiente desnaturizante con un porcentaje de urea y formamida de 40-70%.

En primer lugar, se analizó la PCR-DGGE de la cepa 20006FA, CON y CON-I para identificar las bandas correspondientes a la inoculación y al consorcio. En la primera calle de la figura IV.14 (CON-I), se observó claramente la banda correspondiente a la cepa inoculada 20006FA (marcada con una flecha amarilla), confirmando el establecimiento de la misma dentro del consorcio natural CON.



**Figura IV.14.** Análisis por PCR-DGGE de los cultivos de CON-I, CON y la cepa *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA en MML suplementados con 200 mg/L de fenantreno luego de 15 días de incubación.

Para investigar los cambios en la diversidad genética de CON-I, se realizó la DGGE de las muestras correspondientes a los 4 tiempos monitoreados durante la degradación de 200 mg/L fenantreno (0, 4, 7 y 15 días). Para realizar las comparaciones se incluyó el DNA de CON durante la degradación de fenantreno a los mismos tiempos de incubación. En la figura IV.15 se observó notoriamente en CON-I la banda correspondiente a la cepa 20006FA hasta el final del ensayo. Asimismo, se observan algunas bandas que comparte con CON (flechas negras) y dos nuevas bandas que se encuentran en mayor intensidad el día 7 y 15 de incubación (flechas azules). Al comparar los perfiles obtenidos a partir de CON y CON-I a los 4 tiempos monitoreados durante la degradación de fenantreno, se observó que la comunidad en CON-I se mantuvo constante durante todo el ensayo, mostrando que no hay dinámica, como también fue observada a nivel de cultivables. En cambio, en CON se muestra una dinámica en las poblaciones a lo largo de los días, donde aparecen principalmente el día 15 tres bandas (flechas celestes) que no se observaron antes. Esto indicaría que la inoculación con la cepa 20006FA produce cambios en la estructura bacteriana de CON, con el establecimiento de una comunidad con una menor dinámica durante la degradación de fenantreno.



**Figura IV.15.** Análisis por PCR-DGGE de los cultivos de CON y CON-I en MML suplementados con 200 mg/L de fenantreno a lo largo de los 15 días de incubación.

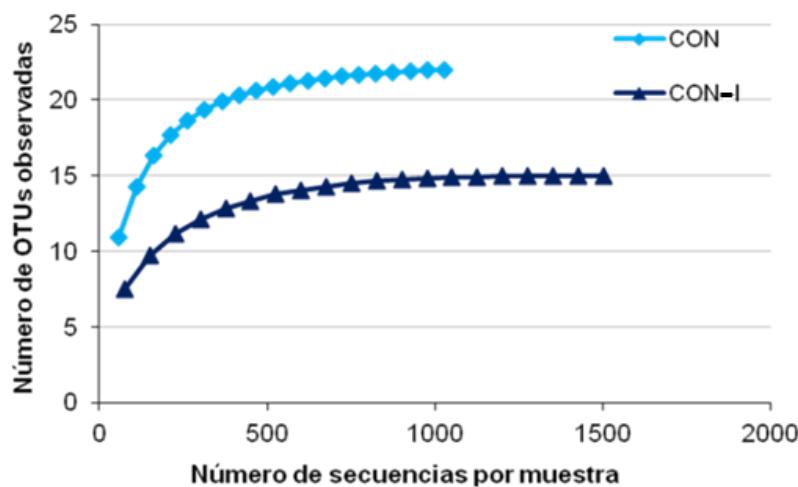
#### IV.3.2.4 Pirosecuenciación del DNA total de CON y CON-I

Para conocer la composición detallada y las abundancias relativas de las distintas poblaciones presentes en CON-I y ver los cambios que produjo la inoculación comparándola con la composición de CON previamente analizada por Festa y col. (2016a), se realizó la pirosecuenciación de los fragmentos de PCR del gen 16S rRNA a partir del DNA total de CON-I extraído el día 4 de incubación. La pirosecuenciación generó un total de 1501 secuencias filtradas que se agruparon en 15 OTUs (de las siglas en inglés *operational taxonomic units*) considerando un mínimo de 97% de similitud. Todas las secuencias representativas de cada OTU se clasificaron dentro del dominio Bacteria y filo Proteobacteria (Alpha, Gamma y Beta con 84%, 3,8% y 12,2% de las lecturas respectivamente). La curva de rarefacción obtenida (Figura IV.16) muestra que el número de secuencias recuperadas fue suficiente para cubrir la diversidad presente en CON-I. Dicho resultado se confirma mediante el valor del índice de Good, que informa sobre la cobertura del análisis (Tabla IV.11). Cuando su valor se acerca a 1.0 indica que las secuencias

obtenidas para cada biblioteca representan a la mayoría de las secuencias bacterianas presentes en la muestra (Rungrassamee y col., 2013).

Para evaluar la diversidad de CON-I se utilizó una familia de índices de diversidad desarrollada por Mark Hill (Hill, 1973), llamada Números de Hill. Los números de Hill ( $qD$ ) están definidos por un orden “ $q$ ” (Gotelli y Chao, 2013), este parámetro determina la sensibilidad de la medida a las abundancias relativas de las especies (Chiu y Chao, 2014). Los números de Hill más utilizados son; la riqueza de especie ( $^0D$ ), el exponencial de entropía de Shannon ( $^1D$ ) y la inversa del índice de Simpson ( $^2D$ ).

Los números que se muestran en la tabla IV.11 presentan valores correspondientes a comunidades con una baja de riqueza de especies ( $^0D$ ) y con pocas especies muy dominantes ( $^2D$ ).



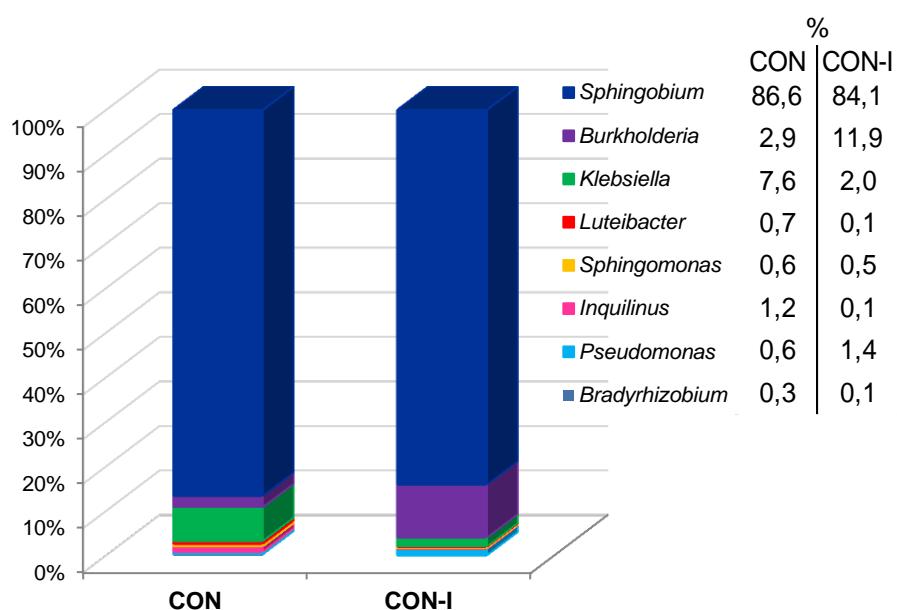
**Figura IV.16.** Análisis de rarefacción indicando el número de OTUs observados en la muestra del DNA de CON y CON-I construido con los datos de pirosecuenciación utilizando software EstimateS.

	Número de secuencias	Número de OTUs	Números de Hill			índice de Good
			$^0D$	$^1D$	$^2D$	
CON	996	21	22	1.51	2.24	0.99
CON-I	1501	15	15	1.29	2.49	0.99

**Tabla IV.11.** Parámetros de diversidad obtenidas por el análisis de los datos de pirosecuenciación del consorcio y el consorcio inoculado y valor de índice de Good.

Se pudo observar una disminución en la riqueza de especies causada por la inoculación que se demuestra por un valor más bajo del número de Hill  $^0D$  (Tabla IV.11). Las curvas de rarefacción que estiman la riqueza confirmaron esta diferencia (Figura IV.16).

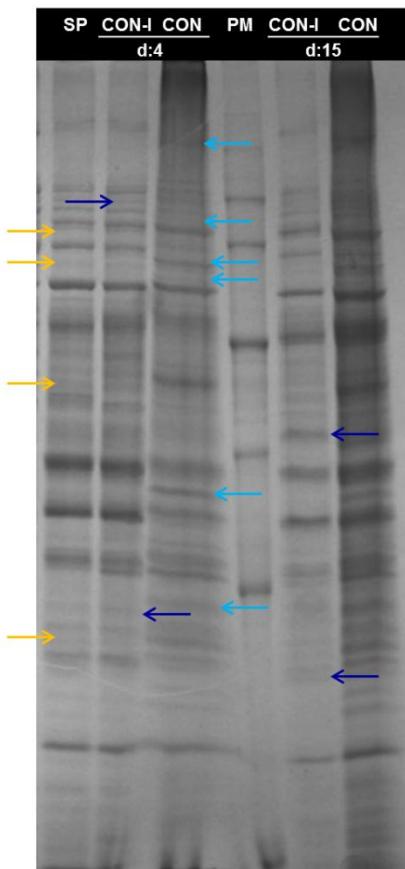
Como se observa en el gráfico de la figura IV.17, CON-I mostró un incremento en el porcentaje de secuencias pertenecientes a *Burkholderia* (11,9%) con respecto a CON (2,9%), a expensas de una disminución en el porcentaje de las secuencias de *Klebsiella* (2,0%) en relación con CON (7,6%); mientras que las secuencias pertenecientes a la familia *Sphingomonadaceae* (*Sphingomonas* y *Sphingobium*) se mantuvieron constantes (84,4% CON-I y 87,1% CON).



**Figura IV.17.** Frecuencia relativa a nivel de género bacteriano encontrados en los cultivos de CON y CON-I durante la degradación de 200 mg/L de fenantreno el día 4 de incubación mediante pirosecuenciación.

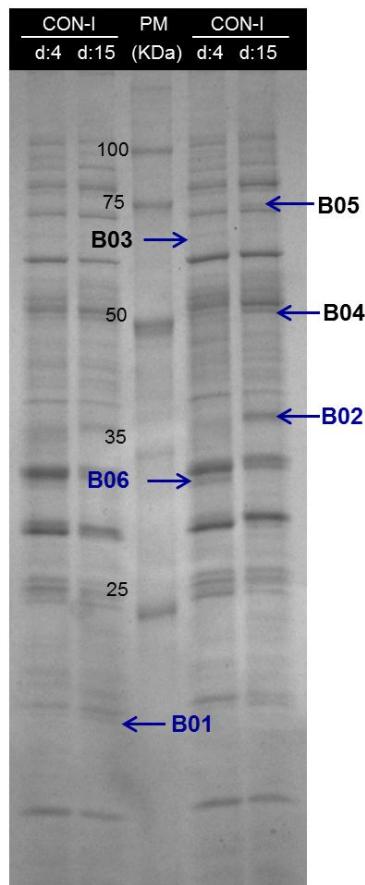
#### IV.3.2.5 Estudio del metaproteoma de CON y CON-I mediante SDS-PAGE durante la degradación de fenantreno

Para intentar dilucidar el rol de los distintos integrantes del consorcio inoculado (CON-I) durante la degradación de fenantreno se comenzó con el estudio de la expresión de proteínas específicas en respuesta a la utilización de fenantreno como única fuente de carbono y energía y se comparó con el metaproteoma de CON y de la cepa inoculada. En un primer intento, se realizaron geles bidimensionales (2-DE) para obtener el perfil de masas de péptidos. La baja concentración de proteínas obtenida a partir de los consorcios, no permitieron la identificación de spots mediante el análisis por MALDI-TOF/TOF (MS/MS).



**Figura IV.18.** Electroforesis en gel de poliacrilamida (12% SDS-PAGE) de las fracciones solubles de proteínas de cultivos de CON y CON-I en MML suplementados con 200 mg/L de fenanreno. Calle PM: marcador de peso molecular; SP: 20006FA; calle 2 y 5: fracción soluble de proteínas de CON-I a los 4 y 15 días de incubación respectivamente; calle 3 y 6: fracción soluble de proteínas de CON a los 4 y 15 días de incubación respectivamente.

Se continuó el estudio comparativo del metaproteoma a través de geles SDS-PAGE. El análisis del metaproteoma de la figura IV.18, realizado para CON, CON-I y 20006FA a los 4 y 15 días de incubación, mostró que la inoculación con la cepa 20006FA produjo la desaparición de numerosas bandas correspondientes a proteínas en el gel SDS-PAGE, mostradas con flechas celestes, en comparación con los perfiles proteicos de CON-I, y la aparición de otras que corresponderían a la cepa inoculada (flechas amarillas). En adición se observaron diferencias entre los perfiles de CON-I a los diferentes tiempos de incubación (flechas azules).



**Figura IV.19.** Electroforesis en gel de poliacrilamida (12% SDS-PAGE) de las fracciones solubles de proteínas de cultivos de CON-I en MML suplementados con 200 mg/L de fenantreno. Calle PM: marcador de peso molecular; calle 1: 20006FA; calle 2 y 3: fracción soluble de proteínas de CON-I a los 4 y 15 días de incubación respectivamente. Con flechas se marcan las bandas cortadas para el análisis por MALDI TOF/TOF (MS/MS).

Se realizó un nuevo gel SDS-PAGE (Figura IV.19) sembrando el CON-I a los 4 y 15 días de incubación en fenantreno y por duplicado. Se cortaron de este gel 6 bandas específicas, señaladas como B01 a B06, que se expresaron diferencialmente en CON-I bajo la condición de fenantreno a los dos tiempos estudiados. Se procedió a la identificación de esas bandas mediante MALDI-TOF/TOF (MS/MS) y los resultados se muestran en la Tabla IV13. No se pudieron identificar todas las proteínas analizadas, pero entre ellas se encontraron las proteínas B01 y B02 con alta similitud con una naftaleno dioxigenasa (NahA2f) y una alcohol deshidrogenasa, pertenecientes a la familia *Sphingomonadaceae*. La banda B06 correspondió a una proteína Chaperona GroEL, perteneciente a *Sphingomonas wittichii* RW1.

Proteína	Descripción de proteínas	Especies	Nº de acceso (Mascot)	Migración teórica M(Da)
<b>B01</b>	Naftaleno dioxygenasa (NahA2f)	<i>Sphingomonas</i> sp. LH128	158346891	20806
<b>B02</b>	Alcohol deshidrogenasa	<i>Sphingomonas</i> sp. LH128	146275507	38861
<b>B03</b>	No identificada			
<b>B04</b>	No identificada			
<b>B05</b>	No identificada			
<b>B06</b>	Chaperona GroEL	<i>Sphingomonas wittichii</i> RW1	495099009	35973

**Tabla IV.12.** Listado de proteínas identificadas de las bandas cortadas en SDS-PAGE analizados por MALDI-TOF/TOF (MS/MS).

Estas enzimas podrían participar en algunos pasos de la ruta de degradación de fenantreno de *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA (Figura IV.8). La enzima B01 podría actuar en los pasos 1, 3, 10 y 15, mientras que la enzima B02 actuaría en los pasos 2, 11 y 18 (Figura señalador).

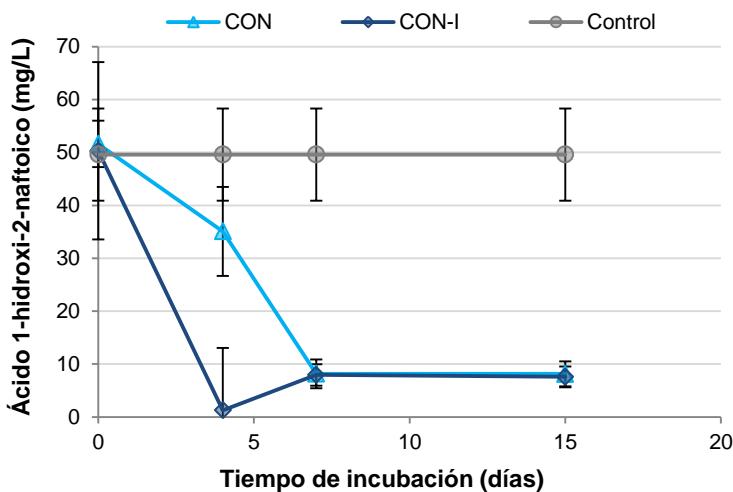
Esta información indicaría que la inoculación logra la sobreexpresión de proteínas relacionadas con la ruptura inicial del anillo de fenantreno, pertenecientes a la familia *Sphingomonadaceae*.

#### IV.3.2.6 Degradación de ácido 1-hidroxi-2-naftoico de CON y CON-I

Como la diferencia más notable entre CON y CON-I se observó a nivel de la acumulación de AHN, se estudió la capacidad de degradación de dicho compuesto por parte de los consorcios.

Se prepararon cultivos suplementados con AHN exógeno (50 mg/L), que no resultó tóxica para la cepa inoculada 20006FA (Tabla IV.3), y se monitoreó la capacidad de degradarlo por parte de CON y CON-I durante 15 días.

En la figura IV.20 se puede observar que el día 4 el CON-I degradó un  $95 \pm 14\%$  de AHN mientras que CON sólo un  $30 \pm 4\%$ . A partir del día 7 hasta el final del ensayo los dos consorcios mostraron porcentajes de eliminación muy semejantes.

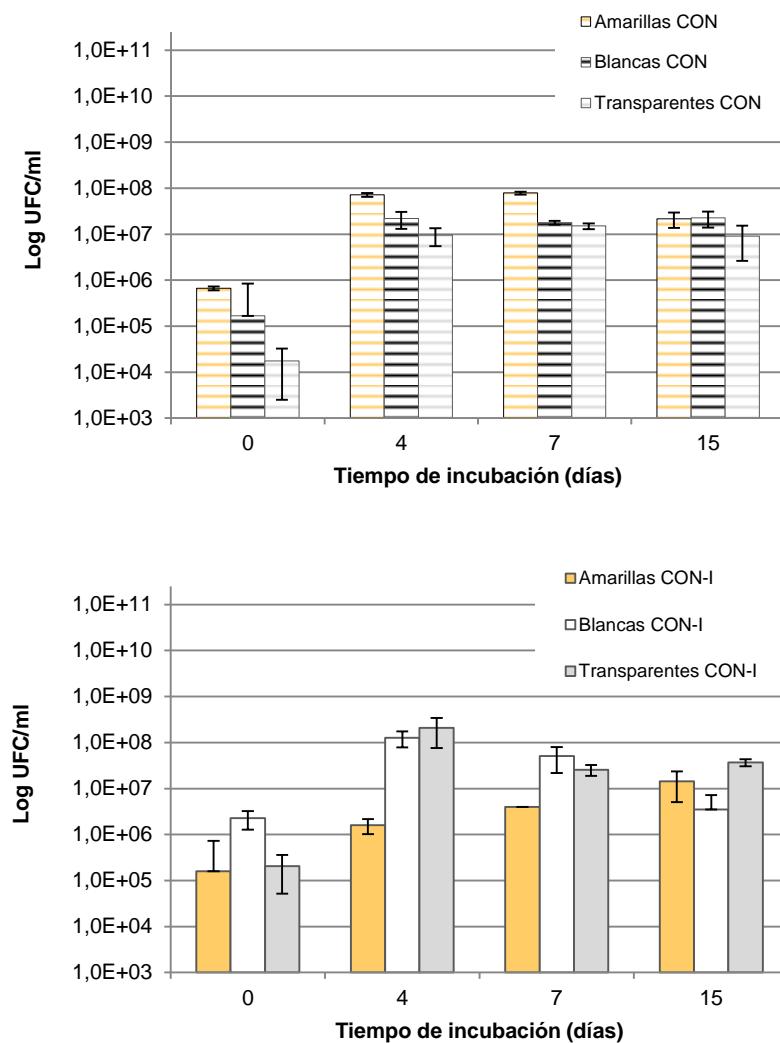


**Figura IV.20.** Concentración de AHN en cultivos de CON y el CON-I en MML suplementados con 50 mg/L de ácido 1-hidroxi-2-naftoico a los 0, 4, 7 y 15 días de incubación. Se grafican los valores promedios y las desviaciones estándar de tres réplicas biológicas.

A pesar de que en los cultivos de CON en fenantreno, el AHN se acumulaba, este resultado demuestra que cuando el único sustrato es el AHN, las células son capaces de degradarlo.

#### IV.3.2.6.a Recuento de bacterias heterótrofas totales en ácido 1-hidroxi-2-naftoico

Durante la realización del recuento de bacterias heterótrofas en cultivos con AHN como única fuente de carbono y energía se observó la presencia de 3 tipos de colonias diferentes en base a las características morfológicas macroscópicas, colonias amarillas, blancas y transparentes, lo que nos permitió observar una dinámica diferencial entre CON y CON-I causada por la inoculación con la cepa 20006FA.

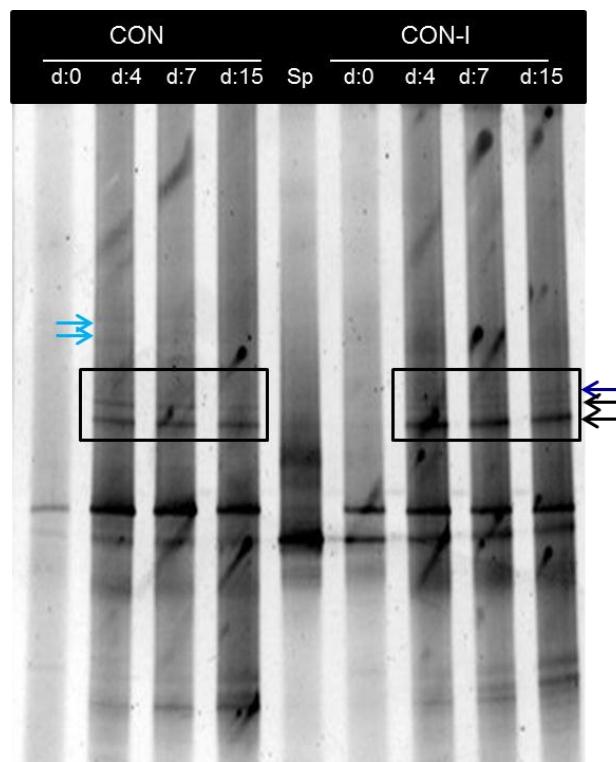


**Figura IV.21.** Recuento diferencial en R2A de bacterias heterótrofas cultivables para los distintos morfotipos encontrados en cultivos de CON y CON-I en MML suplementados con 50 mg/L de AHN durante 15 días de incubación. Se grafican los valores promedios y las desviaciones estándar de tres réplicas biológicas.

En la figura IV.21 se observa que en los cultivos de CON los recuentos de todos los morfotipos aumentan durante los primeros 4 días de incubación y luego no hubo cambios significativos hasta el final del ensayo, siendo el morfotipo de colonia amarilla el que predomina en todos los tiempos. En CON-I la proporción de colonias blancas y transparentes aumenta el día 4, donde se observa su máximo valor, concordando con el pico de mayor degradación del AHN (Figura IV.20). Las colonias amarillas aumentan hacia el final del ensayo, cuando no se evidencia degradación de AHN, igualando los valores de los otros morfotipos.

#### IV.3.2.6.b Evaluación de la estructura y dinámica bacteriana de los consorcios durante la degradación de AHN

Con el objetivo de analizar la estructura de la comunidad bacteriana de CON y CON-I durante la degradación de AHN se realizó la extracción de DNA total a partir de cultivos en MML con 50 mg/L de AHN, a los 0, 4, 7 y 15 días de incubación.



**Figura IV.22.** Análisis por PCR-DGGE de los cultivos de CON, CON-I y 20006FA en MML suplementados con 50 mg/L de ácido 1-hidroxi-2-naftoico durante 15 días de incubación.

En la figura IV.22 del gel de DGGE se observa en los perfiles de los dos consorcios (CON y CON-I) una banda que se ubica en la misma posición del gel que la banda correspondiente a la cepa inoculada 20006FA (Calle: Sp), en los cuatro tiempos monitoreados la banda es más intensa en CON-I. Es interesante ver en los dos consorcios, como a partir del día 4, aparecen dos bandas (flechas negras) que no se observan el día 0 de ambos tratamientos, y que permanecen hasta el final del ensayo. Se observan pocas bandas diferenciales entre los dos consorcios. En CON aparecen dos bandas el día 4 (flechas celestes) que no se observaron en el resto de los tiempos monitoreados y en CON-I, una banda diferencial a CON (flecha azul), que aparece el día 4 y continúan hasta el final del ensayo. Tal como se observó en el recuento diferencial (Figura IV.21) a partir del día 4 de incubación no se

observaron cambios significativos en la composición de CON y CON-I hasta el final del ensayo.

#### **IV.3.2.7 Determinación del espectro de degradación de CON y CON-I**

##### **IV.3.2.7.a Degradación de distintos Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos**

Se prepararon cultivos de CON y CON-I en distintos PAH (200 mg/L de antraceno, dibenzotiofeno, fluoreno y pireno), se incubaron durante 15 días y se determinó el porcentaje de degradación (Tabla IV.13).

PAH	% de degradación	
	CON	CON-I
Antraceno	-	19 ± 3
Dibenzotiofeno	24 ± 2	38 ± 8
Fluoreno	-	-
Pireno	-	-

**Tabla IV.13.** Porcentaje de degradación de los cultivos de CON y CON-I en MML suplementados con 200 mg/L en diferentes PAH luego de 15 días de incubación. -: no detectado.

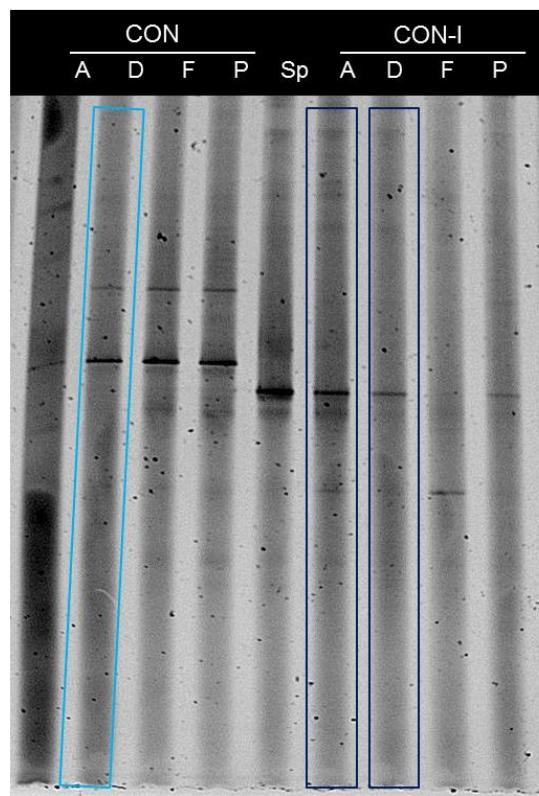
Los perfiles degradativos de PAH fueron diferenciales, siendo más amplio el de CON-I que presentó mayor eficiencia de degradación de dibenzotiofeno ( $38 \pm 8\%$ ) con respecto a CON ( $24 \pm 2\%$ ) y degradó antraceno ( $19 \pm 3\%$ ) que no fue observado en CON. Tanto para fluoreno como pireno no se detectó degradación en ninguno de los consorcios.

##### **IV.3.2.7.b Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE)**

Se estudió la estructura de CON y CON-I en los cultivos de los diferentes PAH (antraceno: A; dibenzotiofeno: D; fluoreno: F y Pireno: P) luego de 15 días de incubación. La Figura IV.23 muestra los resultados obtenidos a partir de PCR-DGGE donde se observó en ambos consorcios una baja diversidad bacteriana.

En CON la comunidad fue similar para los cuatro hidrocarburos, sin observarse cambios en el perfil de DGGE para dibenzotiofeno, fluoreno y pireno. En la Figura IV.23 en las calles correspondientes a CON-I, se observó que el número de bandas para antraceno y dibenzotiofeno (recuadros azules) resultó mayor que para fluoreno y pireno. Los

hidrocarburos que presentan más bandas fueron los únicos PAH donde se detectó degradación por HPLC (Tabla IV.13).



**Figura IV.23.** Análisis por PCR-DGGE de los cultivos de CON y CON-I en MML suplementados con 200 mg/L de antraceno, dibenzotifeno, fluoreno y pireno a los 15 días de incubación. A: Antraceno, D: Dibenzotifeno, F: Fluoreno, P: Pireno, Sp: cepa 20006FA.

Estos resultados muestran que la cepa inoculada se estableció en los cultivos con antraceno (A) y dibenzotifeno (D), con lo que concuerda con el potencial de degradación de la cepa pura. La ausencia de la banda correspondiente a la cepa 20006FA en los perfiles de los cultivos en fluoreno (F) y pireno (P), indica que el establecimiento de la misma depende de su participación en el flujo del carbono.

#### IV.4 Discusión

El uso de estrategias de bioaumento para el tratamiento de suelos contaminados debe ser antecedido por una serie de ensayos de laboratorio y estudios en microcosmos, a fin de evaluar la capacidad de los microorganismos seleccionados de colonizar el suelo y degradar el contaminante. Se hace necesario entonces adoptar una perspectiva ecológica, lo que permitirá profundizar en principio generales, teorías microbiológicas y aplicaciones prácticas del fenómeno de invasión (inoculación) (Mallon y col., 2015).

El género *Sphingomonas* incluye muchas cepas que son atractivas como resultado de sus diversas adaptaciones ambientales y sus capacidades para degradar xenobióticos y contaminantes recalcitrantes, entre ellos los PAH (Zhao y col., 2017b; Khara y col., 2014; Dong y col., 2014; Stolz, 2009; Vandermeer y Daugulis, 2007). A pesar del aumento en el número de compuestos aromáticos que se sabe que son biodegradados por las *Sphingomonas*, muchos aspectos críticos de su metabolismo aún no se conocen, incluidos los metabolitos intermedios de las vías de degradación, la evolución y dispersión de los grupos de genes relacionados con la degradación y los mecanismos reguladores (Zhao y col., 2017a).

Estudios previos de la cepa *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA, demostraron que posee varios de los rasgos deseables para la degradación de PAH, siendo candidata adecuada para procesos de bioaumento en suelos (Coppotelli y col., 2008). En este capítulo, con el objetivo de diseñar consorcios con alta eficiencia de biodegradación para el desarrollo de estrategias de bioaumento de suelos contaminados con PAH, se inoculó la cepa 20006FA en un consorcio natural degradador (CON). En primer lugar y con el fin de mejorar nuestra comprensión del proceso biológico y dilucidar la ruta completa de degradación de fenantreno, se realizó un enfoque que incluía estudios fisiológicos, genómicos y proteómicos sobre 20006FA.

En un trabajo publicado por Zhao y col. (2017a), donde se realizó un análisis genómico comparativo de 26 cepas de *Sphingomonas* y *Sphingobium* se sugirió, por ejemplo, que las cepas BHC-A y EPA505 se deben colocar en el género *Sphingobium* en lugar de *Sphingomonas*. Reevaluamos si la secuenciación y afiliación taxonómica del gen 16S rRNA de *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA (GenBank: DQ400860.1) es un *Sphingobium*. La reclasificación taxonómica realizada por NCBI, dio como resultado una actualización en el nombre del organismo del genoma WGS a *Sphingobium* sp. 20006FA. Sin embargo, por cuestiones de coherencia con los trabajos publicados anteriormente con esta cepa, decidimos seguir utilizando el término *Sphingomonas* “*sensu latu*” para referirnos a esta cepa. La denominación amplia “*sensu latu*” se aplica para nombrar a bacterias pertenecientes al género *Sphingomonas*, el cual presenta 4 subgéneros propuestos por

Takeuchi y col. (2001), denominados *Sphingobium*, *Novosphingobium*, *Sphingopyxis* y *Sphingomonas (sensu stricto)*.

Para profundizar en el conocimiento de los mecanismos involucrados en la degradación de fenantreno por 20006FA, se procedió a la secuenciación del genoma (Tabla IV.4), y en base a la asignación de la función de los genes putativos, se analizaron los diferentes pasos de las vías de degradación del hidrocarburo. El resultado indicó que se podía asignar al menos un CDS a cada uno de los pasos enzimáticos requeridos para la ruta completa de degradación del fenantreno y predijo la existencia de una ruta catabólica completa (Tabla IV.10 y Figura IV.8). La herramienta del servidor localizado en el sitio RHObase (Chakraborty y col., 2014) nos permitió asignar un paso de la ruta de degradación de fenantreno a algunas enzimas de 20006FA (Tabla IV.6). Las enzimas dioxigenasas hidroxilantes de anillo aromático encontradas, participarían principalmente de la ruptura del anillo (primer paso de la ruta), la enzima benzoato 1,2-dioxigenasa, atacaría sustratos carboxilados como el benzoato, que pueden ser generados por la descarboxilación del ftalato, producto formado por el orto clivaje de anillos aromáticos durante la degradación de PAH de bajo peso molecular (Mallick y col., 2011). Las enzimas benzoato dioxigenasas permiten la formación de catecol a partir de benzoato (Das y Chandran, 2011, Mallick y col., 2011), lo cual sugiere la participación de estas enzimas en la activación de la vía baja de degradación. También algunas enzimas identificadas tienen especificidad por compuestos como salicilato y antranilato, intermediarios de la vía baja de degradación de PAH (Mallick y col., 2011; Habe y Omori., 2003), que permitirían la conversión de salicilato a catecol o gentisato, para luego entrar al ciclo de Krebs.

Si bien las rutas catabólicas involucradas en la degradación aeróbica de compuestos aromáticos son diversas, comúnmente producen intermediarios de reacción derivados del catecol (Kasuga y col., 2007). Las enzimas EXDO permiten el clivaje de estos intermediarios, reacciones claves en la degradación de PAH (Suenaga y col., 2014). Mediante AromaDeg, se identificaron dos enzimas, catecol 2,3-dioxigenasa y 2,3-dihidroxibifenil 1,2-dioxigenasa, pertenecientes a la familia EXDO I que atacarían compuestos bicíclicos y monocíclicos (Tabla IV.7). Tanto las secuencias de enzimas hidroxilantes de anillo aromático como las EXDO, han sido utilizadas como marcadores funcionales para estimar el potencial biodegradativo de comunidades bacterianas (Vilchez-Vargas y col., 2013; Brennerova y col., 2009).

Los datos proteómicos obtenidos para 20006FA, permitieron la identificación de enzimas que catalizan 19 pasos requeridos para la degradación de fenantreno a intermedios que ingresan al ciclo de Krebs (Figura IV.8). Entre las proteínas sobreexpresadas se encontraron enzimas que intervienen en el ataque inicial de fenantreno (enzimas hidroxilante de anillo aromático). Asimismo, se confirmó la presencia y expresión de algunas enzimas, como

naftaleno 1,2-dioxigenasa, bifenil dioxigenasa y antranilato 1,2-dioxigenasa (Tablas IV.10), que pueden atacar el ftalato; enzimas como homogentisato 1,2-dioxigenasa y 2,3-dihidroxibifenilo 1,2-dioxigenasa (Tabla IV.10) actuarían sobre el ácido protocatecuico, todas pertenecientes a la vía del orto-clivaje para la degradación de fenantreno. Los genes de la vía del orto-clivaje han sido bien caracterizados en otras especies (Iwabuchi y Harayama, 1998, 1997), pero sólo fueron descriptos previamente en dos cepas de *Sphingomonas* (Thiel y col., 2005; Kohler, 1999). Conjuntamente, enzimas como 4-hidroxi-2-oxovalerato aldolasa y 4-carboximucronolactona descarboxilasa actuarían sobre el salicilaldehído de la ruta del meta clivaje (Tabla IV.10).

En estudios previos se evidenció a nivel fisiológico que 20006FA podría degradar de manera eficiente el fenantreno, mediante la vía del meta clivaje, a AHN y ácido salicílico como principales productos metabólicos (Coppotelli y col., 2010) (Figura señalador). Diferentes autores han reportado iguales resultados para otras otras especies de la familia *Sphingomonadaceae* (Zhao y col., 2017b; Ban y col., 2016; Roy y col., 2012; Pinyakong y col., 2000). Si bien se conoce que las *Sphingomonas* podrían seguir las vías del orto o metaclivaje (Cerniglia y Yang, 1984; Gibson, 1984), hay pocos estudios que demuestren que presentan activas las dos vías para la degradación de fenantreno. Un trabajo de enfoques fisiológicos y ómicos realizado por Lyu y col. (2014) en la cepa *Novosphingobium pentaromaticivorans* US6-1, una bacteria marina aislada de sedimentos lodosos, sugirió que la degradación de PAH podía seguir la ruta del o-ftalato o la vía del salicilato, hasta el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) (Lyu y col., 2014), y un análisis de caracterización fenotípica realizado por Segura y col. (2017) sobre una cepa de *Novosphingobium* sp. HR1a mostró que crece en una amplia gama de posibles intermediarios de la vía de degradación de fenantreno, como salicilato, protocatecuato y o-ftalato. En los resultados obtenidos para 20006FA, los estudios proteómicos (Figuras IV.6 y IV.7 y Tabla IV.9) y fisiológicos (Tabla IV.2 y Figura IV.3) aportaron claras evidencias de que la cepa podría tener activa las dos vías.

En cuanto a la disposición de los genes catabólicos, se encontraron dispersos en todo el genoma, como se ha observado para otras *Sphingomonas* (Zhao y col. 2017a; Demaneche y col., 2004; Pinyakong y col., 2003; Romine y col., 1999), en contraste con la estructura organizada en operones regulada coordinadamente de los genes en *Burkholderia*, *Pseudomonas* y *Rhodococcus* (Khara y col., 2014). En cambio las bacterias del género *Sphingomonas* exhiben una organización flexible de genes (diferentes combinaciones con algunos grupos de genes conservados), cuya plasticidad contribuiría a la versatilidad catabólica, a través de ajustes rápidos y eficientes ante la presencia de nuevos compuestos (Zhao y col., 2017a; Basta y col., 2005). Otros estudios sobre cepas de *Sphingomonas* degradadoras de PAH indicaron que ciertos genes catabólicos se localizaron en plásmidos

(Basta y col., 2005). Las similitudes de secuencia observadas entre los genes *phn* (genes catabólicos de fenantreno) de la cepa 20006FA y los genes *bph* (genes catabólicos de bifenilo) correspondientes encontrados en el plásmido pNL1, parece informar que la disposición genética es la misma. Estos genes, junto con los genes de la vía superior, otorgan la capacidad de degradar naftaleno, fenantreno, antraceno y bifenilos hasta compuestos intermediarios del ciclo de Krebs (Habe y Omori., 2003, Pinyakong y col., 2003). Otras proteínas inducidas por fenantreno encontradas en los extractos celulares de 20006FA (Tabla IV.11) exhibieron una alta similitud de secuencia con los productos génicos encontrados en pNL1, incluyendo una *xyl/Q* (acetaldehído deshidrogenasa; *spot C*), *nahE* (2-hidroxi-bencilpiruvato aldolasa; *spot 7*) y *bphK* (glutatión S-transferasa; *spot U*). Los grupos *bph* y *xyl*, también presentes en el plásmido pNL1 se encontraron en los genomas de otras cepas degradadoras de PAH que pertenecen al grupo de *Sphingomonas* “*sensu latu*” como la cepa *Sphingobium* sp. C100 (Dong y col., 2014) y *Sphingobium yanoikuya* B1 (Zhao y co., 2017b y 2015). Un estudio de nuestro laboratorio realizado por Starevich (2016), utilizando métodos de extracción y purificación de ADN plasmídico, confirmó la presencia de megaplásmidos en la cepa 20006FA. En *S. paucimobilis* 20006FA como en otras *Sphingomonas* (Segura y col., 2017; Zhao y col., 2017a y 2015), se localizaron grupos de genes flanqueados por elementos IS (Figura IV.5), que promueven la transferencia de los genes y proporcionan funciones metabólicas periféricas. La transferencia de grandes plásmidos responsables de la degradación de los PAH se ha observado en cepas *Sphingomonas* y *Sphingobium* (Basta y col., 2004). Algunos autores han sugerido que si se lleva a cabo la estrategia de bioaumento mediante la inoculación con microorganismos que poseen elementos genéticos móviles (como plásmidos y transposones) portando genes degradativos, estos serían transferidos horizontalmente a las poblaciones bacterianas indígenas contribuyendo a la remediación (Top y col., 2002; Weekers y col., 2001).

Cuando 20006FA se cultivó en MML con fenantreno como única fuente de carbono, pudo degradar eficientemente el 52,9% del fenantreno presente en una concentración inicial de 2 g/L en 20 días (Coppotelli y col., 2010), 60% con una concentración inicial de 0,84 g/L en 15 días y más de 98% cuando la concentración fue de 0,2 g/L también en 15 días (Figura IV.2 a y Tabla IV.1), mostrando mayor eficiencia de degradación cuando la concentración de fenantreno fue menor. Estos resultados concuerdan con los de Waigi y col. (2015), que también han observado que la concentración de un contaminante como el fenantreno juega un papel crítico en el crecimiento bacteriano y, como consecuencia, podría producir menores tasas de degradación a concentraciones más altas de contaminante. Además, una acumulación de metabolitos de fenantreno puede conducir a una toxicidad que afecta el crecimiento celular (Zhao y col., 2008; Yuan y col., 2000), siendo uno de los factores responsable en la inhibición de la degradación de PAH (Kazunga y Aitken, 2001). Algunos

reportes en cepas de *Sphingomonas* mostraron que concentraciones de 100 ppm o menos de AHN favorecieron un crecimiento más rápido, en comparación con las concentraciones superiores a 100 ppm (Waigi y col., 2015).

Se sabe que varios metabolitos podrían inhibir la biodegradación sobre diferentes PAH, probablemente debido a la competencia de las enzimas involucradas en la oxidación y el transporte, la acumulación de subproductos citotóxicos y el bloqueo de la inducción enzimática (Kim y col., 2004; Van Hamme y col., 2003; Bouchez y col., 1995).

Junto con la degradación de fenantreno, observamos que la cepa acumuló AHN, alcanzando valores mayores cuanto más alta era la concentración inicial de fenantreno (Figura IV.2 b y Tabla IV.1), lo que podría causar la disminución de la velocidad de degradación del compuesto. Asimismo, a la mayor concentración de fenantreno, la cepa no consigue degradar el metabolito, mientras que a la concentración más baja (0,2 g/L), no se detectó AHN al final del ensayo (Tabla IV.1). Resultados similares han sido encontrados en otra cepa de la familia *Sphingomonadaceae*, *Novosphingobium* sp. HR1a, seleccionada por la excelente capacidad de degradar PAH en suelos, donde se produjo una acumulación transitoria de AHN en cultivos líquidos suplementados con baja concentración de fenantreno (0,1 g/L), que no se detectó hacia el final del experimento (6 días) (Segura y col. 2017). El AHN se ha considerado uno de los intermedios metabólicos cruciales en la degradación del fenantreno (Ghosal y col., 2010; Mallick y col., 2007; Keum y col., 2006). Postulamos que la presencia de AHN endógeno en altas concentraciones, podría haber inhibido la degradación de fenantreno. Cuando se estudió la degradación de AHN (0,05 g/L) presente en los cultivos como única fuente de carbono y energía, la cepa degradó eficientemente el metabolito (Tabla IV.2), alcanzando un 94% de eliminación después de 15 días. Sin embargo, a concentraciones crecientes de AHN (> a 0,14 g/L), se observó un aumento de la fase de latencia junto con una inhibición del crecimiento (Martínez, 2010). En este trabajo, las concentraciones de AHN acumulado durante la degradación de fenantreno en concentraciones altas, alcanzaron y hasta superaron concentraciones de 0,14 g/L (Tabla IV.1). De hecho, a las 96 horas, el momento en que se muestra una disminución en la velocidad de degradación de fenantreno (Figura IV.2 a), la acumulación de AHN alcanzó esa concentración límite (Figura IV.2 b), a partir de la cual comienza a ser tóxica para la cepa.

A pesar de que se ha considerado a la ruta del meta clivaje como la vía principal de degradación del AHN por las cepas de *Sphingomonas* (Roy y col., 2012; Pinyakong y col., 2000) hasta el momento, no se han encontrado claras evidencias de cuales serían la/s enzimas responsables de esa reacción que resulta un paso clave en la biodegradación de fenantreno por bacterias Gram-negativas, y que se indica en el paso 14 de la figura IV.8 presentada para 20006FA. Hasta ahora, se ha propuesto que tanto la hidroxilación de salicilato como la conversión de AHN en 1,2-dihidroxinaftaleno serían catalizadas por la

enzima salicilato hidroxilasa (Cho y col., 2005; Balashova y col., 2001). En un trabajo realizado por Pinyakong y col. (2003), hallaron tres enzimas salicilato 1-hidroxilasas isofuncionales en la cepa *Sphingobium* sp. P2, que constan de 3 componentes (hidroxilasa, ferredoxina y ferredoxina reductasa), sugiriendo que se requieren los tres componentes para el catabolismo de fenantreno en esta cepa. Sin embargo, las tres isoenzimas salicilato 1-hidroxilasas de la cepa P2 no pudieron catalizar la conversión de 1-hidroxi-2-naftoato a 1,2-dihidroxinaftaleno, como si se demostró en una cepa de *Pseudomonas putida* BS202-P1 (Balashova y col. 2001).

Por otro lado, Jouanneau y col. (2007) purificaron la enzima salicilato hidroxilasa y encontraron que el AHN no era un sustrato, sino que inducía la oxidación de NADH a una velocidad elevada en una reacción desacoplada que, a su vez, podía inhibir la degradación de PAH. Observaron una inhibición de la hidroxilación de salicilato por la presencia del AHN y postularon que esa inhibición podría ser perjudicial para las células bacterianas que crecen en hidrocarburos policíclicos aromáticos. El salicilato es un intermediario de varios PAH y su hidroxilación puede ser un cuello de botella si se ve sometida a inhibición metabólica. Se necesitan más esfuerzos para identificar inequívocamente en *Sphingomonas* la enzima responsable de la hidroxilación de AHN, que es un paso esencial en el catabolismo de fenantreno (Jouanneau y col., 2007), y que podría ser un punto en la regulación en la cepa 20006FA. En nuestro estudio, a pesar de no encontrar la salicilato hidroxilasa en los resultados del proteoma, incluimos esa enzima en la ruta de degradación de la Figura IV.8 en función de la ubicación genética y la confirmación funcional de la actividad enzimática, ya que el salicilato fue degradado por esta cepa (Coppotelli y col., 2010) (Tablas IV.2 y IV.5).

Dado que en nuestro estudio la acumulación de AHN que ocurre durante la degradación de fenantreno dificulta su eliminación, se intentó esclarecer qué procesos regulatorios ocurren en los tiempos claves de degradación y eliminación. El patrón de inducción de proteínas varió entre las 24 y 96 horas de exposición al fenantreno. El mayor número de enzimas que participan en la degradación se expresaron a las 96 horas (Figura IV.7 y Tabla IV.9), a pesar que el AHN se acumuló a ese tiempo (Figura IV.2 b). La enzima aldehído deshidrogenasa, que actúa en el paso 6 de la Figura señalador y que generaría AHN, se encuentra en un alto número de copias en el genoma de 20006FA (Tabla IV.5). Estas enzimas están ampliamente distribuidas en organismos vivos y están involucradas en la desintoxicación de los aldehídos tóxicos producidos por varias vías metabólicas celulares, siendo reconocidas como una de las enzimas esenciales para la degradación de muchos hidrocarburos (Sierra-García, 2014). Estas enzimas que catalizan la oxidación irreversible de una amplia gama de aldehídos xenobióticos a sus ácidos correspondientes (Panoutsopoulos y col., 2004) se encuentran generalmente en clusters de genes de degradación de PAH (Sierra-García, 2014; Pérez-Pantoja y col., 2012; Haritash, 2009; Demanèche y col., 2004). En 20006FA se

encontró una acetaldehído deshidrogenasa (*spot C*), cuyo gen presenta alto número de copias (Tabla IV.5), expresada en ambos tiempos y una acetaldehído y benzaldehído deshidrogenasas (*spots 27 y 31*) expresada a las 96 horas, lo que sugieren que podría haber un evento regulador en esta etapa, debido a que la enzima se encuentra inducida por la presencia de altas concentraciones de fenantreno, acumulando una concentración de AHN que la célula no llega a degradar.

Si bien la secuenciación de alto rendimiento ha permitido esclarecer el arsenal genético de las bacterias que degradan hidrocarburos, haciendo factible la anotación proteica y la predicción y reconstrucción de la ruta metabólica, la mera presencia de genes catabólicos putativos en el genoma bacteriano no garantiza la biodegradabilidad en un entorno dado (Perruchon y col., 2017). El estudio de los elementos reguladores junto con el análisis proteómico ofrece una visión dinámica única de la red catabólica en el contexto de la respuesta celular global y la adaptación a la exposición a contaminantes (Perruchon y col., 2017). Los genes de PAH implicados en la misma ruta de degradación del compuesto aromático están específicamente regulados a nivel transcripcional por proteínas reguladoras que se activan por compuestos aromáticos (Fernández y col., 1994). Como se mencionó anteriormente, la regulación de genes para la degradación de compuestos aromáticos en *Sphingomonas* es bastante compleja. Khara y col., (2014) encontraron en *Sphingobium* algunos genes que codifican reguladores transcripcionales que pertenecen a la familia NtrC, los cuales se identificaron muy cerca de los genes que codifican el catabolismo de compuestos aromáticos, no obstante, estos reguladores no pudieron encontrarse en el genoma de la cepa 20006FA (Tabla IV.8), posiblemente porque el genoma está parcialmente secuenciado, y se pudo haber perdido información. Se sabe que los miembros de esta familia activan la ARN polimerasa que contiene el factor sigma alternativo  $\sigma$ 54. Los análisis de las secuencias de la región promotora del plásmido catabólico pNL1 en la cepa F199 sugirieron que los eventos reguladores se modulan a través de la interacción de promotores de este tipo con el factor  $\sigma$ 54 (Romine y col., 1999). Homólogos de estos reguladores se encuentran en muchas *Sphingomonas* que tienen una organización similar de genes degradativos y se ha reportado que estas cepas (*Sphingomonas* sp. P2, *Novosphingobium pentaromativorans* US6-1 y *Sphingobium* sp. PNB) mineralizan con éxito el fenantreno o PAH de alto peso molecular. Reguladores transcripcionales del tipo TetR se encontraron en un alto número de copias (61 CDS) distribuidos en todo el genoma de 20006FA (Tabla IV.8). Tropel y col. (2004) sostienen que estos reguladores están a menudo involucrados en la degradación aromática. Sin embargo, su rol no se ha podido comprobar, ya que se encontró ausente en muchas *Sphingomonas* degradadoras comparadas en otros estudios (Khara y col., 2014).

Teniendo en cuenta que las oxigenasas necesitan componentes de transferencia de electrones para realizar sus conversiones enzimáticas, se encontró una discrepancia numérica entre los spots de las proteínas de enlace 2Fe-2S expresadas en los cultivos de fenantreno (spot M en la Figura IV.7 b y Tabla IV.10). Se ha observado que una copia del gen del componente de transferencia de electrones puede ser compartida por las múltiples oxigenasas terminales para una actividad enzimática completa (Moritz y col., 2004; Pinyakong y col., 2003). Esto es consistente con los hallazgos de Khara y col. (2014) en *Sphingomonas* que reveló que un clado de genes de siete componentes de enzimas hidroxilantes de anillo aromático (RHO) interactúa con un único conjunto de proteínas de transporte de electrones (ET).

En nuestro análisis proteómico sobre la cepa 20006FA, el hecho de que a las 96 horas cuando se frena la degradación de fenantreno, el número de enzimas dioxigenasas encontradas sea mayor (spots B, J, L, M, 8, 29) que a las 24 horas (spots B, 8) sugiere que la regulación de la tasa de degradación del fenantreno ocurre a nivel transcripcional (Figura IV.7 y Tabla IV.9) y por proteínas reguladoras que se activan por compuestos aromáticos (Fernández y col., 1994).

Para lograr un proceso de biorremediación eficiente, es importante encontrar bacterias involucradas en la realización de una vía de degradación completa de manera que los metabolitos potencialmente tóxicos no se acumulen (Kazunga y col., 2001). Si este no es el caso, es importante saber qué metabolitos se espera que se acumulen para que otras cepas capaces de degradar esos metabolitos puedan añadirse si es necesario (Zhao y col., 2008). Si bien hay poca información disponible sobre el destino en el medio ambiente, la biodisponibilidad y los mecanismos de toxicidad para la mayoría de los intermediarios de la degradación de PAH. Algunos metabolitos hidroxilados derivados de los PAH, como 2-hidroxinaftaleno,

2-hidroxibenzofurano, 2-hidroxi-9-fluorenona, 2-hidroxifluoreno, 1-hidroxipireno y 1-hidroxinaftaleno están asociados con un aumento de la inflamación y el estrés oxidativo y pueden causar cambios sistémicos durante el embarazo (Ferguson y col., 2017). Un estudio realizado por Carney y colaboradores en 2008 sobre embriones de peces Medaka (*Oryziaslatipes*) reveló que los cuatro isómeros de AHN poseen toxicidad. Parikha y col. (2004) informaron que el AHN posee menos sorción a sedimentos orgánicos estuarinos a temperatura y pH ambientales, que el fenantreno. Esa menor sorción del AHN reflejaría su mayor polaridad y solubilidad en agua, por lo que los metabolitos de PAH podrían estar más biodisponibles y ser biológicamente más activos que los compuestos parentales. Postularon así que el AHN es /será más tóxico que su compuesto progenitor, el fenantreno (Parikha y col., 2004).

Se sugirió que los co-cultivos de cepas de *Sphingomonas* con otros géneros bacterianos, que permiten actividades metabólicas cooperativas, puedan reducir la concentración de los metabolitos tóxicos de degradación de los PAH (Yuan y col., 2000; Bouchez y col., 1999).

Se estudió el co-cultivo del consorcio microbiano CON y la cepa exógena 20006FA, en el cultivo llamado CON-I. La introducción de microorganismos a un ambiente se considera exitosa cuando la/s especie/s introducida/s presenta/n la capacidad de alterar las interacciones dentro de una comunidad y generar cambios en la estructura de la comunidad e impactos neutrales, benéficos o negativos en el nuevo hábitat (Mallon y col., 2015).

Se observó que el consorcio inoculado resultó ser más eficiente en degradar el contaminante (78%), y además, no acumuló el metabolito intermediario AHN (Figura IV.9). Estos cambios producidos en el consorcio natural fueron causados por la presencia de la cepa 20006FA, que interaccionaría con algunos microorganismos dentro de CON, causando un efecto sinérgico. Efectos similares de sinergia se observaron entre las 5 cepas aisladas de un consorcio degradador del herbicida linuron (Dejonghe y col., 2003). De los 5 aislados sólo uno fue capaz de usar linuron como única fuente de carbono, nitrógeno y energía (la cepa *Variovorax* sp. WDL1), adicionalmente 3 de los otros 4 aislados son capaces de degradar compuestos intermediarios en la ruta de degradación de linuron. La degradación se vio aumentada por una interacción sinérgica cuando la cepa WDL1 fue cultivada con los otros 4 aislados (Dejonghe y col., 2003). Efectos sinérgicos en consorcios también se observaron durante la degradación de fluoreno (Casellas y col., 1998) y de fenantreno (Kim y col., 2009).

En la naturaleza, la biorremediación depende también de las interacciones sinérgicas para la degradación de PAH (Ghazali y col., 2004). Debido a que el AHN es acumulado por la cepa 20006FA y CON, pero no en CON-I, (Figura IV.9), se analizó el comportamiento de los consorcios cultivados con este metabolito como única fuente de carbono. La cinética de degradación de AHN resultó ser similar en CON y CON-I, que degradaron un 84% el día 15. Sin embargo, el día 4, CON-I degrada un porcentaje mucho mayor ( $95 \pm 14\%$ ) que el alcanzado por CON ( $30 \pm 4\%$ ) (Figura IV.20). Es importante considerar que debido a la dinámica observada en CON en el cultivo con fenantreno (Fig. IV.15), la comunidad que no logró degradar el AHN acumulado el día 4 podría ser diferente al inóculo inicial (consorcio activado) sembrado en el medio que contiene AHN como única fuente de carbono.

Durante la degradación de fenantreno, la cepa 20006FA causó cambios en la composición, diversidad y dinámica de CON, observados tanto a nivel cultivable (Figuras IV.9, IV.10 y IV.13) como molecular (Figuras IV.15, IV.17 y IV.18), que podrían ser considerados como un indicio de establecimiento del inoculante.

En CON-I, la degradación de fenantreno que se produjo durante todo el tiempo monitoreado, coincidió con un predominio en las colonias amarillas (característica morfológica de la cepa

20006FA; Figura IV.12) que además siguió el comportamiento de bacterias degradadoras de hidrocarburos (Figura IV.13). De esta manera, el crecimiento neto positivo en colonias (principalmente de morfología de la cepa inoculada) pondría en evidencia una invasión exitosa, donde el invasor se convierte en un residente autóctono (Mallon y col., 2015). Asimismo, el recuento diferencial en AHN mostró una dinámica diferencial entre CON y CON-I causada por la inoculación con la cepa (Figura IV.21).

El espectro de degradación de CON-I coincidió con el de 20006FA (Tablas IV.2, IV.3 y IV.13) y fue diferencial entre los consorcios (Tabla IV.13), siendo más amplio el de CON-I. En todos los perfiles de DGGE (Figuras IV.15, IV.22 y IV.23) se observó en las calles correspondientes a CON-I, la permanencia de la cepa inoculada durante el período de incubación. Se observó en CON-I, una disminución en la diversidad genética durante la degradación (Figura IV.15), que también se reflejó en el valor del índice de Shannon [<sup>1</sup>D] (Tabla IV.11), que podría indicar un desplazamiento de las otras especies por parte de 20006FA. El cambio en la estructura genética mostraría que la inoculación modula la dinámica de CON y que la cepa introducida representa un componente significativo dentro de CON-I. Se ha reportado que los cambios en la composición de una comunidad bacteriana indígena causada por una cepa introducida exógenamente (Yang y col., 2016; Boon y col., 2000) definen el establecimiento de la cepa introducida.

La pirosecuenciación provee información de la estructura y diversidad de una comunidad con alta resolución revelando la presencia de los miembros presentes en baja abundancia (Bohorquez y col., 2012). Los resultados de los estudios de pirosecuenciación del gen 16S rRNA revelaron que el género mayoritario de CON y CON-I es *Sphingobium* (Figura IV.17), quien forman parte de las *Sphingomonas*, conocidas por ser catabólicamente versátiles y genéticamente adaptados a diferentes condiciones ambientales (Zhao y col. 2017a; Waigi y col., 2015; Madueño y col., 2011; Guo y col., 2005; Chung y King, 2001). El porcentaje de secuencias pertenecientes a la familia *Sphingomonadaceae* (*Sphingobium* + *Sphingomonas*) se mantuvo constante, mientras que la inoculación logró aumentar el porcentaje de secuencias de *Burkholderia* (Figura IV.17), un género bacteriano considerado responsable de la degradación de PAH en suelo o sedimentos (Sun y col., 2010), lo que sugiere una interacción con la cepa inoculada. Los resultados en este trabajo sugieren un efecto de coexistencia entre las especies de *Sphingomonas* y *Burkholderia*. Anteriormente se había informado que las especies de los dos géneros coexistían en cultivos enriquecidos con PAH (Vacca y col., 2005; Mueller y col., 1997). Si bien se han reportado evidencias de relaciones sinérgicas entre géneros de los órdenes *Sphingomonadales* y *Burkholderiales* durante la degradación de PAH (Festa y col., 2017; Tauler y col., 2015; Huang y col., 2008). Joshi y col., (2015) reportaron que la inoculación de un cultivo mixto de *Sphingobium chlorophenolicum* y *Burkholderia cepacia* no fue tan efectiva como lo fue la inoculación con

cultivos puros de las mismas cepas en ensayos de bioaumento de agua contaminada con pentaclorofenol, sugiriendo la posibilidad de efectos antagónicos o de competencia, que no fueron los que se observaron en CON-I, donde aumentó la eficiencia y potencial de degradación (Figura IV.9 y Tabla IV.13). El género *Klebsiella* disminuyó en CON-I con respecto a CON (Figura IV.17). Algunos estudios sugieren que cepas del género *Klebsiella* tienen la capacidad de degradar altas concentraciones de PAH como fenantreno y pireno, mostrando un gran potencial en la biorremediación de suelos contaminados (Li y col., 2017; Hassan y col., 2015; Xu y col., 2016; Ping y col, 2014; Chikere, 2012). Otros reportes de bacterias de la misma familia, demostraron que presentaban actividad bioemulsificadora en cultivo líquido con hidrocarburos (Hua y col., 2010; Toledo y col., 2008).

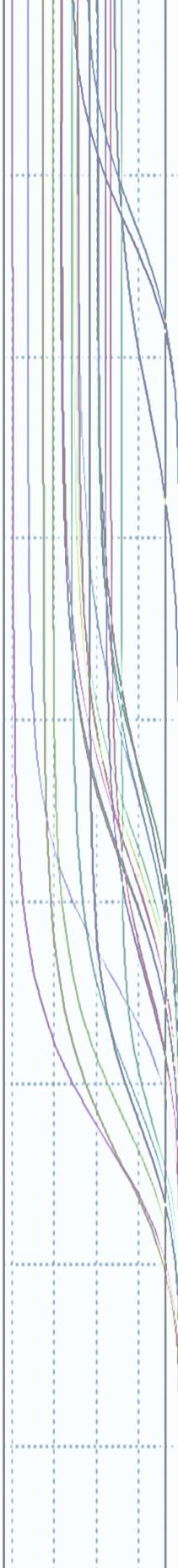
A partir del extracto de proteínas de los cultivos en fenantreno se obtuvieron los metaproteomas de CON, CON-I y 20006FA. El primer estudio se hizo por SDS-PAGE, el cual a pesar de estar trabajando con una comunidad microbiana, permitió una buena separación de las proteínas. En la figura IV.18, el estudio de los metaproteomas mostró que la inoculación con la cepa 20006FA produjo la desaparición de numerosas bandas, en comparación con los perfiles proteicos de CON, y la aparición de otras que podrían corresponder a la cepa inoculada (flechas amarillas de la figura IV.18).

Para intentar dilucidar el rol de los distintos integrantes de CON-I se comenzó con el estudio de la expresión de proteínas específicas en respuesta a la utilización de fenantreno. Se procedió a la secuenciación de algunas bandas diferenciales entre el día 4 y el día 15 encontrándose en el CON-I dos enzimas B01 y B02 que pertenecen a la ruta de degradación de fenantreno y corresponden al género *Sphingomonas*, una naftaleno dioxygenasa y una alcohol deshidrogenasa, que se expresaron el día 15 a pesar de ser las primeras de la ruta de degradación (Tabla IV.12 y Figura IV.19). Así, a pesar de que no aumentó la proporción de *Sphingomonas* (Figura IV.17) en CON-I, hay mayor expresión de algunas de sus proteínas.

Un mecanismo importante que limita la invasión en comunidades altamente diversas es la competencia por los nutrientes, el establecimiento de la especie invasora depende de la cantidad de recursos que no son consumidos por las especies nativas, y de la tasa a la que la especies nativas e invasoras los consumen (Van Elsas y col., 2012). Al estudiar el efecto de la inoculación sobre la estructura de la comunidad bacteriana de CON en las distintas fuentes de carbono utilizadas (fenantreno, AHN, antraceno, dibenzotifeno, fluoreno y pireno) se observó la banda correspondiente a la cepa inoculada en los cultivos conteniendo los compuestos que mostraron degradación (Figuras IV.15, IV.22 y IV.23), mientras que en las calles correspondientes a fluoreno y pireno (compuestos que no degrada la cepa 20006FA en cultivos puros como tampoco formando parte del consorcio), la banda de la

cepa desaparece, indicando que el establecimiento depende de su participación en el flujo de carbono y energía.

La cepa *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA cumplió con algunos de los rasgos claves como la invasividad, la adaptación rápida en la comunidad bacteriana y la permanencia a lo largo del tiempo, que deben presentarse para que un microorganismo se establezca y difunda con éxito según las interacciones ecológicas entre especies (Whitney y Gabler, 2008). Esto se vio reflejado en los niveles de degradación alcanzados en fenantreno y otros PAH por CON-I con respecto a CON. A pesar de ello, no se lograron obtener los valores de degradación conseguidos en cultivos puros de 20006FA. No obstante, la inoculación de 20006FA en CON (CON-I) evitó la acumulación de AHN. Estos cambios estarían indicando que la cepa introducida es altamente competitiva y se adaptó a las condiciones imperantes dentro de CON durante la degradación de fenantreno, incrementando su potencial degradativo. La capacidad de los microorganismos para mantenerse dentro de una población, propagarse y crecer define la existencia de un establecimiento y aumenta sus posibilidades de éxito de invasión (Mallon y col., 2015).



**CAPÍTULO V**

***Diseño de consorcios  
bacterianos con alta  
eficiencia de degradación de  
PAH:  
Estrategia II***

## V. Diseño de consorcios bacterianos con alta eficiencia de degradación de PAH: Estrategia II

Este capítulo tuvo como objetivo diseñar consorcios sintéticos combinando todas las cepas aisladas a partir del consorcio natural CON, con el fin de establecer la contribución de cada población al proceso de degradación de fenantreno y estudiar su potencial para ser utilizados como inoculantes en procesos de biorremediación.

### V.1 Cepas aisladas de CON

En trabajos previos de laboratorio se aislaron y caracterizaron fisiológicamente 4 cepas pertenecientes a CON, representantes de los tres tipos de colonias observados en los recuentos (amarillas, blancas y transparentes) (Figura IV.14). Estas cepas se identificaron por secuenciación del gen 16S rRNA como: *Sphingobium* sp., (AM) ( $\alpha$ -Proteobacteria), *Pseudomonas* sp. (Bc-h y T) y *Klebsiella aerogenes* (B) ( $\delta$  -Proteobacteria) (Festa y col., 2013).

Ensayos en cultivos puros de las cepas aisladas mostraron que sólo la cepa AM era capaz de degradar fenantreno (87%) luego de 7 días de incubación, acumulando  $73 \pm 12$  mg/L de AHN el día 4, valor que luego disminuye el día 15 ( $4,1 \pm 0,1$  mg/L) (Festa y col., 2013).

Al diseñar consorcios definidos combinando las cepas aisladas de a pares (AM+T, AM+Bc-h y AM+B), se observó una degradación superior al 97% y significativamente mayor a la eliminación alcanzada por la cepa *Sphingobium* sp. AM (87,5%) y por CON (59%), luego de 7 días de incubación. Esos consorcios definidos acumularon AHN el día 2 que no se detectó luego de 7 días (Festa y col., 2013).

A partir de la información de la composición bacteriana de CON realizada por 454-pirosecuenciación, que reveló la frecuencia relativa de filotipos a nivel de género (Festa y col., 2016a), mencionada en el capítulo IV sección IV.3.2.4 y las evidencias encontradas por metagenómica funcional de la presencia en CON de por lo menos otro género degradador perteneciente al orden *Burkholderiales* (Festa y col., 2017), se realizaron nuevos esfuerzos para poder obtener cultivos pertenecientes a todos los órdenes presentes en el consorcio.

## V.2 Resultados

### **V.2.1 Aislamiento, caracterización e identificación de cepas del consorcio natural degradador de fenantreno (CON) para ser utilizadas en el diseño de consorcios sintéticos con alta eficiencia de degradación de PAH**

#### **V.2.1.1 Aislamiento y caracterización**

Para obtener nuevos aislados de bacterias cultivables, se utilizó una alícuota de CON reactivado y diferentes medios de cultivo que se muestran en la tabla V.1. A partir de la información obtenida por pirosecuenciación, conocemos que el género *Burkholderia* está representando un 2,5% del total de CON. Asimismo, los estudios metagenómicos y metaproteómicos realizados sobre CON (Festa y col., 2017), determinaron la presencia de una cepa perteneciente al género *Burkholderia* potencialmente degradadora de fenantreno. Se utilizó el medio Baz, un medio semisólido libre de nitrógeno selectivo para *Burkholderiales*, que contiene ácido azelaico como fuente de carbono y azul de bromotimol como indicador. El crecimiento de colonias del género *Burkholderia* produce el viraje del medio al azul debido a la alcalinización del mismo. Después de la incubación, no se pudo observar crecimiento ni viraje del indicador. En otro intento, se utilizó el medio selectivo para la especie *Burkholderia cepacia* (BSCA) (Henry y col., 1997) que contiene lactosa y sacarosa, además del indicador rojo de fenol y 3 antibióticos: gentamicina (40 mg/L), ampicilina (50 mg/L) y polimixina (50 mg/L). Luego de 7 días de incubación a 25 °C no se observó crecimiento. Por otro lado, en placas con el medio rico y selectivo para *Burkholderia* LGI, con baja concentración de extracto de levadura, y ácido cítrico para ajustar el pH=6, luego de la incubación, se observó crecimiento de colonias con un único tipo de morfología (Tabla V.1: Colonia I, Figura V.1 a).

También, se intentó aislar microorganismos pertenecientes al género *Inquilinus*, que mostraron una abundancia relativa de 1,2% dentro de CON (Figura IV.17). Sabiendo que la especie *Inquilinus ginsengisoli* es resistente al antibiótico colistina (Wellinghausen y col., 2005), se utilizó el medio R2A suplementado con este antibiótico, obteniéndose colonias aisladas (Tabla V.1: Colonia II). Estas colonias presentaron una característica diferente al resto de las bacterias previamente aisladas, se tornaban de color marrón luego de guardadas una semana a 4°C (Figura V.1 b).

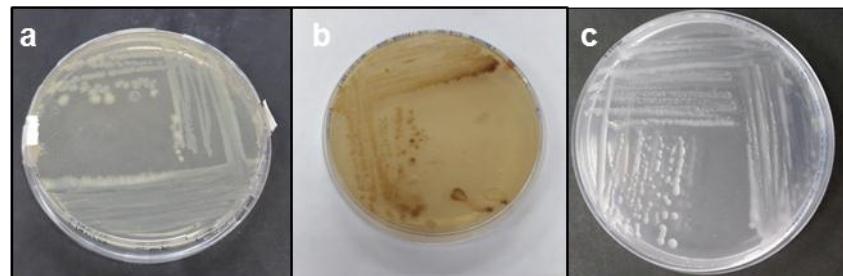
Como se encontró en CON un 0,3% de la abundancia relativa en el género *Bradyrhizobium*, se utilizó el medio EMA – Extracto de levadura, Manitol (YEM, Vincent, 1970) selectivo para este género, para su aislamiento. Luego de unos días de incubación, se pudo observar la

presencia de una colonia blanca, translúcida, pequeña con morfología diferente a las colonias aisladas anteriormente (Tabla V.1: Colonia III, Figura V.1 c).

Muestra	Medios de cultivo	<i>Burkholderia</i>		<i>Inquilinus</i>		<i>Bradyrhizobium</i>
		Baz	LGI	BSCA	R2A+Colistina	EMA
CON		-	+ (I)	-	+ (II)	+ (III)

**Tabla V.1.** Medios de cultivos utilizados para el aislamiento de diferentes especies de CON.

El aislamiento en placa para cada una de las colonias obtenidas se muestra en la figura V.1.



**Figura V.1.** Fotografía del aislamiento de la colonia) I, b) II y c) III en R2A.

Sobre cultivos puros obtenidos a partir de las colonias aisladas (Colonia I, II y III) se realizó una caracterización fisiológica utilizando pruebas bioquímicas convencionales. La Tabla V.2 resume los resultados obtenidos para la caracterización fenotípica.

Microorganismo	Observación macroscópica	Morfología	Prueba Gram	Catalasa	Oxidasa	Nitrato Gas/amonio/nitrito	Indol	TSI	Movilidad	Colistina
I	Colonia blanca, chica, mucosa	Bacilo	(-)	+	ND	ND	ND	ND	+	ND
II	Colonia blanca, translúcida mucosa	Bacilo	(-)	+	+	Gas/-/-	-	ND	+	R
III	Colonia blanca translúcida y pequeña	Bacilo	(-)	ND	ND	ND	ND	Alc/Alc	ND	ND

**Tabla V.2.** Caracterización fenotípica de las colonias aisladas I, II y III. ND: no determinado.

#### V.2.1.2 Identificación de cepas mediante secuenciación del gen 16S rRNA

Sobre los aislados I, II y III se realizó la secuenciación del gen 16S rRNA completo. Los resultados de su afiliación genética y el número de acceso a GenBank se muestran en la Tabla V.3. La colonia I mostró un 99% de similitud con la cepa *Klebsiella aerogenes* B, aislada previamente (Festa y col., 2013). Las colonias II y III resultaron ser nuevos aislados bacterianos; la secuenciación del gen 16S rRNA y su posterior comparación con las secuencias depositadas en la base de datos de NCBI utilizando el programa BLAST, permitió la afiliación taxonómica de los mismos. La cepa II clasificó como *Inquilinus limosus* con un 99% de similitud y la cepa III como *Burkholderia* sp., alcanzando el mismo porcentaje de similitud. Se decidió llamar a los cultivos identificados como I y Bk, respectivamente.

Colonia	Secuencia bacteriana del gen 16S rRNA más relacionada	% Similitud	Nº de acceso <sup>a</sup>	Nº de acceso <sup>b</sup>
I	<i>Klebsiella aerogenes</i>	99	JQ886666	AB244467.1
II	<i>Inquilinus limosus</i>	99	KY924326	LN995702.1
III	<i>Burkholderia</i> sp.	99	KY924007	GQ478264.1

**Tabla V.3.** Resultados de la secuenciación del gen 16S rRNA y afiliaciones taxonómicas de las colonias aisladas I, II y III del consorcio. a Número de acceso a GenBank de las secuencias perteneciente a la cepa aislada. b Número de acceso a GenBank de la secuencia bacteriana más cercanamente relacionada.

### V.2.2 Estudio de la capacidad degradadora de PAH de las cepas

#### V.2.2.1 Degradación de fenantreno y metabolitos intermediarios de su vía de degradación

Se estudió la degradación de fenantreno (200 mg/L) luego de 7 días de incubación y la degradación de dos de los principales intermediarios de la vía, ácido 1-hidroxi 2-naftoico (AHN) y ácido salicílico (AS), suplementados con 100 mg/L, luego 15 días de incubación, para todas las cepas aisladas del consorcio.

% de degradación PAH y metabolitos intermediarios	AM	Bk	I
Fenantreno [200 mg/L]	88 ± 1	97,8 ± 0,8	-
AHN [100 mg/L]	43 ± 6	-	21 ± 4
AS [100 mg/L]	-	92 ± 2	-

**Tabla V.4.** Porcentaje de degradación de fenantreno suplementados con 200 mg/L luego de 7 días de incubación y de ácido 1-hidroxi-2-naftoico (AHN) o ácido salicílico (AS) suplementados con 100 mg/L luego de 15 días de incubación, en cultivos de las cepas AM, Bk e I. Los datos corresponden al promedio de tres réplicas biológicas y su respectiva desviación estándar. -: no detectado.

Las cepas B, Bc-h y T no mostraron degradación de ninguno de los compuestos en cultivos puros. En los cultivos de fenantreno, AM consiguió degradar un 88 ± 1%, resultado similar al encontrado por Festa y col. (2013). La cepa Bk degradó el 97,8 ± 0,8% de fenantreno luego

de 7 días de incubación, mientras que en el cultivo de la cepa I no se observó degradación (Tabla V.4).

En los cultivos donde se analizó la degradación de fenanreno se midió también la acumulación de los metabolitos intermediarios AHN y AS, luego de 7 días de incubación. En la tabla V.5 se muestran los resultados obtenidos para las únicas cepas que lograron degradar fenanreno, AM y Bk.

Producción (mg/L)	AM	Bk
Ácido 1-hidroxi-2-naftoico	18,7 ± 0,1	11,7 ± 0,6
Ácido salicílico	-	-

**Tabla V.5.** Producción de ácido1-hidroxi-2-naftoico y ácido salicílico en los cultivos de las cepas AM y Bk durante la degradación de 200 mg/L de fenanreno luego de 7 días de incubación. Los datos corresponden al promedio de tres réplicas biológicas y su respectiva desviación estándar. -: no detectado.

AM acumuló una concentración algo mayor de AHN que Bk, a pesar de que esta última mostró mayor porcentaje de degradación de fenanreno. No se observó para ninguna de las dos cepas generación de AS luego de 7 días (Tabla V.5).

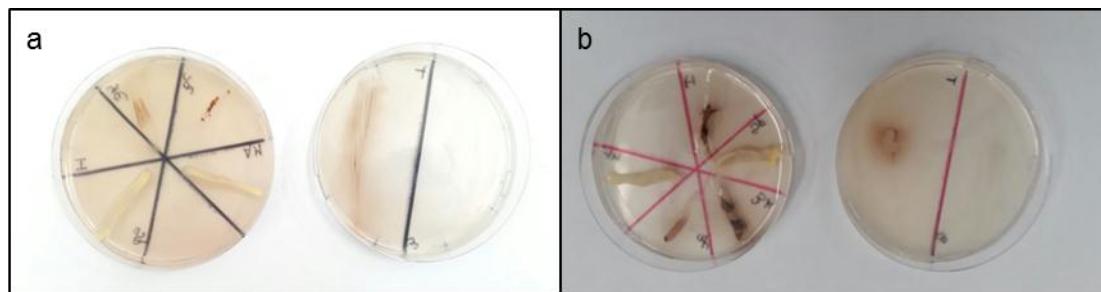
En cuanto a la degradación de los metabolitos intermediarios, AM e I degradaron  $43 \pm 6\%$  y  $21 \pm 4\%$  de AHN, respectivamente, y sólo la cepa Bk mostró degradación de AS ( $92 \pm 2\%$ ) luego de 15 días de incubación (Tabla V.4).

Se estudió también, aunque cualitativamente, la degradación de catecol y 2,3-dihidroxibifenilo, intermediarios de la vía baja de degradación de fenanreno. Para esto se realizó la inducción de las cepas con cristales de fenol durante 6 horas. En el primer ensayo se rociaron las estrías del cultivo con una solución de catecol como sustrato; la aparición de una coloración ocre debida a la generación del ácido 2-hidroximucónico semialdehído, por la actividad de la enzima catecol 2,3-dioxigenasa, indica un resultado positivo. Se observó en las cepas I, Bc-h y T la aparición de color en la estría (Figura V.2 a y Tabla V.6).

En el segundo ensayo se utilizó una solución de 2,3-dihidroxibifenilo como sustrato, que es clivado por la enzima 2,3-dihidroxibifenilo 1,2-dioxigenasa, que forma parte de la vía alta o periférica de degradación de los PAH, formando un compuesto meta clivado también de coloración ocre. Las cepas Bk, I, Bc-h y T, dieron resultados positivos lo que indica que degradan 2,3-dihidroxibifenilo (Tabla V.6 y Figura V.2 b).

Análisis cualitativo	AM	Bk	I	B	Bc-h	T
Catecol	-	-	+	-	+	+
2,3-dihidroxibifenilo	-	+	+	-	+	+

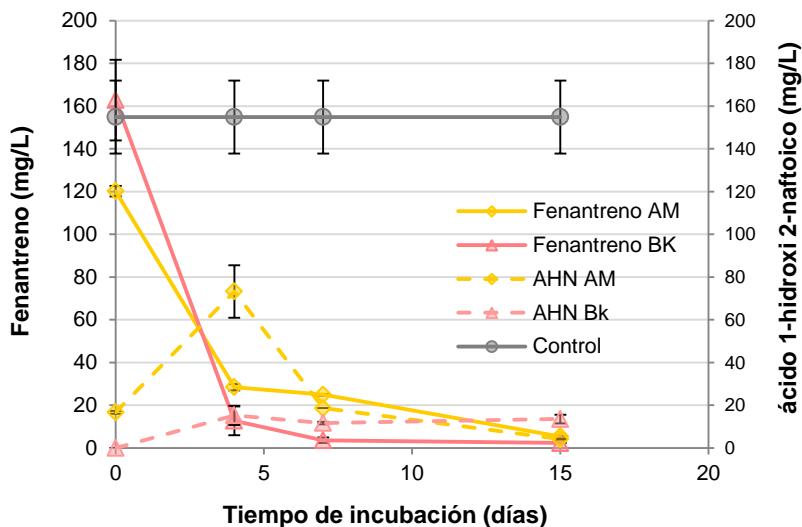
**Tabla V.6.** Determinación cualitativa de la degradación de catecol y 2,3 dihidroxibifenilo por las cepas AM, Bk, I, B, Bc-h y T +: positivo (coloración ocre en la estría); - : no detectado.



**Figura V.2.** Fotografía de estrías de las cepas AM, Bk, I, B, Bc-h y T en R3A diluido (1/10), rociadas con a) una solución de catecol; b) una solución de 2,3-dihidroxibifenilo.

#### V.2.2.2 Cinética comparativa de degradación de fenantreno en las cepas *Sphingobium sp. AM* y *Burkholderia sp. Bk*

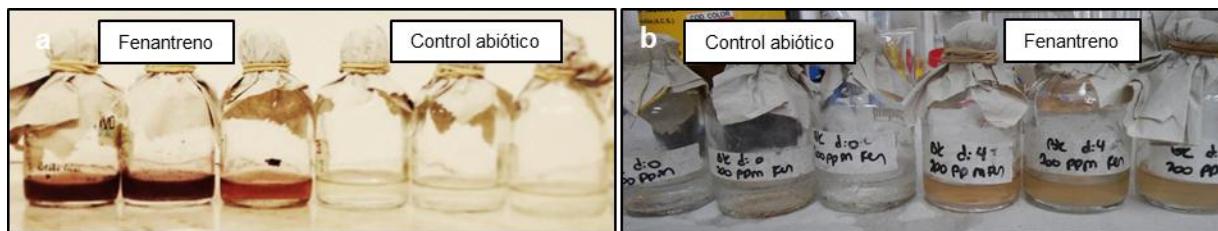
Siendo AM y Bk las únicas cepas aisladas del consorcio natural con capacidad de degradar fenantreno en cultivos puros, se llevó a cabo una comparación de la cinética de degradación con una concentración de 200 mg/L, durante 15 días de incubación. Simultáneamente, se midió la concentración de AHN y AS acumulado.



**Figura V.3.** Concentración de fenantreno y producción de ácido 1-hidroxi 2-naftoico (AHN) en cultivos de las cepas AM y Bk en MML suplementado con 200 mg/L de fenantreno durante 15 días de incubación. Se grafican los valores promedio de tres réplicas biológicas y su respectiva desviación estándar.

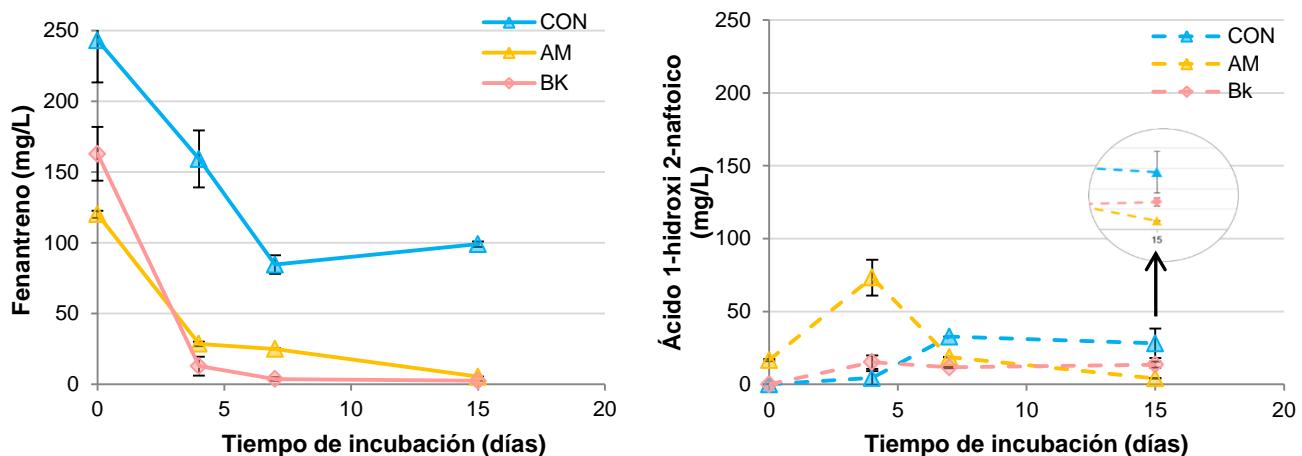
En la figura V.3 se puede observar que AM y Bk degradan rápidamente el fenantreno, alcanzando a los 4 días un porcentaje de eliminación del 86,4% y 92,1%, respectivamente. Luego de 15 días de incubación, ambas cepas consiguieron degradar alrededor de un 98% del fenantreno suplementado. Las dos cepas producen AHN, aunque mostraron distintos patrones de acumulación, la cepa AM generó la mayor concentración de AHN ( $73 \pm 12$  mg/L) el día 4, luego la concentración del intermediario disminuyó hasta el final del ensayo llegando a  $4,1 \pm 0,1$  mg/L; mientras que la concentración de AHN en el cultivo de la cepa Bk sólo alcanzó un valor de  $15 \pm 4$  mg/L a los 4 días, valor que se mantuvo constante hasta el día 15 de incubación.

En las fotografías de la figura V.4 se muestran los cultivos de AM (a) y Bk (b) en fenantreno, donde se evidencia la aparición de color ocre de distinta intensidad debido a la formación de productos de degradación.



**Figura V.4.** Fotografía de los cultivos de las cepas *Sphingobium* sp. AM (a) y *Burkholderia* sp. Bk (b) en MML suplementado con 200 mg/L de fenantreno utilizados para realizar la cinética de degradación y controles abióticos.

En la Figura V.5 se añadió la cinética de degradación del consorcio natural CON a las de las cepas degradadoras AM y Bk, con el fin de comparar los tres cultivos.



**Figura V.5.** Concentración de fenantreno y producción de ácido 1-hidroxi 2-naftoico (AHN) en cultivos de CON, CON-I y Bk en MML suplementado con 200 mg/L de fenantreno durante 15 días de incubación. Se grafican los valores promedio de tres réplicas biológicas y su respectiva desviación estándar.

Las cepas aisladas AM y Bk mostraron una mayor eficiencia de degradación (>97%) que CON (59%). A pesar de que AM acumuló mayor concentración de AHN ( $73 \pm 12$  mg/L) que CON ( $32,7 \pm 0,1$  mg/L) y Bk ( $15 \pm 4$  mg/L), consiguió reducirlo alcanzando luego de 15 días de incubación una concentración significativamente menor ( $4,1 \pm 0,1$  mg/L) ( $P>0,05$ ) con respecto a CON y Bk.

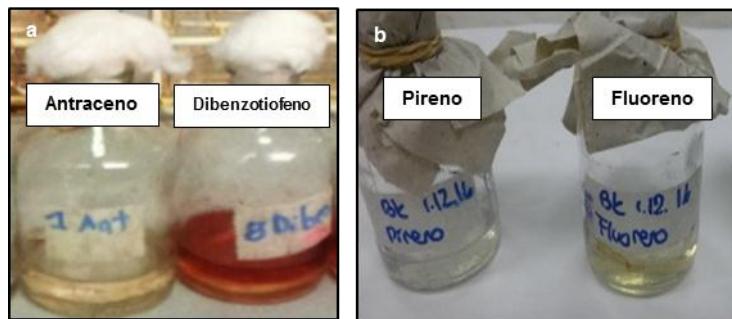
### V.2.2.3 Determinación del espectro de degradación de las cepas AM y Bk

Con el objetivo de determinar cualitativamente el espectro de degradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos de las cepas degradadoras AM y Bk, se inocularon en MML suplementado con 1 g/L de diferentes hidrocarburos policíclicos aromáticos, algunos de los 16 PAH incluidos en la lista de contaminantes prioritarios de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA 2010; 2001). Luego de 15 días de incubación se consideró como resultado positivo la aparición de color amarillo/naranja en el medio de cultivo (propia de los productos intermediarios de la degradación) (Figura V.6) y turbidez en el medio (indicio del crecimiento microbiano). Los resultados se muestran en la tabla V.7.

Se observó que las cepas AM y Bk poseen la capacidad de degradar antraceno, fluoreno y dibenzotiofeno, presentando coloración rosada, amarilla y ocre respectivamente en el medio de cultivo. Los cultivos de Bk también mostraron turbidez para benzo[a]antraceno, criseno, fluoranteno y pireno.

PAH	AM		Bk	
	Color	Turbidez	Color	Turbidez
Acenaftileno*	-	-	-	-
Antraceno*	+	+	+	+
Benzo[a]antraceno*	-	-	-	+
Criseno*	-	-	-	+
Dibenzo[a,h]antraceno*	-	-	-	-
Dibenzotiofeno	+	+	+	+
Fluoranteno*	-	-	-	+
Fluoreno*	+	+	+	+
Pireno*	-	-	-	+

**Tabla V.7.** Degradación y crecimiento en cultivos de las cepas *Sphingobium* sp. (AM) y *Burkholderia* sp. (Bk), suplementados con diferentes hidrocarburos policíclicos aromáticos (1 g/L) como única fuente de carbono y energía +: degradación/crecimiento, -: no detectado. \*: Hidrocarburos policíclicos aromáticos incluidos en la lista de contaminantes prioritarios de la USEPA.

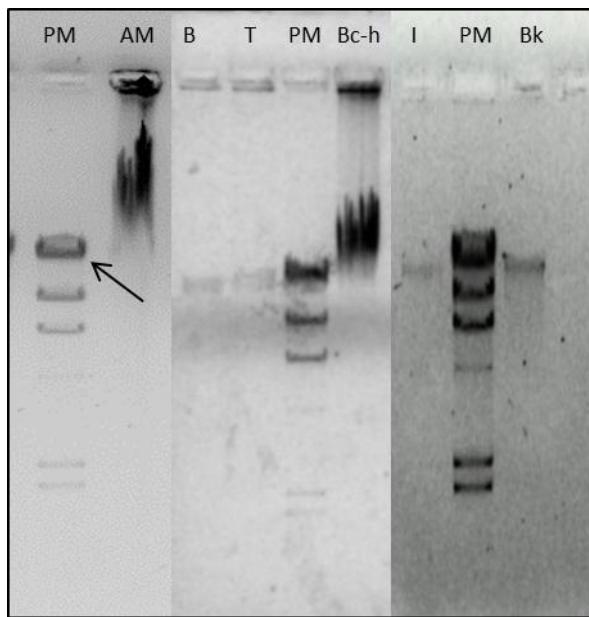


**Figura V.6.** Fotografía de los cultivos de las cepas a) AM y b) Bk, en MML suplementados con 1 g/L de algunos hidrocarburos policíclicos aromáticos que presentaron color (Antraceno, Dibenzotifeno y Fluoreno) y que no presentó color (Pireno), luego de 15 días de incubación.

### V.2.3 Análisis genómico de las cepas aisladas de CON y estudio “*in silico*” de los genes relacionados con la ruta de degradación de fenantreno

#### V.2.3.1 Extracción de DNA, secuenciación y ensamblaje de los genomas de las cepas de CON

Para poder identificar “*in silico*” genes codificantes relacionados con las vías de degradación de PAH, se realizó la secuenciación y ensamble parcial de los genomas de las cepas aisladas de CON: AM, B, T, Bc-h, I y Bk. Se realizó la extracción del ADN total de todas las cepas siguiendo el protocolo explicado por Entcheva y col. (2001) para obtener fragmentos mayores a 23 kpb y de buena calidad, que se corroboró en un gel de agarosa 0,8% (Figura V.7). Conjuntamente se midió la concentración y la pureza de DNA (relación 260/280) (Tabla V.8).



**Figura V.7.** Fotografía del gel de agarosa de la corrida de DNA de alto peso molecular extraído de las cepas de CON (AM, B, T, Bc-h, I y Bk). PM: marcador de peso molecular. Con la flecha se indica la banda de 23130 pb del marcador de peso molecular ( $\lambda$  DNA/Hind III).

Muestras	ng/ $\mu$ l	Abs 260/280
AM ( <i>Sphingobium</i> sp.)	292,1	1,94
B ( <i>Klebsiella aerogenes</i> )	106,3	2,08
T ( <i>Pseudomonas</i> sp.)	177,2	2,08
Bc-h ( <i>Pseudomonas</i> sp.)	246,9	1,92
I ( <i>Inquilinus limosus</i> )	144,5	2,08
Bk ( <i>Burkholderia</i> sp.)	52,8	2,06

**Tabla V.8.** Concentración obtenida de DNA total (ng/ $\mu$ l) para cada una de las cepas de CON y sus respectivas relaciones de absorbancia 260/280.

Para cada una de las cepas se obtuvo DNA puro, de calidad y con la concentración adecuada para la secuenciación. Los genomas se secuenciaron utilizando el método WGS en el INDEAR-CONICET. Las lecturas resultaron en una cobertura de los genomas de 500 veces, abarcando un promedio de 5,9 Mbp.

### V.2.3.2 Anotación

Cada genoma fue curado y anotado en la base de datos mundial NCBI y tienen un número de acceso público en WGS (Tabla V.9). Para cada cepa se obtuvo el tamaño de los contigs en Mb, el porcentaje de GC, la división en subsistemas (obtenida de RAST), el número total de genes, secuencias codificantes (CDS), cantidad de genes RNAs y el número total de pseudogenes. Los datos de la anotación de ensamblaje de cada genoma se muestran en la tabla V.9.

Muestra	BioProject:	BioSample:	Número de acceso WGS	Tamaño (Mb)	% GC	Sub-sistemas	Genes (total)	CDS (total)	CDS (coding)	Genes (RNA)	tRNAs	ncRNAs	Pseudo-genes (total)
AM <i>Sphingobium</i> sp.	PRJNA305642	SAMN04364794	LRUK01	5.32	64,5	435	4.944	4.888	4.765	56	48	3	123
B <i>Klebsiella aerogenes</i>	PRJNA361572	SAMN06234924	MTLB01	5.22	54,8	578	5.223	5.114	4.968	109	85	11	146
Bc-h <i>Pseudomonas</i> sp.	PRJNA361580	SAMN06235001	MUIN01	7.04	59,5	551	6.363	6.296	6.197	67	59	4	99
T <i>Pseudomonas</i> sp.	PRJNA361506	SAMN06234460	MUHV01	6.76	65,2	539	6.200	6.129	6.053	71	62	5	76
I <i>Inquilinus limosus</i>	PRJNA361599	SAMN06235018	NHON01	7.69	69,9	500	7.218	7.163	7.046	55	48	4	117
Bk <i>Burkholderia</i> sp.	PRJNA361918	SAMN06235020	NHOM01	7.34	61,9	515	6.580	6.518	6.409	62	52	4	109

**Tabla V.9.** Datos generales del ensamble de cada genoma de las cepas de CON curados por NCBI.

Luego del ensamble de cada una de las cepas, se realizó la asignación funcional de los genes identificados y la división en subsistemas, utilizando el sistema integral de predicción y anotación automática (RAST) y la anotación automática del genoma procariota NCBI (PGAAP) (Angiuoli y col., 2008).

Con el objetivo de diseñar consorcios sintéticos con alta eficiencia de degradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos, se estudiaron en detalle los genes que podrían codificar enzimas involucradas en las reacciones claves de la ruta de degradación de fenantreno hasta entrar al ciclo de Krebs, tomando como referencia la base de datos KEGG. Las potenciales funciones de los genes se confirmaron y analizaron manualmente utilizando MetaCyc, Protein Data Bank y AmiGo.

### **V.2.3.3 Análisis “*in silico*” del genoma de las cepas de CON en relación con la degradación de PAH**

#### **V.2.3.3.a Análisis genómico de la cepa *Sphingobium sp. AM***

Los datos del ensamble y anotación del genoma de la cepa AM se describen en la tabla V.9. En el análisis de los 112 scaffolds se predijeron 98 CDS de enzimas involucradas en diferentes pasos de la vía superior e inferior de degradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos (Figura señalador y Tabla V.10). Principalmente se encontraron enzimas dioxygenasas, muchas presentes en varias copias, que podrían estar implicadas en los primeros pasos de la vía de degradación de fenantreno (pasos 1 y 3) de la figura señalador. También, se asignaron algunos genes que podrían participar en las vías de degradación de alifáticos (Tabla V.S1).

Los genes que participarían en las vías de degradación de PAH se encontraron distribuidos a lo largo del genoma. En el análisis de los diferentes scaffolds, se encontró en el scaffold 34, una alta frecuencia de genes pertenecientes a la degradación de compuestos aromáticos, junto con reguladores de la transcripción y elementos móviles flanqueando esta región, similar a la organización del scaffold 19 de *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA (Capítulo IV, Figura IV.5). Se alinearon las secuencias genómicas de estos scaffolds que obtuvieron un 100% de identidad y cobertura. El scaffold 34 también comparte el 92% de similitud y 76% de cobertura (E-Valor de 0.0) con la secuencia del plásmido pNL1 de *Novosphingobium aromaticivorans* F199 (Romine y col., 1999).

Enzimas predichas - <i>Sphingobium</i> sp. AM			
Enzimas de vía alta	CDS	Enzimas de vía baja	CDS
Biphenyl dioxygenase (EC 1.14.12.18)	1	Anthranilate 1,2-dioxygenase (EC 1.14.12.1)	2
2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase (EC 1.13.11.39)	1	Catechol 1,2-dioxygenase (EC 1.13.11.1)	2
Aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase $\alpha$ y $\beta$ subunits	4	Catechol 2,3-dioxygenase (EC 1.13.11.2)	2
Naphthalene 1,2-dioxygenase (EC 1.14.12.12)	1	Homogentisate 1,2-dioxygenase (EC 1.13.11.5)	1
Benzoate 1,2-dioxygenase subunit alfa (EC 1.14.12.10)	2	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (EC 1.13.11.27)	1
Benzene 1,2-dioxygenase (EC 1.14.12.3)	1	Isoquinoline 1-oxidoreductase alpha subunit (EC 1.3.99.16)	1
Salicylate hydroxylase (EC 1.14.13.1)	1	Maleylacetoacetate isomerase (EC 5.2.1.2)	1
Monooxygenase	9	Muconate cycloisomerase (EC 5.5.1.1)	1
(2Fe-2S)-binding protein	11	Muconolactone delta-isomerase (EC 5.3.3.4)	1
		3-phenylpropionate dioxygenase (EC 1.14.12.19)	1
		4-carboxymuconolactone decarboxylase (EC 4.1.1.44)	5
		1,6-dihydroxycyclohexa-2,4-diene-1-carboxylate dehydrogenase (EC 1.3.1.25)	1
		Carboxymuconolactone decarboxylase (EC 4.1.1.44)	6
		3-phenylpropionate dioxygenase (EC 1.14.12.19)	1
		5-carboxymethyl-2-hydroxymuconate semialdehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.60)	2
		4-oxalocrotonate decarboxylase (EC 4.1.1.77)	4
		3-isopropylmalate dehydratase subunit beta (EC 4.2.1.33)	1
		2-keto-4-pentenoate hydratase (EC 4.2.1.80)	2
		4-hydroxy-2-oxovalerate aldolase (EC 4.1.3.39)	3
		Cysteine dioxygenase (EC 1.13.11.20)	1
		Alcohol dehydrogenase (EC 1.1.1.1)	15
		Acetaldehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.10)	3
		Aldehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.3)	8
		2-hydroxymuconic semialdehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.32)	2

**Tabla V.10.** Enzimas pertenecientes a las vías de degradación de PAH en el genoma de *Sphingobium* sp. AM, predichas por RAST, KEGG y NCBI. CDS: número de secuencias de codificación para esa proteína en el genoma. Los genes en las tablas se nombran en inglés debido a que se obtiene del dato crudo proveniente de la base de datos.

#### V.2.3.3.b Análisis genómico de la cepa *Klebsiella aerogenes* B

Los datos del ensamble y anotación del genoma de la cepa B se describen en la tabla V.9. En el análisis de los 94 scaffolds se predijeron 61 CDS de enzimas involucradas en diferentes pasos de las vías de degradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos (Figura señalador y tabla V.11). También, se asignaron genes que podrían estar implicados en las vías de degradación de alifáticos (Tabla V.S2).

Enzimas predichas - NCBI- <i>Klebsiella aerogenes B</i>			
Enzimas de vía alta	CDS	Enzimas de vía baja	CDS
Aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase α y β subunits	1	Gentisate 1,2-dioxygenase (EC 1.13.11.4)	1
Naphthalene 1,2-dioxygenase (EC 1.14.12.12)	1	Catechol 1,2-dioxygenase (EC 1.13.11.1)	1
2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase (EC 1.13.11.39)	2	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (EC 1.13.11.27)	2
3,4-dihydroxyphenylacetate 2,3-dioxygenase (EC 1.13.11.15)	1	Protocatechuate 3,4-dioxygenase α y β subunits (EC 1.13.11.3)	1
Benzoate 1,2-dioxygenase subunit beta (EC 1.14.12.10)	1	Maleylacetoacetate isomerase (EC 5.2.1.2)	1
Benzene 1,2-dioxygenase (EC 1.14.12.3)	1	Muconate cycloisomerase (EC 5.5.1.1)	1
Monooxygenase	2	Muconolactone delta-isomerase (EC 5.3.3.4)	1
(2Fe-2S)-binding protein	6	3-carboxy-cis,cis-muconate cycloisomerase (EC 5.5.1.2)	1
		3-isopropylmalate dehydratase subunit beta (EC 4.2.1.33)	2
		5-carboxymethyl-2-hydroxymuconate semialdehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.60)	1
		4-hydroxybenzoate 3-monooxygenase (EC 1.14.13.33)	1
		3-isopropylmalate dehydratase large subunit (EC 4.2.1.33)	2
		Cysteine dioxygenase (EC 1.13.11.20)	2
		n-hydroxybenzoate hydroxylase (EC 1.14.13.2)	1
		4-carboxymuconolactone decarboxylase (EC 4.1.1.44)	4
		3,4-dihydroxybenzoate decarboxylase (EC 4.1.1.63)	1
		1,6-dihydroxycyclohexa-2,4-diene-1-carboxylate dehydrogenase (EC 1.3.1.25)	1
		4-hydroxy-2-ketovalerate aldolase (EC 4.1.3.39)	1
		2,3-dihydroxybenzoate-2,3-dehydrogenase (EC 1.3.1.28)	2
		Salicylate hydroxylase (EC 1.14.13.1)	1
		Alcohol dehydrogenase (EC 1.1.1.1)	9
		Aldehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.3)	8
		Salicylaldehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.65)	1

**Tabla V.11.** Enzimas pertenecientes a las vías de degradación de PAH en el genoma de *Klebsiella aerogenes B*, predichas por RAST, KEGG y NCBI. CDS: número de secuencias de codificación para esa proteína en el genoma.

El análisis de los scaffolds de B mostró a los genes relacionados con la degradación de PAH distribuidos en todo el genoma, sin estar organizados en un clúster específico. No se encontró un scaffold con alta proporción de estos genes a diferencia de lo que se observó en el genoma de AM.

#### V.2.3.3.c Análisis genómico de la cepa *Pseudomonas sp. Bc-h*

Los datos del ensamble y anotación del genoma de la cepa Bc-h se describen en la tabla V.9. En el análisis de los 73 scaffolds se predijeron 91 CDS que corresponden a enzimas que participarían en diferentes pasos de la vía superior e inferior de degradación fenantreno, 35 pertenecen a enzimas dioxygenasas y 56 a otras enzimas que pueden participar en las vías de degradación de PAH (Tabla V.12). También, se asignaron 7 CDS que podrían participar en las vías de degradación de alifáticos (Tabla V.S3).

Enzimas predichas - NCBI- <i>Pseudomonas</i> sp. Bc-h			
Enzimas de vía alta	CDS	Enzimas de vía baja	CDS
Aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase α y β subunits	1	Catechol 1,2-dioxygenase (EC 1.13.11.1)	1
2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase (EC 1.13.11.39)	3	Homogentisate 1,2-dioxygenase (EC 1.13.11.5)	1
4,5-dioxygenase (EC 1.13.11.8)	1	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (EC 1.13.11.27)	2
Benzoate 1,2-dioxygenase α y β subunits (EC 1.14.12.10)	1	Maleylacetoacetate isomerase (EC 5.2.1.2)	1
Aromatic ring-opening dioxygenase	1	Isomerase/hydrolase	1
Monooxygenase	6	4-carboxy-4-hydroxy-2-oxoadipate aldolase (EC 4.1.3.17)	1
Salicylate hydroxylase (EC 1.14.13.1)	1	Muconolactone delta-isomerase (EC 5.3.3.4)	1
(2Fe-2S)-binding protein	14	Muconate cycloisomerase (EC 5.5.1.1)	1
		Protocatechuate 3,4-dioxygenase α y β subunits (EC 1.13.11.3)	2
		4-hydroxybenzoate 3-monooxygenase (EC 1.14.13.33)	1
		3-carboxy-cis,cis-muconate cycloisomerase (EC 5.5.1.2)	2
		3-isopropylmalate dehydratase α y β subunits (EC 4.2.1.33)	3
		Cysteine dioxygenase (EC 1.13.11.20)	1
		4-carboxymuconolactone decarboxylase (EC 4.1.1.44)	4
		1,6-dihydroxycyclohexa-2,4-diene-1-carboxylate dehydrogenase (EC 1.3.1.25)	1
		Quercetin:oxygen 2,3-oxidoreductase (ring-opening)	1
		1-carboxy-3-chloro-3,4-dihydroxycyclo hexa-1,5-diene dehydrogenase (EC 1.3.1.25)	1
		2-keto-4-pentenoate hydratase (EC 4.2.1.80)	1
		Alcohol dehydrogenase (EC 1.1.1.1)	16
		Aldehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.3)	21

**Tabla V.12.** Enzimas pertenecientes a las vías de degradación de PAH en el genoma de *Pseudomonas* sp. Bc-h, predichas por RAST, KEGG y NCBI. CDS: número de secuencias de codificación para esa proteína en el genoma.

El análisis de los scaffolds de Bc-h mostró a los genes relacionados con la biodegradación de hidrocarburos aromáticos distribuidos a lo largo de todo el genoma, sin encontrar alguna agrupación en clúster o scaffold.

#### V.2.3.3.d Análisis genómico de la cepa *Pseudomonas* sp. T

Los datos del ensamble y anotación del genoma de la cepa T se describen en la tabla V.9. En el análisis de los 106 scaffolds se predijeron 74 CDS de enzimas involucradas en diferentes pasos de la vía superior e inferior de degradación de fenantreno (Figura señalador y Tabla V.13). También se encontraron enzimas pertenecientes a pasos enzimáticos de la degradación de alifáticos (Tabla V.S4).

Enzimas predichas - NCBI- <i>Pseudomonas</i> sp. T			
Enzimas de vía alta	CDS	Enzimas de vía baja	CDS
4,5-dioxygenase	1	Salicylaldehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.65)	1
Benzoate 1,2-dioxygenase $\alpha$ y $\beta$ subunit (EC 1.14.12.10)	1	Homogentisate 1,2-dioxygenase (EC 1.13.11.5)	1
Monooxygenase	6	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (EC 1.13.11.27)	2
2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase (EC 1.13.11.39)	1	Maleylacetoacetate isomerase (EC 5.2.1.2)	1
(2Fe-2S)-binding protein	12	Isomerase/hydrolase Protocatechuate 3,4-dioxygenase $\alpha$ y $\beta$ subunit (EC 1.13.11.3)	1
		4-hydroxybenzoate 3-monooxygenase (EC 1.14.13.33 )	1
		4-carboxy-4-hydroxy-2-oxoadipate aldolase (EC 4.1.3.17)	1
		Muconate cycloisomerase (EC 5.5.1.1)	1
		Muconolactone delta-isomerase (EC 5.3.3.4)	1
		4-oxalocrotonate tautomerase (EC 5.3.2.-)	1
		3-carboxy-cis,cis-muconate cycloisomerase (EC 5.5.1.2)	1
		3-isopropylmalate dehydratase $\alpha$ y $\beta$ subunit (EC 4.2.1.33)	2
		Cysteine dioxygenase (EC 1.13.11.20)	1
		4-carboxymuconolactone decarboxylase (EC 4.1.1.44)	7
		1,6-dihydroxycyclohexa-2,4-diene-1-carboxylate dehydrogenase (EC 1.3.1.25)	1
		Quercetin:oxygen 2,3-oxidoreductase (ring-opening)	2
		Alcohol dehydrogenase (EC 1.1.1.1)	16
		Aldehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.3)	2

**Tabla V.13.** Enzimas pertenecientes a las vías de degradación de PAH en el genoma de *Pseudomonas* sp. T, predichas por RAST, KEGG y NCBI. CDS: número de secuencias de codificación para esa proteína en el genoma.

El análisis de los scaffolds de T mostró a los genes relacionados con la biodegradación de hidrocarburos aromáticos distribuidos a lo largo de todo el genoma, sin encontrar alguna agrupación en clúster o scaffold.

#### V.2.3.3.e Análisis genómico de la cepa *Inquilinus limosus* I

Los datos del ensamble y anotación del genoma de la cepa I se describen en la tabla V.9. En el análisis de los 223 scaffolds se predijeron 81 CDS que pertenecen a enzimas que podrían estar involucradas en diferentes pasos de las vías de degradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos (Figura señalador y Tabla V.14). También se encontraron enzimas pertenecientes a pasos enzimáticos de la degradación de alifáticos (Tabla V.S5).

Enzimas predichas - NCBI- <i>Inquilinus limosus</i> I			
Enzimas de vía alta	CDS	Enzimas de vía baja	CDS
Benzoate 1,2-dioxygenase $\alpha$ y $\beta$ subunits (EC 1.14.12.10)	1	Catechol 1,2-dioxygenase (EC 1.13.11.1)	1
Aromatic ring-cleaving dioxygenase	2	Gentisate 1,2-dioxygenase (EC 1.13.11.14)	1
Salicylate hydroxylase (EC 1.14.13.1)	1	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (EC 1.13.11.27)	1
Monooxygenase	2	Homogentisate 1,2-dioxygenase (EC 1.13.11.5)	1
(2Fe-2S)-binding protein	14	4-hydroxybenzoate 3-monooxygenas	1
		Protocatechuate 3,4-dioxygenase $\alpha$ y $\beta$ subunits (EC 1.13.11.3)	1
		Cysteine dioxygenase (EC 1.13.11.20)	1
		Maleylacetoacetate isomerase (EC 5.2.1.2)	1
		3-carboxy-cis,cis-muconate cycloisomerase (EC 5.5.1.2)	2
		Muconolactone delta-isomerase (EC 5.3.3.4)	1
		4-carboxy-4-hydroxy-2-oxoadipate aldolase (EC 4.1.3.17)	1
		4-hydroxy-2-oxoalerate aldolase (EC 4.1.3.39)	3
		3-isopropylmalate dehydratase large and small subunit (EC 4.2.1.33)	2
		2-keto-4-pentenoate hydratase (EC 4.2.1.80)	1
		4-carboxymuconolactone decarboxylase (EC 4.1.1.44)	5
		1,6-dihydroxycyclohexa-2,4-diene-1-carboxylate dehydrogenase (EC 1.3.1.25)	1
		4,5-dihydroxyphthalate dehydrogenase	1
		Alcohol dehydrogenase (EC 1.1.1.1)	14
		Aldehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.3)	18

**Tabla V.14.** Enzimas pertenecientes a las vías de degradación de PAH en el genoma de *Inquilinus limosus* I, predichas por RAST, KEGG y NCBI. CDS: número de secuencias de codificación para esa proteína en el genoma.

El análisis de los scaffolds de I mostró a los genes relacionados con la biodegradación de hidrocarburos aromáticos distribuidos a lo largo de todo el genoma. Se encontró también una alta proporción de CDS relacionados con reguladores transcripcionales.

#### V.2.3.3.f Análisis genómico de la cepa *Burkholderia sp. Bk*

Los datos del ensamble y anotación del genoma de la cepa Bk se describen en la tabla V.9. En el análisis de los 41 scaffolds se predijeron 104 CDS de enzimas involucradas en diferentes pasos de la vía superior e inferior de degradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos (Tabla V.15). Principalmente se encontraron enzimas dioxigenasas, muchas presentes en varias copias, que podrían estar implicadas en los primeros pasos de la vía de degradación de fenanreno (pasos 1 y 3) de la figura señalador y enzimas específicas de sustrato, la mayoría de ellas involucrados en la vía inferior. También se encontraron enzimas pertenecientes a pasos enzimáticos de la degradación de alifáticos (Tabla V.S6).

Enzimas predichas - NCBI- <i>Burkholderia</i> sp. Bk			
Enzimas de vía alta	CDS	Enzimas de vía baja	CDS
Aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase α y β subunits	3	Anthranilate 1,2-dioxygenase (EC 1.14.12.3)	1
Naphthalene 1,2-dioxygenase (EC 1.14.12.12)	5	Catechol 1,2-dioxygenase (EC 1.13.11.1)	1
2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase (EC 1.13.11.39)	3	Catechol 2,3-dioxygenase (EC 1.13.11.2)	1
4,5-dioxygenase (EC 1.13.11.8)	1	3,4-dihydroxyphenylacetate 2,3-dioxygenase (EC 1.13.11.15)	1
Benzoate 1,2-dioxygenase subunit alfa (EC 1.14.12.10)	2	Homogentisate 1,2-dioxygenase (EC 1.13.11.5)	1
Benzoate 1,2-dioxygenase subunit beta (EC 1.14.12.10)	1	Gentisate 1,2-dioxygenase (EC 1.13.11.14)	1
Monoxygenase	1	Hydroxyquinol 1,2-dioxygenase (EC 1.13.11.37)	2
Salicylate hydroxylase (EC 1.14.13.1 )	2	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (EC 1.13.11.27)	4
(2Fe-2S)-binding protein	17	3-phenylpropionate dioxygenase (EC 1.14.12.19)	1
		Protocatechuate 3,4-dioxygenase α y β subunits (EC 1.13.11.3)	3
		4-hydroxybenzoate 3-monooxygenase (EC 1.14.13.33)	1
		Salicylaldehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.65)	1
		Mandelate racemase (EC 5.1.2.2)	1
		Maleylacetoacetate isomerase (EC 5.2.1.2)	2
		Salicylate hydroxylase (EC 1.14.13.1)	2
		5-carboxymethyl-2-hydroxymuconate isomerase (EC 5.3.3.10)	3
		3-carboxy-cis,cis-muconate cycloisomerase (EC 5.5.1.2)	2
		2-hydroxychromene-2-carboxylate isomerase (EC 1.99.1.4)	4
		4-carboxy-4-hydroxy-2-oxoadipate aldolase (EC 4.1.3.17)	3
		4-oxalocrotonate decarboxylase (EC 4.1.1.77)	1
		Carboxymuconolactone decarboxylase (EC 4.1.1.44)	3
		Muconolactone delta-isomerase (EC 5.3.3.4)	1
		3-isopropylmalate dehydratase α y β subunits (EC 4.2.1.33)	3
		2-oxopent-4-enoate hydratase (EC 4.2.1.80)	1
		4-oxalomesaconate hydratase (EC 4.2.1.83)	1
		2-keto-4-pentenoate hydratase (EC 4.2.1.80)	1
		4-carboxymuconolactone decarboxylase (EC 4.1.1.44)	9
		1,6-dihydroxycyclohexa-2,4-diene-1-carboxylate dehydrogenase (EC 1.3.1.25)	2
		Cysteine dioxygenase (EC 1.13.11.20)	2
		3-octaprenyl-4-hydroxybenzoate decarboxylase (EC 4.1.1.61)	1
		5-carboxymethyl-2-hydroxymuconate semialdehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.60)	1
		Alcohol dehydrogenase (EC 1.1.1.1)	4
		Aldehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.3)	4

**Tabla V.15.** Enzimas pertenecientes a las vías de degradación de PAH en el genoma de *Burkholderia* sp. Bk, predichas por RAST, KEGG y NCBI. CDS: número de secuencias de codificación para esa proteína en el genoma.

El análisis de los scaffolds de la cepa Bk mediante RAST, mostró que gran parte de los genes que podrían estar involucrados en las vías de degradación de PAH, se encontraban agrupados en un mismo scaffold. Esto nos llevó a pensar que estaban organizados de alguna manera específica. Se comparó la secuencia completa de los scaffolds 5 y 22 con genomas bacterianos de la base de datos GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank)) y la herramienta blastn contra la secuencia de nucleótidos similares en genomas caracterizados. El scaffold 5 alineó con un 86% de identidad y una cobertura del 68% (E-Valor de 0.0) con una secuencia completa del cromosoma 1 de *Burkholderia* sp. HB-1 (NBRC 110738), una

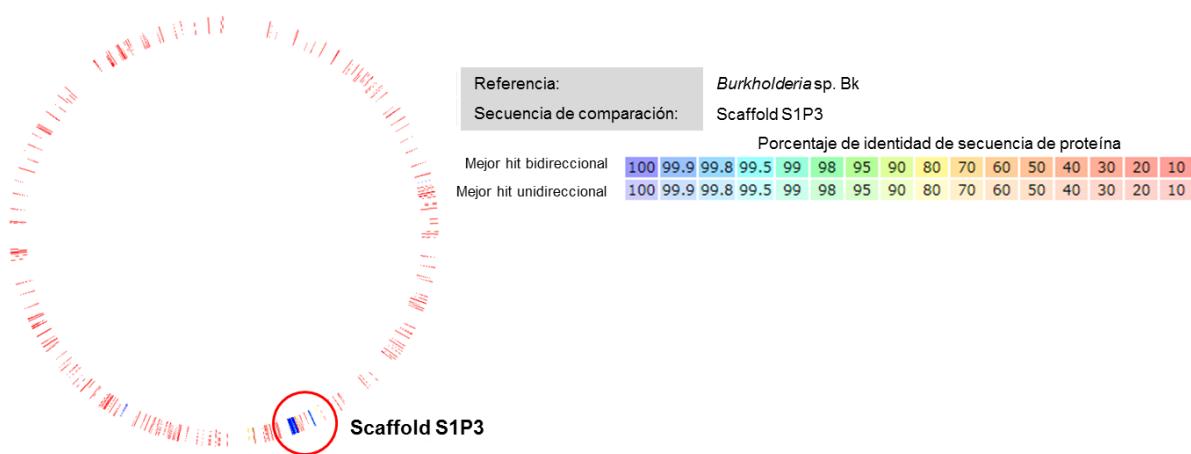
cepa degradadora de fenantreno (Ohtsubo, 2015), aislada de una muestra de suelo prístico enriquecido con fenantreno (Número de acceso a Genbank: CP012192), que comprende dos cromosomas circulares de 4,1 Mb y 3,1 Mb. El scaffold 22 mostró un 99% de identidad y un 94 % de cobertura con la misma secuencia de *Burkholderia* sp. HB-1 y una orientación y organización genómica (99% de identidad y 14% de cobertura) con una secuencia completa dirigida a los genes degradadores de dibenzotifeno (*dbtC*) de la cepa *Burkholderia* sp. DBT1. Esta secuencia contiene genes de una isomerasa putativa, oxidoreductasa putativa, extradiol dioxygenasa *DbtC* (*dbtC*), dioxygenasa ferrodoxina *DbtAb* (*dbtAb*), la subunidad alfa de una monooxygenasa, hidrolasa putativa, un componente ferredoxin reductasa de dioxygenasas PAH (*dbtAa*) y genes de hidratasa-aldolasa (*dbtE*).

El scaffold 25 reveló el 99% de identidad y el 25% de cobertura con el clúster de genes *phn* de la cepa *Burkholderia* sp. RP007, aislada de un suelo contaminado con fenantreno, que constituye un grupo de genes ortólogos para el catabolismo de hidrocarburos policíclicos aromáticos (Laurie, 1999).

#### **V.2.3.4 Análisis comparativo con los scaffolds de la librería metagenómica funcional de CON**

En trabajos previos de nuestro grupo se construyó una biblioteca metagenómica a partir de DNA de un cultivo de CON en 200 mg/L de fenantreno como única fuente de carbono y energía, después de 2 días de incubación (Festa y col. 2017). El posterior screening funcional y afiliación taxonómica mediante el servidor NCBI mostró que uno de los scaffolds (S1P3) tenía una alta similitud con un fragmento del genoma de *Burkholderia* sp. HB1 cromosoma 1 (nº acceso NCBI: NZ\_CP012192.1); ambas secuencias compartieron 99% de identidad y una cobertura de 80% (E-Valor de 0.0). La predicción y anotación funcional de los genes identificados utilizando RAST mostró que un 38% correspondía a genes putativos implicados en la biodegradación de PAH.

Se comparó el genoma secuenciado de *Burkholderia* sp. Bk con el scaffold S1P3 de CON mediante la herramienta del software RAST de “comparación en base a secuencia”. Cada gen se colorea basado en la similitud de proteínas usando BLASTp. En la escala de colores, se puede ver que el azul representa la similitud de secuencia de proteína más alta y el rojo la más baja. En la figura V.8 se muestra el diagrama circular de comparación entre Bk y S1P3 (como genoma de referencia), con el genoma coloreado dependiendo la similitud. El alineamiento mostró una alta similitud con el scaffold 22 de la cepa Bk, marcado como color azul dentro del círculo rojo de la figura V.8. Esto confirmaría que la secuencia encontrada en la librería metagenómica corresponde a la cepa aislada Bk.

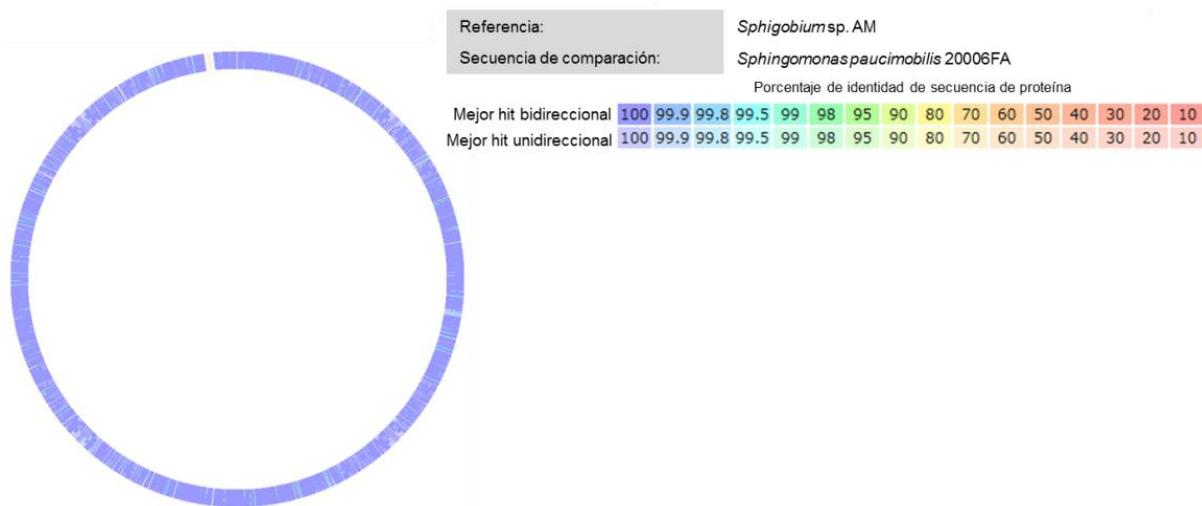


**Figura V.8.** Mapa circular del genoma de la cepa *Burkholderia* sp. Bk alineado con el scaffold S1P3 de CON (mostrado con un círculo rojo) mediante RAST.

El alineamiento del genoma de Bk y el scaffold S1P3 mostró que gran parte de los genes encontrados corresponden a la ruta de degradación de PAH, entre ellos genes de la subunidad mayor de la naftaleno/bifenil dioxigenasa, las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de benzoato 1,2-dioxigenasa, hidroxilasas, isomerasas, aldolasas, aldehído deshidrogenasas, el regulador transcripcional GntR, elementos móviles, entre otros.

#### V.2.3.5 Análisis comparativo de los genomas de las cepas *Sphingobium* sp. AM y *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA

En el reporte de anotación y ensamble genómico de AM de NCBI, el vecino más cercano, con un 99% de similitud fue la cepa 20006FA. Se utilizó la herramienta de comparación basada en secuencia de RAST, a fin de alinear los genomas de los dos organismos. En la figura V.9 se muestra el diagrama circular de comparación entre AM y 20006FA (como genoma de referencia), con el genoma coloreado dependiendo la similitud realizada por BLASTp.



**Figura V.9.** Mapa circular del genoma de la cepa *Sphingobium* sp. AM alineado con el genoma de la cepa *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA mediante RAST. El color azul representa la similitud más alta y el rojo la más baja.

Como se muestra en el mapa circular, los genomas reflejaron alta similitud, con pocas regiones de color rosado de similitud más baja.

#### V.2.3.6 Clasificación de enzimas dioxigenasas implicadas en la vía superior e inferior de la degradación de fenantreno

Durante los estudios fisiológicos de degradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos pudimos observar que no todas las cepas tienen la capacidad de degradar PAH en cultivos puros a pesar de contener en su genoma genes que codifican enzimas dioxigenasas vinculadas a su degradación (Tablas V.10, V.11, V.12, V.13, V.14 y V.15). Se realizó la clasificación de las enzimas dioxigenasas de compuestos aromáticos, presentes en todas las cepas, que puedan actuar tanto de la vía superior como inferior de fenantreno mediante las bases de datos específicas para genes dioxigenasas RHObase y AromaDeg. Se utilizaron las secuencias homólogas a la subunidad α de enzimas hidroxilantes de anillo aromático y para AromaDeg también secuencias de proteínas catabólicas que pueden incluir extradiol dioxigenasas. Las secuencias de aminoácidos en formato FASTA extraídas de la base pública NCBI utilizadas para este análisis se encuentran en material suplementario (Tabla V.S7).

Tal como se explicó en el capítulo I sección I.4.3, la afiliación filogenética de RHO en las diferentes clases y de AromaDeg en diferentes superfamilias, proporcionó un indicio de la especificidad de sustrato que poseen las diferentes enzimas encontradas en los genomas de todas las cepas.

#### V.2.3.6.a Clasificación de dioxigenasas de la cepa *Sphingobium sp. AM*

Los resultados de la clasificación por RHObase de las dioxigenasas de la cepa AM se muestran en la tabla V.16, donde también se detalla el paso de la vía que podrían catalizar (Figura señalador). Las cuatro copias de la subunidad  $\alpha$  de dioxigenasas de anillo aromático, que presentaron un gen adyacente y codireccional correspondiente a la subunidad beta de enzimas dioxigenasas, y la naftaleno 1,2-dioxigenasa se clasificaron en clase A. La enzima benzoato 1,2-dioxigenasa clasificó como B, también con su subunidad  $\beta$  adyacente. Estas enzimas dioxigenasas incorporan dos grupos oxhidrilo en posiciones cercanas a grupos carboxilatos aromáticos como benzoatos y toluatos. Las enzimas bifenil 1,2- dioxigenasa (*BphA1d*) y la proteína Rieske (2Fe-2S), presente en 3 copias, clasificaron como clase C, enzimas capaces de formar catecol o gentisato a partir de salicilato; o que catalizan la formación de catecol a partir de antranilato. Las ferredoxina 2Fe-2S, presentes en 4 copias, y la enzima salicilato hidroxilasa clasificaron en clase D, que tienen como sustratos potenciales al ftalato e hidrocarburos heterocíclicos.

Si bien no todas las secuencias de las subunidades  $\alpha$  de enzimas dioxigenasas, pertenecientes al genoma de AM, pudieron ser clasificadas en RHObase, se encontraron los cuatro clases de dioxigenasas que predice la base de datos, lo cual muestra la diversidad de sustratos aromáticos que podrían hidroxilar estas enzimas, indicando que la cepa podría atacar sustratos tanto de la vía superior como inferior de degradación de fenantreno.

Nombre de la proteína - AM	Longitud (aa)	Presencia del gen de la subunidad β	Clase	Possible paso de la ruta catalizado
Aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase alpha (4 copias)	438	sí	A	1
Naphthalene 1,2-dioxygenase	385	no	A	1
Benzoate 1,2-dioxygenase alpha	472	sí	B	10, 15
Biphenyl 1,2-dioxygenase	299	no	C	19, 21
Rieske (2Fe-2S) protein (3 copias)	238	no	C	19, 21
2Fe-2S ferredoxin (4 copias)	240	no	D	10, 15
Salicylate hydroxylase	312	no	D	10, 15

**Tabla V.16.** Clasificación de las secuencias de la subunidad α de enzimas dioxigenasas de la cepa AM, longitud de la secuencia (aa), presencia de gen codificante para la subunidad β contiguo al gen codificante para la subunidad α de la enzima dioxigenasa encontrado, clasificación funcional y posible paso de la ruta catalizado de la Figura señalador.

Nombre de la proteína - AM	Clasificación (superfamilias)
Aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase alpha (4 copias)	RHO
Catechol 2,3-dioxygenase	EXDO I
2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase	EXDO I

**Tabla V.17.** Clasificación de las secuencias de la subunidad α de enzimas dioxigenasas y extradiol dioxigenasas de la ruta de degradación de fenantreno en la cepa AM en superfamilias mediante AromaDeg.

Utilizando el servidor AromaDeg, se logró obtener la clasificación de las cuatro copias de las dioxigenasas de anillo aromático en la superfamilia RHO de las oxigenasas que contienen un centro Rieske con hierro (tipo no hemo). La enzima catecol 2,3-dioxigenasa y la enzima 2,3-dihidroxibifenil 1,2-dioxigenasa clasificaron en la familia de las enzimas extradiol dioxigenasas que pertenecen a proteínas quelantes de oxígenos vecinales (EXDO I),

caracterizadas típicamente por tener preferencia por los sustratos monocíclicos y bicíclicos, respectivamente (Tabla V.17).

#### V.2.3.6.b Clasificación de enzimas dioxigenasas de la cepa *Klebsiella aerogenes B*

Mediante la clasificación en RHObase que se muestra en la tabla V.18, la enzima benceno 1,2-dioxigenasa subunidad alfa (con el gen de la subunidad β adyacente) y la proteína de unión (2Fe-2S) clasificaron en clase B, mientras que la naftaleno 1,2-dioxigenasa y la proteína Rieske (2Fe-2S), en la clase D. Esta clasificación sugiere que esta cepa tiene enzimas que participarían del ataque de sustratos de la vía baja de degradación de fenantreno, ya que ninguna secuencia clasificó como clase A.

Nombre de la proteína - B	Longitud (aa)	Presencia del gen de la subunidad β	Clase	Possible paso de la ruta catalizado
Benzene 1,2-dioxygenase large	460	sí	B	10, 15
(2Fe-2S)-binding protein	434	no	B	10, 15
(2Fe-2S)-binding protein	87	no	D	10, 15
Naphthalene 1,2-dioxygenase	107	no	D	10, 15

**Tabla V.18.** Clasificación de las secuencias de la subunidad α de enzimas dioxigenasas de la cepa B, longitud de la secuencia (aa), presencia de gen codificante para la subunidad β contiguo al gen codificante para la subunidad α de la enzima dioxigenasa encontrado, clasificación funcional y posible paso de la ruta catalizado de la Figura señalador.

Utilizando el servidor AromaDeg se clasificó la enzima benceno 1,2-dioxigenasa en la superfamilia RHO de subunidades α de oxigenasas que contienen un centro Rieske con hierro (tipo no hemo) que tienen como sustratos potenciales benzoato y 2-clorobenzoato. La enzima 3,4-dihidroxifenilacetato 2,3-dioxigenasa clasificó en EXDO II y la enzima gentisato 1,2-dioxigenasa en EXDO III (Tabla V.19).

Nombre de la proteína - B	Clasificación (superfamilias)
Benzene 1,2-dioxygenase large	RHO
3,4-dihydroxyphenylacetate 2,3-dioxygenase	EXDO II
Gentisate 1,2-dioxygenase	EXDO III

**Tabla V.19.** Clasificación de las secuencias de la subunidad  $\alpha$  de enzimas dioxigenasas y extradiol dioxigenasas de la ruta de degradación de fenantreno en la cepa B en superfamilias mediante AromaDeg.

#### V.2.3.6.c Clasificación de enzimas dioxigenasas de la cepa *Pseudomonas sp. Bc-h*

Mediante la clasificación en RHObase que se muestra en la tabla V.20 la subunidad  $\alpha$  de dioxigenasas hidroxilantes de anillo aromático clasificó como clase A, con la subunidad  $\beta$  adyacente; la subunidad  $\alpha$  de la benzoato 1,2-dioxigenasa, también con la subunidad  $\beta$  adyacente y las dos proteínas Rieske (2Fe-2S) se clasificaron como B, y dos enzimas ferredoxinas (2Fe-2S) como clase D. En esta cepa no se encontraron enzimas que clasifiquen en C, las que podrían ser activas en el ataque de salicilato.

Nombre de la proteína - Bc-h	Longitud (aa)	Presencia del gen de la subunidad $\beta$	Clase	Possible paso de la ruta catalizado
Aromatic ring-hydroxylating dioxygenase subunit alpha	469	sí	A	1
Benzoate 1,2-dioxygenase large	458	sí	B	10, 15
(2Fe-2S)-binding protein	356	no	B	10, 15
Rieske (2Fe-2S) protein	121	no	B	10, 15
2Fe-2S ferredoxin	121	no	D	10, 15
(2Fe-2S)-binding protein	172	no	D	10, 15

**Tabla V.20.** Clasificación de las secuencias de la subunidad  $\alpha$  de enzimas dioxigenasas de la cepa Bc-h, longitud de la secuencia (aa), presencia de gen codificante para la subunidad  $\beta$  contiguo al gen codificante para la subunidad  $\alpha$  de la enzima dioxigenasa encontrado, clasificación funcional y posible paso de la ruta catalizado de la Figura señalador.

Utilizando el servidor AromaDeg se clasificó la subunidad  $\alpha$  de enzimas hidroxilantes de anillo aromático en la superfamilia de las RHO y la enzima 2,3-dihidroxibifenil 1,2-dioxigenasa en la superfamilia de las EXDO I, que tienen preferencia por sustratos bicíclicos (Tabla V.21).

Nombre de la proteína - Bc-h	Clasificación (superfamilias)
Aromatic ring-hydroxylating dioxygenase subunit alpha	RHO
2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase	EXDO I

**Tabla V.21.** Clasificación de las secuencias de la subunidad  $\alpha$  de enzimas dioxigenasas y extradiol dioxigenasas de la ruta de degradación de fenantreno en la cepa Bc-h en superfamilias mediante AromaDeg.

#### V.2.3.6.d Clasificación de enzimas dioxigenasas de la cepa *Pseudomonas sp. T*

Mediante la clasificación en RHObase que se muestra en la tabla V.22, en la cepa T se encontraron enzimas que clasificaron en las de clases A, B y D (la mayoría correspondientes a las secuencias de aminoácido de las ferredoxinas (2Fe-2S) y una que clasificó en clase B que correspondió a la subunidad  $\alpha$  de la benzoato 1,2-dioxigenasa con la subunidad  $\beta$  adyacente.

En esta cepa no se encontraron enzimas que clasifiquen en C, que podrían ser activas en el ataque de salicilato.

Nombre de la proteína NCBI - T	Longitud (aa)	Presencia del gen de la subunidad $\beta$	Clase	Possible paso de la ruta catalizado
(2Fe-2S)-binding protein	115	no	A	1
Benzoate 1,2-dioxygenase large	455	sí	B	10, 15
Rieske (2Fe-2S) protein	427	no	B	10, 15
Rieske (2Fe-2S) protein	108	no	D	10, 15
2Fe-2S ferredoxin	112	no	D	10, 15

**Tabla V.22.** Clasificación de las secuencias de la subunidad  $\alpha$  de enzimas dioxygenasas de la cepa T, longitud de la secuencia (aa), presencia de gen codificante para la subunidad  $\beta$  contiguo al gen codificante para la subunidad  $\alpha$  de la enzima dioxygenasa encontrado, clasificación funcional y posible paso de la ruta catalizado de la Figura señalador.

Nombre de la proteína NCBI - T	Clasificación (superfamilias)
Benzoate 1,2-dioxygenase large	RHO
Rieske (2Fe-2S) protein	RHO

**Tabla V.23.** Clasificación de las secuencias de la subunidad  $\alpha$  de enzimas dioxygenasas y extradiol dioxygenasas de la ruta de degradación de fenanreno en la cepa T en superfamilias mediante AromaDeg.

Utilizando el servidor AromaDeg, las enzimas benzoato 1,2-dioxigenasa y la proteína Rieske (2Fe-2S) también clasificaron en la superfamilia RHO (Tabla V.23).

#### V.2.3.6.e Clasificación de enzimas dioxygenasas de la cepa *Inquilinus limosus* I

Mediante la clasificación en RHObase que se muestra en la tabla V.24, la enzima benzoato 1,2-dioxigenasa, con el gen de la subunidad  $\beta$  adyacente, de la cepa I clasificó como B.

Nombre de la proteína - I	Longitud (aa)	Presencia del gen de la subunidad β	Clase	Possible paso de la ruta catalizado
Benzoate 1,2-dioxygenase large subunit	449	sí	B	10, 15

**Tabla V.24.** Clasificación de las secuencias de la subunidad α de enzimas dioxigenasas de la cepa I, longitud de la secuencia (aa), presencia de gen codificante para la subunidad β contiguo al gen codificante para la subunidad α de la enzima dioxigenasa encontrado, clasificación funcional y posible paso de la ruta catalizado de la Figura señalador.

Nombre de la proteína - I	Clasificación (superfamilias)
Benzoate 1,2-dioxygenase large subunit	RHO
Gentisate 1,2-dioxygenase	EXDO III

**Tabla V.25.** Clasificación de las secuencias de la subunidad α de enzimas dioxigenasas y extradiol dioxigenasas de la ruta de degradación de fenantreno en la cepa I en superfamilias mediante AromaDeg.

Utilizando el servidor AromaDeg se clasificó la enzima benzoato 1,2-dioxigenasa en la superfamilia RHO y la enzima gentisato 1,2-dioxigenasa en EXDO III (Tabla V.25).

#### V.2.3.6.f Clasificación de enzimas dioxigenasas de la cepa *Burkholderia sp. Bk*

Mediante la clasificación en RHObase que se muestra en la tabla V.26, las dos enzimas naftaleno 1,2-dioxigenasas clasificaron como A, dos benzoatos 1,2-dioxigenasas como B, la salicilato hidroxilasa como C y tres copias de subunidades α de dioxigenasas hidroxilantes de anillo aromático que tienen una subunidad β adyacente como D.

Al igual que la cepa AM, en Bk se encontraron las cuatro clases de enzimas según RHObase de diferentes clases funcionales: A, B, C y D.

Nombre de la proteína - Bk	Longitud (aa)	Subunidad β	Clase	Possible paso de la ruta catalizado
Naphthalene 1,2-dioxygenase	452	no	A	1
Naphthalene 1,2-dioxygenase	450	no	A	1
Benzoate 1,2-dioxygenase large subunit	452	sí	B	10, 15
Benzoate 1,2-dioxygenase large subunit	481	no	B	10, 15
Salicylate hydroxylase	418	no	C	19, 21
Aromatic ring-hydroxylating dioxygenase subunit alpha (3 copias)	372	sí	D	10, 15

**Tabla V.26.** Clasificación de las secuencias de la subunidad α de enzimas dioxigenasas de la cepa Bk, longitud de la secuencia (aa), presencia de gen codificante para la subunidad β contiguo al gen codificante para la subunidad α de la enzima dioxigenasa encontrado, clasificación funcional y posible paso de la ruta catalizado de la Figura señalador.

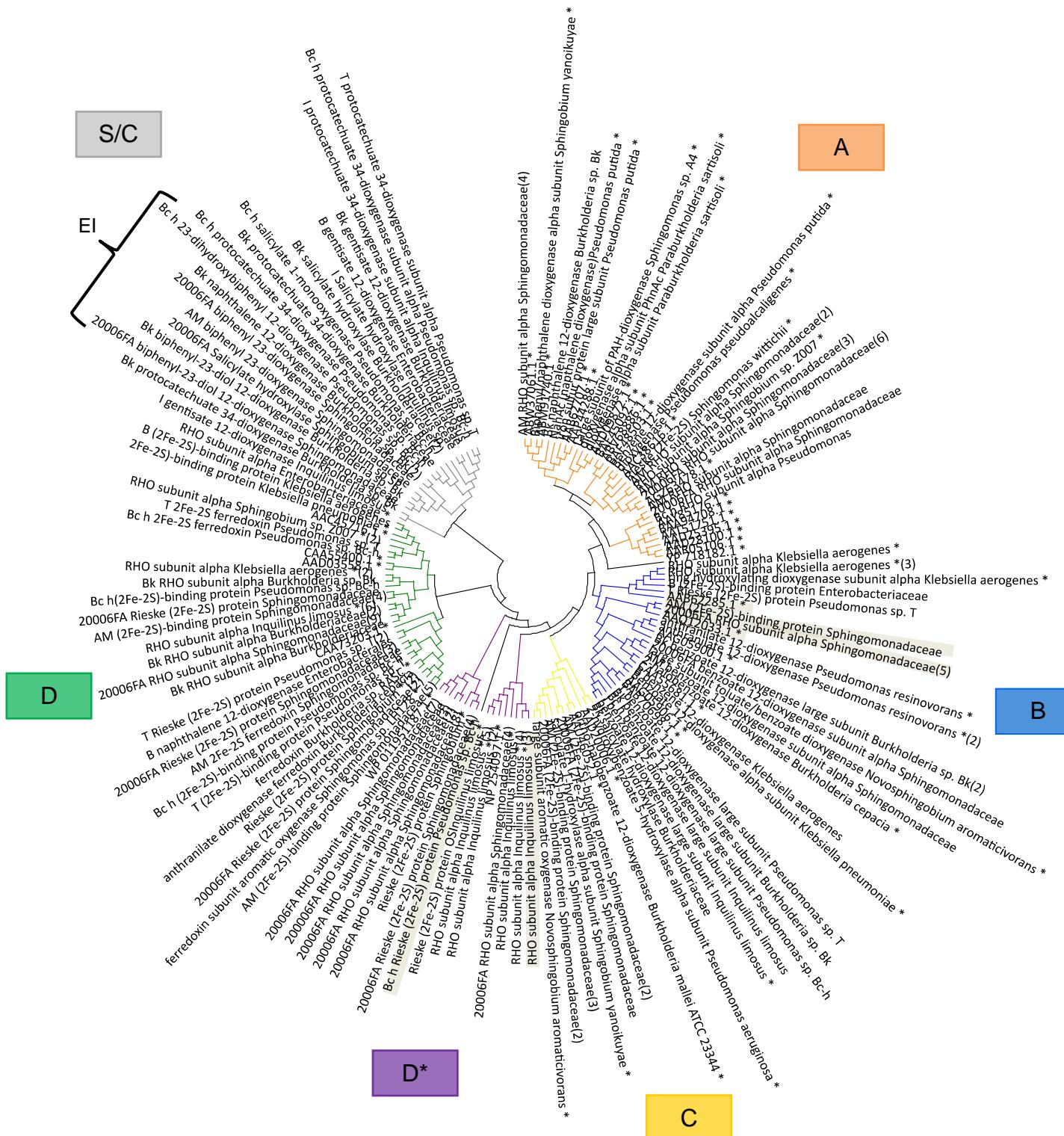
Utilizando el servidor AromaDeg se clasificaron las enzimas benzoato 1,2-dioxigenasa, naftaleno 1,2-dioxigenasa en la superfamilia RHO, y las enzimas 2,3-dihidroxibifenil 1,2-dioxigenasa y catecol 2,3-dioxigenasa en EXDO I, que tienen preferencia por sustratos bicíclicos y monocíclicos, las enzimas 2,4 dihidroxifenilacetato 2,3-dioxigenasa y protocatecuato 3,4-dioxigenasa en EXDO II, y la gentisato 1,2-dioxigenasa en EXDO III (Tabla V.27).

Nombre de la proteína - Bk	Clasificación (superfamilias)
Naphthalene 1,2-dioxygenase	RHO
Benzoate 1,2-dioxygenase large subunit	RHO
2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase	EXDO I
Catechol 2,3-dioxygenase	EXDO I
3,4-dihydroxyphenylacetate 2,3-dioxygenase	EXDO II
Protocatechuate 3,4-dioxygenase	EXDO II
Gentisate 1,2-dioxygenase	EXDO III

**Tabla V.27.** Clasificación de las secuencias de la subunidad  $\alpha$  de enzimas dioxigenasas y extradiol dioxigenasas de la ruta de degradación de fenantreno en la cepa Bk en superfamilias mediante AromaDeg.

#### V.2.3.7 Estudio filogenético de las enzimas dioxigenasas pertenecientes a las cepas aisladas de CON

Con el objetivo de evaluar la relación de las enzimas dioxigenasas involucradas en la degradación de PAH, se realizó un análisis filogenético de las mismas. Se construyó un árbol filogenético a partir del alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las subunidades  $\alpha$  de las enzimas dioxigenasas de todas las cepas aisladas: AM, B, Bc-h, T, I, Bk y 20006FA. En el alineamiento se incluyeron secuencias de referencia representativas, algunas que habían sido previamente clasificadas (Wanapasian y col., 2018; Khara y col., 2014) y otras secuencias de aminoácidos seleccionadas de UniProt y Genbank y que pertenecen a las mismas especies que las cepas aisladas de CON.



**Figura V.10.** Árbol filogenético que muestra la relación filogenética de las secuencias de aminoácidos de las subunidades  $\alpha$  de las dioxigenasas de las cepas AM, B, Bc-h, T, I, Bk y 20006FA. El árbol se construyó utilizando el método Neighbor-Joining y el algoritmo p-distance basándose en la matriz de distancia obtenida en base al alineamiento de todas las secuencias obtenido con ClustalW con la versión 7 del software MEGA (Tamura y col., 2007). \*: Secuencias de referencia.

Para construir el árbol se utilizó el programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis package (MEGA versión 7.0). Las secuencias fueron alineadas mediante la función ClustalW y el árbol filogenético obtenido por Neighbor-Joining (NJ) que se muestra en la figura V.10. Las secuencias FASTA de las cepas aisladas de nuestro trabajo utilizadas en este análisis se muestran en material suplementario (Tablas IV.S2 y V.S7), y los códigos de las secuencias de referencias en las Tablas V.S8 y V.S9.

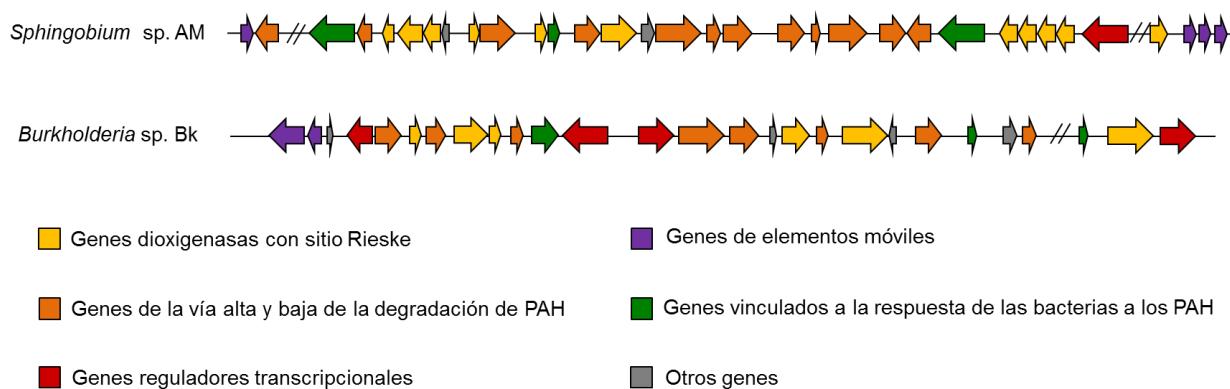
Los resultados de la figura V.10 muestran dos ramas principales, una que agrupa 5 clados, que incluyen a todas las enzimas hidroxilantes de anillo aromático, y otra rama con un sólo clado, que contiene las extradiol e intradiol dioxigenasas, haciendo un total de 6 clados diferentes. Todas las secuencias de las subunidades  $\alpha$  de enzimas dioxigenasas de las cepas aisladas, previamente clasificadas, se relacionaron con las secuencias de referencia también clasificadas en las 4 clases propuestas del esquema de RHObase (A, B, C y D) y en la clase no caracterizada D\* que no tienen especificidad de sustrato. Sólo cuatro de las secuencias de referencia utilizadas para este análisis y dos de las secuencias de las cepas de nuestro estudio (una secuencia dioxigenasa de la cepa AM y otra de la cepa 20006FA) no clasificaron dentro del grupo correspondiente (sombreadas en gris en la Figura V.10). Asimismo, dentro de los subclados se encontró similitud significativa entre secuencias dioxigenasas de las cepas aisladas en este trabajo con las cepas de referencia de la misma especie. El análisis de agrupamiento realizado coincidió con los datos obtenidos mediante la clasificación por RHObase de cada clase y también con aquellas secuencias de dioxigenasas que no habían podido ser clasificadas por la base de datos, que se agruparon en el clado S/C juntos con secuencias de enzimas extradiol dioxigenasas. Además, dentro de este clado, un subclado (EI), perteneció a secuencias de EXDO I, que se obtuvo de la clasificación en AromaDeg.

El árbol filogenético de dioxigenasas reveló que el agrupamiento depende ampliamente de la especificidad de sustrato. Esto confirmaría que las enzimas dioxigenasas de las cepas aisladas que se encuentran dentro del mismo clado podrían estar involucradas en la degradación del mismo sustrato en la ruta de degradación de fenantreno. Aquellas enzimas que se agruparon en el clado D\*, deberían verificarse mediante análisis moleculares y bioquímicos adicionales para confirmar su especificidad de sustrato.

Por otro lado, el análisis filogenético reveló que las proteínas de las mismas especies están cercanamente relacionadas.

### V.2.3.8 Reguladores transcripcionales de los genes de la ruta de degradación de hidrocarburos

Para aquellas cepas que presentaron degradación de PAH, se decidió estudiar sus entornos genómicos para poder identificar reguladores transcripcionales que pudieran participar en la regulación de la expresión de genes de las vías de degradación de hidrocarburos. Este análisis se realizó manualmente utilizando el explorador genómico Artemis y RAST. Los factores de transcripción se pueden agrupar en base al análisis de su secuencia. Se han identificado gran variedad de proteínas reguladoras incluidas en distintas familias de reguladores transcripcionales procariotas que controlan la expresión de las rutas catabólicas de degradación de compuestos aromáticos, entre ellas NtrC, LysR, XylS, IclR, MarR, GntR y TetR, son las mejores caracterizadas (Pérez-Rueda y Collado-Vides, 2000). En la tabla V.28 se muestran genes de reguladores transcripcionales de AM y Bk que podrían controlar la expresión de enzimas de las rutas catabólicas de la degradación de compuestos aromáticos, como LysR y NtrC (sólo presente en Bk) y otros pertenecientes a las familias AraC, FNR, MarR y GntR, que se encuentran cercanos a genes de enzimas dioxigenasas, y genes que participan en la vía alta y baja de degradación de fenantreno y otros que participan en la degradación de diferentes PAH, como también elementos móviles que promueven la transferencia de esos genes. La figura V.11 muestra la organización genética de una región de los genomas de AM y Bk, donde se puede ver la cercanía de genes dioxigenasas a algún regulador transcripcional (gen coloreado en rojo).



**Figura V.11.** Esquema de organización génica encontrada en una región de los scaffolds 34 y 25 de las cepas AM y Bk, respectivamente. Cada secuencia codificante (CDS) se muestra con flechas y se colorea dependiendo de la función de sus productos génicos.

Reguladores transcripcionales - Genbank NCBI	nº de copias de los genes	
	AM	Bk
NtrC/XyIR	-	1
LysR/CatR	35	145
AraC/XylS	10	59
IclR	4	8
TetR/MarR/FNR	0	0
GntR	10	25

**Tabla V.28.** Reguladores transcripcionales encontrados en los genomas de las cepas AM y Bk.

### V.2.3.9 Reconstrucción de la red metabólica guiada por los datos genómicos y filogenéticos

Al analizar los genomas de las cepas de CON mediante el servidor RAST y la base de datos NCBI se encontraron enzimas que pueden catalizar diferentes pasos de la vía de degradación de fenantreno propuesta. En la Figura V.12 se agruparon los datos de los genes de enzimas de la vía de degradación de fenantreno de todas las cepas aisladas, representadas cada una con un círculo de color, y ubicada en el paso que podría participar según tenga en su genoma la enzima o enzima homóloga necesaria para catalizar ese paso. Dentro de los genomas de las cepas aisladas se encontraron enzimas dioxygenasas que participan de algunos pasos claves en la degradación de fenantreno (Tabla V.29 y Figura V.S1). Las enzimas 2,3-dihidroxibifenil 1,2-dioxigenasa (EC 1.13.11.39) y 4,5-dioxigenasa (EC 1.13.11.8), halladas en AM, Bc-h, Bk y 20006FA, podrían catalizar el paso inicial de ataque al fenantreno. Otras dioxygenasas como las subunidades alfa y beta de la dioxygenasa de anillo aromático (EC 1.14.12.-), la bifenilo 2,3-dioxigenasa (EC 1.14.12.18) y la naftaleno 1,2 dioxigenasa (EC 1.14.12.12), que podrían actuar en el paso 10, se encontraron en todas las cepas. Para el paso 7 donde actúa una dioxygenasa EC 1.13.11.- sólo se encontraron enzimas homólogas en las cepas AM, 20006FA, Bc-h y Bk. Es interesante remarcar que en este análisis *in silico* la enzima clave que atacarían el AHN por meta clivaje (Paso 14), una salicilato monooxygenasa/hidroxilasa (EC 1.14.13.1), se encontró en las cepas AM, 20006FA, Bc-h, I y Bk.

El juego completo de enzimas que serían necesarias para la ruta de degradación de fenantreno (Tabla V.29 y Figura V.S1) se encontró en las cepas AM, 20006FA, Bc-h y Bk.

Pasos de la vía de degradación de fenantreno	Enzimas predichas de la vía Alta y Baja de degradación de fenantreno	Cepas
1, 3, 7	2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase (EC 1.13.11.39)	AM Bc-h Bk Sp
1, 3, 7	4,5-dioxygenase (EC 1.13.11.8)	Bk
1, 10	Aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase alpha and beta subunit (EC 1.14.12.-)	AM B Bc-h Bk Sp
2, 11	2,3-dihydroxybenzoate-2,3-dehydrogenase (EC 1.3.1.28)	B
2, 11	1,2-dihydroxycyclohexa-3,5-diene-1-carboxylate dehydrogenase (EC 1.3.1.25)	Bc-h
2, 11	1,6-dihydroxycyclohexa-2,4-diene-1-carboxylate dehydrogenase (EC 1.3.1.25)	AM Bc-h B T I Bk Sp
4	Mandelate racemase (EC 5.1.2.2)	Bk
4	Maleylacetoacetate isomerase (EC 5.2.1.2)	AM B Bc-h I Bk Sp
5, 12, 17	3,4-dihydroxybenzoate decarboxylase (EC 4.1.1.63)	B
5, 12, 17	4-carboxymuconolactone decarboxylase (EC 4.1.1.44)	AM B Bc-h T I Bk Sp
5, 8	Carboxymuconolactone decarboxylase (EC 4.1.1.44)	AM T Bk Sp
5, 8, 17	4-hydroxy-2-oxovalerate aldolase (EC 4.1.3.39)	AM B Bc-h T I Sp
6	Acetaldehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.10)	AM B Bc-h T I Bk Sp
8	4-oxalocrotonate decarboxylase (EC 4.1.1.77)	AM T Sp
9	Aldehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.3)	AM B Bc-h T Sp
9	2-hydroxymuconic semialdehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.60)	AM Sp
10	Biphenyl 2,3-dioxygenase (EC 1.14.12.18)	AM Sp
10	Naphthalene 1,2-dioxygenase (EC 1.14.12.12)	AM B Bk Sp
10	Benzoate 1,2-dioxygenase alpha and beta subunit (EC 1.14.12.10)	AM Bc-h T I Bk Sp
10	Anthranilate 1,2-dioxygenase small subunit (EC 1.14.12.1)	AM Bk Sp
13, 15	Protocatechuate 3,4-dioxygenase alpha and beta subunit (EC 1.13.11.3)	B Bc-h T I Bk
13, 15, 20	Gentisate 1,2-dioxygenase (EC 1.13.11.4)	B I Bk
13, 15, 20	Homogentisate 1,2-dioxygenase (EC 1.13.11.5)	AM Bc-h T I Bk Sp
13, 15, 20	3,4-dihydroxyphenylacetate 2,3-dioxygenase (EC 1.13.11.15)	B Bk
14, 19, 21	Salicylate 1-monooxygenase (EC 1.14.13.1)	AM Bc-h I Bk Sp
16	Muconolactone delta-isomerase (EC 5.3.3.4)	AM B Bc-h T I Bk Sp
16, 13	Muconate cycloisomerase (EC 5.5.1.1)	AM B Bc-h T Sp
17	2-keto-4-pentenoate hydratase (EC 4.2.1.80)	AM Bc-h I Bk Sp
18	Salicylaldehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.65)	T Bk
18	5-carboxymethyl-2-hydroxymuconate semialdehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.60)	AM B Bk Sp
18	2-hydroxymuconic semialdehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.32)	AM Sp
19	4-hydroxybenzoate 3-monooxygenase (EC 1.14.13.33)	B Bc-h T I Bk
21	n-hydroxybenzoate hydroxylase (EC 1.14.13.2)	B
21	4-hydroxybenzoate 3-monooxygenase (EC 1.14.13.33)	B Bc-h T Bk
21	Salicylate hydroxylase (EC 1.14.13.1)	B Bk
22	Catechol 1,2-dioxygenase (EC 1.13.11.1)	AM B Bc-h I Bk Sp
23	Catechol 2,3-dioxygenase (EC 1.13.11.2)	AM Bk Sp
22	Hydroxyquinol 1,2-dioxygenase (EC 1.13.11.37)	Bk
*	(2Fe-2S)-binding protein	AM B Bc-h T I BK Sp

**Tabla V.29.** Predicción de enzimas pertenecientes a los diferentes pasos de la ruta de degradación de fenantreno en las cepas aisladas de CON: *Sphingobium* sp. (AM), *Pseudomonas* sp. (Bc-h y T) *Klebsiella aerogenes* (B), *Inquilinus limosus* (I) y *Burkholderia* sp. (Bk), y la cepa exógena a CON *Sphingobium* sp. (20006FA) obtenida utilizando el servidor RAST y NCBI.

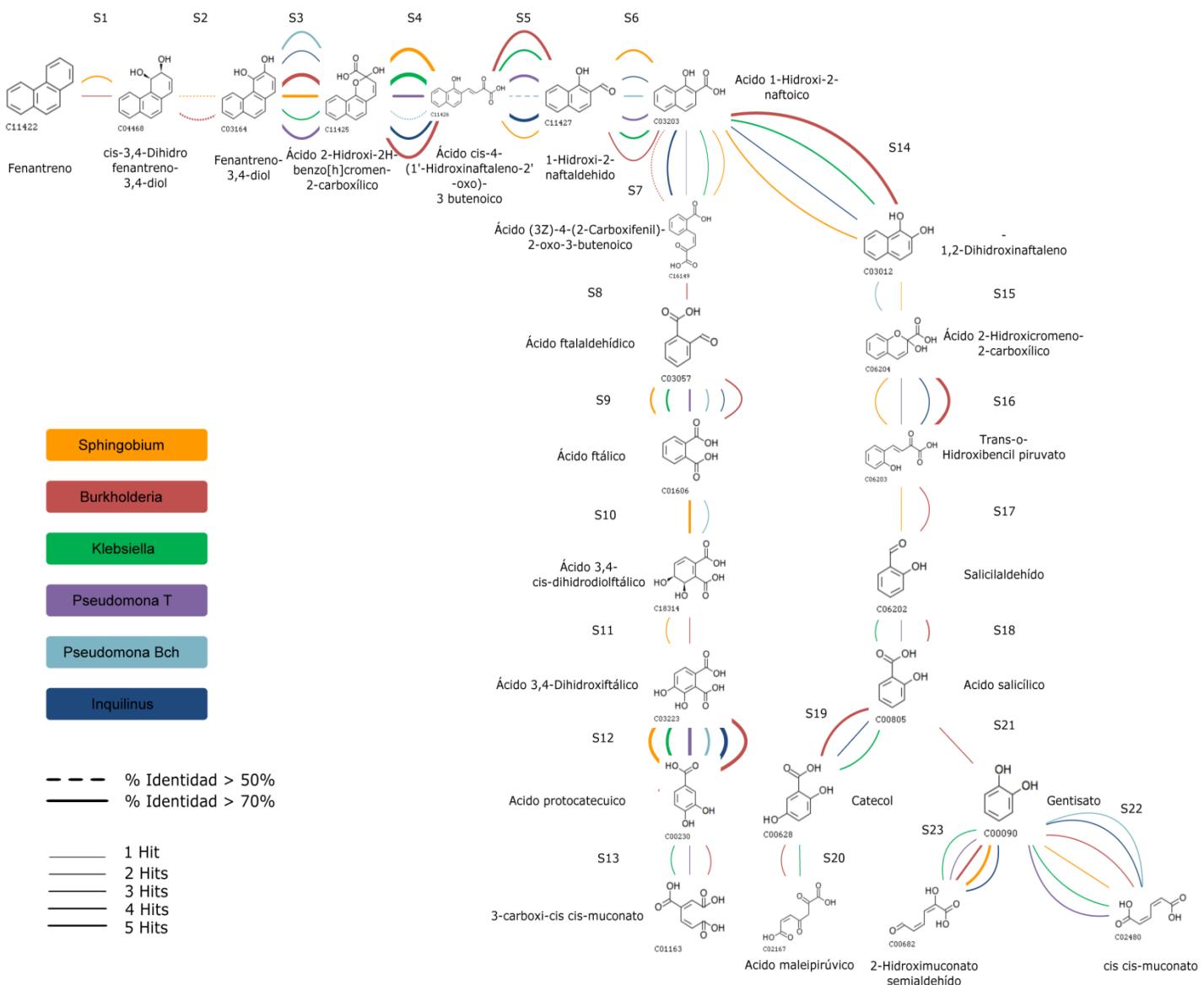
Los procedimientos de reconstrucción de red basados en datos "ómicos" son una herramienta invaluable para inferir un conjunto total y activo de reacciones mediadas por diferentes miembros en una comunidad microbiana. Dentro de ellos, los métodos basados en red para el análisis automático de capacidades catabólicas en genomas permiten el

aprovechamiento de los datos para obtener ideas claras de cómo funcionan los consorcios (Bargiela y Ferrer, 2017).

Partiendo de la ruta de degradación del fenantreno reportada en la base de datos KEGG, se seleccionaron todas las reacciones de interés y se identificaron las enzimas que participaban en cada etapa. Una vez obtenida la lista de enzimas, se descargaron todas las secuencias de aminoácidos correspondientes a cada enzima. Para ello se utilizaron bases de datos específicas, como RHObase, y bases de datos con alto nivel de anotación, como UniProt, Interpro, Pfam y OrthoDB. Estas secuencias fueron comparadas contra los genes predichos en los genomas del consorcio utilizando BLAST y se seleccionaron aquellos resultados que tuvieran más del 70% de identidad y más de 70% de cobertura. Para los pasos 2, 7 y 23, la identidad se fijó en 50% por no lograr buenos *hits*.

Paso	Reacción	Nº EC	<i>Burkholderia</i> sp.			<i>Klebsiella aerogenes</i>			<i>Pseudomonas</i> sp. T			<i>Sphingobium</i> sp. AM			<i>Inquilinus limosus</i>			<i>Pseudomonas</i> sp. Bch		
			Amount	BestHit	AvgID	Amount	BestHit	AvgID	Amount	BestHit	AvgID	Amount	BestHit	AvgID	Amount	BestHit	AvgID	Amount	BestHit	AvgID
S1	R05843	1.13.11.-	2	99,8	86,45	0	0	0	0	0	0	2	99,8	91,20	0	0	0	0	0	0
S2	R04151	1.3.1.49	2	56	54,20	0	0	0	0	0	0	1	54,3	54,30	0	0	0,00	0	0	0,00
S3	R05650	1.13.11.-	7	99,7	86,28	2	88	82,70	4	93,3	84,57	7	100	88,07	1	74,3	74,30	3	85,2	82,83
S4	R05642	5.1.2.-	5	93	81,18	8	93,4	83,62	5	87	79,62	6	93,5	83,98	4	79,5	75,17	1	81,1	81,10
S5	R05648	4.1.2.-	4	86,3	83,95	3	99	87,86	4	84,3	78,95	2	88	85,40	5	77,7	72,78	1	78,2	78,20
S6	R05649	1.2.1.-	2	80,9	76,15	3	88,4	85,33	3	85,6	77,80	3	95,7	82,36	1	71,1	71,10	2	78,3	75,40
S7	R07657	1.13.11.38	1	56,5	56,50	1	74,1	74,10	1	80,9	80,9	1	92,8	92,80	3	100	71,86	0	0	0
S8	R07713	4.1.2.34	1	100	100,00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S9	R05643	1.2.1.78	2	80,9	76,15	3	88,4	85,33	3	85,6	77,80	3	95,7	82,36	1	71,1	71,10	2	78,3	75,40
S10	R09227	1.14.12.-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	95	85,50	0	0	0	1	100	100,00
S11	R09228	1.3.1.-	1	73,4	73,4	0	0	0	0	0	0	1	99,6	99,60	0	0	0	0	0	0
S12	R01634	4.1.1.69	7	85,7	81,11	5	100	93,54	7	95,5	88,77	6	100	94,56	8	100	98,62	4	93,6	83,02
S13	R01631	1.13.11.3	1	70,1	70,10	1	86,4	86,40	1	75,5	75,50	0	0	0,00	0	0	0,00	0	0	0,00
S14	R05632	1.14.13.1	5	93,2	80,24	2	95,5	97,10	0	0	0,00	2	100	90,35	1	75,8	75,80	0	0	0,00
S15	R04117	1.13.11.56	0	0	0,00	0	0	0,00	0	0	0,00	1	83,9	83,90	0	0	0,00	1	70,8	70,80
S16	R05137	5.99.1.4	5	100	92,46	0	0	0,00	1	71,9	71,90	1	97,5	97,50	1	92,5	92,50	0	0	0,00
S17	R05136	4.1.2.45	1	75,6	75,60	0	0	0,00	0	0	0,00	1	83,2	83,20	0	0	0,00	0	0	0,00
S18	R02941	1.2.1.65	2	77,3	75,90	1	81,6	81,60	1	77,6	77,60	0	0	0,00	0	0	0,00	0	0	0,00
S19	R07709	1.14.13.1	4	93,2	81,37	2	98,7	97,10	0	0	0,00	0	0	0,00	1	75,8	75,80	0	0	0,00
S20	R02656	1.13.11.4	1	96,5	96,50	1	89,4	89,40	0	0	0,00	0	0	0,00	0	0	0,00	0	0	0,00
S21	R00818	1.14.13.17	1	79,1	79,10	0	0	0,00	0	0	0,00	0	0	0,00	0	0	0,00	0	0	0,00
S22	R00817	1.13.11.1	1	81	81,00	1	97,4	97,40	2	89	84,00	1	99,3	99,30	1	79	79,00	1	79,6	79,60
S23	R00816	1.13.11.2	3	86,3	77,43	1	99,7	99,70	1	81,5	81,50	4	99,6	90,72	2	74,7	73,25	0	0	0,00

**Tabla V.30.** Tabla utilizada para la construcción del gráfico computacional con los diferentes pasos de la ruta de degradación de fenantreno, código de KEGG (reacción), número de EC de la enzima y los best *hits* para las enzimas de los genomas de cada una de las cepas del consorcio: Bk, B, T, AM, I y Bc-h.



**Figura V.12.** Gráfico computacional de las enzimas que participan en la vía de degradación de fenanreno en todas las cepas.

Se construyó una red usando Cytoscape, donde los nodos representan los compuestos y las uniones las enzimas encontradas. Brevemente, cada nodo puede estar conectado a otro por hasta 6 uniones, una por cada genoma en el consorcio. El ancho de la línea está determinado por el número de hits que contiene el genoma correspondiente, mientras que el tipo de línea varía según el umbral de identidad de secuencia utilizado en la búsqueda.

En la figura V.12 se muestra el gráfico computacional de la red de degradación de fenanreno obtenida para todas las cepas aisladas de CON, a partir de los datos genómicos.

La red obtenida muestra una actividad protagonista de las cepas AM y Bk en el ataque inicial al fenantreno, lo que es consistente con las capacidades metabólicas observadas en estudios fisiológicos de estas cepas (Tablas V.16, V.26 y Figura V.12). Se observa que las enzimas de la vía superior de degradación del fenantreno (codificadas en AM y Bk) serían complementadas con las enzimas codificadas en las cepas I, T y Bc-h que intervienen en pasos posteriores a los iniciales y principalmente en la vía baja atacando compuestos aromáticos monocíclicos. Encontramos varias enzimas codificadas por más de una cepa, compatible con la redundancia funcional observada en estudios fisiológicos y de la dinámica del consorcio durante la degradación.

Para que en los consorcios se den las colaboraciones entre las diferentes especies predichas por la reconstrucción automática de la red metabólica, se asume que los metabolitos que son intercambiados por las diferentes especies son mercancías comunes que deben ser, respectivamente, importadas y exportadas del citoplasma bacteriano a través de transportadores. Si bien, no tenemos evidencia experimental de proteínas involucradas en la movilización directa de estos metabolitos dentro o fuera de organismos bacterianos, identificamos genes que codifican transportadores clásicos como los dependientes de unión a ATP (ABC) (en los genomas de todas las cepas) y genes de la familia OmpW, que codifican para transportadores de PAH a través de la membrana externa (son canales hidrofóbicos) (Touw y col., 2010; Hong y col., 2006). Estos últimos se encontraron en 5 copias en el genoma de Bk y sólo una copia en los genomas de AM, 20006FA, B, Bc-h y T.

#### V.2.4 Diseño y caracterización de consorcios microbianos sintéticos

Con el objetivo de construir consorcios microbianos sintéticos que exhiban altos niveles de degradación de PAH de bajo y alto peso molecular, a partir de las cepas aisladas de CON (AM, B, Bc-h, T, I y Bk) se diseñaron diferentes consorcios sintéticos (CS). También, se empleó la cepa exógena a CON, *Sphingomonas paucimobilis* (20006FA), que resultó ser buen inoculante dentro de CON (Capítulo IV, sección IV.3.2) y que está taxonómica y filogenéticamente relacionada con la cepa de *Sphingobium* sp. (AM).

Se prepararon 5 consorcios sintéticos diferentes, teniendo en cuenta características de cada cepa (Figura V.13):

- CS-1, constituido por *Sphingobium* sp. (AM), *Klebsiella aerogenes* (B), *Pseudomonas* sp. (T y Bc-h) e *Inquilinus limosus* (I);
- CS-2 constituido por AM, B, T, Bc-h e I más 20006FA;

- CS-3: constituido por B, T, Bc-h, I y 20006FA en reemplazo de AM;
- CS-4: constituido por todas las cepas aisladas de CON: AM, B, Bc-h, T, I y *Burkholderia* sp. (Bk);
- CS-5: constituido por B, Bc-h, T y I.

Conjuntamente a los criterios fisiológicos que se evaluaron para el diseño de los consorcios sintéticos, se consideró el análisis genómico de cada cepa y la red metabólica obtenida según los porcentajes de identidad de todas las enzimas que participan de la ruta de degradación.

El CS-1, no tiene a Bk, ya que esta cepa podría competir con AM.

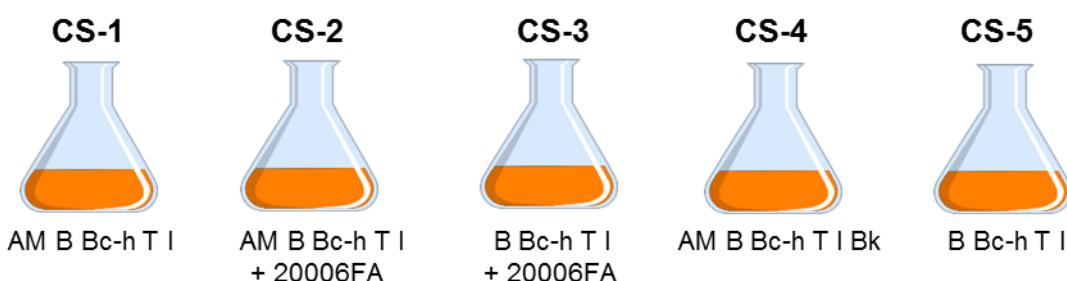
El CS-2 tiene 20006FA, con el objetivo de aumentar la eficiencia de degradación y comprobar si actúa de manera similar a CON-I, ya estudiado en el capítulo IV.

El CS-3, no tiene a AM pero si a 20006FA, para estudiar el comportamiento de esta cepa degradadora con las cepas de CON.

El CS-4 tiene todas las cepas aisladas del consorcio original CON, con el objetivo de reproducir este consorcio.

CS-5 formado con las cepas de CON, sin la presencia de las cepas que resultaron degradadoras en cultivos puros.

En todos los casos se inocularon 100 µl de un cultivo de 0,2 DO<sub>580nm</sub> de cada una de las cepas. Los consorcios se incubaron en MML con 200 mg/L de fenantreno como única fuente de carbono y energía durante 15 días a 28 °C y 250 rpm.



**Figura V.13.** Consorcios sintéticos diseñados (CS).

#### V.2.4.1 Estudio del potencial de degradación de los consorcios sintéticos

Con el objetivo de determinar cualitativamente el espectro de degradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos de los cinco consorcios sintéticos, se inocularon en MML suplementado con 1 g/L de diferentes hidrocarburos policíclicos aromáticos y 0,05 g/L de

AHN, intermediario clave de la degradación. Luego de 15 días de incubación se consideró como resultado positivo la aparición de color debido a la formación de productos de degradación.

PAH y metabolitos intermediarios	Capacidad de degradación				
	CS-1	CS-2	CS-3	CS-4	CS-5
Acenaftileno	-	-	-	-	-
Antraceno	+	+	+	+	-
Criseno	-	-	-	-	-
Fenanreno	+	+	+	+	-
Fluoreno	+	+	+	+	-
Pireno	-	-	-	-	-
Ácido 1-hidroxi-2-naftoico	+	+	+	+	-

**Tabla V.31.** Degradación de diferentes PAH (1 g/L) e intermediarios de la degradación de PAH (0,05 g/L) por los consorcios sintéticos CS-1, CS-2, CS-3, CS-4 y CS-5. +: Corresponde a la aparición de color; -: no detectado.

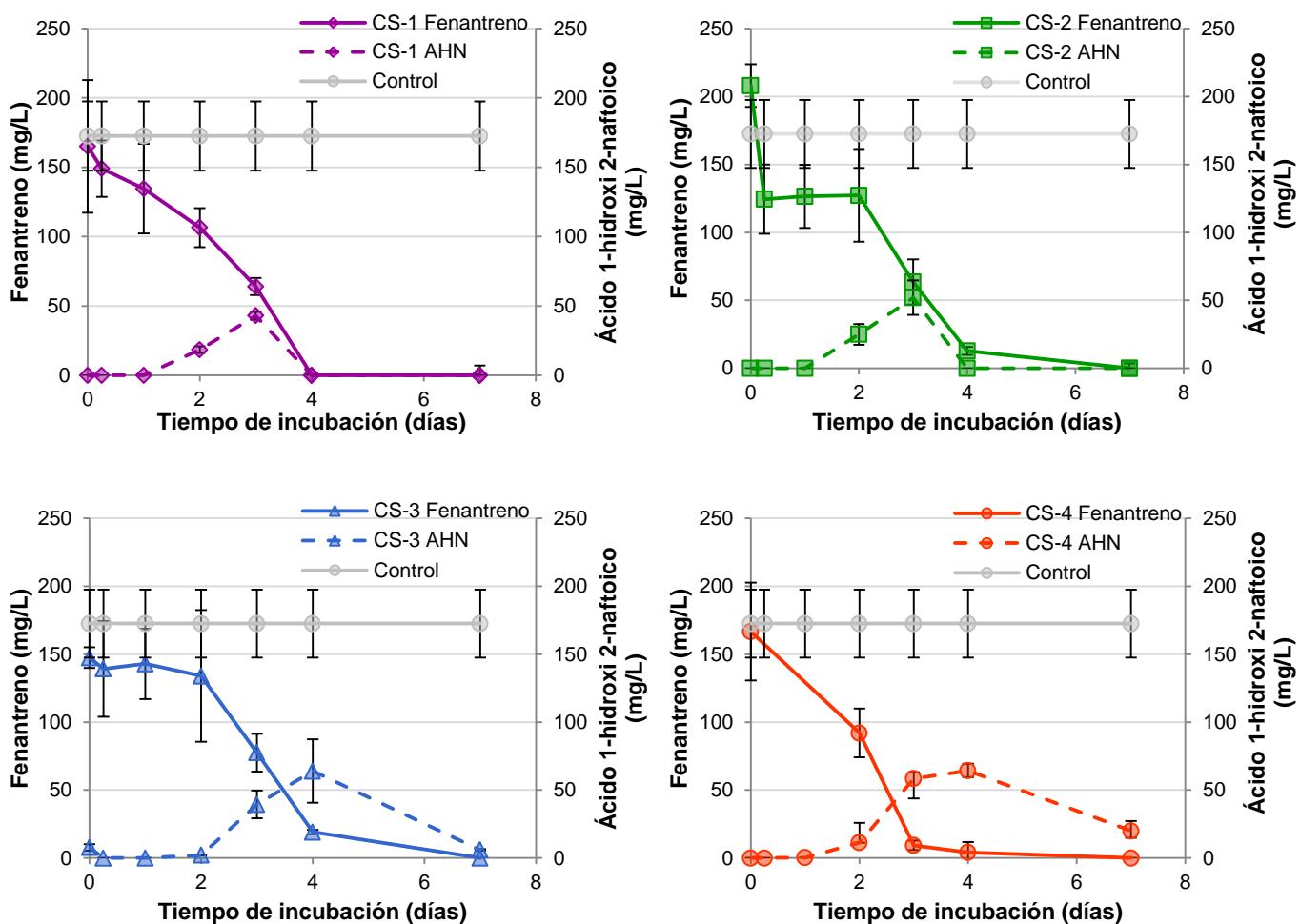
Los resultados se muestran en la tabla V.31. Los consorcios CS-1, CS-2, CS-3 y CS-4 mostraron el mismo comportamiento, degradando antraceno, fenantreno y fluoreno, como también el intermediario ácido 1-hidroxi-2-naftoico. En el CS-5 no se observó coloración en ninguno de los PAH estudiados, confirmando que excepto AM y Bk, ninguna de las otras cepas aisladas mostró la capacidad de iniciar la degradación de PAH ni en cultivos puros ni juntas en un consorcio sintético, por lo que se decidió no continuar analizando el CS-5.

#### V.2.4.2 Cinética de degradación de fenantreno de los consorcios sintéticos

Se estudió la cinética de degradación de fenantreno y la producción de AHN de CS-1, CS-2, CS-3 y CS-4 en MML con 200 mg/L de durante 7 días (Figura V.15). En la Figura V.14 se puede ver una fotografía de uno de los consorcios sintéticos analizados, donde se observa la coloración ocre propia de la aparición de los metabolitos intermediarios de la degradación.



**Figura V.14.** Fotografía de uno de los consorcios sintéticos durante la degradación de 200 mg/L de fenanreno luego de 15 días de incubación.



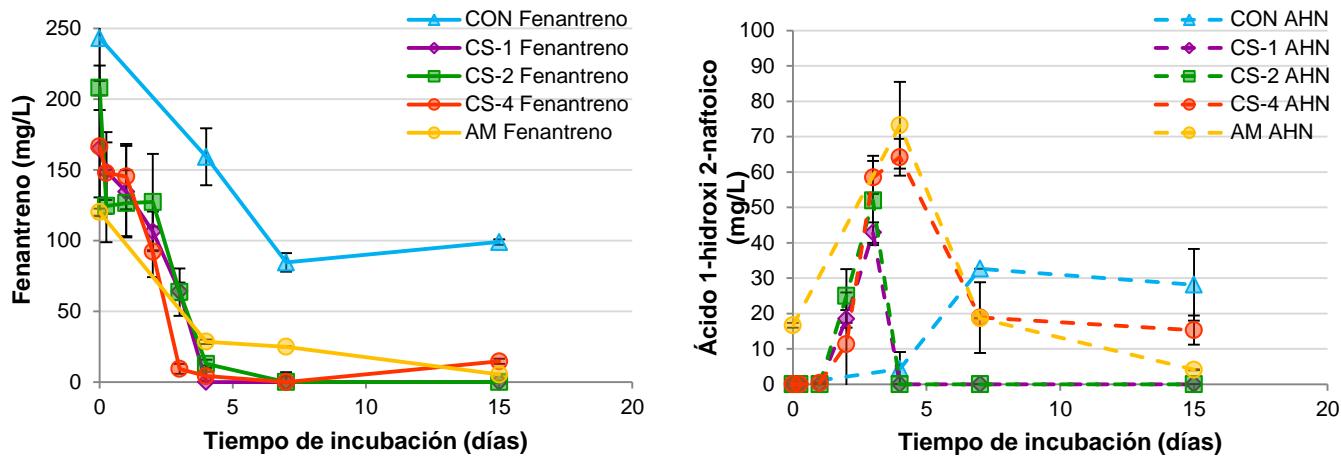
**Figura V.15.** Concentración de fenanreno y producción de ácido 1-hidroxi 2-naftoico (AHN) en los cultivos de CS-1, CS-2, CS-3 y CS-4 en MML suplementado con 200 mg/L de fenanreno durante 7 días de incubación. Se grafican los valores promedio de tres réplicas biológicas y su respectiva desviación estándar.

En la figura V.15 se observa que todos los CS lograron degradar al fenantreno a niveles no detectables luego de 7 días de incubación. El CS-4 que contiene a la cepa degradadora Bk mostró una mayor velocidad de degradación, alcanzando luego de 3 días un porcentaje de degradación (97,48%) significativamente mayor ( $P<0.05$ ) al de los otros 3 consorcios. Los consorcios CS-2 y CS-3 que contienen la cepa exógena 20006FA mostraron un comportamiento diferente al CS-1 que contiene sólo la cepa degradadora AM, observándose un período de latencia o adaptación, durante los cuales la concentración de fenantreno se mantuvo constante. En el caso del CS-3 en donde la única cepa degradadora era la exógena, se observó un tiempo de latencia entre el día 0 y el 2 de incubación, alcanzando luego de 4 días un porcentaje de degradación de fenantreno (88,92%) significativamente menor ( $P<0.05$ ) al alcanzado por los otros CS. En el caso del CS-2 que contiene las dos cepas de la familia *Sphingomonadaceae*, AM y 20006FA, si bien se observó una degradación inicial, a las pocas horas la degradación se detuvo y la concentración de fenantreno permaneció constante hasta el día 2 de incubación, alcanzando luego de 4 días valores de degradación semejantes a los observados en CS-1 y CS-4.

En los mismos cultivos se midió simultáneamente la concentración de ácido 1-hidroxi-2-naftoico (Figura V.15). En todos los consorcios fue posible detectar la aparición de este intermediario metabólico. El CS-4, que contiene las cepas degradadoras AM y Bk, muestra un patrón distinto en la producción y eliminación de este intermediario que los consorcios que sólo contienen las cepas de la familia *Sphingomonadaceae* (CS-1, CS-2 y CS-3). El CS-4 genera la mayor producción de AHN ( $64 \pm 5$  mg/L), que aunque disminuye ( $20 \pm 7$  mg/L) hacia el día 7, no logra eliminarlo.

El CS-1, que tiene a la cepa degradadora AM, y CS-2, que tiene a 20006FA, acumulan una menor concentración de AHN, que se elimina llegando a concentraciones no detectables al día 4. En CS-3, la aparición de AHN se manifiesta a partir del día 2, coincidiendo con el retraso que se observó en la degradación de fenantreno, y presenta su pico de concentración máxima el día 4 ( $63 \pm 23$  mg/L), que disminuye hasta su desaparición el día 7 de incubación.

En la figura V.16 se combinan las cinéticas de degradación de fenantreno y producción de AHN en la cepa degradadora AM y los consorcios que la contienen, CS-1, CS-2 y CS-4, y CON para ayudar en la visualización de los resultados y comparar los comportamientos de cada cultivo.



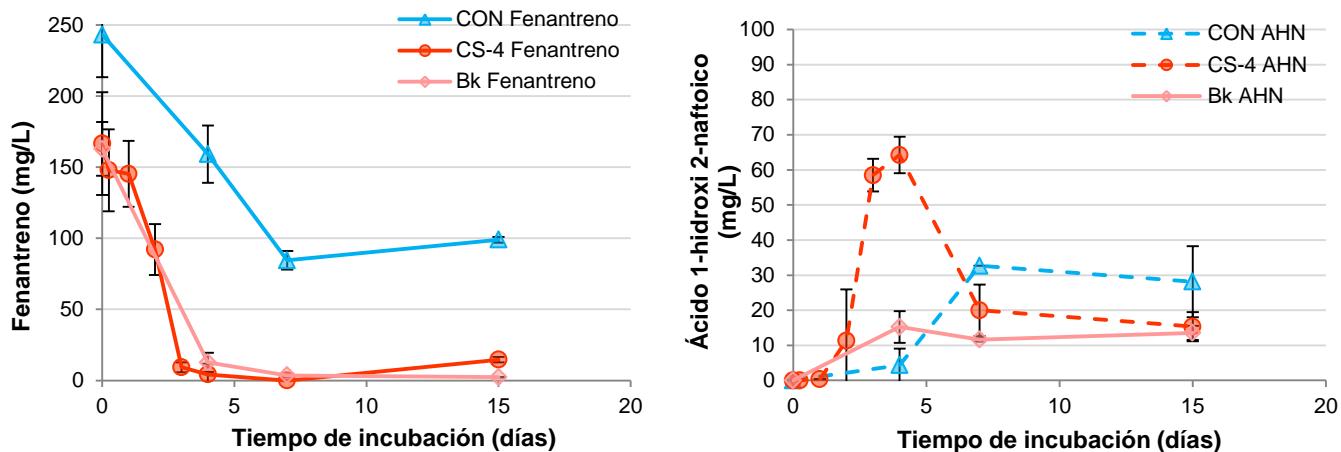
**Figura V.16.** Concentración de fenanreno y producción de ácido 1-hidroxi 2-naftoico (AHN) en los cultivos de CON, CS-1, CS-2, CS-4 y AM en MML suplementado con 200 mg/L de fenanreno durante 15 días de incubación. Se grafican los valores promedio de tres réplicas biológicas y su respectiva desviación estándar.

En todos los consorcios sintéticos se observó mayor degradación de fenanreno con respecto a CON y la cepa AM. Después de 15 días todos los CS y la cepa AM lograron degradar el fenanreno, mientras que CON sólo alcanza un 59% de degradación.

En cuanto a la acumulación de AHN, la cepa AM y CS-4, que tiene a la cepa degradadora Bk, alcanzaron la mayor concentración; AM consigue degradarlo completamente mientras que en CS-4 queda una concentración residual que se mantienen desde el día 7 hasta el final del ensayo ( $15 \pm 4$  mg/L). Los consorcios CS-1, CS-2 y CS-3 (los consorcios que contienen las cepas de la familia *Sphingomonadaceae*) acumularon menos concentraciones de AHN que la cepa AM, logrando degradarlo el día 15. En CON la concentración producida del metabolito se mantuvo en un valor constante hasta el final del tiempo ensayado ( $28 \pm 10$  mg/L).

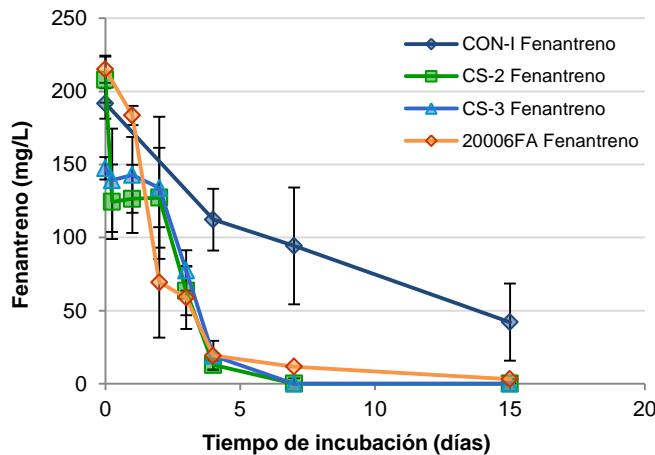
En la figura V.17, se analizaron los resultados para la cepa degradadora Bk, y los consorcios que la contienen, CS-4 y CON. Mientras que CON sólo alcanza una degradación de 59% de fenanreno, tanto la cepa Bk y CS-4 lograron degradar el 99% el día 15.

Si bien el CS-4 acumula la mayor concentración de AHN, es el único que muestra capacidad de degradarlo. Bk y CON presentan un comportamiento similar de acumulación de AHN pero CON alcanzó mayores concentraciones al finalizar el ensayo.



**Figura V.17.** Concentración de fenantreno y producción de ácido 1-hidroxi 2-naftoico (AHN) en los cultivos de CON, CS-4 y Bk en MML suplementado con 200 mg/L de fenantreno durante 15 días de incubación. Se grafican los valores promedio de tres réplicas biológicas y su respectiva desviación estándar.

En la figura V.18 se combinaron las cinéticas de degradación de fenantreno en la cepa degradadora y exógena a CON, 20006FA y los consorcios que la contienen, CS-2, CS-3 y CON-I para ayudar en la visualización de los resultados y comparar los comportamientos de cada cultivo.



**Figura V.18.** Concentración de fenantreno en los cultivos de CON-I, CS-2, CS-3 y 20006FA en MML suplementado con 200 mg/L de fenantreno durante 15 días de incubación. Se grafican los valores promedio de tres réplicas biológicas y su respectiva desviación estándar.

En los consorcios sintéticos (CS-2 y CS-3) y en la cepa 20006FA se observó mayor degradación de fenantreno con respecto a CON-I. Después de 15 días los CS y la cepa

20006FA lograron degradar todo el fenantreno, mientras que CON-I sólo alcanza un 78% de degradación. A tiempos cortos (hasta el día 2), se observó en CS-2 y CS-3 un tiempo de latencia que no se observa en el cultivo puro de la cepa, que alcanzó rápidamente el día 2 un 60% de degradación. En CON-I la concentración de fenantreno remanente se midió recién el día 4, y no en tiempos más cortos, por lo que no se puede establecer si presentó el período de adaptación.

En resumen, los valores observados de degradación de fenantreno para las cepas individuales y los consorcios sintéticos diseñados, son significativamente ( $P<0.05$ ) superiores al valor alcanzado por el consorcio natural CON, de donde las cepas fueron aisladas y el consorcio inoculado CON-I, que contiene a la cepa 20006FA (Figuras V.17, V.18 y V19). También se observó que los CS alcanzan las menores concentraciones de AHN al final del tiempo ensayado en comparación a CON.

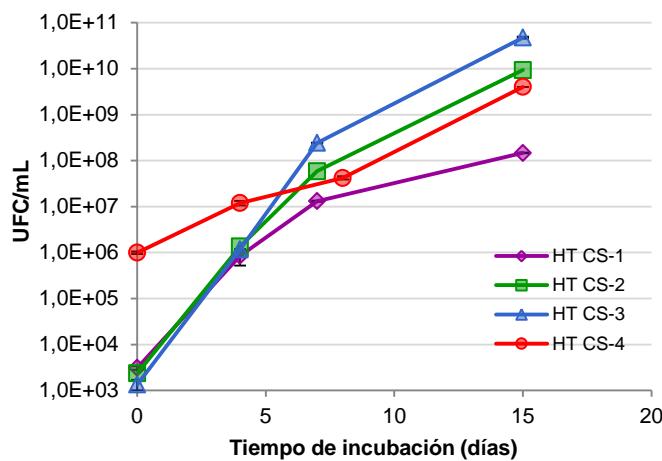
Dentro de los CS, si bien el CS-4 mostró la mayor velocidad de degradación, acumula AHN, en cambio CS-1 logra degradar el fenantreno y el AHN a niveles no detectables.

#### **V.2.4.3 Determinación de la dinámica de las poblaciones bacterianas de los consorcios sintéticos**

##### **V.2.4.3.a Recuento de bacterias heterótrofas totales**

Se realizó el recuento de las poblaciones cultivables de bacterias heterótrofas de los 4 CS creciendo en MML suplementado con fenantreno como única fuente de carbono y energía durante 15 días.

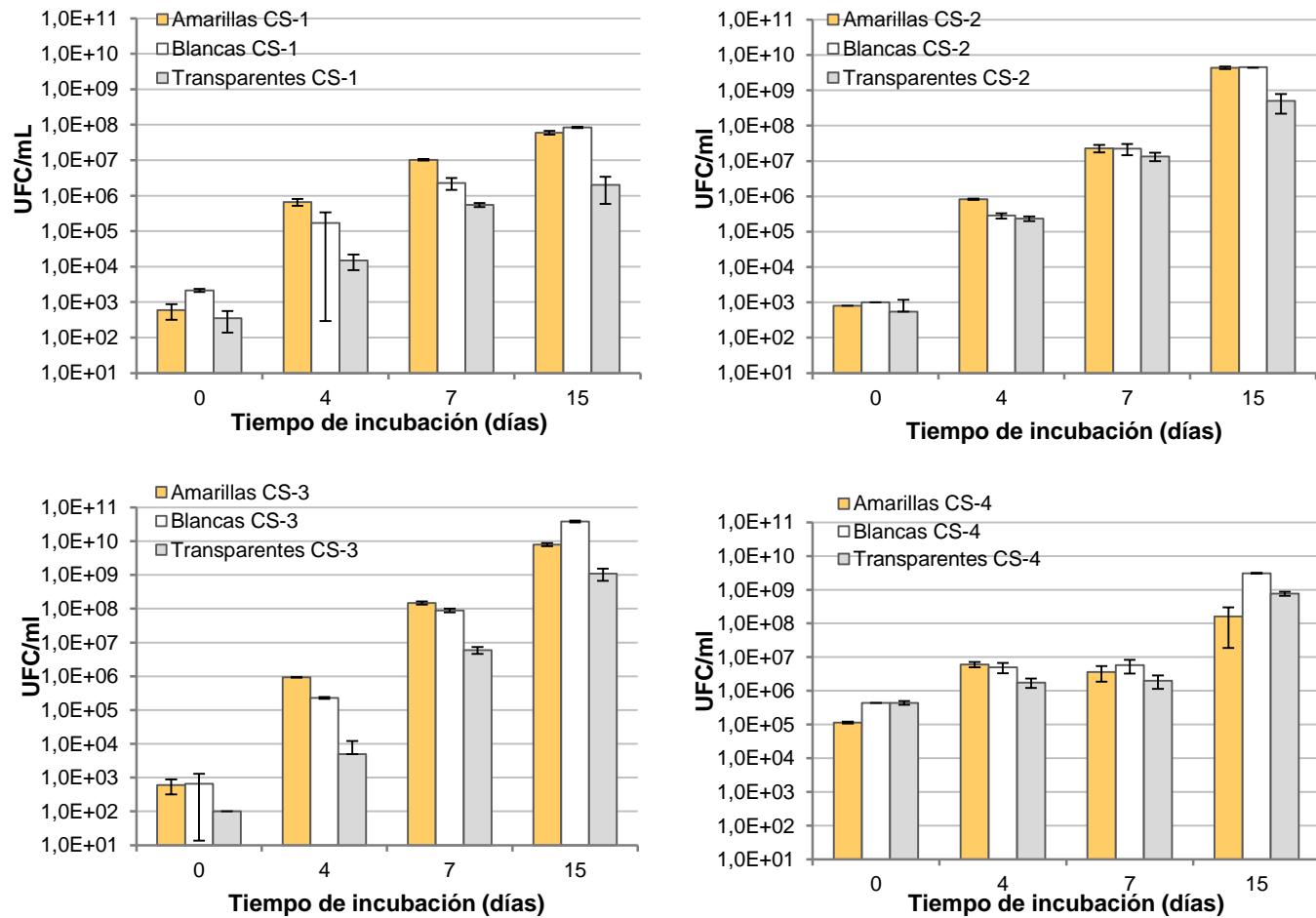
Como se puede observar en la figura V.19, el CS-4 posee un número inicial de bacterias heterótrofas cultivables superior en más de dos órdenes a los encontrados en los otros CS. Esto puede deberse a diferencias en la relación UFC/DO entre la cepa de *Burkholderia* (Bk) y las otras cepas inoculadas, ya que la estandarización de la concentración de las distintas poblaciones se realizó en base a DO. La figura V.19 muestra para todos los consorcios diseñados un aumento en el número de bacterias heterótrofas cultivables durante todo el ensayo. Los consorcios CS-2 y CS-3, que contienen la cepa 20006FA, alcanzaron los valores más altos de UFC, superando al CS-4 que había partido de un recuento significativamente ( $P<0.05$ ) mayor. Por el contrario, CS-1 manifestó un valor de recuento de bacterias heterótrofas significativamente ( $P<0.05$ ) menor a los otros CS.



**Figura V.19.** Recuento de poblaciones heterótrofas cultivables en cultivos de CS-1, CS-2, CS-3, CS-4 en MML suplementado con 200 mg/L de fenantreno durante 15 días de incubación. Se grafican los valores promedios y las desviaciones estándar de tres réplicas biológicas.

Se llevó a cabo también un recuento diferencial considerando los distintos morfotipos macroscópicos, colonias amarillas: *Sphingobium* sp. (AM) y *Sphingomonas paucimobilis* (20006FA); colonias blancas: *Klebsiella aerogenes* (B), *Pseudomonas* sp. (Bc-h), *Inquilinus limosus* (I) y *Burkholderia* sp. (Bk); colonias transparentes: *Pseudomonas* sp. (T) (Figuras V.26 y V.17).

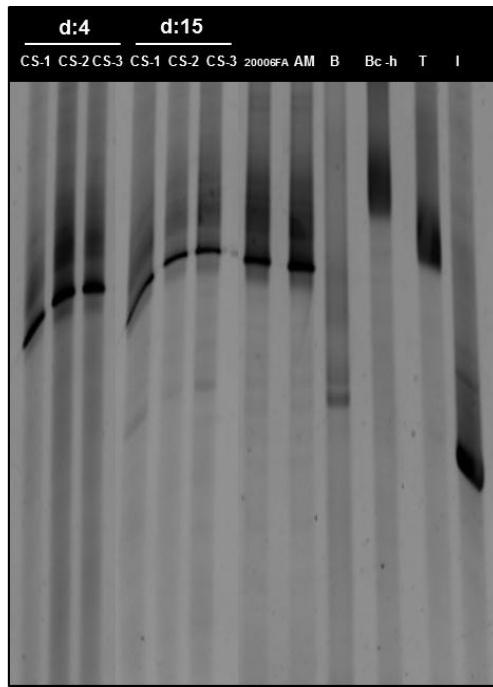
En la figura V.20 se observa que en los consorcios CS-1, CS-2 y CS-3, luego de 4 días de incubación, los recuentos de las colonias amarillas (correspondientes a las cepas AM y 20006FA) fueron mayores a los de los otros morfotipos; posteriormente y cuando ya no es detectable el fenantreno (Figura V.15), esta relación se modifica, y las colonias blancas alcanzan o superan a las colonias amarillas. En CS-4, que contiene la cepa Bk, cuyas colonias son blancas, las colonias amarillas y blancas muestran recuentos semejantes y mayores a los observados para las colonias transparentes hasta el día 7 de incubación. Al finalizar el ensayo y cuando la concentración de AHN se mantiene constante (Figura V.15), las colonias blancas y transparentes superan en recuento a las amarillas (Figura V.20).



**Figura V.20.** Recuento diferencial en R2A de bacterias heterótrofas cultivables para los distintos morfotipos encontrados en los cultivos de CS-1, CS-2, CS-3 y CS-4 en MML suplementado con 200 mg/L de fenanreno durante 15 días de incubación. Se grafican los valores promedio y las desviaciones estándar de tres réplicas biológicas

#### V.2.4.3.b Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE)

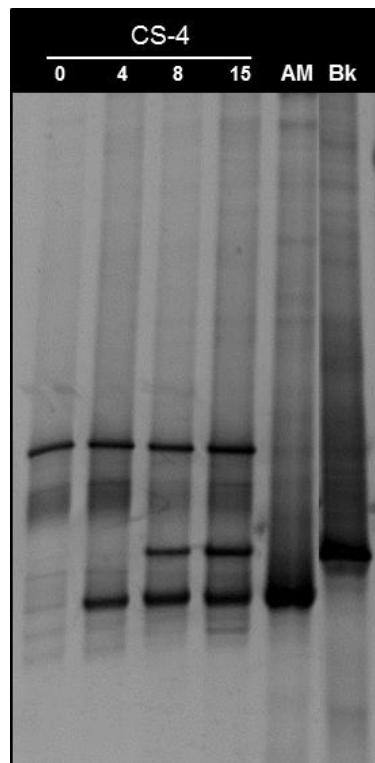
Se realizó la extracción de DNA de los consorcios sintéticos a dos tiempos de incubación (4 y 15 días) durante la degradación de fenanreno y se llevó a cabo una PCR con primers específicos para una porción el gen 16S rRNA. Para realizar comparaciones se incluyó el DNA de las cepas aisladas. Con estos productos de amplificación se llevaron a cabo dos DGGE; una para CS-1, CS-2 y CS-3, y otra para CS-4, con la cepa Bk aislada recientemente. Los geles se realizaron con un porcentaje de desnaturización de urea y formamida de 45-70% respectivamente.



**Figura V.21.** Análisis por PCR-DGGE los cultivos de CS-1, CS-2 y CS-3 en MML suplementado con 200 mg/L de fenanreno a los 4 y 15 días de incubación y las cepas 20006FA, AM, B, Bc-h, T e I.

Las claras diferencias que se observaron al comparar la dinámica de las poblaciones cultivables no pudieron distinguirse a nivel de la estructura genética por la técnica DGGE (Figura V.21). En el perfil de bandas para los diferentes consorcios sintéticos, tanto para el día 4 como el día 15 de incubación sólo se observan pequeñas diferencias. La banda perteneciente a la cepa B aparece el día 15 de incubación, no observándose en el día 4.

Se llevó a cabo otra DGGE para el CS-4 a los días 0, 4, 7 y 15 de incubación y se incluyó en la corrida electroforética a las cepas degradadoras Bk y AM, pertenecientes a este CS. En la figura V.22 se puede ver la banda correspondiente a la cepa AM a partir del día 0 de incubación y la banda correspondiente a la cepa Bk posteriormente, que aparece luego de 8 días de incubación.



**Figura V.22.** Análisis por PCR-DGGE de fragmentos de 16S rRNA amplificados por PCR de las poblaciones bacterianas en cultivos los cultivos de CS-4 (Duplicados A y B) en MML suplementado con 200 mg/L de fenantreno a los 0, 4, 7 y 15 días de incubación y las cepas Bk, I, T, Bc-h, B y AM.

#### V.2.4.4 Estudio de la expresión de genes de la cepa AM regulados diferencialmente entre el cultivo puro y el consorcio CS-1 mediante RT-qPCR

Con el objetivo de evaluar si la presencia de otras cepas bacterianas modula la expresión de los genes de la vía de degradación de fenantreno de la cepa AM, se realizaron extracciones de RNA total de cultivos de la cepa AM y del CS-1 en MML suplementado con 200 mg/L de fenantreno, a diferentes tiempos durante la degradación.

Se seleccionaron primers para amplificar genes que codifican para enzimas implicadas en la ruta superior e inferior de degradación de fenantreno de la cepa *Sphingobium* sp. AM. Se incluyó un primer que amplifica en forma específica el gen 16s rRNA de *Sphingomonas* para la normalización de la expresión de los genes funcionales. Los primers utilizados se detallan en la Tabla III.2. La especificidad de los primers elegidos fue evaluada mediante la comparación de sus secuencias con la base de datos NCBI utilizando la herramienta blastn. También, se realizó un chequeo “*in silico*” de los primers, para confirmar especificidad en la secuencia genómica de la cepa AM, y que estos no hibriden con las secuencias genómicas del resto de las cepas de CON. Esta estimación se hizo a través del servidor ARTEMIS.

La presencia y el tamaño de los fragmentos de amplificación de los genes utilizados y la optimización de la temperatura de hibridación se verificó mediante corridas electroforéticas en gel de agarosa a partir de las muestras de PCR sobre el ADN de la cepa AM en cultivo líquido (Figura V.S2). La especificidad se confirmó con la secuenciación de los productos de PCR que presentaron el peso molecular esperado mediante el servicio Macrogen, Korea.

El RNA total de los cultivos de AM y CS-1 a las 2, 8, 24, 72 y 96 horas en 200 mg/L de fenanreno se obtuvo siguiendo el protocolo del kit comercial y algunas modificaciones que se detallan en el inciso *III.2.11.1.d*. La cantidad y calidad del RNA se midió por NanoDrop 2000 (Thermo-ScientificTM) y la integridad del RNA sin contaminación por DNA genómico se corroboró realizando una electroforesis en geles de agarosa.

En cuanto a la extracción de RNA del consorcio sintético, debido a que la inoculación fue de un bajo número inicial de células (que se correspondía con el inóculo que se utilizó al diseñar los CS), y al cosechar cultivos a tiempos cortos, se obtuvieron pellets de poca cantidad de células, que nos permitió adquirir bajas concentraciones de RNA.

Se continuó con la retrotranscripción de RNA a cDNA. Tras la síntesis del cDNA, se eliminó el RNA añadiendo RNasa.

#### **V.2.4.4.a Eficiencia de primers**

La eficiencia de los primers seleccionados (Tabla V.32) se verificó mediante RT-qPCR utilizando como molde diluciones seriadas de una mezcla equimolar de cDNA de todas las condiciones ensayadas para cada cultivo.

En la tabla V.32 se encuentra el listado de los genes utilizados en el ensayo, el nombre de la enzima, con las eficiencias resultantes y la Tm (°C) correspondiente a cada gen.

Entre los primers que mostraron una buena eficiencia, se encuentran genes de enzimas que codifican para la vía superior como la subunidad mayor de la naftaleno/bifenil dioxigenasa (*ahdA1f*), la 2,3-dihidroxibifenil 1,2-dioxigenasa (*ahdC*) y para de la vía baja de degradación de fenanreno, como dos toluato/benzoato dioxigenasas (*ahdA1d* y *adhA1c*) y la catecol 2,3 dioxigenasa (*XylE*) y algunos que codifican para enzimas que pueden participar tanto de la vía superior como inferior dentro de los que se encuentran la dihidrodiol deshidrogenasa (*ahdB*) y las ferredoxinas de anillo aromático (*adhA3*). En estos ensayos se incluyó como gen de referencia (housekeeping) el gen 16S rRNA.

Gen	Nombre de la enzima (Macrogen)	% Eficiencia	R <sup>2</sup>
<i>ahdA1b</i>	Large subunit naph/bph dioxygenase	1000	0,008
<i>ahdA1c</i>	Large subunit toluate/benzoate dioxygenase	104	0,95
<i>ahdA1d</i>	Large subunit toluate/benzoate dioxygenase	108	0,95
<i>ahdA1e</i>	No dio producto	-	-
<i>ahdA1f</i>	Large subunit naphthalene/biphenyl dioxygenase	99	0,98
<i>ahdA3</i>	Ferredoxin and ring-hydroxylating dioxygenases	97,1	0,97
<i>ahdA4</i>	Ferredoxin reductase	562,2	0,38
<i>adhB</i>	Dihydrodiol dehydrogenase	100	0,99
<i>ahdC</i>	2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase	99,2	0,97
<i>catA</i>	No dio producto	-	-
<i>nahD</i>	No dio producto	-	-
<i>orf781_19</i>	TetR	123,4	0,77
<i>xyIE</i>	Catechol 2,3-dioxygenase	104	0,99
<i>xyIX</i>	No dio producto	-	-
<b>16S rRNA</b>	-	102,3	0,99

**Tabla V.32.** Eficiencia de las reacciones de RT-qPCR para la cepa AM y relación lineal ( $R^2$ ).

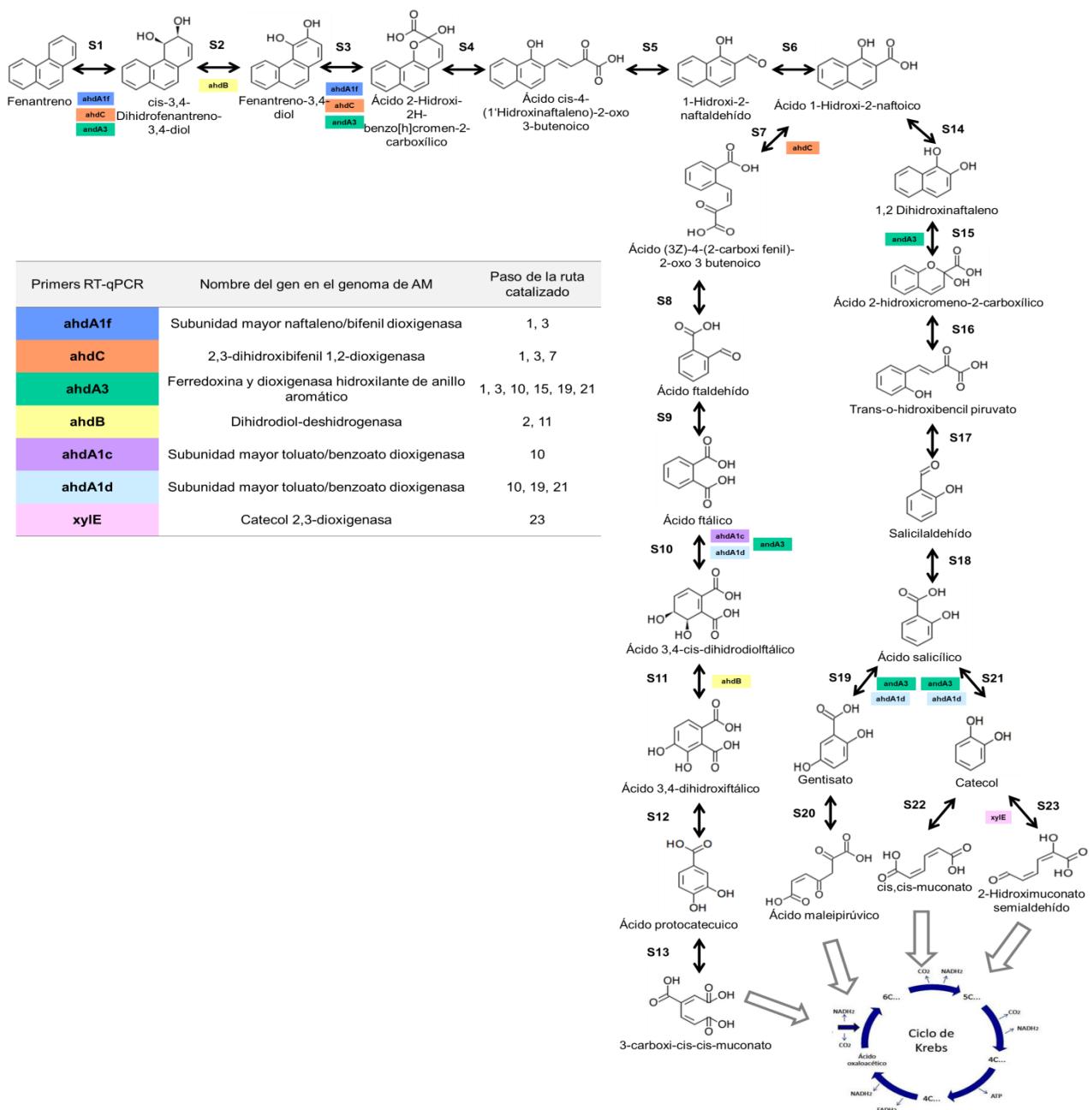
Se prosiguió con el análisis de las muestras utilizando los genes de enzimas para los que se obtuvo una eficiencia entre 90 - 110% y un  $R^2 > 0,9$ . También se evaluó la pendiente de la recta que se considera confiable con los valores entre -3,58 a -3,10 (resultado no mostrado).

#### V.2.4.4.b Cuantificación de la expresión relativa normalizada mediante RT-qPCR

A continuación se presentan los niveles de expresión relativa de los genes estudiados en cultivos de la cepa AM y de CS-1 en medio líquido con 200 mg/L de fenantreno a las 2, 8, 24, 72 y 96 horas durante la degradación. Los resultados fueron obtenidos mediante el método Delta-Delta Ct desarrollado por PE Applied Biosystems en base a la fórmula  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , que asume una eficiencia del 100% en todas las reacciones. Los valores son expresados como las veces que cambia la expresión, y representan los promedios  $\pm$  STD de dos replicas independientes y tres réplicas de medida e indican el cambio en los niveles de mRNA de los genes estudiados en comparación con las condiciones de control (valor de 1). Con el objetivo de observar la posible formación de dímeros de primers u otros ensamblados oligoméricos, y evaluar la especificidad de los fragmentos amplificados se realizaron curvas

de desnaturización luego de finalizar el programa de amplificación para todos los ensayos realizados. No se evidenció la presencia de productos inespecíficos para ninguno de los genes.

En la figura V.23 se ubican los primers de acuerdo al paso de la ruta que cataliza la enzima a la que se dirigen.



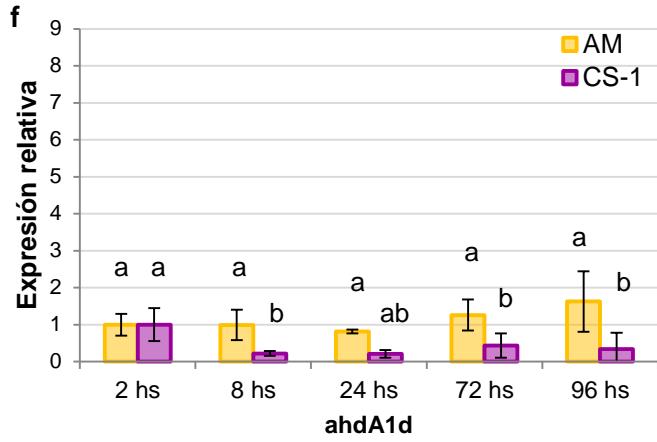
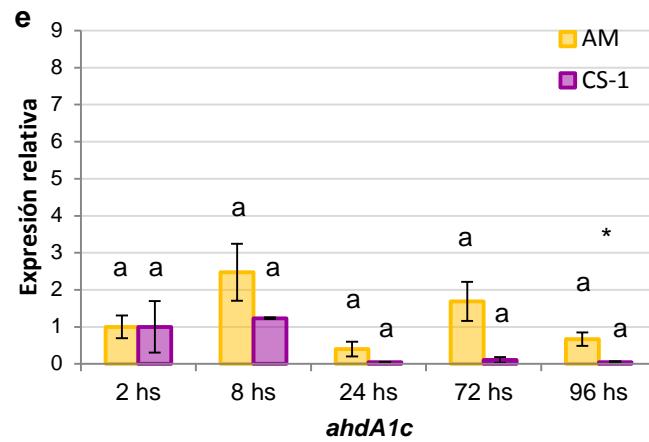
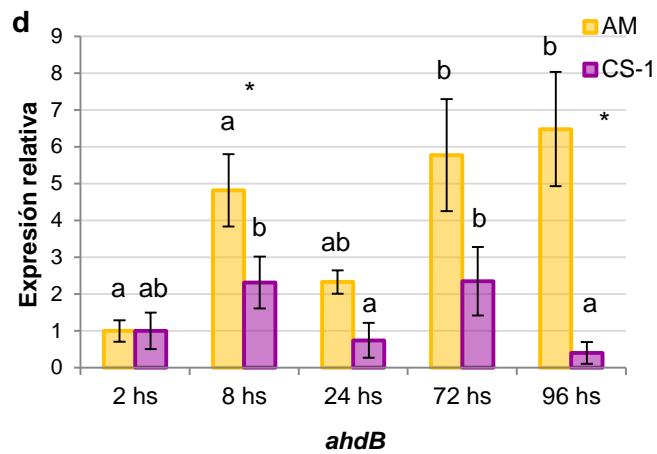
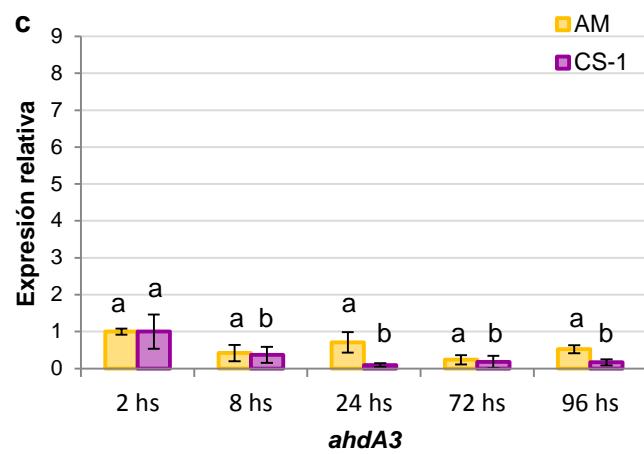
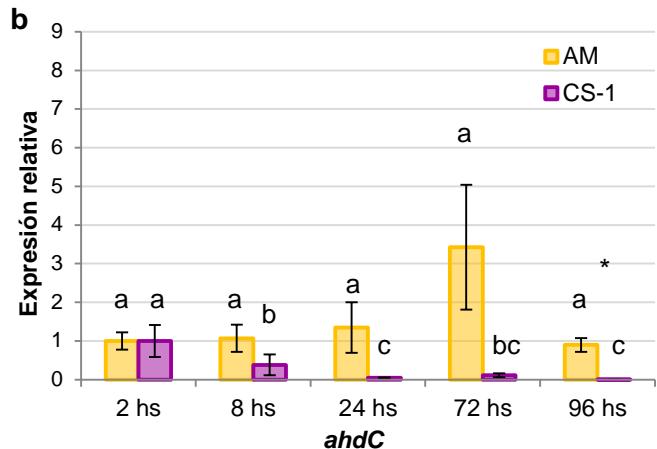
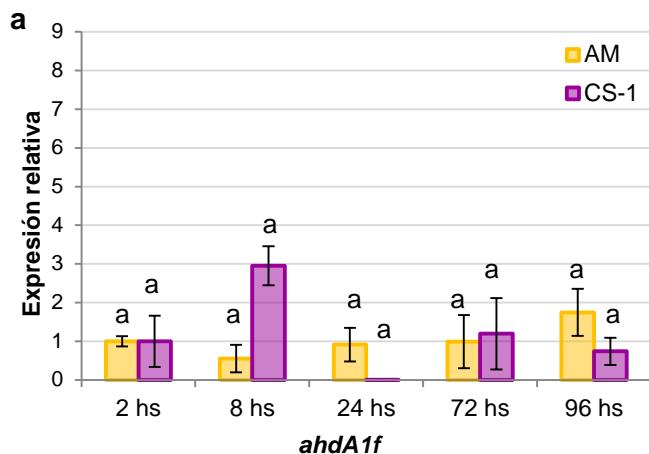
**Figura V.23.** Se muestran los primers utilizados en RT-qPCR, ubicados en el paso en que actúa la enzima a la que se dirigen en la ruta de degradación de fenantreno propuesta.

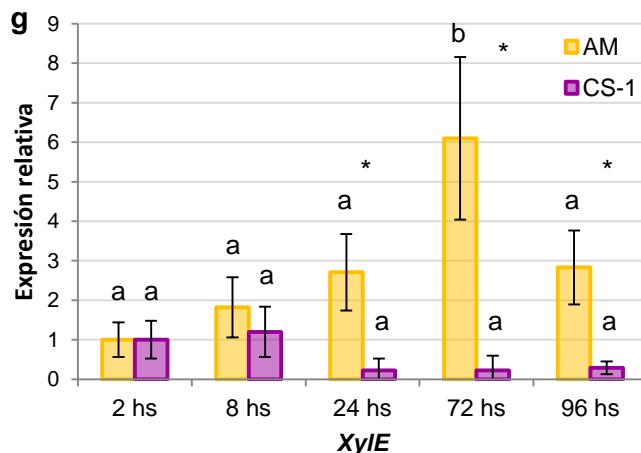
La figura V.24 a-g muestra los valores relativos de la expresión de los siete genes de la ruta de degradación de fenantreno en la cepa AM, a las 2, 8, 24, 72 y 96 horas durante la degradación, determinada por análisis de RT-qPCR en los dos cultivos analizados. En cada gráfico se muestra la expresión de cada gen en referencia a la expresión a las 2 horas de cada cultivo, para el cultivo de la cepa AM (barras amarillas) y para el cultivo de CS-1 (barras violetas).

La Figura V.24 a muestra la expresión génica de *ahdA1f*, gen que codifica la subunidad mayor naftaleno/bifenil dioxigenasa, una enzima que podría participar de los pasos 1 y 3 de la ruta. Para el gen *ahdA1f* se observa que tanto en AM como en CS-1 la expresión se mantiene a niveles constantes y cercanos al tiempo de referencia (2 horas), sin mostrar diferencias significativas a los diferentes tiempos durante la degradación de fenantreno. Tampoco se observaron diferencias significativas en la expresión de *ahdA1f* entre AM y CS-1 a los diferentes tiempos.

En la Figura V.24 b, se muestra la expresión génica de *ahdC*, gen que codifica la enzima 2,3-dihidroxibifenil 1,2-dioxigenasa que actuaría en los pasos 1, 3 y 7 de la ruta de degradación de fenantreno, atacando tanto al fenantreno, como al intermediario AHN por la vía del orto clivaje. Para el gen *ahdC* se observa que en AM la expresión se mantiene a niveles constantes y cercanos al tiempo de 2 horas, sin mostrar diferencias significativas a los diferentes tiempos de incubación. En el cultivo de CS-1 se observan niveles significativamente ( $P<0.05$ ) más bajos de expresión a todos los tiempos con respecto a las 2 horas. Adicionalmente se pueden observar diferencias significativas ( $P<0.05$ ) en la expresión de *ahdC* entre AM y CS-1 a las 96 horas, existiendo una menor expresión en el consorcio.

En la Figura V.24 c, se muestra la expresión génica de *ahdA3*, gen que codifica una dioxigenasa hidroxilante de anillo aromático junto a la ferredoxina, enzima que participaría en diferentes pasos de la ruta como 1, 3, 10, 15, 19, 21, atacando compuestos tanto de la vía superior como inferior. En AM el gen *ahdA3* se mantiene a niveles constantes y cercanos al tiempo de referencia (2 horas), sin mostrar diferencias significativas a los diferentes tiempos durante la degradación de fenantreno. El cultivo de CS-1 presentó menores niveles de expresión en todos los tiempos con respecto a las 2 horas. Sin embargo no se observaron diferencias significativas en la expresión de *ahdA3* entre AM y CS-1 a los diferentes tiempos.





**Figura V.24.** Nivel de expresión de genes claves regulados durante la degradación de fenantreno en cultivos de AM y CS-1 (a: *ahdA1f*, b: *ahdC*, c: *ahdA3*, d: *ahdB*, e: *ahdA1c*, f: *ahdA1d* y g: *XylE*). Los valores son expresados como las veces que cambia la expresión, y representan los promedios  $\pm$  STD de dos replicas independientes y tres réplicas de medida e indican el cambio en los niveles de mRNA de los genes estudiados en comparación con las condiciones de control (valor de 1). La diferencia significativa de la expresión génica entre las condiciones (diferentes tiempos) del mismo cultivo (AM o CS-1) se muestran con letras diferentes (a, b, c y d) y la diferencia significativa entre cultivos (AM y CS-1) para cada tiempo se muestra con asterisco (\*) y fueron determinadas por el test de Student's usando un valor P de  $\pm 0.05$  como corte (ANOVA two-ways, Tukey test).

En la Figura V.24 d, se muestra la expresión génica de *ahdB*, gen que codifica para la enzima dihidrodiol-deshidrogenasa, que puede actuar en los pasos 2 y 11 de la ruta.

En el cultivo de AM se observa que el gen *ahdB* se encuentra sobreexpresado significativamente ( $P<0.05$ ) a las 72 y 96 horas con respecto a las 2 y 8 horas.

En CS-1, se observó una sobreexpresión significativa ( $P<0.05$ ) del gen *ahdB* a las 8 y 72 horas con respecto a las 24 y 96 horas. La expresión de *ahdB* fue significativamente menor ( $P<0.05$ ) en los cultivos de CS-1 a las 8 y 96 horas en relación con AM.

En la Figura V.24 e, se muestra la expresión génica de *ahdA1c*, gen que codifica la subunidad mayor toluato/benzoato dioxygenasa, una enzima que podría participar en el paso 10 y 21 de la ruta. Tanto en los cultivos de AM como en los de CS-1, el gen *ahdC* se mantiene a niveles constantes y cercanos al tiempo de referencia, sin mostrar diferencias significativas a los diferentes tiempos de incubación.

Sin embargo, en CS-1 existe una reducción significativa ( $P<0.05$ ) en el nivel de expresión con respecto a AM a las 96 horas.

En la Figura V.24 f, se muestra la expresión génica de *ahdA1d*, gen que codifica para la subunidad mayor otra enzima toluato/benzoato dioxygenasa, cuya secuencia de aminoácidos

fue clasificada en RHObase como clase C, indicando que podría actuar en los pasos 10, 19 y 21 de la ruta. En AM el gen *ahdA1d* se mantiene a niveles constantes y cercanos al tiempo de referencia, sin mostrar diferencias significativas a los diferentes tiempos durante la degradación de fenantreno. El cultivo de CS-1 presentó menores niveles de expresión a las 8, 72 y 96 horas en relación con las 2 horas. Sin embargo no se observaron diferencias significativas en la expresión de *ahdA1d* entre AM y CS-1 a los diferentes tiempos.

En la Figura V.24 g, se muestra la expresión génica de *XylE*, gen que codifica para la enzima catecol 2,3-dioxigenasa y que puede actuar en el paso 23 de la ruta.

En AM el gen *XylE*, se sobreexpresó significativamente ( $P<0.05$ ) a las 72 con respecto a todos los otros tiempos de incubación. El cultivo de CS-1 la expresión del gen *XylE* se mantiene a niveles constantes y cercanos a las 2 horas, sin mostrar diferencias significativas a los diferentes tiempos. La expresión de *XylE* fue significativamente menor ( $P<0.05$ ) en los cultivos de CS-1 a las 24, 72 y 96 horas en relación con AM.

Las diferencias encontradas en los genes muestran que la expresión de AM se modula de forma distinta cuando se encuentra dentro del consorcio CS-1, en relación con el cultivo de la cepa pura. Las enzimas en el cultivo de AM se encuentran expresadas desde las 2 horas, y en la mayoría de los genes no se producen cambios significativos hasta el final del ensayo. En el cultivo de CS-1, a las 96 horas, cuando no hay más fenantreno ni AHN (Figura V.15), la expresión de los genes *ahdC*, *ahdB*, *ahdA1c* y *XylE* se encuentra reducida con respecto al cultivo de AM.

En AM se observa que la expresión de *XylE*, se encuentra sobreexpresada a partir de las 24 horas de incubación, mientras que en CS-1 se encuentra sobreexpresada con respecto a AM desde las 24h de incubación. Esto estaría indicando que en el CS-1, la cepa AM tendría una menor participación en la vía baja de degradación de fenantreno, donde el resto de las cepas que conforman el consorcio actuarían de forma más activa.

### V.3 Discusión

El estudio de comunidades sintéticas construidas con bacterias degradadoras y de su potencial para degradar los PAH en condiciones de laboratorio podría facilitar la utilización de ese recurso biológico en la remediación de sitios que han sido contaminados con PAH. Las comunidades microbianas sintéticas aportan una relativa reducción en la complejidad frente a comunidades ambientales, creando un sistema más manejable para determinar intercambios metabólicos (Großkopf y Soyer, 2014; Song, 2014). Las comunidades construidas con aislamientos del mismo entorno maximizan el parecido con la comunidad natural y preservan las interacciones indígenas formadas por la coadaptación / evolución (Stadie y col., 2013).

La interacción entre diferentes genotipos microbianos puede crear dinámicas complejas y promover propiedades inesperadas a nivel comunitario. Esta complejidad ha inspirado la disciplina de la ecología microbiana sintética. La ecología microbiana sintética se centra en el diseño, la construcción y el análisis del comportamiento dinámico de los "circuitos ecológicos" (es decir, un conjunto de genotipos microbianos interactivos) y la comprensión de cómo surgen las características (funciones) a nivel de la comunidad como consecuencia de esas interacciones (Dolinšek y col., 2016).

Aún los consorcios microbianos sintéticos compuestos de múltiples especies pueden presentar interacciones complicadas debido a sus estructuras ecológicas, por lo que estudiar las interacciones entre los miembros, así como la estabilidad y la adaptabilidad, son claves para abrir la puerta a la comprensión de su funcionamiento (Jia y col., 2016).

Este capítulo, tuvo como objetivo diseñar consorcios sintéticos combinando todas las cepas aisladas a partir del consorcio natural CON, y la cepa exógena 20006FA, ya caracterizada en el capítulo IV, intentando establecer la contribución de cada cepa al proceso total de degradación de fenantreno y estudiando el potencial de degradación de los distintos consorcios, a fin de seleccionar los más eficientes para ser utilizados como inoculantes en procesos de biorremediación en suelo.

Nuestro enfoque conecta el conocimiento genómico y fisiológico al considerar la organización del genoma, las reacciones bioquímicas catalizadas por enzimas codificadas por sus genes y estudios en cultivo.

Como primer paso se realizaron esfuerzos para aislar todos los miembros del consorcio natural CON. De los dos nuevos aislados que pudieron obtenerse en este trabajo, *Inquilinus limosus* (I) y *Burkholderia* sp. (Bk) (Tabla V.3), sólo Bk mostró una degradación eficiente de fenantreno y otros PAH en cultivo puro (Tabla V.4 y V.7). La capacidad de las *Betaproteobacteria* del orden *Burkholderiales* de degradar compuestos aromáticos ha sido ampliamente reportada (Ponomarova y Kiran, 2015; Ohtsubo y col. 2015; Ghevvariya y col.,

2011) y resulta un rasgo alentador para el posible uso de estas cepas en la limpieza de los sitios contaminados (Andreolli y col. 2011). La cepa I no degradó ninguno de los PAH estudiados. Si bien no se conocen hasta el momento bacterias del orden *Inquilinus* degradadoras, la cepa I mostró degradación de los intermediarios AHN, catecol y 2,3-dihidroxibifenilo (Tablas V.4 y V.6).

Por la secuenciación completa de los genomas, ahora es posible inferir el comportamiento de los microorganismos asociados con la eliminación de contaminantes en más detalle (Buermans y den Dunnen, 2014; Nierman y Nelson, 2002). Este análisis ofrece una mejor visión general de la base genética del catabolismo bacteriano de compuestos aromáticos (Pérez Pantoja, 2010). Cuando se trabajó en la identificación *in silico* de genes codificantes relacionados con las vías de degradación de PAH en los genomas de las 5 cepas aisladas del CON se encontraron genes de enzimas que pueden participar en los diferentes pasos de la vía superior e inferior de la degradación de fenantreno (Tablas V.10, V.11, V.12, V.13, V.14 y V.15). En Bk y AM, las únicas cepas donde se observó degradación en fenantreno y otros PAH en cultivos puros (Tablas V.4, V.6 y V.7), se halló el mayor número de copias de enzimas dioxigenasas iniciales (Tabla V.10, V.15, V.16 y V.26).

En el genoma de la cepa Bk se encontraron 104 CDS (Tabla V.15) que podrían participar de forma activa en la degradación de fenantreno. La comparación entre el genoma de Bk y el scaffold S1P3 de la biblioteca metagenómica funcional preparada por Festa y col. (2017) resultó en una alta similitud con la secuencia genómica del scaffold 22 de Bk (Figura V.8). El scaffold 22, que se encuentra flanqueado por elementos móviles y conjugativos, mostró alta identidad con una región del genoma de la cepa *Burkholderia* sp. HB-1 y con una región codificante completa con los genes degradadores de dibenzotiofeno (*dbtC*) de *Burkholderia* sp. DBT1 (Número de acceso a Genbank: AF404408.2) que codifican las EXDO implicadas en la degradación de dibenzotiofeno (Di Gregorio y col., 2004). La cepa DBT1, aislada inicialmente en dibenzotiofeno como única fuente de carbono, se ha demostrado que degrada fenantreno y otros PAH (Andreolli y col., 2011), lo que sugiere que sus dioxigenasas podrían oxidar estos hidrocarburos, siendo una candidata potencialmente explorable en la biorremediación. El scaffold 25 de Bk reveló alta identidad con el clúster de genes *phn* (genes para el catabolismo de hidrocarburos policíclicos aromáticos que se transcriben en presencia de naftaleno o fenantreno), de la cepa *Burkholderia* sp. RP007 (Laurie y Lloyd-Jones, 1999). Este clúster codifica las subunidades alfa y beta de la proteína de 2Fe-2S de una dioxigenasa inicial de PAH, la dihidrodiol deshidrogenasa (*phnB*) y una inusual estradiol dioxigenasa (*phnC*). Corriente arriba de los genes catabólicos *phn* hay dos genes reguladores putativos, *phnR* y *phnS*. La homología de secuencia sugiere que *phnS* es un activador transcripcional de tipo LysR y que *phnR* un regulador transcripcional positivo. Además, experimentos de RT-qPCR sugieren que este grupo de genes se expresan

coordinadamente y bajo control regulatorio que puede implicar a PhnR y PhnS (Laurie y Lloyd-Jones, 1999).

El análisis de comparación de genomas reflejó una alta similitud entre las cepas AM y 20006FA (Figura V.9), quienes poseen muchos genes y con un elevado número de CDS que codifican para las vías de degradación de PAH y alifáticos (Tablas IV.5, V.10, IV.S1 y V.S1). En AM, y como ya se mencionó en el capítulo IV para 20006FA, se encontraron muchas enzimas dioxigenasas, monooxigenasas, ferredoxinas y reguladores transcripcionales de la degradación de PAH dispuestas en un mismo scaffold (20006FA: GenBank: LYMJ01000019.1 y Figura IV.5 y AM: GenBank: LRUK01000034.1 y Figura V.11). Sin embargo, el resto de genes que codifican para enzimas involucradas en la degradación de PAH se encuentran localizados en diferentes scaffolds del genoma, como ocurre en varias cepas pertenecientes al orden *Sphingomonadales* (Pinyakong y col., 2003). Como se señaló en el capítulo IV, el grupo *Sphingomonas* se adapta genéticamente a diferentes condiciones ambientales (Waigi y col., 2015; Madueño y col., 2011) y tienen la capacidad de degradar una amplia gama de compuestos naturales y xenobióticos (Zhao y col., 2015; Vila y col., 2015; Stoltz, 2009).

En la construcción del árbol filogenético para estudiar la relación filogenética de las enzimas dioxigenasas pertenecientes a las cepas aisladas de CON, se observaron dos ramas principales (Figura V.10). Una de las ramas agrupó 5 clados de enzimas dioxigenasas que clasificaron dentro de la clase RHO (enzimas hidroxilantes de anillo aromático) mientras que la otra rama incluyó a las oxigenasas que participarían del clivaje del anillo (intradiol y extradiol dioxigenasas) y dioxigenasas que no pudieron ser clasificadas. Esto indicaría que todas las dioxigenasas RHO caracterizadas del consorcio pertenecen a un solo linaje evolutivo (Mallick y col. 2011). Se han realizado varios intentos para clasificar estas oxigenasas en términos de número de componentes y naturaleza de sus centros redox (Batie y col., 1992), especificidad del sustrato (Werlen y col., 1996) y en términos de homología de secuencia (Nam y col., 2001). En el caso de las dioxigenasas de escisión del anillo, se cree que todas las intradiol dioxigenasas (INDO) pertenecen a un ancestro común y forman una clase distinta de proteínas (Vaillancourt y col., 2006), que en nuestro árbol clasificaron dentro del clado (S/C) de la otra rama. Las extradiol dioxigenasas, sin embargo, pertenecen a tres familias evolutivamente independientes y en nuestro estudio se pudieron clasificar algunas pertenecientes a EXDO I dentro de un subclado (EI, Figura V.10).

Debido a que el potencial de una comunidad microbiana para degradar PAH es estimado frecuentemente a partir del análisis de los genes codificantes para la subunidad alfa de enzimas hidroxilantes de anillo aromático (Marcos y col., 2009; Cébron y col., 2008; Lozada y col., 2008) y extradiol dioxigenasas (Terrón-González, y col., 2016), nos propusimos

estudiar en más detalle estos genes en los seis aislados bacterianos mediante las bases de datos RHObase (Chakraborty y col., 2014) y AromaDeg (Duarte y col., 2014).

Las enzimas dioxigenasas y ferredoxinas (2Fe-2S) de las cepas AM, Bk y 20006FA clasificaron en las 4 clases propuestas por RHObase con un alto número de copias (Tablas V.16, V.26 y IV.6). Los resultados indicarían que las cepas AM, Bk y 20006FA son esenciales para el ataque inicial de fenantreno, ya que presentan en su genoma enzimas dioxigenasas claves (tipo A) que pueden participar en el primer paso de escisión de anillo aromático, como se observó en el análisis fisiológico (Tablas IV.1, IV.2 y V.4). Además son las únicas que contienen genes de enzimas que clasificaron en la clase C (Tablas V.16, V.26 y IV.6), sugiriendo que pueden catalizar la conversión de salicilato en catecol o gentisato en la vía baja de la degradación del fenantreno (pasos 19 y 21 de la Figura señalador), confirmado también en el análisis fisiológico de Bk y 20006FA (Tablas V.4 y IV.2). Si bien en AM y 20006FA no se observó degradación de catecol (Tabla V.6 y Figura V.2), las extradiol dioxigenasas clasificaron como EXDO I en AromaDeg (Tablas V.17 y IV.7), indicando que estas cepas degradarían el salicilato vía gentisato (Paso 19 de la Figura señalador). Wang y col., (2008) observaron que *Cycloclasticus sp.* P1 no era capaz de utilizar ni salicilato ni catecol como fuentes de carbono; sin embargo se confirmó la existencia de la vía del catecol mediante un ensayo de actividad enzimática llevada a cabo con lisados de células de P1 creciendo en pireno, naftaleno o fenantreno. Se postuló que esta vía podría ser activada por pireno, naftaleno y fenantreno pero no por el catecol. En base a la predicción de la regulación de los operones, Khara y col., (2014) sugirieron que la expresión de enzimas catabólicas de compuestos aromáticos requiere múltiples inductores. Las enzimas dioxigenasas de las cepas *Pseudomonas* sp. (T y Bc-h) clasificaron en clase A (Tablas V.20 y V.22), no obstante no degradaron ninguno de los PAH estudiados; aunque mostraron crecimiento en fenantreno (Festa y col., 2013). Para algunas *Pseudomonas* se evidenció que la exposición de estas bacterias a concentraciones de PAH del orden de 200 mg/L, podría inhibir su capacidad de degradación (Xu y col., 2016). Un trabajo realizado por Cho y col. (2005) sobre los efectos de los metabolitos intermediarios en la biodegradación del fenantreno sugirió que cepas de *Pseudomonas* podrían necesitar para la degradación de fenantreno, la inducción por metabolitos como catecol, AHN y salicilato agregados exógenamente (Cho y col., 2005).

La clasificación de las dioxigenasas y extradiol dioxigenasas de T y Bc-h, junto a las de B e I, indicó especificidad principalmente por compuestos bicíclicos y monocíclicos sustituidos (clase B y D; EXDO II y III) (Tablas V.18, V.19, V.20, V.21, V.22, V.23, V.24 y V.25), como se demostró también a nivel fisiológico para I, Bc-h y T que degradaron catecol y 2,3-didroxibifenilo (Tabla V.6), por lo que tendrían participación en la vía baja de la degradación de fenantreno.

La diversidad de estas enzimas es demasiado amplia para ser identificada por los enfoques basados sólo en la información de secuencia (Vilchez-Vargas y col., 2010). De un estudio que comprendió enfoques dependientes como independientes de cultivo realizado por Suenaga y col. (2014), empleados para investigar la diversidad genética de las enzimas EXDO, se sugirió que los dos enfoques podrían complementarse para comprender la heterogeneidad de las vías de degradación de compuestos aromáticos de bacterias aisladas de un entorno de lodo activado. Nuestra integración de estudios fisiológicos y genómicos de las EXDO nos proporcionó mayor evidencia de sus potenciales funciones.

Cuando se comparó la cinética de degradación en fenantreno entre las cepas AM y Bk (Figura V.3) se observó que las dos cepas lo degradan rápidamente alcanzando valores remantes menores al 5% luego de 15 días de incubación. Bk acumula menos AHN ( $15 \pm 4$  mg/L) que AM ( $73 \pm 12$  mg/L) (Figura V.4), pero está última consigue eliminar más del 98% del intermediario al final del ensayo, mientras que en el cultivo de Bk la concentración de AHN acumulado se mantiene constante hasta el día 15 (Figuras V.3, V.5 y V.18). Sin embargo, al observar los valores estequiométricos, y si consideramos que todo el fenantreno que se degrada genera AHN, en una ecuación mol a mol, parte del AHN que produjo Bk sería degradado a la misma velocidad con que se produce, quedando el día 15 sólo un 6,4% remanente del total de intermediario que podría haberse formado. Seo y col. (2007) encontraron en una cepa de *Burkholderia* sp. C3 una acumulación constante de AHN en medios suplementados con 40 mg/L de fenantreno, durante 14 días, y los cultivos de esa cepa en AHN (200 mg/L) como sustrato mostraron también una lenta degradación. En cambio en AM a tiempos iniciales, la velocidad de producción del AHN es mayor que su velocidad de degradación (Figura V.16), esta relación de velocidades se invierte luego de 4 días sugiriendo un «switch» regulatorio.

Como el AHN se acumuló durante la degradación de fenantreno, y como ya expusimos en el capítulo IV, este metabolito interfiere en el proceso de biorremediación, se estudió a nivel genómico y fisiológico el potencial de las cepas para degradarlo. Las secuencias homólogas de genes de las enzimas dioxigenasas y salicilato hidroxilasa que podrían atacar el AHN por orto o meta clivaje (pasos 7 y 14 de la figura V.12), sólo se encontraron en los genomas de las cepas AM, Bk, Bc-h, I y 20006FA (Figura V.12), sin embargo en cultivos puros sólo AM, I y 20006FA mostraron degradación del intermediario (Tablas IV.2 y V.4). Como ya se mencionó en el capítulo IV, la enzima salicilato 1-hidroxilasa que posee sitio Rieske no hemo ha sido poco estudiada hasta ahora (Jouanneau y col., 2007; Pinyakong y col., 2003), pero su gran abundancia y diversidad encontrada en una biblioteca metagenómica construida a partir de un suelo contaminado con combustible, indica su importancia para la degradación aromática (Duarte y col., 2017).

Los resultados encontrados de los análisis fisiológicos y genómicos en el presente trabajo sugieren que en las cepas Bk, B y Bc-h la inducción de las enzimas necesarias para la degradación de AHN podría atribuirse al fenantreno o que la incapacidad de las cepas de degradar el intermediario es debido a que el sustrato exógeno no puede ingresar a la célula (Balashova y col., 1999). En otros trabajos se ha demostrado que cepas de *Burkholderia* sp. no son capaces de crecer a partir de AHN exógeno, y producen la acumulación de AHN cuando crecen en presencia de fenantreno (Puntus y col., 2008; Balashova y col., 1999), lo que podría indicar la existencia de mecanismos regulatorios no conocidos. Por otro lado, se reportaron algunos estudios que demuestran que las *Pseudomonas* crecen en AHN (Lin y col., 2014; Balashova y col. 2001). Resultados diferentes a los nuestros fueron encontrados por Cho y col. (2005) donde para la degradación de PAH, al utilizar como inductores metabolitos de la degradación de fenantreno, las cepas de *Pseudomonas putida* ATCC 17484 y *Burkholderia cepacia* PB12 fueron capaces de utilizar AHN como única fuente de carbono (Cho y col., 2005).

Un factor que debe tenerse en cuenta al diseñar consorcios microbianos son los mecanismos de transporte (Pieper y Reineke, 2000). Dado que los compuestos xenobióticos son generalmente transportados por sistemas especializados (Pao y col., 1998), una saturación de dicho transportador podría ser la causa de una inhibición de la captación de AHN por el citoplasma. Se conoce poco sobre como los PAH atraviesan las membranas bacterianas para alcanzar las enzimas catabólicas presentes en el citoplasma, los mecanismos descritos incluyen tanto difusión pasiva como una captación dependiente de energía que se activaría durante el crecimiento con PAH como única fuente de carbono (Neher y Lueking, 2009). En los genomas de todas las cepas se encontraron diferentes tipos de transportadores como ABC y genes de la familia OmpW, que podrían cumplir alguna de estas funciones. De todos modos, deberían realizarse estudios específicos de los procesos moleculares implicados en el transporte microbiano transmembrana de hidrocarburos, ya que existen investigaciones limitadas sobre el mismo (Wang y col., 2018; Hua y Wang, 2014).

Para la cepa B no pudimos establecer la degradación de ningún compuesto de la vía, no obstante, junto a la cepa T, presentaron alfa hemólisis en agar sangre, sugiriendo la producción de compuestos con actividad surfactante (Festa y col., 2013). Los biosurfactantes producidos extracelularmente o como parte de la membrana celular por diferentes microorganismos incluyen rhamnolípidos, surfactina, lipopéptidos, etc. (Mulligan, 2005). Estos ayudan en la formación de micelas en presencia de contaminantes hidrofóbicos y aumentan su movilidad, biodisponibilidad y exposición a bacterias, favoreciendo la biodegradación de hidrocarburos (Bezza y Nkhalambaya Chirwa, 2016; Souza y col., 2014). Hua y col., (2010) demostraron que los exopolisacáridos excretados por una cepa de

la familia *Enterobacteriaceae*, (a la que pertenece nuestra cepa B), presentaba actividad bioemulsificadora, aumentando la solubilidad en agua del hexadecano. También, el género *Pseudomonas* fue previamente reportado por su capacidad de producir biosurfactantes en medios con hidrocarburos (Thavasi y col., 2011; Prabhu y Phale, 2003; Deziel y col., 1996). Si bien I degradó intermediarios de la vía (Tablas V.4 y V.6), también podría generar biosurfactantes como se reportó en cepas de *Inquilinus limosus* KB3 que fueron capaces de formar emulsiones con varios hidrocarburos, mejorando la recuperación del petróleo (Ponomarova y Patil, 2015).

Se construyó un gráfico computacional con la información contenida en el genoma de todas las cepas aisladas que conforman los consorcios sintéticos (Figura V.12). La biología *in silico* se está aplicando progresivamente en el campo de la biorremediación (Khara y col., 2014; Chakraborty y col., 2012; Kweon y col., 2010). Se espera que los métodos biológicos, analíticos y computacionales emergentes pueden predecir la actividad de los microorganismos implicados en la biodegradación, y proporcionar una mejor comprensión predictiva de la dinámica de la comunidad microbiana y de propiedades de orden superior (Henson y Hanly, 2014). El análisis computacional nos permitió inferir un conjunto activo de reacciones mediadas por las diferentes cepas aisladas y la construcción de una red metabólica específica de la degradación de fenantreno que se correlaciona significativamente bien con los resultados fisiológicos experimentales (Figura V.12, Tablas V.4 y V.6). Esta red indica que las poblaciones responsables del ataque inicial al fenantreno podrían ser las cepas Bk y AM, mientras que las cepas I, T y Bc-h intervendrían posteriormente. A nivel de la vía baja es cuando se observa la mayor redundancia funcional entre las poblaciones del consorcio (Figura V.12). La redundancia funcional se basa en la observación de que algunas especies realizan funciones similares en comunidades y ecosistemas, y por lo tanto pueden ser sustituibles con poco impacto en los procesos del ecosistema (Rosenfeld, 2002; Lawton y Brown 1993). La redundancia funcional de especies es considerada necesaria para asegurar la resiliencia a la perturbación del ambiente (Briones y Raskin, 2003; Rosenfeld, 2002). Esto podría explicar en parte la coexistencia de las cepas I, T, B y Bc-h en CON, ya que podrían actuar alternativamente en la degradación de compuestos de la vía baja de degradación en función de los cambios producidos en el ecosistema.

El diseño *in silico* de consorcios sintéticos beneficia en gran medida la expansión del conocimiento del metabolismo microbiano y la anotación de genes funcionales, lo que, a su vez, facilita la integración de conjuntos de datos ómicos, cinéticos y fisiológicos para una mejor predicción de su comportamiento (Lindeman y col., 2016).

En un ensamblaje simple de dos genotipos microbianos pueden existir dinámicas sorprendentemente complejas e inesperadas, que resultan en funcionalidades y

comportamientos comunitarios (p. Ej., robustez, resiliencia, complementariedad, facilitación, competencia y antagonismo) que podrían no esperarse fácilmente al analizar cada genotipo por separado. La comprensión de las reglas y principios que rigen la dinámica y las funcionalidades emergentes de los ensamblajes microbianos está en su infancia (Dolinšek y col., 2016).

La estabilización de comunidades microbianas para su uso en biorremediación puede tener claras ventajas sobre el uso de cultivos puros (Marshall y col., 2013; de-Bashan y col., 2011; Kleerebezem y van Loosdrecht, 2007; Rodríguez y col., 2006). Tales ventajas son: (i) mayor capacidad de adaptación (un conjunto más grande de genes permite que se realicen diferentes procesos dependiendo de las condiciones ambientales); (ii) mayor robustez del proceso; (iii) realización de tareas complicadas (división del trabajo y modularidad metabólica que permiten que ocurran varios procesos en un solo cultivo); y (iv) el control de las interacciones permite la regulación del proceso (Perez-Garcia y col., 2016).

Dado que para una biorremediación eficiente es esencial estudiar la capacidad de los microorganismos de degradar los PAH, conocer los metabolitos que podrían acumularse, para que otras cepas capaces de degradar esos compuestos puedan agregarse si es necesario (Zhao y col. 2008) y comprender las diferentes asociaciones que pueden generarse entre las distintas especies, se utilizaron combinaciones de todas las cepas aisladas de CON y la cepa exógena a este, 20006FA y se construyeron y cultivaron diferentes consorcios sintéticos (Figura V.13). Sólo aquellos consorcios que incluían alguna de las cepas degradadoras, AM, Bk y 20006FA, fueron capaces de degradar fenantreno (Figura V.29), por este motivo se continuó con el análisis de los consorcios CS-1, CS-2, CS-3 y CS-4.

Los cuatro consorcios microbianos sintéticos aceleraron la degradación de fenantreno, alcanzando una eliminación mayor al 99% el día 7 de incubación (Figura V.15), significativamente superior a la obtenida por CON (65%) (Figura V.16), CON-I (51%) (Figura V.18) y los cultivos individuales de las cepas degradadoras AM (88%), Bk (97%) (Figuras V.6, V17 y V.18) y 20006FA (92%) (Tabla IV.1 y Figura V.18), demostrando la existencia de relaciones sinérgicas entre sus integrantes. Este tipo de comportamiento se ha observado en cultivos mixtos definidos que mostraron degradación significativamente superior que los aislados individuales (Wanapaisan y col., 2018). En general, pueden ocurrir tres tipos distintos de cooperación entre los miembros del consorcio bacteriano durante la degradación de contaminantes orgánicos: deficiencia metabólica, asociación metabólica y desintoxicación de metabolitos (Barreiros y col., 2003). En la deficiencia metabólica, el organismo degradante tiene requisitos nutricionales específicos, necesarios para promover o aumentar la degradación, que son proporcionados por cepas secundarias. La asociación metabólica se caracteriza por la alimentación cruzada de metabolitos de la ruta de degradación dentro

de los miembros del consorcio; esta es la forma más común de cooperación, y se pueden encontrar numerosos ejemplos (Carvalho y col., 2002; De Souza y col., 1998; Arfmann y col., 1997; Chaudhry y Chapalamadugu, 1991). La desintoxicación de metabolitos, que puede considerarse un caso particular de asociación metabólica, implica la producción de un metabolito tóxico y / o inhibidor por el organismo degradante y su consumo por cepas secundarias. Aunque las interacciones entre especies en cultivos definidos mixtos aún no se comprenden por completo, es claro que la asociación metabólica y la desintoxicación imponen la interdependencia entre los miembros del consorcio.

Al observar la cinética de acumulación de AHN, en los CS-1 (Figura V.15) y CS-4 (Figura V.15), vemos que durante los primeros 4 días de incubación ambos consorcios muestran un patrón de acumulación que se asemeja al de la cepa AM, con una mayor velocidad de producción inicial, y una posterior degradación. Teniendo en cuenta la composición de CS-1, donde la única cepa con capacidad de generar la ruptura inicial es la AM (Tabla V.4 y Figura V.12), podríamos inferir que la cepa AM participaría de los primeros pasos de la ruta. Por otro lado, la menor concentración de AHN alcanzada en CS-1 con respecto a AM y el hecho de que la etapa de degradación rápida del AHN comience tempranamente en el consorcio sintético (Figura V.15), indicaría un efecto sinérgico donde el resto de las cepas que conforman el consorcio (Bc-h, B, T e I) estarían participando de la degradación de metabolitos de la vía baja. Este resultado también se corroboró mediante el ensayo de RT-qPCR, que mostró en CS-1 reducción significativa ( $P<0.05$ ) de la expresión de los genes *XylE* y *adhA1c*, que actúan en la vía baja de la degradación de fenantreno, con respecto a la cepa AM (Figura V.24 e y g). Esto estaría demostrando que cuando forma parte del consorcio la cepa AM tendría una menor participación en la vía baja de degradación.

En el CS-4 existen dos candidatos para iniciar la ruptura inicial de fenantreno y por lo tanto podrían competir entre sí, las cepas AM y Bk (Tabla V.4 y Figura V.12). El principio de exclusión competitiva establece que dos especies no pueden ocupar un mismo nicho ecológico en el mismo hábitat al mismo tiempo (Harper y col., 1961), sin embargo oscilaciones temporales en la disponibilidad de recursos, entre otras dinámicas ambientales, puede crear nuevos nichos que permitan la coexistencia; si las condiciones oscilan con el tiempo, entonces ningún genotipo puede ser capaz de desplazar completamente al otro (Dolinšek y col., 2016). El patrón de acumulación y degradación del AHN observado en CS-4 (Figura V.15) y el hecho de que en los perfiles de DGGE (Figura V.22) la banda correspondiente a la cepa Bk sea visiblemente predominante después de los 4 días de incubación, sugiere que sería la cepa AM la que ganaría la competencia, ocupando el nicho correspondiente a la ruptura inicial del fenantreno, mientras que la cepa Bk se establecería en función de la aparición de otros nichos (productos de degradación). Este efecto de coexistencia entre las especies de *Sphingomonas* y *Burkholderias* fue también observado en

CON-I (Capítulo IV) y por otros autores (Festa y col., 2017; Willsey y Wargo., 2015; Arfmann y col., 1997).

Luego de los 8 días de incubación CS-4 muestra una concentración de AHN que permanece constante hasta el final del ensayo, lo que se asemeja al patrón de degradación de AHN de la cepa Bk y al del consorcio natural CON (Figura V.17). La aparición de una banda intensa que correspondería a Bk en el perfil de DGGE de CS-4 a este mismo tiempo (Figura V.22), podría estar indicando un establecimiento de la cepa en función de algún metabolito intermedio (ya que en el medio ya no hay fenantreno). Zelezniak y col. (2015) mostraron que los intercambios metabólicos entre especies están muy extendidos en comunidades naturales, y que tales intercambios pueden proporcionar ventajas a un grupo bacteriano bajo condiciones pobres en nutrientes. Sus resultados destacan las dependencias metabólicas como un importante impulsor de co-ocurrencia de especies (Zelezniak y col., 2015).

Estos resultados sugieren un efecto de competencia entre el resto de las cepas del CS-4 (B, Bc-h, T e I) y Bk, que provoca una disminución del efecto sinérgico observado en CS-1, provocando la acumulación del AHN. Se ha establecido que los fenómeno de antagonismo y competencia podrían causar un impacto negativo sobre la capacidad degradadora de un contaminante (Fuentes y col., 2013).

El efecto de competencia o interacción negativa que se observa entre Bk con el resto de las cepas de CS-4, también podría estar ocurriendo en CON, que mostró un comportamiento semejante en la acumulación de AHN (Figura V.17). A diferencia de los consorcios sintéticos, y probablemente debido a la existencia de otras especies no aisladas, cuando aumenta la concentración de AHN todavía hay una concentración importante de fenantreno en el medio (Figuras IV.9 y V.18), por lo que podría ocasionar una nueva competencia, bajo condiciones ambientales distintas, que podría originar el desplazamiento de la cepa AM (colonias amarillas) (Figura IV.12).

En el CS-3 que contiene a la cepa exógena 20006FA, se observó un retraso inicial en la degradación de fenantreno hasta el día 2 (Figura V.15 y V.19), y una mayor acumulación de AHN, con respecto a CS-1 y CS-2 (Figuras V.17), lo que pone en evidencia, una diferencia de interacción de la cepa exógena con las otras especies del consorcio ya que esta inhibición no se genera cuando 20006FA no forma parte del CS. Si bien en el CS-2 (constituido por las dos cepas correspondientes al orden *Sphingomonadales*, AM y 20006FA) se observó una degradación inicial, a las pocas horas ocurre una detención en la degradación hasta el día 2, a partir de donde se manifestó la acumulación de AHN (Figura V.15). Este retraso coincide con el comportamiento observado en suelos inoculados con 20006FA donde se infirió que la pausa en la degradación de fenantreno se debió principalmente a la acumulación de metabolitos y no a una falta de biodisponibilidad del hidrocarburo (Coppotelli y col., 2008). No obstante, CS-2 y CS-3 acumulan menos AHN que

el cultivo de las cepas puras (Tabla IV.1 y V.17), y esta acumulación ocurre luego del día 2, demostrando que no sería el AHN el metabolito que determinaría esta fase de retraso.

A pesar de que las cepas de la familia *Sphingomonadaceae* (AM y 20006FA) están estrechamente relacionadas (Figura V.9), tienen una cinética de degradación diferente (Figura V.S3). En 20006FA se observa una pausa en la degradación entre las 48 y las 72 horas de incubación, lo que podría estar demostrando una diferencia a nivel regulatorio entre las dos cepas. Por otro lado, que en CS-3 no haya degradación durante las primeras 48 horas indicaría que las cepas interactúan de manera distinta con las otras especies presentes en los consorcios sintéticos, ya que se observaron claras diferencias en cuanto a la degradación de fenantreno y acumulación de AHN (Figuras V.16, V17, V19), y recuento de bacterias heterótrofas, donde CS-3 alcanzó el valor más alto de UFC, mientras que CS-1 alcanzó el más bajo, luego de los 15 días (Figura V.19).

En el diseño de consorcios sintéticos, a menudo la falta de adaptación de las poblaciones alóctonas puede poner en peligro su supervivencia (Dejonghe y col., 2001; Kästner, 2000). Es por eso que la selección de poblaciones que ya estén pre-adaptadas a funcionar en conjunto resulta esencial para minimizar las interacciones ecológicas que podrían interferir en su funcionamiento.

Los microorganismos pueden utilizar y secretar una gran cantidad de metabolitos; esta red plástica se adapta y regula fácilmente en respuesta a los nutrientes (Ponomarova y Patil, 2015), por ejemplo, para optimizar la asignación de recursos (Jenna y col., 2015; Xavier y col. 2011), pero también en respuesta a señales de otros microorganismos (Estrela y col. 2015), de tipo químico (Jarosz y col., 2014). La respuesta transcripcional puede deberse a adaptaciones metabólicas a otros miembros de la comunidad (Liu y col., 2011). Los microorganismos se afectan entre sí a través de su tasa de crecimiento, su metabolismo o por medio de la señalización mediada por moléculas (Haruta y col., 2009). La regulación de genes por QS (del inglés *quorum sensing*) produce fenotipos que le otorgan a la población bacteriana una ventaja competitiva como por ejemplo, la formación de biofilm, la patogenicidad, (Case y col., 2008), el acceso a nutrientes, o nichos específicos, la defensa colectiva contra otros organismos, producción de pigmentos o antibióticos (Williams, 2007). Debido a que la degradación de todos los consorcios sintéticos fue mayor que la del consorcio natural CON (Figuras V.17 y V.18) y el consorcio inoculado CON-I (Figura V.18), los resultados obtenidos en estos ensayos estarían indicando que la degradación de fenantreno en los consorcios sintéticos se produce a través de interacciones sintróficas, y que en CON y CON-I podrían estar ocurriendo interacciones antagónicas con las poblaciones no cultivables que disminuyen la eficiencia de degradación.

En CON-I los resultados podrían sugerir la presencia de interacciones positivas (que permiten la eliminación de metabolitos intermedios, ya que no se observó AHN) pero también interacciones negativas (que provocan una menor degradación de fenantreno en comparación con los CS y los cultivos de las cepas puras) entre todas las poblaciones bacterianas presentes en el consorcio.

Los resultados obtenidos a partir de los consorcios sintéticos demostraron las ventajas que este tipo de consorcios poseen frente a las poblaciones individuales e incluso frente al consorcio natural (a partir del que fueron aisladas sus cepas constituyentes) en la biodegradación de contaminantes complejos y remarcan la importancia que tienen en su funcionamiento las interacciones que se dan entre sus miembros.

La selección de microorganismos para la construcción de los consorcios resultó fundamental para la optimización de su eficiencia de degradación. De los consorcios estudiados el CS-1 resultó ser el más eficiente y el que resultaría de elección para su utilización en procesos de bioaumento.



## CAPÍTULO VI

# *Conclusiones Generales*

## VI. Conclusiones Generales y perspectivas

### VI.1 Conclusiones Generales

La vía metabólica del fenantreno en *S. paucimobilis* 20006FA se elucidó usando una combinación de genómica y proteómica, cuyos resultados fueron posteriormente verificados por estudios fisiológicos. Pudimos confirmar la información predictiva obtenida mediante el análisis del genoma y elucidar la ruta metabólica utilizada por la bacteria que podría adaptarse bien a los ambientes contaminados del suelo ya que tiene activas las dos rutas de degradación (vías de salicilato y protocatecuato).

La inoculación de una cepa degradadora logró, aumentar el potencial degradador del consorcio natural CON y mejorar la eficiencia de degradación, aumentando la velocidad de degradación, sin la acumulación de AHN que resulta tóxico para los procesos de biorremediación. La cepa logró su establecimiento dentro de la comunidad adaptándose a la misma, lo que fue corroborado por los perfiles proteómicos y de DGGE de CON-I tanto en fenantreno como en AHN como única fuente de carbono y energía.

A través de los estudios con técnicas de secuenciación de alto rendimiento se logró conocer la estructura en términos de abundancia relativa de los consorcios y se determinó que la inoculación produjo una disminución de la diversidad y la riqueza con respecto a CON. La mejora en la degradación de fenantreno en CON-I podría ser explicada no sólo por la inoculación con la cepa exógena 20006FA, sino por el incremento en el género *Burkholderia* que produjo la inoculación del consorcio natural. Todas estas características hacen que CON-I presente condiciones para ser utilizado como inoculante en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos policíclicos aromáticos.

El análisis *in silico* de los genomas de las cepas aisladas del consorcio natural reveló que todas podrían producir enzimas de las vías de degradación de PAH, sin embargo en cultivos puros, sólo las cepas AM y Bk mostraron capacidad de degradar PAH o sus intermediarios. Con la utilización de la base de datos RHO y AromaDeg se pudieron clasificar algunas enzimas dioxygenasas, encontrándose en las cepas AM y Bk muchas copias de enzimas dioxygenasas que pueden actuar en los primeros pasos de la vía de degradación de fenantreno.

Mediante la construcción de una red metabólica específica de la degradación de fenantreno a través de gráfico computacional conteniendo la información del genoma de todas las

cepas aisladas, observamos que las poblaciones responsables del ataque inicial al fenantreno podrían ser las cepas Bk y AM, mientras que las cepas I, T, B y Bc-h intervendrían posteriormente. Además se observó una fuerte redundancia funcional que se justifica en comunidades ambientales debido a que ofrece versatilidad frente a distintas condiciones de entorno. La diversidad que conforma el CON original podría estar justificada por la regulación de los genes que codifican enzimas intervenientes en la ruta así como la ampliación de la capacidad degradadora total en presencia de los subproductos de degradación o en situaciones ambientales diferentes.

A partir de los estudios funcionales de las cepas aisladas del consorcio natural CON y de la cepa 20006FA y las distintas herramientas ómicas como genómica y proteómica, se aplicó la estrategia de generar consorcios bacterianos sintróficos cuyos miembros están especializados en ciertos pasos biodegradativos, los consorcios sintéticos diseñados mostraron una alta eficiencia de degradación de PAH.

Uno de los consorcios sintéticos diseñados a partir de las cepas, el CS-1, logró ser más eficiente que el consorcio natural (CON) incluso más eficiente que el consorcio inoculado con la cepa (CON-I). CS-1 logró la mayor degradación de fenantreno y la menor acumulación del metabolito intermedio AHN. La aplicación de RT-qPCR para evaluar la expresión de genes catabólicos y la respuesta funcional frente a la degradación de fenantreno en medio líquido de la cepa AM indicó que en el CS-1 la cepa AM participaría de los primeros pasos de la ruta y habría un efecto sinérgico con el resto de las cepas que conforman el consorcio, las cuales estarían participando de la degradación de metabolitos de la vía baja. Todas estas características hacen que el CS-1 presente las mejores condiciones para ser utilizado como inoculante en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos policíclicos aromáticos. Esto resulta muy importante desde el punto de vista tecnológico, ya que los ensambles microbianos sintéticos se pueden propagar con mayor facilidad que los consorcios naturales bajo condiciones experimentales cuidadosamente mantenidas (Dolinšek y col., 2016).

En este trabajo se logró dar un primer paso en el estudio de las interacciones entre las poblaciones de un consorcio natural, y se observó que las interacciones dentro de un cultivo aun sintético son muy complejas. Los estudios de este trabajo confirmaron la hipótesis de Stadie y col. (2013) en relación a que las comunidades construidas con aislamientos del mismo entorno resguardan las interacciones indígenas formadas por la coadaptación / evolución.

## VI.2 Perspectivas

Las nuevas hipótesis generadas por este trabajo de tesis serán puestas a prueba durante mi trabajo postdoctoral en el cual estudiaremos estos mismos consorcios mediante estrategias transcriptómicas y proteómicas, para evaluar la expresión de genes catabólicos correspondientes a las distintas cepas.

También se estudiarán interacciones entre las distintas poblaciones bacterianas que conforman los consorcios, mediante la generación de cultivos mixtos y aplicación de herramientas metabolómicas (determinación de la aptitud metabólica=producción de metabolitos intermedios frente a mezclas de hidrocarburos aromáticos), herramientas proteómicas y herramientas transcriptómicas (análisis de la expresión de genes vinculados a la producción de moléculas involucradas en la comunicación intercelular por *quórum sensing* (homoserina lactonas) o a la producción de moléculas que puedan interferir esa comunicación.

Otros miembros del grupo de trabajo realizarán la inoculación de suelo con los consorcios definidos y estudiarán los cambios en la estructura y función de la comunidad microbiana de un suelo contaminado por efecto de la inoculación y los relacionarán con la efectividad del proceso de degradación.

Los avances en bioinformática han mejorado el análisis de los datos de secuenciación que caracterizan a las comunidades microbianas (Raes y Bork, 2011). Sin embargo, esta descripción sigue siendo insuficiente para describir los comportamientos funcionales de los ecosistemas microbianos si no se consideran otros conocimientos complementarios. En estudios futuros se combinarán los recursos disponibles (filogenéticos, ambientales, ómicos, etc.) dentro de un marco de modelado para superar esta debilidad. Estos modelos podrían usarse para predecir el comportamiento de un ecosistema, como estabilidad, resistencia y funcionalidad.

## CAPÍTULO VII

### *Bibliografía*

## VII. Bibliografía

- Adams, M. A., Singh, V. K., Keller, B. O. & Jia, Z., 2006. Structural and biochemical characterization of gentisate 1,2-dioxygenase from *Escherichia coli* O157 : H7. *Mol Microbiol* 61, 1469–1484.
- Ahlf, W., Förstner, U., 2001. Managing contaminated sediments. *J. Soils Sediments* 1, 30–36.
- Alegbeleye, O. O., Opeolu, B. O., and Jackson, V., 2017. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) compounds:(acenaphthene and fluorene) in water using indigenous bacterial species isolated from the Diep and Plankenburg rivers, Western Cape, South Africa. *Braz. J. Microbiol.* 48, 314–325.
- Amézcua-Allieri MA, Lead JR, Meléndez-Estrada J, Rodríguez-Vázquez R., 2003. Phenanthrene removal in selected mexican soils by the fungus *Penicillium frequentans*: Role of C:N ratio and water content. *Soil Sediment Contam* 12:387-399.
- Andreolli, M., Lampis, S., Zenaro, E., Salkinoja-Salonen, M., Vallini, G., 2011. *Burkholderia fungorum* DBT1: A promising bacterial strain for bioremediation of PAHs-contaminated soils. *FEMS Microbiol. Lett.* 319, 11–18.
- Andreoni, V., Gianfreda, L., 2007. Bioremediation and monitoring of aromatic-polluted habitats. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76, 287–308.
- Arfmann, H.A., Timmis, K.N., Wittich, R.M., 1997. Mineralization of 4-chlorodibenzofuran by a consortium consisting of *Sphingomonas* sp. strain RW1 and *Burkholderia* sp. strain JWS. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3458–3462.
- Aziz, R.K., Bartels, D., Best, A.A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R.A., Formsma, K., Gerdes, S., Glass, E.M., Kubal, M., 2008. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics* 9, 75.
- Bai, Y., Müller, D.B., Srinivas, G., Garrido-Oter, R., Potthoff, E., Rott, M., Dombrowski, N., Münch, P.C., Spaepen, S., Remus-Emsermann, M., Hüttel, B., McHardy, A.C., Vorholt, J.A., Schulze-Lefert, P., 2015. Functional overlap of the *Arabidopsis* leaf and root microbiota. *Nature* 528, 364–369.
- Balashova, N. V., Stolz, A., Knackmuss, H.J., Kosheleva, I.A., Naumov, A. V., Boronin, A.M., 2001. Purification and characterization of a salicylate hydroxylase involved in 1-hydroxy-2-naphthoic acid hydroxylation from the naphthalene and phenanthrene-degrading bacterial strain *Pseudomonas putida* BS202-P1. *Biodegradation* 12, 179–188.

- Balashova, N. V., Kosheleva, I. a., Golovchenko, N.P., Boronin, A.M., 1999. Phenanthrene metabolism by Pseudomonas and Burkholderia strains. *Process Biochem.* 35, 291–296.
- Ban, Y.H., Ahn, J.Y., Sekhon, S.S., Cho, S.J., Kim, Y.H., Kim, Y.C., 2016. Identification of inducible proteins in the phenanthrene degrader *Sphingobium chungbukense* DJ77 by 2-dimentional electrophoresis and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Genes and Genomics* 38, 397–405.
- Barberán, A., Bates, S.T., Casamayor, E.O., Fierer, N., 2012. Using network analysis to explore co-occurrence patterns in soil microbial communities. *ISME J.* 6, 343–351.
- Bargiela, R., Ferrer, M., 2017. Metagenomics 1539, 145–157. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6691-2>
- Barreiros, L., Nogales, B., Manaia, C.M., Silva Ferreira, A.C., Pieper, D.H., Reis, M.A., Nunes, O.C., 2003. A novel pathway for mineralization of the thiocarbamate herbicide molinate by a defined bacterial mixed culture. *Environ. Microbiol.* 5, 944–953.
- Basta, T., Buerger, S., Stolz, A., 2005. Structural and replicative diversity of large plasmids from sphingomonads that degrade polycyclic aromatic compounds and xenobiotics. *Microbiology* 151, 2025–2037.
- Basta, T., Keck, A., Klein, J., Stolz, A., 2004. Detection and characterization of conjugative degradative plasmids in xenobiotic-degrading *Sphingomonas* strains. *J. Bacteriol.* 186, 3862–3872.
- Bastida, F., Hernández, T., García, C., 2014. Metaproteomics of soils from semiarid environment: Functional and phylogenetic information obtained with different protein extraction methods. *J. Proteomics* 101, 31–42.
- Bateman, A., Finn, R.D., Clements, J., Coggill, P., Eberhardt, R.Y., Eddy, S.R., Heger, A., Hetherington, K., Holm, L., Mistry, J., Sonhammer, E.L.L., Tate, J., Punta, M., 2014. Pfam: The protein families database. *Nucleic Acids Res.* 42, 138–141.
- Batie, C.J., Ballou, D.P., & Correll, C.C., 1992. Phthalate dioxygenase reductase and related flavin-iron-sulfur containing electron transferases. In F. Müller (Ed.), *Chemistry and biochemistry of flavoenzymes* (pp. 543–556). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Bezza, F.A., Nkhalambayausi Chirwa, E.M., 2016. Biosurfactant-enhanced bioremediation of aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in creosote contaminated soil. *Chemosphere* 144, 635–644.

- Bodenhausen, N., Bortfeld-Miller, M., Ackermann, M., Vorholt, J.A., 2014. A Synthetic Community Approach Reveals Plant Genotypes Affecting the Phyllosphere Microbiota. *PLoS Genet.* 10.
- Bohorquez, L.C., Delgado-Serrano, L., López, G., Osorio-Forero, C., Klepac-Ceraj, V., Kolter, R., Junca, H., Baena, S., Zambrano, M.M., 2012. In-depth Characterization via Complementing Culture-Independent Approaches of the Microbial Community in an Acidic Hot Spring of the Colombian Andes. *Microb. Ecol.* 63, 103–115.
- Boon, N., Goris, J., Vos, P. De, Verstraete, W., Top, E.M., 2000. Bioaugmentation of Activated Sludge by an Indigenous 3-Chloroaniline-Degrading Bioaugmentation of Activated Sludge by an Indigenous 3-Chloroaniline-Degrading Comamonas testosteroni Strain , I2 gfp. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2906–13.
- Bouchez M, Blanchet D, Bardin V, Haeseler F, Vandecasteele P., 1999. Efficiency of defined strains and of soil consortia in the biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) mixtures. *Biodegradation*; 10: 429–435.
- Bouchez, M.; Blanchet, D.; Vandecasteele, J., 1995. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by pure strains and by defined strain associations: inhibition phenomena and cometabolism. *Appl Microbiol Biotechnol* . 45: 156–164.
- Brenner, K., You, L., Arnold, F.H., 2008. Engineering microbial consortia: a new frontier in synthetic biology. *Trends Biotechnol.* 26, 483–489.
- Brennerova, M. V., Josefiova, J., Brenner, V., Pieper, D.H., Junca, H., 2009. Metagenomics reveals diversity and abundance of meta-cleavage pathways in microbial communities from soil highly contaminated with jet fuel under air-sparging bioremediation. *Environ. Microbiol.* 11, 2216–2227.
- Briones, A., Raskin, L., 2003. Diversity and dynamics of microbial communities in engineered environments and their implications for process stability. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14, 270–276.
- Buermans, H. P., and den Dunnen, J. T., 2014. Next generation sequencing technology: advances and applications. *Biochim. Biophys. Acta* 1842, 1932– 1941.
- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., Madden, T.L., 2009. BLAST+: Architecture and applications. *BMC Bioinformatics* 10, 1–9.
- Carbon, S., Ireland, A., Mungall, C.J., Shu, S., Marshall, B., Lewis, S., Lomax, J., Mungall, C., Hitz, B., Balakrishnan, R., Dolan, M., Wood, V., Hong, E., Gaudet, P., 2009. AmiGO: Online access to ontology and annotation data. *Bioinformatics* 25, 288–289.

- Carney, M.W., Erwin, K., Hardman, R., Yuen, B., Volz, D.C., Hinton, D.E., Kullman, S.W., 2008. Differential developmental toxicity of naphthoic acid isomers in medaka (*Oryzias latipes*) embryos. Mar. Pollut. Bull. 57, 255–266.
- Carvalho, M. F., C. C. T. Alves, M. I. M. Ferreira, P. De Marco, and P. M. L. Castro., 2002. Isolation and initial characterization of a bacterial consortium able to mineralize fluorobenzene. Appl. Environ. Microbiol. 68:102–105
- Case, R.J., Labbate, M., Kjelleberg, S., 2008. AHL-driven quorum-sensing circuits: Their frequency and function among the Proteobacteria. ISME J. 2, 345–349.
- Casellas M, Grifoll M, Sebata J, Solanas AM., 1998. Isolation and characterization of a fluorenone-degrading bacterial strain and its role in synergistic degradation of fluorene by a consortium. Can J Microbiol 44:734–742
- Cases, I., de Lorenzo, V., 1998. Expression systems and physiological control of promoter activity in bacteria. Curr. Opin. Microbiol. 1, 303–310.
- Caspi, R., Billington, R., Ferrer, L., Foerster, H., Fulcher, C.A., Keseler, I.M., Kothari, A., Krummenacker, M., Latendresse, M., Mueller, L.A., Ong, Q., Paley, S., Subhraveti, P., Weaver, D.S., Karp, P.D., 2013. The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of pathway/genome databases. Nucleic Acids Res. 44, D471–D480.
- Cébron, A., Norini, M.P., Beguiristain, T., Leyval, C., 2008. Real-Time PCR quantification of PAH-ring hydroxylating dioxygenase (PAH-RHDA) genes from Gram positive and Gram negative bacteria in soil and sediment samples. J. Microbiol. Methods 73, 148–159.
- Cerniglia C, Yang S., 1984 Stereoselective metabolism of anthracene and phenanthrene by the fungus Cunninghamella elegans Applied and environmental microbiology 47:119-124
- Chakraborty, J., Ghosal, D., Dutta, A., Dutta, T.K., 2012. An insight into the origin and functional evolution of bacterial aromatic ring-hydroxylating oxygenases. J. Biomol. Struct. Dyn. 30, 419–436.
- Chakraborty, J., Jana, T., Saha, S., Dutta, T.K., 2014. Ring-Hydroxylating oxygenase database: A database of bacterial aromatic ring-hydroxylating oxygenases in the management of bioremediation and biocatalysis of aromatic compounds. Environ. Microbiol. Rep. 6, 519–523.
- Chao, A., 2004. Species Estimation and Applications, in: Encyclopedia of Statistical Sciences. pp. 7907–7916.

- Chaudhry GR, C.S., 1991. Biodegradation of halogenated organic compounds. *Japan J. water Pollut. Res.* 55, 59–79.
- Chiu, C.H., Chao, A., 2014. Distance-based functional diversity measures and their decomposition: A framework based on hill numbers. *PLoS One* 9.
- Cho, O., Choi, K.Y., Zylstra, G.J., Kim, Y.S., Kim, S.K., Lee, J.H., Sohn, H.Y., Kwon, G.S., Kim, Y.M., Kim, E., 2005. Catabolic role of a three-component salicylate oxygenase from *Sphingomonas yanoikuyae* B1 in polycyclic aromatic hydrocarbon degradation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 327, 656–662.
- Chubiz, L. M., & Rao, C. V., 2010. Aromatic acid metabolites of *Escherichia coli* K-12 can induce the marRAB operon. *Journal of bacteriology*, 192(18), 4786-4789.
- Chung, W.K., King, G.M., 2001. Isolation, Characterization, and Polyaromatic Hydrocarbon Degradation Potential of Aerobic Bacteria from Marine Macrofaunal Burrow Sediments and Description of *Lutibacterium anuloederans* gen. nov., sp. nov., and *Cycloclasticus spirillensus* sp. nov. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5585–5592.
- Clements, W.H., Otis, J.T., Wissing, T.E., 1994. Environmental Contamination and Toxicology Accumulation and Food Chain Transfer of Fluoranthene and Benzo[a]pyrene in *Chironomus riparius* and *Lepomis macrochirus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol* 26, 261–266.
- Cole, J.R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R.J., Kulam-Syed-Mohideen, A.S., McGarrell, D.M., Marsh, T., Garrity, G.M., Tiedje, J.M., 2009. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* 37, D141–5.
- Colwell, R.K., 2013. EstimateS: Statistical estimation of species richness and shared species from 629 samples. User's Guide and application published at: <http://purl.oclc.org/estimates> Version 9.
- Coppotelli, B.M., Ibarrolaza, A., Dias, R.L., Del Panno, M.T., Berthe-Corti, L., Morelli, I.S., 2010. Study of the degradation activity and the strategies to promote the bioavailability of phenanthrene by *Sphingomonas paucimobilis* Strain 20006FA. *Microb. Ecol.* 59, 266–276.
- Coppotelli, B.M., Ibarrolaza, A., Del Panno, M.T., Morelli, I.S., 2008. Effects of the inoculant strain *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA on soil bacterial community and biodegradation in phenanthrene-contaminated soil. *Microb. Ecol.* 55, 173–183.
- Correia, A.D., Gonçalves, R., Scholze, M., Ferreira, M., Henriques, M.A.R., 2007. Biochemical and behavioral responses in gilthead seabream (*Sparus aurata*) to phenanthrene. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 347, 109–122.

- Cravo-Laureau, C., Cagnon, C., Lauga, B., Duran, R., 2017. Microbial ecotoxicology, Microbial Ecotoxicology.
- Das, N. and Chandran, P. 2011. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: An overview. *Biotechnol. Res. Int.*, Volume 2011(Article ID 941810).
- de-Bashan, L. E., Schmid,M., Rothballer,M.,Hartmann,A., and Bashan, Y. 2011. Cell-cell interaction in the eukaryote-prokaryote model of the microalgae *Chlorella vulgaris* and the bacterium *Azospirillum brasiliense* immobilized in polymer beads. *J. Phycol.* 47, 1350–1359.
- de Lorenzo, V., Pieper, D., Ramos, J.L., 2013. From the test tube to the environment-and back. *Environ. Microbiol.* 15, 6–11.
- de Menezes, A., Clipson, N., and Doyle, E. 2012. Comparative metatranscriptomics reveals widespread community responses during phenanthrene degradation in soil. *Environ. Microbiol.* 14, 2577–2588.
- De Roy, K., Marzorati, M., Van den Abbeele, P., Van de Wiele, T., Boon, N., 2014. Synthetic microbial ecosystems: an exciting tool to understand and apply microbial communities. *Environ. Microbiol.* 16, 1472–1481.
- De Souza, M., Newcombe, D., Alvey, S., Crowley, D.E., Hay, A., Sadowsky, M.J., Wackett, L.P., 1998. Molecular Basis of a Bacterial Consortium : Interspecies Catabolism of Atrazine Molecular Basis of a Bacterial Consortium : Interspecies Catabolism of Atrazine. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 178–184.
- Dejonghe,W., Berteloot, E., Goris, J., y col., 2003. Synergistic degradation of linuron by a bacterial consortium and isolation of a single linuron-degrading *Variovorax* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1532e1541.
- Dejonghe, W., Boon, N., Seghers, D., Top, E.M., Verstraete, W., 2001. Bioaugmentation of soils by increasing microbial richness: Missing links. *Environ. Microbiol.* 3, 649–657.
- Demanèche, S., Meyer, C., Micoud, J., Louwagie, M., Willison, J.C., Jouanneau, Y., 2004. Identification and functional analysis of two aromatic-ring-hydroxylating dioxygenases from a *Sphingomonas* strain that degrades various polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 6714–6725.
- Demeter, M.A., Lemire, J.A., Mercer, S.M., Turner, R.J., 2017. Screening selectively harnessed environmental microbial communities for biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in moving bed biofilm reactors. *Bioresour. Technol.* 228, 116–124.

- Denef, V. J., Mueller, R. S., and Ban- field, J. F., 2010. AMD biofilms: using model communities to study microbial evolution and ecological complexity in nature. *ISME J.* 4, 599–610
- Desai, C., Pathak, H., Madamwar, D., 2010. Advances in molecular and “-omics” technologies to gauge microbial communities and bioremediation at xenobiotic/anthropogen contaminated sites. *Bioresour. Technol.* 101, 1558–69.
- Diaz, E. and MA Prieto., 2000. Bacterial promoters triggering biodegradation of aromatic pollutants. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 11, 467-475.
- Dolinšek, J., Goldschmidt, F., Johnson, D.R., 2016. Synthetic microbial ecology and the dynamic interplay between microbial genotypes. *FEMS Microbiol. Rev.* 40, 961–979.
- Dong C, Bai X, Lai Q, Xie Y, Chen X, Shao Z., 2014 Draft Genome sequence of *Sphingobium* sp. strain C100, a polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium from the deep-sea sediment of the Arctic Ocean. *Genome Announc* 2(1):e01210–e01213
- Dowd, S.E., Callaway, T.R., Wolcott, R.D., Sun, Y., McKeehan, T., Hagevoort, R.G., Edrington, T.S., 2008a. Evaluation of the bacterial diversity in the feces of cattle using 16S rDNA bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP). *BMC Microbiol.* 8, 125.
- Dowd, S.E., Sun, Y., Secor, P.R., Rhoads, D.D., Wolcott, B.M., James, G.A., Wolcott, R.D., 2008b. Survey of bacterial diversity in chronic wounds using pyrosequencing, DGGE, and full ribosome shotgun sequencing. *BMC Microbiol.* 8, 43.
- Dowd, S.E., Sun, Y., Wolcott, R.D., Domingo, A., Carroll, J. a, 2008c. Bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP) for microbiome studies: bacterial diversity in the ileum of newly weaned *Salmonella*-infected pigs. *Foodborne Pathog. Dis.* 5, 459–472.
- Duarte, M., Jauregui, R., Vilchez-Vargas, R., Junca, H., Pieper, D.H., 2014. AromaDeg, a novel database for phylogenomics of aerobic bacterial degradation of aromatics. *Database* 2014, 1–12.
- Duarte, M., Nielsen, A., Camarinha-Silva, A., Vilchez-Vargas, R., Bruls, T., Wos-Oxley, M.L., Jauregui, R., Pieper, D.H., 2017. Functional soil metagenomics: elucidation of polycyclic aromatic hydrocarbon degradation potential following 12 years of in situ bioremediation. *Environ. Microbiol.* 19, 2992–3011.
- Dunwell, J. M., Purvis, A., y Khuri, S., 2004. Cupins: the most functionally diverse protein superfamily? *Phytochemistry*, 65(1):7-17.
- Durante-Rodríguez G., Gómez-Álvarez H., Nogales J., Carmona M., Díaz E., 2016. One-Component Systems that Regulate the Expression of Degradation Pathways for Aromatic Compounds. In:

- Krell T. (eds) Cellular Ecophysiology of Microbe. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. Springer, International Publishing
- Edgar, R.C., 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26, 2460–1.
- Edwards, S.J., Kjellerup, B. V., 2013. Applications of biofilms in bioremediation and biotransformation of persistent organic pollutants, pharmaceuticals/personal care products, and heavy metals. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 9909–9921.
- Edwards, U., Rogall, T., Blöcker, H., Emde, M., Böttger, E.C., 1989. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res.* 17, 7843–53.
- El Amrani, A., Dumas, A.S., Wick, L.Y., Yergeau, E., Berthomé, R., 2015. “Omics” Insights into PAH Degradation toward Improved Green Remediation Biotechnologies. *Environ. Sci. Technol.* 49, 11281–11291.
- Entcheva, P., Liebl, W., Johann, a., Hartsch, T., Streit, W.R., 2001. Direct cloning from enrichment cultures, a reliable strategy for isolation of complete operons and genes from microbial consortia. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 89–99.
- Estrada-De Los Santos, P., Bustillos-Cristales, R., Caballero-Mellado, J., 2001. Burkholderia, a Genus Rich in Plant-Associated Nitrogen Fixers with Wide Environmental and Geographic Distribution. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2790–2798.
- Estrela, S., Whiteley, M., Brown, S.P., 2015. The demographic determinants of human microbiome health. *Trends Microbiol.* 23, 134–141.
- Evans, W.C., Fernly, H.N., Griffiths, E., 1965. Oxidative Metabolism of Phenanthrene and Anthracene By Soil Pseudomonads. the Ring-Fission Mechanism. *Biochem. J.* 95, 819–31.
- Faust JJ, Ahern PP, Ridaura VK, Cheng J, Gordon JI., 2014. Identifying gut microbe-host phenotype relationships using combinatorial communities in gnotobiotic mice. *Sci Transl Med*; 6:20ra11; PMID:24452263; <http://dx.doi.org/10.1126>
- Faust, K., Raes, J., 2012. Microbial interactions: From networks to models. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 538–550.
- Ferguson K., K., McElrath, T.F., Pace, G.G., Weller, D., Zeng, L., Pennathur, S., Cantonwine, D.E., Meeker, J.D., 2017. Urinary Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Metabolite Associations with

- Biomarkers of Inflammation, Angiogenesis, and Oxidative Stress in Pregnant Women. *Environ. Sci. Technol.* 51, 4652–4660.
- Fernandez S, Shingler V, De Lorenzo V., 1994. Cross-regulation by XylR and DmpR activators of *Pseudomonas putida* suggests that transcriptional control of biodegradative operons evolves independently of catabolic genes. *J Bacteriol* 176(16):5052–5058
- Ferraro, D.J., Gakhar, L., Ramaswamy, S., 2005. Rieske business: Structure-function of Rieske non-heme oxygenases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338, 175–190.
- Festa, S., Coppotelli, B.M., Madueño, L., Loviso, C.L., Macchi, M., Neme Tauil, R.M., Valacco, M.P., Morelli, I.S., 2017. Assigning ecological roles to the populations belonging to a phenanthrene-degrading bacterial consortium using omic approaches. *PLoS One* 12.
- Festa, S., Coppotelli, B.M., Morelli, I.S., 2016a. Comparative bioaugmentation with a consortium and a single strain in a phenanthrene-contaminated soil: Impact on the bacterial community and biodegradation. *Appl. Soil Ecol.* 98, 8–19.
- Festa, S., Macchi, M., Cortés, F., Morelli, I.S., Coppotelli, B.M., 2016b. Monitoring the impact of bioaugmentation with a PAH-degrading strain on different soil microbiomes using pyrosequencing. *FEMS Microbiol. Ecol.* 92.
- Festa, S., Coppotelli, B.M., Morelli, I.S., 2013. Bacterial diversity and functional interactions between bacterial strains from a phenanthrene-degrading consortium obtained from a chronically contaminated-soil. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 85, 42–51.
- Finn, R.D., Attwood, T.K., Babbitt, P.C., Bateman, A., Bork, P., Bridge, A.J., Chang, H.Y., Dosztanyi, Z., El-Gebali, S., Fraser, M., Gough, J., Haft, D., Holliday, G.L., Huang, H., Huang, X., Letunic, I., Lopez, R., Lu, S., Marchler-Bauer, A., Mi, H., Mistry, J., Natale, D.A., Necci, M., Nuka, G., Orengo, C.A., Park, Y., Pesceat, S., Piovesan, D., Potter, S.C., Rawlings, N.D., Redaschi, N., Richardson, L., Rivoire, C., Sangrador-Vegas, A., Sigrist, C., Sillitoe, I., Smithers, B., Squizzato, S., Sutton, G., Thanki, N., Thomas, P.D., Tosatto, S.C.E., Wu, C.H., Xenarios, I., Yeh, L.S., Young, S.Y., Mitchell, A.L., 2017. InterPro in 2017—beyond protein family and domain annotations. *Nucleic Acids Res.* 45, D190–D199.
- Fuentes, M.S., Briceño, G.E., Saez, J.M., Benimeli, C.S., Diez, M.C., Amoroso, M.J., 2013. Enhanced removal of a pesticides mixture by single cultures and consortia of free and immobilized streptomyces strains. *Biomed Res. Int.* 2013.
- Gerischer, U., 2002. Specific and global regulation of genes associated with the degradation of aromatic compounds in bacteria. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 4, 111–121.

- Gerlt, J. A. y Babbitt, P. C., 2001. Divergent evolution of enzymatic function: mechanistically diverse superfamilies and functionally distinct superfamilies. *Annual Review of Biochemistry*, 70(1):209-246.
- Ghazali, F.M., Rahman, R.N.Z.A., Salleh, A.B., Basri, M., 2004. Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 54, 61–67.
- Ghevariya CM, Bhatt JK, Dave BP., 2011. Enhanced chrysene degradation by halotolerant *Achromobacter xylosoxidans* using Response Surface Methodology. *Bioresour Technol.* Elsevier Ltd; 102(20): 9668–74.
- Ghosal, D., Ghosh, S., Dutta, T.K., Ahn, Y., 2016. Current state of knowledge in microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): A review. *Front. Microbiol.* 7.
- Ghosal, D., Chakraborty, J., Khara, P., Dutta, T.K., 2010. Degradation of phenanthrene via meta-cleavage of 2-hydroxy-1-naphthoic acid by *Ochrobactrum* sp. strain PWTJD. *FEMS Microbiol. Lett.* 313, 103–110.
- Gibson, D.T., Parales, R.E., 2000. Aromatic hydrocarbon dioxygenases in environmental biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11, 236–243.
- Gibson, D., 1984. *Microbial degradation of organic compounds*. Marcel Dekker, New York.
- Gotelli, N.J., Chao, A., 2013. Measuring and Estimating Species Richness, Species Diversity, and Biotic Similarity from Sampling Data, *Encyclopedia of Biodiversity*. Elsevier Ltd.
- Großkopf, T., Soyer, O.S., 2014. Synthetic microbial communities. *Curr. Opin. Microbiol.* 18, 72–77.
- Guo, C.L., Zhou, H.W., Wong, Y.S., Tam, N.F.Y., 2005. Isolation of PAH-degrading bacteria from mangrove sediments and their biodegradation potential. *Mar. Pollut. Bull.* 51, 1054–1061.
- Gupta, G., Kumar, V., Pal, A.K., 2017. Microbial Degradation of High Molecular Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons with Emphasis on Pyrene. *Polycycl. Aromat. Compd.* 0, 1–13.
- Habe, H., Omori, T., 2003. Genetics of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Metabolism in Diverse Aerobic Bacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67, 225–243.
- Haddock, J., 2010. Aerobic degradation of aromatic hydrocarbons: enzyme structures and catalytic mechanisms. In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, pages 1057-1069. Springer
- Haritash, A.K., Kaushik, C.P., 2009. Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *J. Hazard. Mater.* 169, 1–15.

- Harper, J.L., Clatworthy, J.N., Mcnaughton, I.H., Sagar, G.R., 1961. The Evolution and Ecology of Closely Related Species Living in the Same Area. *Source Evol.* 15, 209–227.
- Haruta, S., Kato, S., Yamamoto, K., Igarashi, Y., 2009. Intertwined interspecies relationships: Approaches to untangle the microbial network. *Environ. Microbiol.* 11, 2963–2969.
- Hassan, S., Desouky, S., Fouda, A., El-Gamal, M., Alemam, A., 2015. Biodegradation of Phenanthrene by *Klebsiella* sp Isolated from Organic Contaminated Sediment. *J. Adv. Biol. Biotechnol.* 4, 1–12.
- Helbling, D.E., Ackermann, M., Fenner, K., Kohler, H.P.E., Johnson, D.R., 2012. The activity level of a microbial community function can be predicted from its metatranscriptome. *ISME J.* 6, 902–904.
- Hemmerich, C., Hughes, A., Ruan, Y., Buechlein, A., Qiu, J., Fox, G., 2010. Map-reduce expansion of the ISGA genomic analysis web server. *IEEE CloudCom*.
- Henry, D. a, Campbell, M.E., LiPuma, J.J., Speert, D.P., 1997. Identification of *Burkholderia cepacia* isolates from patients with cystic fibrosis and use of a simple new selective medium. *J Clin Microbiol* 35, 614–619.
- Henson, M.A., Hanly, T.J., 2014. Dynamic flux balance analysis for synthetic microbial communities. *IET Syst. Biol.* 8, 214–229.
- Hill, M., 1973. Diversity and evenness: a unifying notation and its consequences. *Ecology* 54, 427–432. doi:10.2307/1934352 Hill, M., 1973. Diversity and evenness: a unifying notation and its consequences. *Ecology* 54, 427–432.
- Hirose, J., Suyama, A., Hayashida, S., & Furukawa, K., 1994. Construction of hybrid biphenyl (bph) and toluene (tod) genes for functional analysis of aromatic ring dioxygenases. *Gene*, 138, 27–33.
- Hong HD, Patel DR, Tamm LK, van den Berg B., 2006. The outer membrane protein OmpW forms an eight-stranded beta-barrel with a hydrophobic channel. *J Biol Chem* 281(11): 7568–7577
- Hu, B., Du, J., Zou, R., Yuan, Y., 2010. An Environment-Sensitive Synthetic Microbial Ecosystem 5, 1–9.
- Hua, F., Wang, H.Q., 2014. Uptake and trans-membrane transport of petroleum hydrocarbons by microorganisms. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 28, 165–175.
- Hua, X., Wu, Z., Zhang, H., Lu, D., Wang, M., Liu, Y., Liu, Z., 2010. Degradation of hexadecane by *Enterobacter cloacae* strain TU that secretes an exopolysaccharide as a bioemulsifier. *Chemosphere* 80, 951–6.

- Huang, X., Tian, Y., Luo, Y.R., Liu, H.J., Zheng, W., Zheng, T.L., 2008. Modified sublimation to isolate phenanthrene-degrading bacteria of the genera *Sphingomonas* and *Burkholderia* from Xiamen oil port. *Mar. Pollut. Bull.* 57, 538–543.
- Iwabuchi, T., Harayama, S., 1997. Biochemical and genetic characterization of 2-carboxybenzaldehyde dehydrogenase, an enzyme involved in phenanthrene degradation by *Nocardoides* sp. strain KP7. *J. Bacteriol.* 179, 6488–6494.
- Iwai, S., Johnson, T. a., Chai, B., Hashsham, S. a., y Tiedje, J. M. 2011. Comparison of the specificities and efficacies of primers for aromatic dioxygenase gene analysis of environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(11):3551-7.
- Janbandhu, A.I., Fulekar, M.H., 2011. Biodegradation of phenanthrene using adapted microbial consortium isolated from petrochemical contaminated environment. *Journal of Hazardous Materials* 187, 333e340.
- Jarosz, D.F., Brown, J.C.S., Walker, G.A., Datta, M.S., Ung, W.L., Lancaster, A.K., Rotem, A., Chang, A., Newby, G.A., Weitz, D.A., Bisson, L.F., Lindquist, S., 2014. Cross-kingdom chemical communication drives a heritable, mutually beneficial prion-based transformation of metabolism. *Cell* 158, 1083–1093.
- Jeon, C.O., Madsen, E.L., 2013. In situ microbial metabolism of aromatic-hydrocarbon environmental pollutants. *Curr. Opin. Biotechnol.* 24, 474–481. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2012.09.001>
- Jia, X., Liu, C., Song, H., Ding, M., Du, J., Ma, Q., Yuan, Y., 2016. Design , analysis and application of synthetic microbial consortia. *Synth. Syst. Biotechnol.* 1, 109–117.
- Jiménez, D.J., Dini-Andreote, F., DeAngelis, K.M., Singer, S.W., Salles, J.F., van Elsas, J.D., 2017. Ecological Insights into the Dynamics of Plant Biomass-Degrading Microbial Consortia. *Trends Microbiol.* 25, 788–796.
- Joshi, V. V., Prewitt, M.L., Ma, D.-P., Borazjani, H., 2015. Enhanced Remediation of Pentachlorophenol (PCP)-Contaminated Groundwater by Bioaugmentation with Known PCP-Degrading Bacteria. *Bioremediat. J.* 19, 160–170.
- Jouanneau, Y., Micoud, J., Meyer, C., 2007. Purification and characterization of a three-component salicylate 1-hydroxylase from *Sphingomonas* sp. strain CHY-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 7515–7521.
- Kanaly, R. a, Harayama, S., 2000. Biodegradation of High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Bacteria MINIREVIEW Biodegradation of High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Bacteria. *J. Bacteriol.* 182, 2059–2067.

- Kanehisa, M., Goto, S., Sato, Y., Kawashima, M., Furumichi, M., Tanabe, M., 2014. Data, information, knowledge and principle: Back to metabolism in KEGG. *Nucleic Acids Res.* 42, 199–205.
- Karlsson, A., Parales, J. V., Parales, R. E., Gibson, D. T., Eklund, H., and Ramaswamy, S., 2003. Crystal structure of naphthalene dioxygenase: side-on binding of dioxygen to iron. *Science.* 299:1039-1042.
- Kastner, M., 2000. "Degradation of aromatic and polyaromatic compounds," in *Biotechnology*, 2nd Edn. Environmental Processes, Vol. 11(b), eds H.-J. Rehm, G. Reed, A. Pühler, and P. Stadler (Weinheim:Wiley-VCH), 211–239.
- Kasuga, I., Nakajima, F., Furumai, H., 2007. Diversity of catechol 2,3-dioxygenase genes of bacteria responding to dissolved organic matter derived from different sources in a eutrophic lake. *FEMS Microbiol. Ecol.* 61, 449–458.
- Kazunga, C., Aitken, M.D., 2000. Products from the incomplete metabolism of pyrene by polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1917–1922.
- Keith, L.H., 2015. The Source of U.S. EPA's Sixteen PAH Priority Pollutants. *Polycycl. Aromat. Compd.* 35, 147–160.
- Keller, L., Surette, M.G., 2006. Communication in bacteria: An ecological and evolutionary perspective. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 249–258.
- Keum, Y.S., Seo, J.S., Hu, Y., Li, Q.X., 2006. Degradation pathways of phenanthrene by *Sinorhizobium* sp. C4. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71, 935–941.
- Khara, P., Roy, M., Chakraborty, J., Ghosal, D., Dutta, T.K., 2014. Functional characterization of diverse ring-hydroxylating oxygenases and induction of complex aromatic catabolic gene clusters in *Sphingobium* sp. PNB. *FEBS Open Bio* 4, 290–300.
- Kim, E.J., Oh, J.E., Chang, Y.S., 2003. Effects of forest fire on the level and distribution of PCDD/Fs and PAHs in soil. *Sci. Total Environ.* 311, 177–189.
- Kim, Y.H., Moody, J.D., Freeman, J.P., Brezna, B., Engesser, K.H., Cerniglia, C.E., 2004. Evidence for the existence of PAH-quinone reductase and catechol-O-methyltransferase in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 31, 507–516.
- Kim, Y.M., Ahn, C.K., Woo, S.H., Jung, G.Y., Park, J.M., 2009. Synergic degradation of phenanthrene by consortia of newly isolated bacterial strains. *J. Biotechnol.* 144, 293–298.
- Kiyohara, H., Torigoe, S., Kaida, N., Asaki, T., Iida, T., Hayashi, H., Takizawa, N., 1994. Cloning and characterization of a chromosomal gene cluster, pah, that encodes the upper pathway for

- phenanthrene and naphthalene utilization by *Pseudomonas putida* OUS82. *J. Bacteriol.* 176, 2439–2443.
- Kleerebezem, R., and van Loosdrecht, M. C., 2007. Mixed culture biotechnology for bioenergy production. *Curr. Opin. Biotechnol.* 18, 207–212.
- Kohler, H.P.E., 1999. *Sphingomonas herbicidovorans* MH: a versatile phenoxyalkanoic acid herbicide degrader. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 23, 336–340.
- Kuppusamy, S., Thavamani, P., Venkateswarlu, K., Lee, Y.B., Naidu, R., Megharaj, M., 2017. Remediation approaches for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contaminated soils: Technological constraints, emerging trends and future directions. *Chemosphere* 168, 944–968.
- Kuppusamy, S., Thavamani, P., Megharaj, M., Lee, Y.B., Naidu, R., 2016a. Polyaromatic hydrocarbon (PAH) degradation potential of a new acid tolerant, diazotrophic P-solubilizing and heavy metal resistant bacterium *Cupriavidus* sp. MTS-7 isolated from long-term mixed contaminated soil. *Chemosphere* 162, 31–39.
- Kuppusamy, S., Palanisami, T., Megharaj, M., Venkateswarlu, K., Naidu, R., 2016d. In situ remediation approaches for the management of contaminated sites: a comprehensive overview. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 236, 1e115.
- Kweon, O., Kim, S. J., Freeman, J. P., Song, J., Baek, S., and Cerniglia, C. E., 2010. Substrate specificity and structural characteristics of the novel Rieske nonheme iron aromatic ring-hydroxylating oxygenases NidAB and NidA3B3 from *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *MBio* 1:e00135-10.
- Kweon, O., Kim, S.-J., Baek, S., Chae, J.-C., Adjei, M. D., Baek, D.-H., Kim, Y.-C., y Cerniglia, C. E., 2008. A new classification system for bacterial rieske non-heme iron aromatic ring-hydroxylating oxygenases. *BMC Biochemistry*, 9(1):11.
- Lafortune, I., Juteau, P., Déziel, E., Lépine, F., Beaudet, R., Villemur, R., 2009. Bacterial diversity of a consortium degrading high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons in a two-liquid phase biosystem. *Microb. Ecol.* 57, 455–68.
- Laskowski, R.A., Hutchinson, E.G., Michie, A.D., Wallace, A.C., Jones, M.L., Thornton, J.M., 1997. PDBsum: A Web-based database of summaries and analyses of all PDB structures. *Trends Biochem. Sci.* 22, 488–490.
- Laurie, A.D., Lloyd-Jones, G., 1999. The phn Genes of *Burkholderia* sp. Strain RP007 Constitute a Divergent Gene Cluster for Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Catabolism The phn Genes of

- Burkholderia sp. Strain RP007 Constitute a Divergent Gene Cluster for Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Cata 181, 531–540.
- Lawton, J. H. and Brown, V. K., 1993. Redundancy in ecosystems. – In: Schulze, E.-D. and Mooney, H. A. (eds), Biodiversity and ecosystem function. Springer, pp. 255– 270.
- Lee, L.S., Rao, P.S.C., Okuda, I., 1992. Equilibrium partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons form coal tar into water - f\_es00035a006-Lee Article.pdf 26.
- Li, C.H., Ye, C., Hou, X.P., Chen, M.H., Zheng, X.Y., Cai, X.Y., 2017. Isolation and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria with tolerance to hypoxic environments. J. Environ. Sci. Heal. - Part A Toxic/Hazardous Subst. Environ. Eng. 52, 581–589.
- Lin, M., Hu, X., Chen, W., Wang, H., Wang, C., 2014. Biodegradation of phenanthrene by Pseudomonas sp: BZ-3, isolated from crude oil contaminated soil. Int. Biodeterior. Biodegrad. 94, 176–181.
- Lindemann, S.R., Bernstein, H.C., Song, H.-S., Fredrickson, J.K., Fields, M.W., Shou, W., Johnson, D.R., Beliaev, A.S., 2016. Engineering microbial consortia for controllable outputs. ISME J. 10, 2077–2084.
- Liu, J., Wu, C., Huang, I.H., Merritt, J., Qi, F., 2011. Differential response of Streptococcus mutans towards friend and foe in mixed-species cultures. Microbiology 157, 2433–2444.
- Lozada, M., Riva Mercadal, J. P., Guerrero, L. D., Di Marzio, W. D., Ferrero, M. a., y Dionisi, H. M., 2008. Novel aromatic ring-hydroxylating dioxygenase genes from coastal marine sediments of Patagonia. BMC Microbiology, 8:50.
- Lyu, Y., Zheng, W., Zheng, T., Tian, Y., 2014. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by Novosphingobium pentaromativorans US6-1. PLoS One 9.
- Madueño, L., Coppotelli, B.M., Alvarez, H.M., Morelli, I.S., 2011. Isolation and characterization of indigenous soil bacteria for bioaugmentation of PAH contaminated soil of semiarid Patagonia, Argentina. Int. Biodeterior. Biodegrad. 65, 345–351.
- Mallick, S., Chakraborty, J., Dutta, T.K., 2011. Role of oxygenases in guiding diverse metabolic pathways in the bacterial degradation of low-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons: A review. Crit. Rev. Microbiol. 37, 64–90.
- Mallick S, Chatterjee S & Dutta TK., 2007. A novel degradation pathway in the assimilation of phenanthrene by Staphylococcus sp. strain PN/Y via meta-cleavage of 2-hydroxy-1-naphthoic

- acid: formation of trans-2,3-dioxo-5-(20-hydroxyphenyl)- pent-4-enoic acid. *Microbiology* 153: 2104–2115.
- Mallon, C.A., Van Elsas, J.D., Salles, J.F., 2015. Microbial invasions: The process, patterns, and mechanisms. *Trends Microbiol.* 23, 719–729.
- Marcos, M. S., Lozada, M., y Dionisi, H. M., 2009. Aromatic hydrocarbon degradation genes from chronically polluted Subantarctic marine sediments. *Letters in Applied Microbiology*, 49(5):602-8.
- Martínez Mauro D., 2010. Seminario de investigación: Elucidación de la ruta de degradación de fenantreno por la cepa *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA: Incursión en estrategias metabolómicas y proteómicas. Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales.
- Marshall, C. W., LaBelle, E. V., and May, H. D., 2013. Production of fuels and chemicals from waste by microbiomes. *Curr. Opin. Biotechnol.* 24, 391–397.
- Megharaj, M., Ramakrishnan, B., Venkateswarlu, K., Sethunathan, N., Naidu, R., 2011. Bioremediation approaches for organic pollutants: A critical perspective. *Environ. Int.* 37, 1362–1375.
- Mohan, S.V., Kisa, T., Ohkuma, T., Kanaly, R.A., Shimizu, Y., 2006. Bioremediation technologies for treatment of PAH-contaminated soil and strategies to enhance process efficiency. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 5, 347–374.
- Moreno-Forero, S.K., Van Der Meer, J.R., 2015. Genome-wide analysis of *Sphingomonas wittichii* RW1 behaviour during inoculation and growth in contaminated sand. *ISME J.* 9, 150–165.
- Moritz E, Ni Chadhain S, Kim E, Zylstra G., 2004. Cloning, sequencing, and characterization of a multicomponent biphenyl dioxygenase system from *Sphingomonas yanoikuyae* B1: Abstract. In: 104th General Meeting of the American Society for Microbiology, New Orleans, LA.
- Mrozika, A., and Piotrowska-Segetb, Z., 2010. Bioaugmentation as a strategy for cleaning up of soils contaminated with aromatic compounds. *Microbiol Res* 165, 363–375.
- Mueller, J.G., Devereux, R., Santavy, D.L., Lantz, S.E., Willis, S.G., Pritchard, P.H., 1997. Phylogenetic and physiological comparisons of PAH-degrading bacteria from geographically diverse soils. *Anton. Van Leeuw.* 71 (4), 329–343.
- Mulligan, C.N., 2005. Environmental applications for biosurfactants. *Environ. Pollut.* 133, 183–198.

- Muyzer, G., de Waal, E.C., Uitterlinden, A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 695–700.
- Muyzer, G., Brinkhoff, T., Nübel, U., Santegoeds, C., Schäfer, H., Wawer, C., 1998. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology. *Mol. Microb. Ecol. Man.* 3, 1–27.
- Nam, J.-W., Nojiri, H., Yoshida, T., Habe, H., Yamane, H., Omori, T., 2001. New Classification System for Oxygenase Components Involved in Ring-Hydroxylating Oxygenations. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65, 254–263.
- Neher TM, Lueking DR., 2009. *Pseudomonas fluorescens* *ompW*: plasmid localization and requirement for naphthalene uptake. *Can J Microbiol* 55(5):553–563
- Nelson, M.J.K., Montgomery, S.O., Mahaffey, W.R., Pritchard, P.H., 1987. Biodegradation of trichloroethylene and involvement of an aromatic biodegradative pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 949–954.
- Nierman, W. C., and Nelson, K. E., 2002. Genomics for applied microbiology. *Adv. Appl.Microbiol.* 51, 201–245.
- Obi, L.U., Atagana, H.I., Adeleke, R.A., 2016. Isolation and characterisation of crude oil sludge degrading bacteria. Springerplus 5.
- Ohtsubo Y, Moriya A, Kato H, Ogawa N, Nagata Y, Tsuda M. Complete Genome Sequence of a Phenanthrene Degrader, *Burkholderia* sp. HB-1 (NBRC 110738). *Genome announcements*. 2015; 3(6).
- Okere, U.V., Semple, K.T., 2011. Biodegradation of PAHs in ‘Pristine’ soils from different climatic regions. *J. Bioremed. Biodegr.* 1e11.
- Overbeek, R., Begley, T., Butler, R.M., Choudhuri, J.V., Chuang, H.-Y., Cohoon, M., de Crécy-Lagard, V., Diaz, N., Disz, T., Edwards, R., 2005. The subsystems approach to genome annotation and its use in the project to annotate 1000 genomes. *Nucleic Acids Res.* 33, 5691–5702.
- Panoutsopoulos, G.I., Kouretas, D., Beedham, C., 2004. Contribution of aldehyde oxidase, xanthine oxidase, and aldehyde dehydrogenase on the oxidation of aromatic aldehydes. *Chem. Res. Toxicol.* 17, 1368–1376.
- Pao SS, Paulsen IT, Saier MH., 1998. Major facilitator superfamily. *Microbiol Mol Biol Rev* 62(1):1–34

- Parales RE., 2003. The role of active-site residues in naphthalene dioxygenase. *J Ind Microbiol Biotechnol* 30:271–278
- Parikh, Sanjai J., Jon Chorover, and William D. Burgos, 2004. "Interaction of phenanthrene and its primary metabolite (1-hydroxy-2-naphthoic acid) with estuarine sediments and humic fractions." *Journal of contaminant hydrology* 72.1-4: 1-22.
- Peng, C.Y., Yang, H.H., Lan, C.H., Chien, S.M., 2008. Effects of the biodiesel blend fuel on aldehyde emissions from diesel engine exhaust. *Atmos. Environ.* 42, 906–915.
- Perez-Garcia, O., Lear, G., Singhal, N., 2016. Metabolic network modeling of microbial interactions in natural and engineered environmental systems. *Front. Microbiol.* 7.
- Pérez-Pantoja, D., Donoso, R., Agulló, L., Córdova, M., Seeger, M., Pieper, D.H., González, B., 2012. Genomic analysis of the potential for aromatic compounds biodegradation in Burkholderiales. *Environ. Microbiol.* 14, 1091–1117.
- Pérez-Pantoja, D., Donoso, R., Junca, H., Gonzalez, B., and Pieper, D.H. 2010a. Phylogenomics of aerobic bacterial degradation of aromatics. In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Timmis, K. (ed): Springer Berlin Heidelberg, pp. 1355-1397.
- Pérez-Pantoja, D., González, B., y Pieper, D. 2010b. Aerobic degradation of aromatic hydrocarbons. In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, pages 799–837. Springer.
- Perruchon, C., Vasileiadis, S., Rousidou, C., Papadopoulou, E., Tanou, G., Samiotaki, M., Garagounis, C., Molassiotis, A., Papadopoulou, K., Karpouzas, D.G., 2017. Metabolic pathway and cell adaptation mechanisms revealed through genomic, proteomic and transcription analysis of a *Sphingomonas haloaromaticamans* strain degrading ortho-phenylphenol. *Sci. Rep.* 7, 1–14.
- Pieper, D.H., Martins Dos Santos, V.A.P., Golyshin, P.N., 2004. Genomic and mechanistic insights into the biodegradation of organic pollutants. *Curr. Opin. Biotechnol.* 15, 215–224.
- Pieper, D.H., Reineke, W., 2000. Engineering bacteria for bioremediation of persistent organochlorine.pdf. *Curr. Opin. Biotechnol.* 262–270.
- Ping, L., Zhang, C., Zhang, C., Zhu, Y., He, H., Wu, M., Tang, T., Li, Z., Zhao, H., 2014. Isolation and characterization of pyrene and benzo[a]pyrene-degrading *Klebsiella pneumonia* PL1 and its potential use in bioremediation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 3819–3828.
- Pinyakong, O., Habe, H., Omori, T., 2003. The unique aromatic catabolic genes in sphingomonads degrading polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *J. Gen. Appl. Microbiol.*

- Pinyakong, O., Habe, H., Supaka, N., Pinpanichkarn, P., Juntongjin, K., Yoshida, T., Furihata, K., Nojiri, H., Yamane, H., Omori, T., 2000. Identification of novel metabolites in the degradation of phenanthrene by *Sphingomonas* sp. strain P2. *FEMS Microbiol. Lett.* 191, 115–121.
- Ponomarova, O., Patil, K.R., 2015. Metabolic interactions in microbial communities: Untangling the Gordian knot. *Curr. Opin. Microbiol.* 27, 37–44.
- Puntus, I.F., Filonov, A.E., Akhmetov, L.I., Karpov, A. V., Boronin, A.M., 2008. Phenanthrene degradation by bacteria of the genera *Pseudomonas* and *Burkholderia* in model soil systems. *Microbiology* 77, 7–15.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., Glöckner, F.O., 2012. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 41, 590–596.
- Raes, J., I. Letunic, T. Yamada, L. J. Jensen, and P. Bork. 2011. Toward molecular trait- based ecology through integration of biogeochemical, geographical and metagenomic data. *Mol. Syst. Biol.* 7:473.
- Reasoner D, Geldreich E., 1985. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Applied and environmental microbiology*; 49:1-7.
- Rieger, P.G., Meier, H.M., Gerle, M., Vogt, U., Groth, T., Knackmuss, H.J., 2002. Xenobiotics in the environment: Present and future strategies to obviate the problem of biological persistence. *J. Biotechnol.* 94, 101–123.
- Rodríguez, J., Kleerebezem, R., Lema, J. M., and Van Loosdrecht, M. C. M., 2006. Modeling product formation in anaerobic mixed culture fermentations. *Biotechnol. Bioeng.* 93, 592–606.
- Röling, Wilfred FM, Manuel Ferrer, and Peter N. Golyshin. 2010. "Systems approaches to microbial communities and their functioning." *Current opinion in biotechnology* 21.4, 532-538.
- Romine, M.F., Stillwell, L.C., Wong, K.K., Thurston, S.J., Sisk, E.C., Sensen, C., Gaasterland, T., Fredrickson, J.K., Saffer, J.D., 1999. Complete sequence of a 184-kilobase catabolic plasmid from *Sphingomonas aromaticivorans* F199. *J. Bacteriol.* 181, 1585–1602.
- Rosenfeld, J.S., 2002. Functional redundancy in ecology and conservation. *Oikos* 98, 156–162.
- Roy, M., Khara, P., Dutta, T.K., 2012. Meta-Cleavage of hydroxynaphthoic acids in the degradation of phenanthrene by *Sphingobium* sp. strain PNB. *Microbiology* 158, 685–695.
- Ruberto I, Vázquez S, Mac Cormack W., 2009. Bacterial hydrocarbon-degrading consortium from Antarctic soils. *Revista Argentina de Microbiología*; 41: 262.

- Venosa A, Suidan M, Wrenn B, Strohmeier K, Haines J, Loya Eberhart B., 1996. Bioremediation of an experimental oil spill on the shoreline of Delaware Bay. *Environmental science & technology*; 30: 1764-75.
- Rungrassamee, W., Klanchui, A., Chaiyapechara, S., Maibunkaew, S., Tangphatsornruang, S., Jiravanichpaisal, P., Karoonuthaisiri, N., 2013. Bacterial Population in Intestines of the Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*) under Different Growth Stages. *PLoS One* 8.
- Rutherford, K., Parkhill, J., Crook, J., Horsnell, T., Rice, P., Rajandream, M. a, Barrell, B., 2000. Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics* 16, 944–945.
- Samanta, S.K., Singh, O. V., Jain, R.K., 2002. Polycyclic aromatic hydrocarbons: Environmental pollution and bioremediation. *Trends Biotechnol.* 20, 243–248.
- Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T., 1989. Molecular Cloning, : A Laboratory Manual 2nd edition, B1-B28,. Cold Spring Harbor, New York.
- Sanchez, J., Hochstrasser, D., Rabilloud, T., 1999. In-gel simple rehydration of immobilized pH gradient. *Methods Mol. Biol.* 112, 221–225.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(12), 5463-5467.
- Segura, A., Hernández-Sánchez, V., Marqués, S., Molina, L., 2017. Insights in the regulation of the degradation of PAHs in *Novosphingobium* sp. HR1a and utilization of this regulatory system as a tool for the detection of PAHs. *Sci. Total Environ.* 590–591, 381–393.
- Seo, J.S., Keum, Y.S., Li, Q.X., 2009. Bacterial degradation of aromatic compounds, *International Journal of Environmental Research and Public Health*.
- Seo, J.S., Keum, Y.S., Hu, Y., Lee, S.E., Li, Q.X., 2007. Degradation of phenanthrene by *Burkholderia* sp. C3: Initial 1,2- and 3,4-dioxygenation and meta- and ortho-cleavage of naphthalene-1,2-diol. *Biodegradation* 18, 123–131.
- Shannon, P., Markiel, A., Owen Ozier, 2, Baliga, N.S., Wang, J.T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., Ideker, T., 2003. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* 2498–2504.
- Schell, M.A., 1993. Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. *Annu. Rev.* 47, 597–626.

- Sierra-García, I.N., Alvarez, J.C., De Vasconcellos, S.P., De Souza, A.P., Dos Santos Neto, E.V., De Oliveira, V.M., 2014. New hydrocarbon degradation pathways in the microbial metagenome from brazilian petroleum reservoirs. PLoS One 9.
- Singh A., Ward O.P., 2004. Biotechnology and Bioremediation — An Overview. In: Singh A., Ward O.P. (eds) Biodegradation and Bioremediation. Soil Biology, vol 2. Springer, Berlin, Heidelberg
- Shingler, V., 1996. Signal sensing by sigma 54-dependent regulators: derepression as a control mechanism. Mol. Microbiol. 19, 409–416.
- Sipilä, T.P., Keskinen, A.K., Åkerman, M.L., Fortelius, C., Haahtela, K., Yrjälä, K., 2008. High aromatic ring-cleavage diversity in birch rhizosphere: PAH treatment-specific changes of I.E.3 group extradiol dioxygenases and 16S rRNA bacterial communities in soil. ISME J. 2, 968–981.
- Song, H., Ding, M.-Z., Jia, X.-Q., Ma, Q., Yuan, Y.-J., 2014. Synthetic microbial consortia: from systematic analysis to construction and applications. Chem. Soc. Rev. 43, 6954–6981.
- Souza, E. C., Vessoni-Penna, T. C., & De Souza Oliveira, R. P., 2014. Biosurfactant-enhanced hydrocarbon bioremediation: An overview. International Biodeterioration and Biodegradation, 89, 88–94.
- Stadie, J., Gulitz, A., Ehrmann, M.A., Vogel, R.F., 2013. Metabolic activity and symbiotic interactions of lactic acid bacteria and yeasts isolated from water kefir. Food Microbiol. 35, 92–98.
- Starevich V., 2016. Laboratorio de procesos biotecnológicos: Estudio de megaplámidos en *Sphingomonas* degradadoras de hidrocarburos policíclicos aromáticos.
- Stephan M P, Oliveira M, Teixeira K R S, Martinez-Dretz G and Döbereiner J., 1991. Physiology and dinitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus*. FEMS Microbiol. Lett. 77: 67-7.
- Stolz, A., 2009. Molecular characteristics of xenobiotic-degrading sphingomonads. Applied microbiology and biotechnology 81, 793-811.
- Suenaga, H., Mizuta, S., Miyazaki, K., Yaoi, K., 2014. Diversity of extradiol dioxygenases in aromatic-degrading microbial community explored using both culture-dependent and culture-independent approaches. FEMS Microbiol. Ecol. 90, 367–379.
- Sugimoto, K., Senda, T., Aoshima, H., Masai, E., Fukuda, M., y Mitsui, Y., 1999. Crystal structure of an aromatic ring opening dioxygenase ligab, a protocatechuate 4, 5-dioxygenase, under aerobic conditions. Structure, 7(8):953–965.
- Sun, W., Xie, S., Luo, C., Cupples, A., 2010. Direct link between toluene degradation in contaminated-site micro- cosms and a *Polaromonas* strain. Appl Env. Microbiol 76, 956–959.

- Sun, Y., and Cheng, J., 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour. Technol.* 83, 1–11.
- Tamaki, H., Wright, C.L., Li, X., Lin, Q., Hwang, C., Wang, S., Thimmapuram, J., Kamagata, Y., Liu, W.-T., 2011. Analysis of 16S rRNA amplicon sequencing options on the Roche/454 next-generation titanium sequencing platform. *PLoS One* 6, e25263.
- Takeuchi, M., Hamana, K., Hiraishi, A., 2001. Proposal of the genus *Sphingomonas* sensu stricto and three new genera. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 1405–17.
- Tauler, M., Vila, J., Nieto, J.M., Grifoll, M., 2015. Key high molecular weight PAH-degrading bacteria in a soil consortium enriched using a sand-in-liquid microcosm system. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*
- Terrón-González, L., Martín-Cabello, G., Ferrer, M., Santero, E., 2016. Functional metagenomics of a biostimulated petroleum-contaminated soil reveals an extraordinary diversity of extradiol dioxygenases. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 2467–2478.
- Thavasi, R., Jayalakshmi, S., and Banat, I. M. 2011. Effect of biosurfactant and fertilizer on biodegradation of crude oil by marine isolates of *Bacillus megaterium*, *Corynebacterium kutscheri* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioresour. Technol.* 102, 772–778.
- Thiel, M., Kaschabek, S.R., Gröning, J., Mau, M., Schlömann, M., 2005. Two unusual chlorocatechol catabolic gene clusters in *Sphingomonas* sp. TFD44. *Arch. Microbiol.* 183, 80–94.
- Toledo, F.L., Gonzalez-Lopez, J., Calvo, C., 2008. Production of bioemulsifier by *Bacillus subtilis*, *Alcaligenes faecalis* and *Enterobacter* species in liquid culture. *Bioresour. Technol.* 99, 8470–5.
- Top, E.M., Springael, D., Boon, N., 2002. Catabolic mobile genetic elements and their potential use in bioaugmentation of polluted soils and waters. *FEMS Microbiol. Ecol.* 42, 199–208.
- Touw DS, Patel DR, van den Berg B., 2010. The crystal structure of OprG from *Pseudomonas aeruginosa*, a potential channel for transport of hydrophobic molecules across the outer membrane. *PLoS ONE* 5:e15016.
- Treccani, V. 1965. Microbial degradation of aliphatic and aromatic hydrocarbons. *Z. Allg. Mikrobiol.* 5, 332–341
- Tritt, A., Eisen, J.A., Facciotti, M.T., Darling, A.E., 2012. An integrated pipeline for de novo assembly of microbial genomes. *PloS one* 7, e42304.

- Tropel, D., Meer, J.R. Van Der, 2004. Bacterial Transcriptional Regulators for Degradation Pathways of Aromatic Compounds Bacterial Transcriptional Regulators for Degradation Pathways of Aromatic Compounds. Society 68, 474–500.
- USEPA. Development of a Relative Potency Factor (RPF) Approach for Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Mixtures. Washington, DC: U.S. Environmental Protection, 2010.
- USEPA. Emergency planning and community right-to-know act— Section 313. Guidance for Reporting Toxic Chemicals: Polycyclic Aromatic Compounds Category. Washington DC: Office of Environmental Information, 2001.
- Vacca, D.J., Bleam, W.F., Hickey, W.J., 2005. Isolation of soil bacteria adapted to degrade humic acid-sorbed phenanthrene. *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (7), 3797–3805.
- Vaillancourt, F. H., Bolin, J. T., y Eltis, L. D., 2006. The ins and outs of ring-cleaving dioxygenases. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 41(4):241-67.
- van Elsas, J.D., Chiurazzi, M., Mallon, C.A., Elhottova, D., Kristufek, V., Salles, J.F., 2012. Microbial diversity determines the invasion of soil by a bacterial pathogen. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 1159–1164.
- van Herwijnen, R., Hutchings, T.R., Al-Tabbaa, A., Moffat, A.J., Johns, M.L., Ouki, S.K., 2007. Remediation of metal contaminated soil with mineral-amended composts. *Environ. Pollut.* 150, 347–354.
- Vandermeersch, G., Lourenço, H.M., Alvarez-Muñoz, D., Cunha, S., Diogène, J., Cano-Sancho, G., Sloth, J.J., Kwadijk, C., Barcelo, D., Allegaert, W., Bekaert, K., Fernandes, J.O., Marques, A., Robbens, J., 2015. Environmental contaminants of emerging concern in seafood - European database on contaminant levels. *Environ. Res.* 143, 29–45.
- Vandermeer, K.D., Daugulis, A.J., 2007. Enhanced degradation of a mixture of polycyclic aromatic hydrocarbons by a defined microbial consortium in a two-phase partitioning bioreactor. *Biodegradation* 18, 211–221.
- Vázquez Núñez, E., García Gaytán, A., Luna-Guido, M., Marsch, R., Dendooven, L., 2009. Impact of moisture dynamic and sun light on anthracene removal from soil. *Biodegradation* 20, 191–198.
- Vecchioli G, Del Panno M, Panceira M., 1990. Use of selected autochthonous soil bacteria to enhance degradation of hydrocarbons in soil. *Environmental pollution*; 67:249-258.
- Vila, J., Tauler, M., and Grifoll, M. 2015. Bacterial PAH degradation in marine and terrestrial habitats. *Curr. Opin. Biotechnol.* 33, 95–102.

- Vila, J., López, Z., Sabaté, J., Minguillón, C., Solanas, A.M., Grifoll, M., 2001. Identification of a Novel Metabolite in the Degradation of Pyrene by *Mycobacterium* sp. Strain AP1: Actions of the Isolate on Two- and Three-Ring Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5497–5505.
- Vilchez-Vargas, R., Geffers, R., Suárez-Diez, M., Conte, I., Waliczek, A., Kaser, V.S., Kralova, M., Junca, H., Pieper, D.H., 2013. Analysis of the microbial gene landscape and transcriptome for aromatic pollutants and alkane degradation using a novel internally calibrated microarray system. *Environ. Microbiol.* 15, 1016–1039.
- Vincent, J., 1970. A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. A manual for the practical study of the root-nodule bacteria.
- Wackett, L.P., 2002. Mechanism and applications of Rieske non-heme iron dioxygenases. *Enzyme Microb. Technol.* 31, 577–587.
- Waigi, M.G., Kang, F., Goikavi, C., Ling, W., Gao, Y., 2015. Phenanthrene biodegradation by sphingomonads and its application in the contaminated soils and sediments: A review. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 104, 333–349.
- Wanapaisan, P., Laothamteep, N., Vejarano, F., Chakraborty, J., Shintani, M., Muangchinda, C., Morita, T., Suzuki-Minakuchi, C., Inoue, K., Nojiri, H., Pinyakong, O., 2018. Synergistic degradation of pyrene by five culturable bacteria in a mangrove sediment-derived bacterial consortium. *J. Hazard. Mater.* 342, 561–570.
- Wang, J., Xu, H., Guo, S., 2008. Isolation and characteristics of a microbial consortium for effectively degrading phenanthrene. *Pet. Sci.* 4, 68–75.
- Watanabe, K., Baker, P.W., 2000. Environmentally relevant microorganisms. *J. Biosci. Bioeng.* 89, 1–11.
- Waterhouse, R.M., Tegenfeldt, F., Li, J., Zdobnov, E.M., Kriventseva, E. V., 2012. OrthoDB: A hierarchical catalog of animal, fungal and bacterial orthologs. *Nucleic Acids Res.* 41, 358–365.
- Weekers, F., Rodriguez, C., Jacques, P., Mergeay, M. and Thonart, P., 2001. Dissemination of catabolic plasmids among desiccation-tolerant bacteria in soil microcosms. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 91, 219–232
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J., 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173, 697–703.

- Wellinghausen, N., Essig, A., Sommerburg, O., 2005. *Inquilinus limosus* in patients with cystic fibrosis, Germany. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 457–459.
- Werlen, C., Kahler, H.P.E., Van Der Meer, J.R., 1996. The broad substrate chlorobenzene dioxygenase and cis-chlorobenzene dihydrodiol dehydrogenase of *Pseudomonas* sp. strain P51 are linked evolutionarily to the enzymes for benzene and toluene degradation. *J. Biol. Chem.* 271, 4009–4016.
- Whitney, K.D., Gabler, C.A., 2008. Rapid evolution in introduced species, “invasive traits” and recipient communities: Challenges for predicting invasive potential. *Divers. Distrib.* 14, 569–580.
- Widder, S., Allen, R.J., Pfeiffer, T., Curtis, T.P., Wiuf, C., Sloan, W.T., Cordero, O.X., Brown, S.P., Momeni, B., Shou, W., Kettle, H., Flint, H.J., Haas, A.F., Laroche, B., Kreft, J.U., Rainey, P.B., Freilich, S., Schuster, S., Milferstedt, K., Van Der Meer, J.R., Grobkopf, T., Huisman, J., Free, A., Picioreanu, C., Quince, C., Klapper, I., Labarthe, S., Smets, B.F., Wang, H., Soyer, O.S., 2016. Challenges in microbial ecology: Building predictive understanding of community function and dynamics. *ISME J.* 10, 2557–2568.
- Williams, P., 2007. Quorum sensing, communication and cross-kingdom signalling in the bacterial world. *Microbiology* 153, 3923–3938.
- Willsey, G.G., Wargo, M.J., 2015. Extracellular lipase and protease production from a model drinking water bacterial community is functionally robust to absence of individual members. *PLoS One* 10, 1–15.
- Wischgoll, S., Heintz, D., Peters, F., Erxleben, A., Sarnighausen, E., Reski, R., Van Dorsselaer, A., Boll, M., 2005. Gene clusters involved in anaerobic benzoate degradation of *Geobacter metallireducens*. *Mol. Microbiol.* 58, 1238–1252.
- Xavier, J.B., Kim, W., Foster, K.R., 2011. A molecular mechanism that stabilizes cooperative secretions in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 79, 166–179.
- Xu, X., Chen, X., Su, P., Fang, F., Hu, B., 2016. Biodegradation potential of polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria strains enriched from Yangtze River sediments. *Environ. Technol. (United Kingdom)* 37, 513–520.
- Yang, Z., Guo, R., Shi, X., He, S., Wang, L., Dai, M., Qiu, Y., Dang, X., 2016. Bioaugmentation of *Hydrogenispora ethanolic LX-B* affects hydrogen production through altering indigenous bacterial community structure. *Bioresour. Technol.* 211, 319–326.
- Yuan, S.Y., Wei, S.H., Chang, B. V, 2000. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a mixed culture 41, 1463–1468.

- Zafra, G., Absalón, Á.E., Anducho-Reyes, M.Á., Fernandez, F.J., Cortés-Espinosa, D. V., 2017. Construction of PAH-degrading mixed microbial consortia by induced selection in soil. *Chemosphere* 172, 120–126.
- Zhang, D., Liu, J., Jiang, X., Cao, K., Yin, P., Zhang, X., 2016. Distribution, sources and ecological risk assessment of PAHs in surface sediments from the Luan River Estuary, China. *Mar. Pollut. Bull.* 102, 223–229.
- Zelezniak, A., Andrejev, S., Ponomarova, O., Mende, D.R., Bork, P., Patil, K.R., 2015. Metabolic dependencies drive species co-occurrence in diverse microbial communities. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 6449–6454.
- Zhao, H.P., Wang, L., Ren, J.R., Li, Z., Li, M., Gao, H.W., 2008. Isolation and characterization of phenanthrene-degrading strains *Sphingomonas* sp. ZP1 and *Tistrella* sp. ZP5. *J. Hazard. Mater.* 152, 1293–1300.
- Zhao, Q., Yue, S., Bilal, M., Hu, H., Wang, W., Zhang, X., 2017a. Comparative genomic analysis of 26 *Sphingomonas* and *Sphingobium* strains: Dissemination of bioremediation capabilities, biodegradation potential and horizontal gene transfer. *Sci. Total Environ.* 609, 1238–1247.
- Zhao, Q., Bilal, M., Yue, S., Hu, H., Wang, W., 2017b. Identification of biphenyl 2 , 3-dioxygenase and its catabolic role for phenazine degradation in *Sphingobium yanoikuyae* B1. *J. Environ. Manage.* 204, 494–501.
- Zhao, Q., Hu, H., Wang, W., Peng, H., Zhang, X., 2015. Genome Sequence of *Sphingobium yanoikuyae* B1, a Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Degrading Strain. *Genome Announc.* 3.

## CAPÍTULO VIII

# *Material Suplementario*

## VIII. Material suplementario

**Tabla IV.S1.** Enzimas pertenecientes a las vías de degradación de alifáticos en el genoma de *Sphingobium* sp. 20006FA, predichas por RAST, KEGG y NCBI. CDS: número de secuencias de codificación para esa proteína en el genoma. Los genes en las tablas se nombran en inglés debido a que se obtiene del dato crudo proveniente de la base de datos.

Enzimas predichas - <i>Sphingomonas paucimobilis</i> 20006FA	
Enzimas de la vía alifática	CDS
Alkane-1 monooxygenase (EC 1.14.15.3)	2
Alkanesulfonate monooxygenase (EC 1.14.14.5)	1
Alkene reductase (EC:1.-.-.-)	1

**Tabla IV.S2.** Código de acceso de las secuencias de aminoácidos en formato FASTA de las enzimas dioxigenasas de *Sphingobium* sp. (20006FA) depositadas en el GenBank (NCBI).

### 20006FA *Sphingomonas paucimobilis*

```
>WP_044662236.1 MULTISPECIES: aromatic ring-hydroxylating dioxygenase subunit alpha [Sphingomonadaceae]
MLHNAGLTLSDGTTLDDLINRDMNEVSLRVMNDKELYELEMERVARTWLLLGHESIEPKAGDYVMRDMAEDNVIVSRDRSGEI
HVMLNVCPhRGMKVCTAEAGNAHAHRCIYHGWAFRSDGSFIGAPIKEQMHNKRSKDELGLKKARVHLYGGLIFATWNKDLS
FEDYLGDAKFYLDQLFCRTDNGLEMLGPPQRFVLPCNWKIPGEQSGSDGFHTLTLHRSLMEGGIMGGTAESIYDTAPGMVGVD
LSVPQGHTLRCLCQAQTFKMFADVSFEKGKTTEERLHLLPPPITKELIPQLFKNLSEDQVKQLANIPPQVGGMFPNIIIAFAPRT
DGGASGALSHTYVPKGPDKVEFVNIFIAEKDAPEDVKRDMILQNAIWSTGTSGTIEQDDADTPQIMRNSRGHMSKTVTLKYQ
ALHGHERPEGWVGGDLYPGFTKDDTQAWWMAYYNLMAEA
```

```
>WP_082718574.1 MULTISPECIES: aromatic ring-hydroxylating dioxygenase subunit alpha [Sphingomonadaceae]
MDKPATAREAVRGIMNKPFDRKGFSVDKDAKYGEKHPYIDNGTALIDPKRYYDPQEAEREWDKMWTWLMAGLASDCPNV
GDVFKFDVGRASIIVRTRPEELKAHFNFCAHRANTLVTTDFGTVGKCFHCSFHGWEYDLDGNLVKIRDEEIFRPDVIAHRPGL
EVKIGLWGNFVFNFNMDPDAEPLMDFLGDIPKHLEPYNLERFRPRYRDEELTWDANWKTAEEAFLEYHGDDVHPEVLGNSETYR
MQYDLFPNGHGRMIIPVGLPREFNDGDKVPPETQQMLGLWDGKPEDYPEELDLSGGDFKKALVDTKRRWAAYGLDFSGLSDG
QVTDDWNYSSFPNMTNTFADVLQIQRWLDPATNPERSRYVTMTLAPPVDDPDYRIFDINNFGPDAHGPMNFDGKVRPRERH
EDTADFGYVLNQDIRLVPENVQKGIKSPGFKGALLGEAEVRIRHYLVEIDRYLER
```

```
>WP_061934014.1 MULTISPECIES: aromatic ring-hydroxylating dioxygenase subunit alpha [Sphingomonadaceae]
MSEDYDIEKGYIVYPKTKNGDIAKSPKTLVHKGIVPTERYFSREEADMEDWDRLFQVWLFAGLTQDLSKVGDYFKFDVGRESIV
VVRSSDENIQAFYNVCPHRGNFLVYDDYGSIKDGSALYCKFHGWRFNLDGSVRSVKDRHTFPENLCGMNGLRELRCCEVVNA
LVFVFSFDDDVPEPLHQALGVVPEHLANYDFTRSRYREVQDVEDANWKTAMEAFLEYHSDDTHPEVPILSATLRTQYDLYLDKGV
SRMFIRFGYSGDRSRNPDDVPEILKGMITLYGGDNADYLGKGGDYRRACDTRLRKWAARNGHSDLFDRLSDDQVTDDWNSI
FPHVTLNFSYGVHIQSWLPCPDDPEKHYRSICLLPLADPDQVIADPTSMVAQEKGWTGEVRPPRIKPKSMADWGSVLLQD
VERLPYIQRGLRSRSRVGNRLSASECRINHYLDEIDRYLGRK
```

```
>WP_044662217.1 MULTISPECIES: aromatic ring-hydroxylating dioxygenase subunit alpha [Sphingomonadaceae]
MREAALLELLNRTMEEQLKRSEHPSDFPALPPIPAGRYTDPRFEALEKDRLNRTWLLAGIASDLPAPGSYRLFQHLDRSVILSHG
KDRGRIRAFHNACRHGSPLLEPQGRAMRFICPYHAWGYDLEGTLKSVPQSQHDFACLDKAENGKIEVKCDTYRGFIFINFDDDA
EPLQNFLGEFVALTEGYPLERMVVKDHFFVEMACNWKIAHNFLEIYHVNTVHPTTALPHLDLSRSFVIALYEGGHMRFGTRKG
GESLFKTPPVKPDFDIAPVFLENTVALPTFPNTFFSLDPVGFLNQCFWPMGSDRSVMEVRQMGWSTDSEEDKLYWQGMRAATE
HILSEDLCLFENIQQSLRNGTIPSIWAGYQERALYWFEEEIDRRIGPDHVPAIDLVRQPRIASFIAPRSA
```

>WP\_008829815.1 MULTISPECIES: aromatic ring-hydroxylating dioxygenase subunit alpha [Sphingomonadaceae] MADATLTWPKNYNEVPKAFTSRSDLYLEEIKRIFHGPEWHVAHESELPNPGDFRTIRLAGIPLLISRDEGGEVRFYNACSHRS NQLETAVMGNKTEFECPYHRWLFSAKGELVGCPNPREFVPGFDKADYPLGQPRFDLFYGLIFVTFASETEPLDQFLGEAGETLR ELMAGDGRLLKGYQKVRYSNWKGYNDNDGYHAPLLHAFKMLNWQGGKGRQYTATKRGHVCFCESALSVASGPSVLKD KD LIAFKGQDPSPGSRIVQLPFTVSTKHLDVNLRFATPIDAETTEVHYAYFAHQNDDADMLRHRLRQSSNLLGPCGLISMEDASIF HRIHIGSHTPGNAIFQKGVRDPAKLESEFSQNDESGNLPWEYYRSVMGFERAQA

>WP\_008828560.1 MULTISPECIES: aromatic ring-hydroxylating dioxygenase subunit alpha [Sphingomonadaceae] MRFERIGREPDSRYMDLKEGWLDRRIFSDADIYEELYRIFARSWLVAHESQIPNSGDFLTTHMGEDAIVARQPDGSIRVML NSCPHRGNKVCFADAGNTRRFVCNYHGWFDTAGDLKGMEHECYDAGIDFKNHGLKNVAKVGNYKGLVFATFNNSDAPSLE AWLGDFRWYLDMDNEEGTEFIGGCIKSVISANWKFGVENFIGDAYHAGWTHDSGTRSMNNQPFPPIDMDNSYHASVNGH GWEFGTEGVGDLFLLGRPKVMDYNNKIRPKMAERLGEMRSKIFGSVASASIFPNVSFLPGISTFRQWQPKGPMQFELKTWIVN KNMPDDIKEEVTKGVMQTFGPGGTFFEMDDGENWNCTVNRGVVTRHERLHYRCIGRQIEHDTLPGIVYRGQYNDANQRGF YQRWLDMMTHDEFGKMPARPEPQLGNVGETRDLPLGLFAL

>WP\_061934423.1 MULTISPECIES: aromatic ring-hydroxylating dioxygenase subunit alpha [Sphingomonadaceae] MNEMISVSRQKVAVTAD RIPVDAYISRDYVRLKERLWPKIWQVACRAEEIPNPGFYTVDIADESIAVRQKDGTIAAYFNCVPH RGRRLT EGCGRMGKFHCKYHG WQWSLDGKPTEIVDRHDWG D ALP D E D V A L Q R V K V G Q W G G W V F I N M D P D S E S L E D F L G E A K T I L D P F E I E H M R Y A W R K R I V M P C N W K T A Q E A F M E G Y H V Q T T H R Q L L A Y Q D D Y T Y S K A Y G K H A M F G Y A P T A L F G L P S P R V S D Q S G D I R K G F Y E F N K E I W D T L Q A T T Q E M L A A G K R L M E L P E G V D P F A L Y A A F Q H A E E S A R S G R P F P A I S G E Q L M K A G T D W N I F P N L V F L Q Q A T N V L F Y R A R P Y G D D P D K C I F E V N V L E R Y A P G A E P K V E D G G D G S D G Q W R A L N W G L I L E Q D F Q N M E E V Q K G M K S Q A F R T A R T N P V Q E V E I S N F H R V Y H E Y M E K D

>WP\_061934439.1 MULTISPECIES: aromatic ring-hydroxylating dioxygenase subunit alpha [Sphingomonadaceae] MNQPAAALQPKITRKKAGPEDIPIKEDYVSRDFARLEQRRRLWPRAWQMACREEEIPRVDYVTDVLDSEIVVRVAADRIAAY HNACQHGRGRLTEGCGCHAARLYCRFHGWSWKLDTIAHVDRDNGLSLKDEDIALPQVRDVWRGGFVFCMDGDAEPLLD FLSPIPDVFRNYPFEKMRYRWWYKRTGIDCNWKTALEAFNEG YHVQTTHTQLLPVHDDEALSFAEGRHGSYQLAPGRISLGERSP RLA STQV D Y R R N V R E F V L M L E E D L K A S I P P H M A E L A D R L V D E L P E D A S L L D V L M K Y G Q I A F E A A Q E R G I P F P S L T P E E I G R A G A D W H L F P N M V F L P A P D A M L A Y R A R P D R D N P E R C I F E V Y S L V L Y P E G Q E P A L E R Q E F K D W R D H D A W G L I L T Q D F E N M T E V Q R G M R STGFTGSRTNPVQERSVSNFHRALREFIGA

>WP\_061937039.1 MULTISPECIES: aromatic ring-hydroxylating dioxygenase subunit alpha [Sphingomonadaceae] MND A H R W L H E H P E L G S G P I S I E P Y I D P D W Y E R E R E K I F R K V W L C V G R V D E I P D R G D Y K V K R L A A D T S V I L M R G K D D V V R A H H N V C A H R G N T V V T E T G P E T F G R S K A A I V T C R F H G W V Y G A D G A L K H V P S E E R F Y P C F D R Q R N G L T P I H T D V W E G F I F V N L A E N P D N S L A D F L G D Y A A H F A G F P P A E L S Y Q F T Y H T E L E C N W K V A H D A F E A Y H V D T I H A G S F P N T F S T G L Q L N V K L M G P H R S C A V C L T G A K P T P V A G I A N N I A G A S L V T Q R A E T M L P P A I N P D K R D D F A F E L S V L F P N T L I H V S E G I W F T H Q F W P I A H N R T L W E G R Y Y V R P P K T N A E R W A I E H A M T L Q R N A W L E D T A T M E D T Q R A M Q S R A K L V Q N L Q D D E I L R H S A A V V D R Y V N A

>WP\_082718769.1 MULTISPECIES: aromatic ring-hydroxylating dioxygenase subunit alpha [Sphingomonadaceae] MPQSGGTHQPLSPAGTPPEALRRSSTEWRGHMYVRNAWVYVAGWAQSLANGELLALKILDRIPIVYRTGSGRVALEDRCRHRS APLSKGRVEGEEIRCMLYHGFKYGATGACTEAIPEAAAIPATARVTAVP/VERHSWIWVWMGDEAGADPALIPPVSGIDEGRFVLK PGVIDYRAAAALCDNLLDFSHLSYVHPNSFGVTEEWALTRPRIEQDRDRLHLERWVWRDQPAPHHQPELGRIDYWEYESP V G I S L T F K M F P V G A A E R H G G R S P G D D P S L L S F S Y S L Q A V T P M T E G T A R Y F F A Y G P R V E E D V D G Y A E A F S A V A N A A F L E D K E I I E A Q Q A R L A E G D A D M L I V R A D S A L V Q Y R R L V E R L S A E T G L D K K N K P Q L D M Q S I A S

>WP\_008828129.1 MULTISPECIES: benzoate 1,2-dioxygenase subunit alpha [Sphingomonadaceae] MELNDKIGRIADLQGLKGRMRAWLKKDHHERGIFQLDRAAFTEAALFELEMKYIFERNWVYLAHESQVSKPNDFITTKIGRVPILV TRDKSGDVGAFVNACSHRGARLCRERAGNKRNHMPFHWTFSSGGDLDVTDESIGGYPEAFNRADFGLQPVARVESYRG FIFASLSADV/VPLVDHLAGARDFIDILVQDKSGAMEVLPGTNRYRHYGNWKMQVENG LDGYHVMTHANYFMTVQRRVEGIS KNETKAISFNGFTARDGGSFHNGHTVLWADYANFMDRPNFEIIDWLEESYGAEKWMNKIRRNQLFPNVFLMDQTSTQIR IIQPLALDETEVSTVCIAVPGESPEARLRLRQYEDFFNSTGMATPDDLTEFNNCQTGYGAGEGRYNEMSRGSTRWDTGPKF GEPLDFNV/VLSSPAVADEGLYVAIHDEWLTMEKAIDSECSELAFLERSLEKAR

>WP\_044662277.1 MULTISPECIES: Rieske (2Fe-2S) protein [Sphingomonadaceae] MSLDSLWVA R S E E V T S Q K P L S V D I G D Q P V V L W R D N Q G I A R A L E D R C P H R R A P L S L G C I R D N G Q I Q C G Y H G W S Y D G E T G R L K E I P N M K D Q Q K F P P I Y K A N A F A V T E Q A G F V R V C L N P K A Q A P L S A D P K Y T V G T V N V C S H Q E Y L N A L Y D D P S L I L S I R G V R F S P Y L M S E L H E E N G L L V M E R N C Q W H P L H W P S H F V A E F P L T L L T R H P L T G E T Q L T L R D D Q F N D L L H A V L S P V S A R G V T A R W R A E L G V R R P G V R G A V L R G I N P L S V L A S V D G S K L R A T K P T V S L H G E D L R K V M L E T T P A P H D Q T V A A

>WP\_082718581.1 MULTISPECIES: Rieske (2Fe-2S) protein [Sphingomonadaceae] MNPDLNHGGEAGRIARI C R P G S G R P W T G P S P V S Y F G V P Q S R Q D E A G E T V R V R L C D R A E I P T G R Y R C F K E G A L S F L V C N V K G T L Y A I N Q C S H M K V P L D G G R Q F G K D F I C P V H G A R F D I P S G K A L S G A A V G R L A T P V T I E D E G V F V E L P V / G L A P P R

>WP\_061936088.1 MULTISPECIES: Rieske (2Fe-2S) protein [Sphingomonadaceae] MSEDERLTATPPGVALAPLDSIADGKARNFVIQMRKGRFHGFVLRIGNEVRGYDRCPHMGLPLAQKLDLYLTPDGALIACSWH GALFAPSDGACLGGPCAGAALIPWPVTVEDGMIVTTV

>WP\_008828132.1 MULTISPECIES: (2Fe-2S)-binding protein [Sphingomonadaceae]  
MNAETMPVAAGSEPTAVDYAVYHSQAITAEQEENIFRGQTWCYLGLEAELANSGDFRSTHVGNTPVVTRATDGTIHAWVNR  
AHKGATVCRSLRGNQADGAFVCVYHQWAYDATGALGVGPFRRLKGVGYYSKEFNMAEHSLERLVRFTGGLVFGTFNPTIA  
PLDDFLGPVMRKYIQRVFQRPVKLVGYARQFPMAGNWKLYSSENRSRDYHQLLHLFYPTFGIYRQSSESQALVSDEGYHTVFTV  
SKPKGVDVYGSFGDEANREMQEAKLQDERLLA弗PEIADDVGLHIQSIFPSVVQQIQNTLATRQIVPHGTDKTELWVTYFGY  
ADDDDETTRHRLRNLLVGPGLISMEDGEAELCQQGTIGAEKGKRSFEMGGDDVRPSYAPMGMDENSVRGFWKGYLGM  
GNALADLAAEGRA

>WP\_008828125.1 MULTISPECIES: (2Fe-2S)-binding protein [Sphingomonadaceae]  
MSIAQQQDTLDQAPSTAGCRVPYRVFTDRQQYDREQEKIFKGDCWSFVGLEAEVPKAGDFKFSTVGETPVILTRSDGSVHH  
VNRCRAHGRALVCREMGRNRSSLECVYHQWAYDLKGKLIGVPFRRGLKGQGGMPGDFDMQSQHNLRQLRTESVNGLVFAFSSE  
TVESCRDFLGPIVVEQIERIMCKPVTVLGDQRQRIRGNWNLKYAENTRDPYHASLLHLFHTFGLYRSTQTGKALMDANKRHSSL  
SIAASNDDAADKQAYGDSRTFDTEFKLQDMSSLKGRQEFADNVTLVILA VYPNLVLQQIQNTLAVRQTVTYGPDEFELVWTHFG  
YQQDDDEEMQAIRLKQANLIGPAGLISMEDGEAVEIVQNAIVGEASATSYIAMGGGRAEDADHLVTEGAIIGFWNDYRKVMGFEVE  
PA

>WP\_061937033.1 MULTISPECIES: Rieske (2Fe-2S) protein [Sphingomonadaceae]  
MTTCTAEDLRHINRSVDDIREELGVDPVSRAISDPAIYELEREKIFRKTWLKVATSWELPHGVDYKVKELPVADASVLVRGKD  
GRIRAFHNVCTHRGNKVPSSGFETFGRSRANVTCRFHGWFSTDGPMRSVPMEKFGKLDTACLGLREIHCDSWEGFVFIIH  
FDAEPAQTLTDYLGFGRFLGGYPYAESTTAFRYSTVLCNCWVKAHYAFSEGYHVPTIHAGSLPGFKGVHEGDFKLMGPHASS  
TIYGAGMDTAPSTLAFASMLSTTERHRPRPDQLPPAINPERRADFQFELPNLFNPNIILASGCCGPGMSFTTHQFWPLDHGRTL  
WEGINYFRPAQNAAEQVAQQHVNALHRNAWLEDTATMEDTFAGIMSGSIDAMQLMDQEFLIRHAARTLDTYLAA

>WP\_061936097.1 MULTISPECIES: homogentisate 1,2-dioxygenase [Sphingomonadaceae]  
 MGESRPFAAAMLTGFGNHFATEAAPGALPGRNNSPQHAPYGLYAEQLSGTAAFTAPRAENRRSWLYRLRPAANHPPYRPYEAE  
 TLLRSGPFDPEAPPTPNRLRWDPPLPERPVDFLDGLISYCGAGDPAAGEGLAVHLYANRPMEKRAFTNADGEMLIVPQQGRL  
 RLTTEMGVMDVAPEQALIPRGRVFRVRVLPDGRTARGYVCENYGALFLRPLDLGPIGANGLANARDFETPAAWFEDDDSPHEIVQK  
 FAGRLWTTQDHSPFDVAAWHGNLAPCRYDLRRFNTMTVSYDHDPDSIFTVLTPSPSDRAGTANCDFVIFPPRWMVAEDTFRP  
 PWFRHNVMSMSEFMGLIHGVDYAKAGGFAGPGASLHNCMAGHGPDKASYEGALAAELKPHRISDTMAFMFESRFARPRTRFAME  
 TPLGQLDYDDCWSGFAKAQLPQGNKA

>WP\_061936107.1 MULTISPECIES: catechol 2,3-dioxygenase [Sphingomonadaceae]  
MAIRGLLRVGEVCVRVDIDARRHYCERMGLIETYQGDPDKLYYKVADEHWDWYSLVLEKADAPGVVEYFAFRTYEDAEIDHFAA  
ALTEYGLAVERHEVPGVPKSGRRIRFTLPSGVHMHYADKEKINGNMPTRNPGTIPDEGYIRGFRCVRLDHVLLGGPNIVENRDI  
TGIFGFTVSEELVTQGDETRLAVFLSCNSKNPHDIAFLQPGDSRFHHVSFLLDSVNLDLFHAGDLIGKYEIPVDVSNRHGVTRGATI  
YFFDPGSNRNEVFTGGYVHYPDTLTWDTSQLGKATFSQDNMPRESFLNVLT

>WP\_061939357.1 MULTISPECIES: dioxygenase [Sphingomonadaceae]  
MRQPTLFIPHGGGPCFFMDPSDPDRPHCDPMWQPMQDYLAGIVATLPERPRAILLVSGHWEESRFTVHDGEGPGLLFDYYGF  
PPHTYALRWDAAPGAPALARRAAGLLEQAGFPTGREDAWRGDHGWFIPMKVALPQADIPVAQLSLRGDLDPDAHLAAGRALAPL  
RDEGVLIIGSGMSFHNLVRGAQATQPSMLWDDALTAATVDPDPASRAQRVAAWADLPHARFAHPREEHLLPLMVALGAGGE  
DAAVRDHASNVLGWAVSGYRFG

>WP\_024018961.1 MULTISPECIES: catechol 2,3-dioxygenase [Sphingomonadaceae]  
 MALTGVIRPGYVQLRVLSDLDEAIHYRDRIGLNFVNREGDRAFFQAFDEFDRHSIILREADQAGMDVMGFKVAKDADLDHFTERL  
 LDIGVHVDVIPAGEDPGVGRKIRPNPTQHV/FELYAEMALSATGPVAKNPDVWVVEPRGMRATRFDHCAALNGVDIASSAKIFVD  
 ALDFSVAAEVLVDETSGLRGIFLCSNSKKAHDVAFLGYPEDKGKHHTSFNLESWHDVGHAADIISRYDISLDIGPTRHGITRGQTIFY  
 FDPSGNRNETFSGGYIYPDNNPQLRWAENAGKAIFYYEKAQNDRFTMVNT

>WP\_008828133.1 MULTISPECIES: anthranilate 1,2-dioxygenase small subunit [Sphingomonadaceae]  
MSVAAEVAQVQAQSIAIDDFNAAYGLCLDDDRLEQWPPTLFVDDCLYQVIARENVDNGLPAAVMYCDSKGMLADRVALRKANVFP  
EHFNRHLIGRAVITGAEGNQVSAAEASYVVFQTRNDGETRIYNAKGKYVDWFDFLSGGTVRLKSRTCIYDTLRATLLATPI

>WP\_008828128.1 MULTISPECIES: biphenyl-2,3-diol 1,2-dioxygenase [Sphingomonadaceae]  
MSVTTELGYLGLSVSDLAAWRAYAAEVAGMEVVDGELEGDRLYLRMDLWHHRIVLHADGSDDLAYMGWVRAGPQEFAAMQEKL  
LSAAGIPFTVGTEAEARRVLGLLLKADPGGNPTEIFFGPQVDTDHKPFPGRPMFGKFLTGSQGVGHICLRRQDDVEAAARFYE  
LLGLRGSVEYHLHLPNGMVAQPYFHMCHNERQHSVSFAGLGPMEKRINHLMFEYTEDDLGMAHDVVRAKKIDVALQLGKHANDQ  
AI TEYCANPSGWLIWEFGWGAROAPSOEYTFTRDIEHGHNAAQGYGMDPVLI

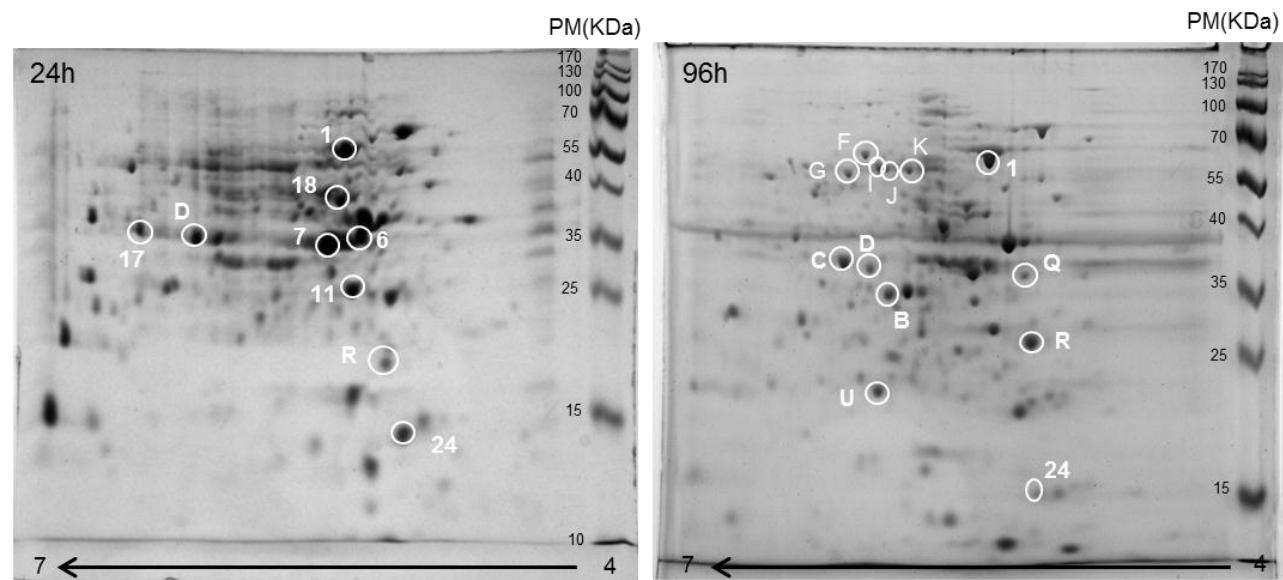
>WP\_008828126.1 MULTISPECIES: anthranilate 1,2-dioxygenase small subunit [Sphingomonadaceae]  
MGLPTLEQMQFQHAAAQLNALHAEIxDDDRLEEWPNLFEKCQYSVISAENHNRSLNLAACFCDSRGMLVDRIVSLRANIFPA  
HSYRHII GPTRVKSTSGOIVTTOTNYV/LMTRNDGOTSIVNSGKY/DQIDVSGAGSREL SKTAIEDTHI DTMVVRP

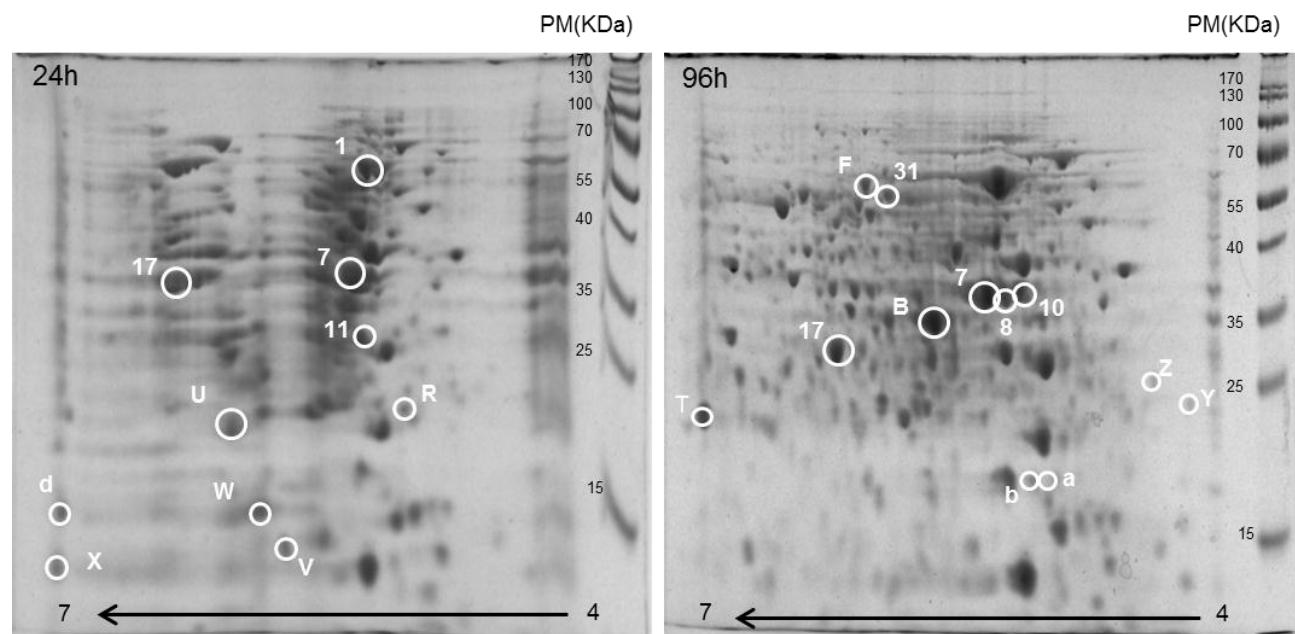
>WP\_061937024.1 MULTISPECIES: catechol 1,2-dioxygenase [Sphingomonadaceae]  
MTEDFVNAAVQALLDRASGLDAEGGDGRLKAIVRELAEAVMRTIVRHDVSESEFWAAIQYFQEAAEFGILIVPGVGLEHFMDL  
LMDARDAEAGRTGGPTRTIEGPLYVAGAPLVEGDVNLSSDPDDTGTLYMSGVIRGPGEVPVEGAILHVWHANSQGWYSHFDP  
TGEQTPFNNRRIRIGSDGRYSFSHKMPNGYSPVPGGATDRLRMALGRHGNRPAHVHFFVEAPGYRTLTQINFQDDPFAADD  
FAAFATRCGLPVPNQGDAATIVEDEFLQKAGCSTEEGESLPARA/AV

>WP\_061939202.1 MULTISPECIES: catechol 1,2-dioxygenase [Sphingomonadaceae]  
 MQAKADIAITQEVIRAMSGTADPRLRQIMEVLVENLHDFARRTNLTRPELDIALDFLNAVKGATNERHNEAVLLADVGLSTLLCD  
 GDPDHAEAEALLGPFWRMHSPTENGGTICRSATPGPKLEVHGQVIDAQRQPIAGVEVDVWHASPVGLYENQDENQVMNL  
 RGKFTTDSEGRFWFTTVLPAGYPVPTHGPVGGLKAQGRHPFRPAHLHFLLWKGYETRISQVFVNDDQYIDTDVVFGVTPGLI  
 GQYEKQADGSYRMERTFAMHEGETFIPKPPID

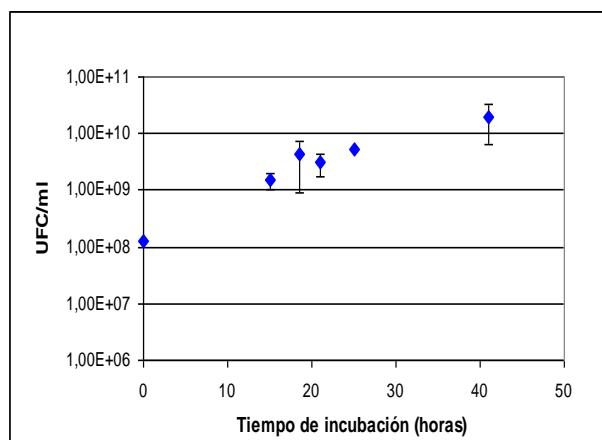
>WP\_061939457.1 MULTISPECIES: biphenyl 2,3-dioxygenase [Sphingomonadaceae]  
 MQMLDERRSEIAAKIVPPSKLAHFVLRSTSRAEMVDWYKLVMHATAAYENPGLSFLSYDEEHHRIAIVAVPDLLDQDSSDVGLHH  
 IAFTYDSLHDLLNYQRLKDLGIAPAWAINHGPTTSLYRDPDGNHLEFQVENFETVEESTKFFFTEEFNVNPIGVEFDPMRLQ  
 RMLAGEDEAEELKRRPASGPVGLDAVKI

**Figura IV.S1.**: Duplicados del análisis por electroforesis bidimensional de fracciones solubles de los cultivos en fenanreno de la cepa 20006FA luego de 24 horas y 96 horas. Los spots marcados se analizaron por MALDI-TOF/TOF (MS/MS).

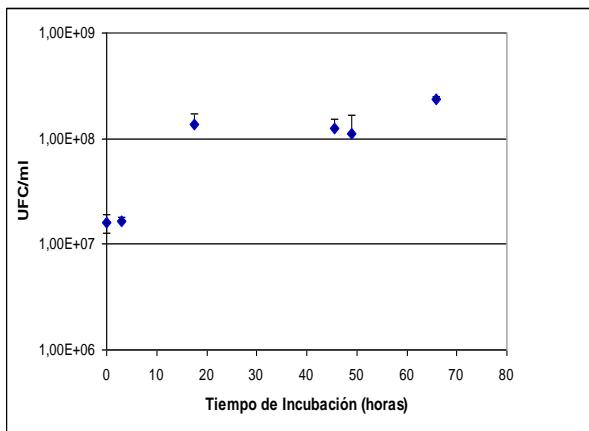




**Figura IV.S2.** Cinética de crecimiento de *Sphingobium* sp. 20006FA en MML suplementado con 2 g/L de glucosa a 28°C y 250 rpm. Se grafican los valores promedio de tres réplicas biológicas y su respectiva desviación estándar.



**Figura IV.S3.** Cinética de crecimiento de *Sphingobium* sp. 20006FA en MML suplementado con 0,84 g/L de fenantreno a 28°C y 250 rpm. Se grafican los valores promedio de tres réplicas biológicas y su respectiva desviación estándar.



**Tabla V.S1.** Enzimas pertenecientes a las vías de degradación de alifáticos en el genoma de *Sphingobium* sp. AM, predichas por RAST, KEGG y NCBI. CDS: número de secuencias de codificación para esa proteína en el genoma.

<b>Enzimas predichas - <i>Sphingobium</i> sp. AM</b>		
Enzimas de la vía alifática		
		CDS
Alkane-1 monooxygenase (EC 1.14.15.3)		2
Alkanesulfonate monooxygenase (EC 1.14.14.5)		1
Alkene reductase (EC:1.-.-.-)		1

**Tabla V.S2.** Enzimas pertenecientes a las vías de degradación de alifáticos en el genoma de *Klebsiella aerogenes* B, predichas por RAST, KEGG y NCBI. CDS: número de secuencias de codificación para esa proteína en el genoma.

<b>Enzimas predichas - NCBI- <i>Klebsiella aerogenes</i> B</b>		
Enzimas de la vía alifática		
		CDS
Alkanesulfonate monooxygenase, FMNH(2)-dependent (EC 1.14.14.5)		1

**Tabla V.S3.** Enzimas pertenecientes a las vías de degradación de alifáticos en el genoma de *Pseudomonas* sp. Bc-h, predichas por RAST, KEGG y NCBI. CDS: número de secuencias de codificación para esa proteína en el genoma.

<b>Enzimas predichas - NCBI- <i>Pseudomonas</i> sp. Bc-h</b>	
Enzimas de la vía alifática	CDS
Alkanesulfonate monooxygenase, FMNH(2)-dependent (EC 1.14.14.5)	1
Alkene reductase (EC:1.-.-.-)	7

**Tabla V.S4.** Enzimas pertenecientes a las vías de degradación de alifáticos en el genoma de *Pseudomonas* sp. T, predichas por RAST, KEGG y NCBI. CDS: número de secuencias de codificación para esa proteína en el genoma.

<b>Enzimas predichas - NCBI- <i>Pseudomonas</i> sp. T</b>	
Enzimas de la vía alifática	CDS
Alkane-1 monooxygenase (EC 1.14.15.3)	1
Alkanesulfonate monooxygenase, FMNH(2)-dependent (EC 1.14.14.5)	2
Alkene reductase (EC:1.-.-.-)	2

**Tabla V.S5.** Enzimas pertenecientes a las vías de degradación de alifáticos en el genoma de *Inquilinus limosus* I, predichas por RAST, KEGG y NCBI. CDS: número de secuencias de codificación para esa proteína en el genoma.

<b>Enzimas predichas - NCBI- <i>Inquilinus limosus</i> I</b>	
Enzimas de la vía alifática	CDS
alkanesulfonate monooxygenase, FMNH(2)-dependent (EC 1.14.14.5)	1
Alkene reductase (EC:1.-.-.-)	1

**Tabla V.S6.** Enzimas pertenecientes a las vías de degradación de alifáticos en el genoma de *Burkholderia* sp. Bk, predichas por RAST, KEGG y NCBI. CDS: número de secuencias de codificación para esa proteína en el genoma.

<b>Enzimas predichas - NCBI- <i>Burkholderia</i> sp. Bk</b>	
Enzimas de la vía alifática	CDS
Alkanesulfonate monooxygenase, FMNH(2)-dependent (EC 1.14.14.5)	1
Alkene reductase (EC:1.-.-.-)	5

**Tabla V.S7.** Código de acceso de las secuencias de aminoácidos en formato FASTA de las enzimas dioxigenasas de *Sphingobium* sp. (AM), *Klebsiella aerogenes* B, *Pseudomonas* sp. (Bc-h y T), *Inquilinus limosus* I y *Burkholderia* sp. Bk.

<b>AM <i>Sphingobium</i> sp.</b>				
>AM_044662235.1	MULTISPECIES:	aromatic-ring-hydroxylating	dioxygenase	[Sphingomonadaceae]
MVNYATAAIKTSVLRGLVSTKRVPLGSEVYNRLLETLYDEAAALDERRFDDWVAYLEQDLSYTAPLRLTRNGPNKDRDVVRTM				
KHFDENYGSILMRTGRFLAKSAWAEDPPSRTRRFVTNVRIAESSETAGEYEVVSYLYVERSRLDNPENETISAERRDIWRLVDGAY				
KLASREIIVDQSTLGMNSNFAIL				
>AM_044662236.1	MULTISPECIES:	aromatic ring-hydroxylating dioxygenase subunit alpha	[Sphingomonadaceae]	
MLHNAGLTLSDGTTLDDLINRDMNEVSLRVMDKELYELEMERVFARTWLLGHESEIPKAGDYVMRDMAEDNVIVSRDRSGEI				
HVMLNVCPHRGMKVCSEAAGNAHAHRCIYHGWAFRSDFSFIGAPIKEQMHGNGRSKDELGLKARVHLYGGIFATWNKDSL				
FEDYLGDAKFYLDQLFCRTDNGLEMLGPPQRFVLPCNWKIPGEQSGSDGFHTLTLHRSLSMEGGIMGGTAESIYDTAPGMGVGD				
LSVPQGHTRLCLEAAQTFKMFADVSFEKGKTEERLHLLPPPITKELIPQLFKNLSEDQVKQLANIPPQVGGMFPNIIAFAPRT				
DGGASGALSALTYVPKGDKVFVNIFAKDAPEDVVKRDMQLQNAIWSTGTSGIEQDDADTWQPQIMRNSRGMSKTVTLKYQ				
ALHGHERPEGWVGGLDYPGFTKDQTQAWWMAYYNLMAEA				
>AM_061936097.1	MULTISPECIES:	homogentisate	1,2-dioxygenase	[Sphingomonadaceae]
MGESRPFAAAMLTGFGNHFATEAAPGALPVGRNSPQHAPYGLYAEQLSGTAFTAPRAENRRSWLYRLRPAANHPYRPEAE				
TLLRSGPFDEAPPTPNRLWDPLPLPERPVDPLGLISYCGAGDPAAGEGLAVHLYANRPMEKRAFTNADGEMLIVPQQGRL				
RLTTEMGVMVDVAPEQIALIPRGVRFRVLDPLDGRTARGYVCENYGALFRPLDLPPIGANGLANARDFETPAWFEDDSPHEIVQK				
FAGRLWTTTQDHSPFDVAAWHGNLAPCRYDLRRFNTMNTVSYDHPDPSIFTVLTSPSDRAGTANCDFVIFPPRWMVAEDTRP				
PWFHRNVMSFMGLIHGVYDAKAGGFAPGGASLHNCMAGHPDKASYEGALAAELKPHRISDTMAFMFESRFAFRPTRFAME				
TPLGQLDYDDCWSGFAKAQLPQGNKA				
>AM_061936107.1	MULTISPECIES:	catechol	2,3-dioxygenase	[Sphingomonadaceae]
MAIRGLLRVGEVCVRFIDDARRHYCERMGLIETYQGDPDKLYYKVADEHDWYSLVLEKADAPGVEYFAFRTYEDAEIDHFAA				
ALTEYGLAVEHVEPGVYPKSGRRIRFTLPSGHVMHIYADKEKIGNGMPTRNPGTIPDEGYIRGFRCVRLDHVLLGGPNIVENRDIF				
YFFDPSGNRNEVFTGGYVHYPDPTLTWDTSQLGATFSQDNMPRESFLNVL				
>AM_061937024.1	MULTISPECIES:	catechol	1,2-dioxygenase	[Sphingomonadaceae]
MTEDFVNGAAVQALLDRASGLDAEGGDGRLKAIIVRELAEAVMRTIVRHDVSESEFWAAIQYFQEGAAEFGLIVPGVGLEHFMDL				
LMDARDAEAGRTGGTPRTIEGPLYVAGAPLVEGDVNLSDDPDTGTLYMSGVIRGPGEVPEGAILHVWHANSQGWYSHFDP				
TGEQTPFNRRRIIGSDGRYSFHSKMPNGYSPVPGGATDRLRALGRHGNRPAHVFFFVEAPGYRTLTTQINFGDDPFAADD				
FAFATREGLLPVNRQGDAATIVFDTELQKAGASTEEGFSLARA				
>AM_061937024.1	MULTISPECIES:	catechol	1,2-dioxygenase	[Sphingomonadaceae]
MTEDFVNGAAVQALLDRASGLDAEGGDGRLKAIIVRELAEAVMRTIVRHDVSESEFWAAIQYFQEGAAEFGLIVPGVGLEHFMDL				
LMDARDAEAGRTGGTPRTIEGPLYVAGAPLVEGDVNLSDDPDTGTLYMSGVIRGPGEVPEGAILHVWHANSQGWYSHFDP				
TGEQTPFNRRRIIGSDGRYSFHSKMPNGYSPVPGGATDRLRALGRHGNRPAHVFFFVEAPGYRTLTTQINFGDDPFAADD				
FAFATREGLLPVNRQGDAATIVFDTELQKAGASTEEGFSLARA				

>AM\_061939202.1 MULTISPECIES: catechol 1,2-dioxygenase [Sphingomonadaceae]  
 MQAKADIAITQEVIRAMSGTADPRLRQIMEVLVENLHDFARRTNLRPELDIALDFLNAVKGATNERHNEAVLLADVLGLSTLLCD  
 GDPDHAAEAEALLGPFWRMHSPTENGGTICRSATPGPKLEVHGQVIDAQRQPIAGVEVDVWHASPVGLYENQDENQVMNL  
 RGKFTTDSEGRFWFTTVLPAGYPVPTHGPVGLKAQGRHPFRPAHLHFLLWKGYETRISQVFVNDDQYIDTDVVFGVTPLI  
 GQYEKQADGSYRMRTRFAMHEGETFIPKPPID

>AM\_008829816.1 MULTISPECIES: aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase subunit beta [Sphingomonadaceae]  
 MLSPTKLECALDRLLLADANALSKDMTGWLTYAEEEQASYCRAAENTEHNLELGFMFDDCRARLEDRTVYVTEIWAGTFQ  
 DYRTRHFVQRVSHRQVDASTAEAMSNSVFMTPMDTGTQILAAGRYLDMVRSLGDRAKFLSRRALDTSVLPRLVYPI

>AM\_008831827.1 MULTISPECIES: aromatic ring-hydroxylating dioxygenase subunit alpha [Sphingomonadaceae]  
 MNDNIADLVDSRTGRQSRSIYASEDIYRQELEIFGRCWLFLVHTSQIPKPGDYFRFTMGEDDVIVIRQKDGSIKAFLNSCTHRGN  
 RICRADRGNAРАFTCNHYGWSFSPDGALAVPLETEAYFGELDRTKFGFLIPVTKVAEYKGLVFGCWANDSPSLDDYLGDAKFF  
 LDVWLDAMPGGSALLGETQKMVLGTVNWLKVPCVCGDGYHLGWAHAGAMA AVQSMQLTGLSVGNSGVLDGGLSVAGMNG  
 HMVL SALDG VSGYAFYPPDKP KPILELEANRQTVIDRLGEVGRQVWGAQVNITIFPNLQLLPGLNWFRVYHPKGPTQIEQWTWA  
 MAENDMPEAVKAQILENQCLTFLAGLF DNDGDNL TACTEQSRGWRTAQMDVYTNMALGRSGKREGFPGDIASGLVSEHNQ  
 RYFYRRWQEHHMAETWAEVPTYNINSLTDEEAHHA

>AM\_024020830.1 MULTISPECIES: aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase subunit beta [Sphingomonadaceae]  
 MLDRPLAPPPVEVIVAVTQALHREARLLNEDLDGWLAMLGKDVSYRLEKSRRFRADRSPPFLPGPGVIFNEDLGRLKMRVDR  
 LKSGFVWAEDPPNYIRRAVSNVEVLA TRADNEVRVHSVLMHRNRIDGTTAGRTDLWRSEGSAWLLAAREIVLDHSVLPD  
 SNLNAFF

>AM\_008828560.1 MULTISPECIES: aromatic ring-hydroxylating dioxygenase subunit alpha [Sphingomonadaceae]  
 MRFERIGREPDSRYMDLKEGWLDRRI FSDADI EEELYRIFARSWLFVAHESQIPNSGDFLTTHMGEDAVI VARQPDGSIRVML  
 NSCPHRGNKVCFA DAGNTRR FVC NYHG WAFDTAGDLKGMIHEEYCYDAGDIDFKNHGLKNVAKVGN YKGLVFA TFNSDAPSLE  
 AWLGDFRWYLD MILDNEEGTEFIGGCIVS ANWKFGV ENFIGDAYHAGWTHD SGTRSMNNQPFPPIDMDNSYHASVNGH  
 GWEFGTEGVGDLFLLGRP KVM DYYNKIRPKMAERLGE MRSKIFGSVAS ASIFP NVSFLPGISTFRQWQPKGPMQFELKTWIVN  
 KNMPDDIKEE VT KGVM QTF GPGGT FEM DDGEN WEN CTTV RGVVTRHERLHYRCIGRQIEHDTLPGIVRGQYNDANQRGF  
 YQRWLDMMTHDEFGKMPARPEPQLGNVGETRDLPLGLFAL

>AM\_024018961.1 MULTISPECIES: catechol 2,3-dioxygenase [Sphingomonadaceae]  
 MALTGVIRPGYVQLRVLDLDEAIHYRDRIGLNFVNREGDRAFFQAFDEFDRHSIILREADQAGMDVMGFVAKDADLDHTERL  
 LDIGVHVDVIPAGEDPGVGRKIRFNTPTQHV FELY AEMAL SATGPAVKNPDVWVVEPRGMRA TRFDHCA LNGVDIASSAKIVD  
 ALDFSVAAEVLDETSGARLGIFLSCSNKAHDVAFLGYPEDGKIHHTSFNLESWHDVGHAA DIISRYDISLDIGPTRHGTRGQTIF  
 FDPSGNRNETFSGGYIYPDNPQRLWQAENAGKAIFYYEKLNDRFMTVNT

>AM\_008828133.1 MULTISPECIES: anthranilate 1,2-dioxygenase small subunit [Sphingomonadaceae]  
 MSVAEVAQVAQSAIDDNAAYGLCLDDDRLEQWPTLFVDDCLYQVIARENVDNGLPAAMYCDSKGMLADRVALRKANVFP  
 EHFNRHLIGRAVITGAEGNQVSAEASYVVFQTRNDGETRIYNAGKYVDWF DLSGGTVRLKSRTCIYDTLRIATLLATPI

>AM\_008828130.1 MULTISPECIES: benzoate 1,2-dioxygenase subunit beta [Sphingomonadaceae]  
 MTAFHSRWLA SRFIGQEA MALDDKDWD A WL A LYHEEAEYVWP AWDD HERT ADPQNEV S LIY PNRGG LED RVF RIR TRRS  
 AASTPQPRTVHQFSLLSAEESDDQVHARTSWT SVLEGKVATLSGWAFYDLEPRDSFVIRRKKTVVTDLFQEADVYSL

>AM\_008828129.1 MULTISPECIES: benzoate 1,2-dioxygenase subunit alpha [Sphingomonadaceae]  
 ME LNDKIGRIADLQGLKGRMRAWLKKDHERGIFQLDRAAFTEAALFELEMKYIFERNWVYLAHESQVSKPNDFITTKIGRVPILV  
 TRDKSGDVGAFVNACSHRGARLCRERAGNKR NHMC PFHW TFSSGGDLLDVT DESIGGYPEAFN RADF GLQP VARVESYRG  
 FIFASLSADV VPLVDHLAGARDFIDILV DQS KSGAMEV LP GTNRYR YHGNW KMQVENG LDGYH VMTTHANYFMTVQRR VEGIS  
 KNETKAISFNGFTARDGGFSFHNGHTVLWADYANFMDRPNFEIIDWLEESYGAEKAKWMNKRIRNLQLFPNVFLMDQTSTQIR  
 IIQPLALDETEVSTVCIAPVGE SPEAR LRLRQYEDFFNSTGMATP DDLTEFNNC QTGYGAGE GRYNEMSRGSTRWDTGP GK  
 GEPLDFNVV LSSPAVADEGLYV AHD EWLMEKAIDSECSEL A F LERS LEKAR

>AM\_008828128.1 MULTISPECIES: 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase [Sphingomonadaceae]  
 MSV VTELGYLGLSVSDL AWRAYAAEVAGM EVVDEGE GDRYL RMDL W H H R I V L HAD GS D D L A Y M G W R V A G P Q E F A A M Q E K  
 LSAAGIPFTVGTEAEARERRVLG LKLADPGGNPTEIFFGPQV DTHKP FHP GRPM FGKFL TGSQGV GH CILR QDD V EAA ARF Y E  
 LLGLRGSVEYHLHLPNGMVAQPYF MHC NERQHSVAFGLGPMEKRINHLMF EY TEL DDLGMAH DV VR A K K ID VAL Q LGK H AND Q  
 ALTFYCANPSGWLWEFGW GARQAPSQQEYYTRDIFGHGNEAAGYGM DPVLL

>AM\_008828126.1 MULTISPECIES: anthranilate 1,2-dioxygenase small subunit [Sphingomonadaceae]  
 MGLPTLEQM QFQHAAQNLNAH ELID DRLE WPNL FEE KCQY SVISAENH NRSLN LA A VFCD SRGM LVDR IVSL RRAN IF PA  
 HS YR HIL GP TRV KST SGQIV TTQ TN YV VL MTR NDG QTS IYNS GK YV D QID VSG AGS RFL SKTA IF DTH LID TM MV RPI

>AM\_061939357.1 MULTISPECIES: dioxygenase [Sphingomonadaceae]  
 MRQPTL FIPHGGPCFFMDPSDPDRPHCDPMWQPMQDYL A GIVATLPERP RAILL VSGHWEESRFTVHDGEGPGPLLFD YYGF  
 PPHTYALRWDAPGAPALAR RAAGL LEQAGFPTGRE DARGW D HGV FIP MKV ALP QADIPV A QLS RGD LDP DAHL AAGR ALA PL  
 RDEGV LII GSGMSF HNL RVR GAQ AT QPSMLW D DAL TA AVTDPD PASRA QRVA A WADL PHAR FAH PREE HLLPLM VAL GAG GE  
 DAA VRD H AS NLG WA VSGY RFG

>AM\_061939457.1 MULTISPECIES: biphenyl 2,3-dioxygenase [Sphingomonadaceae]  
 MQMLDERRSEIAAKIVPPSKLAHFVRLTSRFAEMVDWYKLVMHATAAYENPGLSFLSYDEEHHRIAIVAVPDLLQDSSDVGLHH  
 IAFTYDSLHDLLNEYQLKLDLGIAPIAWAINHGPTTSLYYRDPDGNHLEFQVENFETVEESTKFFFTEEFNVNPIGVEFPDPLMRQ  
 RMLAGEDEAEELKRRPASGPVGDAVKI

>AM\_008827666.1 MULTISPECIES: aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase subunit beta [Sphingomonadaceae]  
 MTETRKPVGMELHHAIVSHSAEVRLMLQNQQYRQWFDTVIAEDIHYWMVYEQRFARDRRPDTPGDAAIYNDDYAEHQQRV  
 DRLLTGQVWMEDPPSRIRYFVTNVEAFEIAPFEFEVFSNLVHRNRRQSEVYVHTLGREDKLRKTDGFVFSRKLNIARVVQ  
 DKNLYFFA

>AM\_061939704.1 MULTISPECIES: aromatic ring-hydroxylating dioxygenase subunit alpha [Sphingomonadaceae]  
 MNGSSGLVDNAGASQSRRVFWDQDVYQLELERIFSRCWLMLGHDSLVPKPGDFITTYMAEDRVILSRQPDGSLKAFINSTR  
 GNQICHADSGSAKAFVCNYHGWFQGDGLSVDPMEERCYHSIDLDSKSLGLAPIRVETYKGFIFGCHDPEAPSLEDYLGDFCW  
 YLDTIWDGPDGGLLELVGPPLKSTLACNWVPTENFVGDGYHVGVTHAAALQMGELAGLSGNRADMPFDLGLQFTMRHGH  
 GFLGLIDNAATAIHVKRDGYVKYLEQTRGGIREKFGPERERLYVGHWNTSIFPNCSFLYGTNTFKIWHPRGPHIEVWTYTMVPKN  
 ADTETKRSIQREAIRSFGTAGTLESDDGENMSSATYNNNGIIRKGRMNSSMGKDREGPHPVPGIVGVSFIGETSYRGFYRFW  
 QEILDAPDWAAIRANDDTWDATNRNFWPERLSAKQAEPQD

>AM\_044662277.1 MULTISPECIES: (2Fe-2S)-binding protein [Sphingomonadaceae]  
 MSLSDLWVAVARSEEVTSQKPLSVDIGDQPVVLWRDNQQIARAEDRCPHRRAPLSLGCIIRDNGQIQCQGYHGWSYDGETGR  
 LKEIPNMKDQQKFQPIYKANAFAVTEQAGFVRVCLNPKAQAPLSADPKYTIVGTVNVSCSHQEYLNALYDDPSLILSIRGVRFSP  
 YLMSELHEENGLLVMERNNCQWHLHWPSHFVAEFPPLLTRHPLTGETQLTLRDDQFNNDLLHAVLSPVPSARGVTAVRWRAE  
 LGVRRPGVRAVLRGINPLSVLASVDGSKLRTAKPTVSLHGEDLRKVMLETTPAHPHDQTVA

>AM\_061934423.1 MULTISPECIES: (2Fe-2S)-binding protein [Sphingomonadaceae]  
 MNEMISVSRQKVAVTADRIPVDAYISRQDYVRLEKERLWPKIWQVACRAEEIPNPGDFYTYDIADESIAVVRQKDGTAAYFNCVCPH  
 RGRRRLTEGCGRMGKFHCKYHGQWSLDGKPTEIVDRHDWGALPDEVALQRVKGQWGGWVFINMDPDESLEDFLGEA  
 KTILDPEIEHHMRYAWRKRVIMPCNWKTAQEAFMEGYHVQTHRQLLAYQDDYTYSKAYGKHAMFGYAPTAIFGLPSPRVSDQ  
 SGDIRKGFYEFNKEIWDTLQATTQEMLAAGKRLMELPEGVDPFALYAAFAQFHAEESARSGRPFPAISGEQLMKAGTDWNIFP  
 NLVFLQQATNVLYRARPYRGDDPKC1FEVNVLERYAPGAEPKVEVEDGGDGSQWALNWGLILEQDFQNMEEVQKGMKS  
 QAFRTARTNPVQEVEISNFHRVYHEYMEKVD

>AM\_061934439.1 MULTISPECIES: (2Fe-2S)-binding protein [Sphingomonadaceae]  
 MNQPAAALQPKITRRKKAGPEDFIPKEDYVSQDFARLEQRRWLWPRAWQMACREEEIPRVGDYVTDVLDSEIIVVRVAADRIAAY  
 HNACQHRRGRRLETCGCGHAARLYCRFHGSWKLDTIAHVDRDNWDGSLKDEDIALPQVVRDWRGGFVFCMDGDAEPLLD  
 FLSPIPDVFRNYPFEMKMRWYKRTGIDCNWKTALEAFNEGQYHVQTTHTQLLPVHDDEALSFAEGRHGSYQLAPGRISLGERSP  
 RLASTQVDYRRNVREFVLMLEDLKASIPPMAELADRLVDELPEDASLLDVLMKYQGQIAFEAAQERGIPFPLPEEIGRAGAD  
 WHLFPMVFLPAPDAMLAYRAPDRNDPERCIFEVYSLVYPEGQEPALERQEFKDWRDHDAWGLILTQDFENMTEVQRGMR  
 STGFTGSRTPVQERSVSNFHRALREFIGA

>AM\_044662217.1 MULTISPECIES: (2Fe-2S)-binding protein [Sphingomonadaceae]  
 MREAALLELLNRTMEEQLKRSEHPSDFPALPPIPAGRYPDPRFEALEKDRWLNRWTLLAGIASDLPAPGSYRLFQHLDRSVILSHG  
 KDGRIRAFHNACRHRSPLLEPQGRAMRIFICPYHAWGYDLEGTLKSVPQSHDFACLDKAENGLIEVKCDTYRGFIFINFDDDA  
 EPLQNFLGEFVALTEGYPLERMVKDHFFVEMACNWKIAYHNFLEIYHVNTVHPTTLAPHLDRSRSFVIALYEGGHMRFGTRKKG  
 GESLFKTPPKPDDIAPVFLENTVALPTFPNTFFSLDPVGFNLQCFWPMGSDRSVMEVRQMGWSTDSEEDKLYWQGMRAATE  
 HILSEDLCLENIQQSLRNQNTIPSIWAGYQERALYWFEEEIDRRIGPDHVPADLRVQPRIASFIAPRSA

>AM\_061936088.1 MULTISPECIES: 2Fe-2S ferredoxin [Sphingomonadaceae]  
 MSEDERLTATPPGVALAPLDSIADGKARNFVIQMRKGRFHFVLRIGNEVRGYVDRCPHMGGLPLAQKLDLYLTPDGALIACSWH  
 GALFAPSDGACLGGPCAGAAALIPWPVTVTVEDGMIVTTV

>AM\_061936771.1 MULTISPECIES: (2Fe-2S)-binding protein [Sphingomonadaceae]  
 MVHVTFTPAVGAVATTLDGVGQSVMIDKragveniIgecgssAACATCHVHVDPAWIERVGPPSEDEWDMLDFAHGKRADSR  
 LSCQIRLRPALDGLIVHTPERQG

>AM\_061936794.1 MULTISPECIES: 2Fe-2S ferredoxin [Sphingomonadaceae]  
 MEEGQLADPDAAWSLPAWTYRDPFFELELRRIFRPSWQIVAHESDIPAPGDFRTLQYGESVILRGGDGVIRAFANVCRHKG  
 ARIVDAAAGCARKLTCPYHGWTYDRGRGLTGVPKLAGYDFDPARHGLHAVEVEDFHGFLVRLEDDGGPGVAEMMAPHGQEIA  
 AAYRFADLRAMGRMLRPRAVNWKIIGDNYSQDGLHVAVAHGPLRRLMGEGRYRVEAGPHADRMCGPILRQPSSNP SERAYQHF  
 LPRIPLGDERQRLWTYFRLWPNIADFIDYQDQVDFMQWLPLSPTRSLIREVPYAI PDERREMKAARYLNWRINRRVNAEDSALLD  
 RVQAGLSSDSFTVGPLSAQEVALRHFCARMRIIPQARLHRAPAPGWSRAA

>AM\_061937033.1 MULTISPECIES: Rieske (2Fe-2S) protein [Sphingomonadaceae]  
 MTTCTAEDLRHINRSVDDIREELGVDPVSRAISDPAIYELEREKIFRKTLKVATSWELPHVGDYKVKELPVADASVLIVRGKD  
 GRIRAFHNVCTHRGNKVPSSGFETGRSRAVNTCRFHGWVFSTDGPMRSVPMEKFGKLDTACLGLREIHCDSWEGFVFIH  
 FDAEPAQTLTDYLGDFGRLFGGYPYAESTTAFRYSTVLNCNWVKVAHYAFSEGYHVPTIHAGSLPGFKGVEHGFDFKLMGPASS  
 TIYGAGMDTAPSTLAFASMLSSTERHRPRPDQLPPAINPERRADFQFELPNLFPNFIILASGCGYPGMSFFTHQFWPLDHGRTL  
 WEGINYFRPAQNAEQVAQQHVNALHRNAWLEDTATMEDTFAGIMSGSIDAMQLMDQEFIRHAARTLDTYLAA

>AM\_061937039.1      MULTISPECIES:      (2Fe-2S)-binding      protein      [Sphingomonadaceae]  
 MMDAHRWLHEHPELGSPISIEPYIDPDWYEREREKIFRKVWLCVGRVDEIPDRGDYKVKRRAADTSVILMRGKDDVVRAHHN  
 VCAHGRNTVVTETGPETFGRSKAAIVTCRFHGWWVGADGALKHVPSEERFPCFDRQRNGLTPHTDVEGFIFVNLAEPNDN  
 SLADFLGDYAAHFAGFPFAELSYQFTYHTELECNWKVAHDAFAEAYHVDTIHAGSFPTNSTGLQNVKLMGPHRSCAVCLTLGA  
 KPTPVAGIANNIAGASLTQRAETMLPAINPDFRDDFAFELSFLFPNTLHVSEGIWFTHQFWPIAHNRTLWEGRYYYVRPPKTNA  
 ERWAIEHAMTLQRNAWLEDATMEDTQRAMQSRAKLVQNLQDDEILRHSAAVVDRYVNA

>AM\_076605796.1      MULTISPECIES:      (2Fe-2S)-binding      protein      [Sphingomonadaceae]  
 MVVCVCNAIREKDLKEVAREGCSTPCSAYARLGRRPKCGQCVFARTIIAERASI

>AM\_008829815.1      MULTISPECIES:      (2Fe-2S)-binding      protein      [Sphingomonadaceae]  
 MADATLWPKNYNEVPKAATRSDLYLEEIKRIFHGPEWHVPAHESELNPNGDFRTIRLAGIPLLIISRDEGGEVRFVNACSHRS  
 NQLETAVMGNKTEFECPYHRWLFSAKGELVGCNPREFVPGFDKADYPLGQPRFDLFYGLIFVTFSAETEPLDQFLGEAGETLR  
 ELMAGDGRLLKGYQKVRYSNWKYNDNDGYHAPLLHAFKMLNWQGGKGRQYTATKRGHVCFCESALSVASGPSVLKD  
 LIAFKGQDPSPGSRVQLPFTVSTKHLDVINLRFATPIDAETTEVHYAYFAHQNDDADMRLRHLRQSSNLLGPCGLISMEDASIF  
 HRIHIGSHTPGNAIFQKGVRDPAKLESEFSQNDESGNLPWEYYRSVMGFERAQ

>AM\_008828132.1      MULTISPECIES:      (2Fe-2S)-binding      protein      [Sphingomonadaceae]  
 MNAETMPVAAGSEPTAVDYAVYHSQAIFTAEQENIFRGGQTWCYLGLEAELANSGDFRSTHVGNTPVVTRATDGTIHWVNRC  
 AHKGATVCRSLRGNGQADGAFVCVYHQWAYDATGALGVGPFRGLKGVGCGSKEFNMAEHSLERLRLVETFGGLVFGTFNPTIA  
 PLDDFLGPVMRKYIQRVFQRPVKVLYARQFMAGNWKLYSSENSRDSYHGLLHLFYPYRQSQESAGLVSDEGYHTVFTV  
 SKPKGDVDYGSFGDEANREMQGEAKLQDERLLA弗PEIADDVGLHIQSIFPSVVQQIQNLTATRQIVPHGTDKTELWVTYFGY  
 ADDDDETTRHRLRNLNLVGPSGLISMEDGEAELCQQGTIGAEKGRSFVEMGGDDVRPSYAPMGMEDENSRGFWKGYLGLM  
 GNALADLAAEGRA

>AM\_008828127.1      MULTISPECIES:      (2Fe-2S)-binding      protein      [Sphingomonadaceae]  
 MSNQLRLCEAVGVKDGEVAAFAEGMPALAVYNVDGEIFVTDNLCTHGNAMLTGQYQDGDIIECPFHGGSDIKTGAAKAFPCQ  
 VAIASYPVEIEDGWVCCITKPEGAA

>AM\_008828125.1      MULTISPECIES:      (2Fe-2S)-binding      protein      [Sphingomonadaceae]  
 MSIAQQQDTLDQAPSTAGCRVPYRVTDRQYYDREQEKEFKGDCWSFVGLEAEVPKAGDFKSTVGETPVILTRDSGSVHVV  
 VNRCAGHAGALVCREMRCNRSSLEVYHQWAYDLKGKLGVPFRRLKGQGGMPGDFMSQHNRLQRLTESVNGLVASFSE  
 TVESCRDFLGPIVEQIERIMCKPVTVLGDQRQRIRGNWKLYAENTRDPLYHASLLHLFHTFGLYRSTQTGKALMDANKRHSLLY  
 SIAASNDDAADKQAYGDSRTFTEFKLQDMSSLKGRQEFADNVTLVILAVPNLVLQIQNLTAVRQTVTYGPDEFELVWTHFG  
 YQDDDEEMQAIRLKQANLIGPAGLISMEDGEAVEIVQNAIVGEASATSYIAMGGRAEDADHLVTEGAIIGFWDNRYRKMVGF  
 PA

>AM\_025549833.1      MULTISPECIES:      (2Fe-2S)      ferredoxin      [Sphingomonadaceae]  
 MTRVVFISADGEHKQEVAPTVLLEVAQAAQGQPLEGTCEGQMACSTCHVIVDAADFPKLKRASEDEEDMLDAAAATRTSRL  
 SCQIVLDEKLDSLTVRIPGESYNMQGM

### B Klebsiella aerogenes

>B\_015703516.1      dioxxygenase      [Klebsiella      aerogenes]  
 MSRTRMPALFLGHGSPMNVLDEDNIYTRAWRHLGETLPRPKAIVVISAHWFTRGTGVTA  
 SPELAQHLDLAPVPAVALDKEAWGFDHGSGVGLIKMYPDADIPMVQLSIDSTKPAAWHEMGRKLASLRDEGIMLVASGNV  
 NLRTARWHGESTPYPWAQSFNDYVKANLNWKGPMV  
 GSLSMLSVVVGAA

>B\_004151769.1      MULTISPECIES:      naphthalene      1,2-dioxxygenase      [Enterobacteriales]  
 MSWIGVCDAEQVQEDFPYSGNIDGKEIGIYLIDGEYYALEDVCPHAYALLSQGFVEDGKVECP  
 LNRYPVRYDNQIQUITFIEENVA

>B\_020078019.1      aromatic-ring-hydroxylating      dioxxygenase      subunit      beta      [Klebsiella      aerogenes]  
 MNTSPILNAAIQFINLEADLLDQGEFREWALWRAEGMYIIPIDQQTDFANVNLNYAYDNHEMREKRVQRLYSGESISTTPPARTI  
 RMSGRYRLLSASDKVVEVRCAQFLYERYRKGNQH  
 VADVTWLAPEGDSFRILQKVRLINGDDYLHSIGYIL

>B\_015365721.1      MULTISPECIES:      gentisate      1,2-dioxxygenase      [Enterobacteriaceae]  
 MTLSTPQSNRERQQFYQHIAQGNLTPLWESLHHLVPQTPNANCAPAYWNYQEIRPLLESQQLIGAKEAVRRVLVLENPQLRG  
 QSSITASLYAGLQLIMPGEVAPSHRHNSALRFIVEGHGAFTAVDGERTPMRPGDFILT  
 PWPQWRWDHGNGP  
 DGP  
 VVWL  
 DGL  
 DL  
 PLVNYLGCGFAEDYPQEQQPVTRKEGDYLP  
 RYANMLPLR  
 HQVG  
 N  
 SS  
 IF  
 NY  
 RY  
 DR  
 S  
 RE  
 AL  
 HD  
 L  
 T  
 H  
 G  
 E  
 A  
 D  
 E  
 W  
 D  
 G  
 Y  
 K  
 M  
 R  
 Y  
 V  
 N  
 P  
 V  
 T  
 G  
 Y  
 P  
 M  
 P  
 S  
 M  
 G  
 A  
 F  
 L  
 Q  
 L  
 P  
 K  
 G  
 F  
 R  
 S  
 R  
 V  
 A  
 K  
 T  
 D  
 S  
 T  
 I  
 Y  
 H  
 V  
 V  
 E  
 G  
 S  
 G  
 Q  
 V  
 T  
 I  
 G  
 E  
 Q  
 T  
 F  
 A  
 Q  
 K  
 D  
 I  
 F  
 V  
 A  
 P  
 T  
 W  
 H  
 G  
 V  
 S  
 F  
 N  
 A  
 S  
 E  
 C  
 V  
 L  
 F  
 S  
 F  
 D  
 R  
 P  
 V  
 Q  
 E  
 A  
 G  
 L  
 F  
 R  
 E  
 A  
 R  
 Y

>B\_020078694.1      benzoate      1,2-dioxxygenase      small      subunit      [Klebsiella      aerogenes]  
 MLNLEQVRQFLYYEARLDDDRQWDEWLSCYSPQVYWM  
 PAWG  
 DDD  
 DQL  
 TRDP  
 PQK  
 E  
 IS  
 LI  
 Y  
 P  
 N  
 R  
 E  
 G  
 L  
 E  
 D  
 R  
 V  
 Y  
 R  
 I  
 K  
 T  
 E  
 R  
 S  
 G  
 A  
 S  
 T  
 P  
 E  
 P  
 R  
 T  
 T  
 H  
 I  
 I  
 S  
 N  
 V  
 E  
 L  
 M  
 G  
 E  
 S  
 E  
 E  
 G  
 L  
 A  
 V  
 R  
 Y  
 N  
 W  
 V  
 T  
 W  
 S  
 H  
 R  
 Y  
 Q  
 H  
 T  
 D  
 A  
 Y  
 F  
 G  
 S  
 T  
 C  
 C  
 T  
 I  
 E  
 Q  
 D  
 G  
 R  
 P  
 Q  
 I  
 V  
 R  
 K  
 T  
 V  
 R  
 L  
 N  
 N  
 D  
 Y  
 I  
 R  
 Q  
 V  
 I  
 D  
 V  
 Y  
 H  
 I

>B\_047058697.1 benzene 1,2-dioxygenase [Klebsiella aerogenes]  
 MQKTLALKDKNNAALIVDRENHRYCRHRSIFTDQQQLDFEMKKHIFEGNWAFLAHESSQIAEPGDYTTLTGRQPVIITRDKKNELHA  
 LINSCAHRGAMLCRRKTGNKNSFTCPFHGWTFSNNNGKLLAKDESTGAYPDTFKHEGSQHDLQKLPRFQSRYRGFLFGSLNADVQ  
 PLEAYLGETSKIIDLIVDQAPEGLEVKGSSSYVYEGNWKLGAENGADGYHVSVVHWNWASTMSRRNYAEAGTHAVDANGWSK  
 SVGGYGFNDNHMLLWTRALNPEVRPVYAHRRERLQAEFGEELRADQMVNTRNLCLYPNVYLMDQFSTQIRVIRPIAVDKTEVTI  
 WCFAPKGEADQARALRIRQYEDFFNVSGMGTDDLEEFSCAQRGYGLGENLAWSLSRGALRWVDPDDEHARHAGFTPLSG  
 VKSEDEALYIAHHHWQTVMALAAEQEQQRYDQSITQRVEVA

>B\_015366455.1 catechol 1,2-dioxygenase [Klebsiella aerogenes]  
 MSNAFVQQEAVQKLLREGAGLNVPGGNERFKAVHRLLENICTLIDDYNVTEEEFWHAVNYLHELGGRQEAALLAAGLGLEHFL  
 DLRLQDAIDAAAHERETGPTRTIEGPLYVANAPLADSHARMDDGTAGEVMWLHGQVKDNQGQPANIAVDIWHANTLGNSFFD  
 QSQSDYLNRRRIRTGADGRYSVRSIMPSCGCPDGPTQKLDQLGRHGNRPAHIHFFVSAPGHKHLTSQINLSGDKYLWDDF  
 AFATRDGLIADPVKVSRETIAQRELDGEHTEVRFDFTLCKALSPDEEHRGARLRAKE

>B\_020078656.1 protocatechuate 3,4-dioxygenase subunit beta [Klebsiella aerogenes]  
 MNNKWSPREVVHRDYNSHPPALAPGYKTSVLSPRNALISLQNSLSEITGPVFSDDLGPLNDLNLNYAKDGLPIGERIIVHGIV  
 RDGFRPMKNTLVEVWQANAGGRYRHKKDQYALPIDPNFGGCGRVLTDENGYCFRTIKPGPYWRNQVSDWRPAIHFSLS  
 GDAWAQRLITQMYFEGDPLIKQCPIVRTINNDDAVRTLIAELDTHAAVPLDSLAYRFDLVLRGHRATLFENRTQGAAQ

>B\_015366377.1 MULTISPECIES: protocatechuate 3,4-dioxygenase subunit alpha [Enterobacteriaceae]  
 MKDYLAEATASQTAGPYVHIGLAPDAAGFHIFEKNFGPNLVAETKGQRTIEGRVFDGSGTPVRDVLLWLQANADGRYNIHPDD  
 RQQSKTLDPNFRGWGRTCSDFASGVWRFQTIKPGAVVGRDGRMMAPHNLWVVARGININLNTRMYFADEQAANEQDPVLNL  
 IEWEVRRQTLIAQREVRGDEVVYRFDIYLQGDKETVFFDI

>B\_015369889.1 MULTISPECIES: (2Fe-2S)-binding protein [Enterobacteriaceae]  
 MSECIKVKNIDSHTAETLAALVQSDRVHTCLYTSEEIFDLEIDNIFNRTWWVVAHESEIPDAGSYKSSMVGTPQPVIVVRDRKGNI  
 NVLNRCCRRAATVCEHRSKGKTNFCPTYHGWGYGLDGALRGVPHPESYGDNLNKESEGMVRLRVESYAGMIFASFNFHIDIEPL  
 TDFLGPAMWKMDLFMKQGAGYALQATTAAHRFRFPGNWKIQLENTTDGYHFPIVHKSLFSSVDKQTEEMLNFVDGKGFVEDLG  
 NGHSVMVMIPELIDLEANLDAPIPERFSELAQALREEGHDEQQVRRIVRAVGGSGFNLNLFPNVACSMAFFRVLQPIVKETEIH  
 MVLTMKDGPAPIANQARLRLHEHFQGPMGFGTDDSEAWERVQRGGGAGDDLWIMLNRGLPGEVRTADGLRSVDVAETGMRA  
 AYQQWKKYMTADNRGG

>B\_015366918.1 MULTISPECIES: (2Fe-2S)-binding protein [Enterobacteriaceae]  
 MSTIKVKVNGKLVEAKVEGNMRLLDVRDTLHLTATKEGCSIGECGACTVLMMDGNAVCSCLVLAEQCDEAEIETLEGNDNPITQ  
 KLDQAFIEKGGVQCGFCTPGVVLVSATELLTKEPHDEAQIKDVLEGNCRCTGYQPIIDSQHAIKS

>B\_012540871.1 MULTISPECIES: ferredoxin, 2Fe-2S type, ISC system [Enterobacteriaceae]  
 MPKIVFLPHQDLCPDGVVVAESGETILDAALRSGIEIEHACEKSCACTTCHCIVREGFDLSAESSEDEDMLDKAWGLEPDSRL  
 SCQARVTDELVVEIPRYTINHAREH

>B\_077203401.1 2Fe-2S ferredoxin [Klebsiella aerogenes]  
 MKRIFLRIISDTRLECQDEHPSLLAALESHNIDVEYQCREGYCGSCRMRLVSGQVDWLTEPLAFIQPGEILPCCCRAKGDIEM

>B\_077203481.1 (2Fe-2S)-binding protein [Klebsiella aerogenes]  
 MNRQPLTPPAHCTFEPQDWLRLAKCWHPVARSADIGPQPVKATLLDEKLVIYRLHERVVARDVCPHRGVPLTLGFHDAEGIIC  
 PYHGLRGEDGRCNRIPSSPNQPIPAKLNLTCAAAEHYGLVVWVCLDYDADNPPRLPTMPHWADDGFQQLTCPAEVNGFAG  
 RQVEGFLDVAHFAWIHTDTFADAENQQVPDYLPEETENGVVWDYWSTVGNYPASAGYRAPEGFQWLRRFEMHPFTATLTIHF  
 PGEARLVIMNAASPVSSRVTRMFAPIANFDLHVPEEVYAFNLRVFEEDRLMVESQRPETLPLDTLEAHIPADRSSIAYRRLK  
 RLGFG

>B\_020079694.1 MULTISPECIES: (2Fe-2S)-binding protein [Klebsiella]  
 MNATLTIIVDGEALTVPEGISVAAALALTGDPTTRQAVNGGLRAPFCGMGVCQECRTVDGLRVACQTLCRSDMQIERSRDEH  
 AAL

### Bc-h *Pseudomonas* sp.

>Bc\_h\_081564042.1 catechol 1,2-dioxygenase [Pseudomonas sp. Bc-h]  
 MTVRISQTADVQQFFEKAQGFDQAAQGNPRMKAVVHVLTDISIIEQDLQITPEEFWKAVNYFNEGLSRQEAGLVAJGLLEHLD  
 MLMADAEDAQAGHVGGBTPTIEGPLYVAGAPVSEHYARLDDGQDPGTFLMTGQVRDTAGEPLANA VVDVWHANTGGTYSYF  
 DPSQSEFNLLRRIITDAEGRYRFQSIVPSGYGCPPDGPTQQLDELGRHGQRPAHIHFFISASGHRHLLTQINLAGDQYLHDDFA  
 YATRDELIAEIRFTEDANGRRADIEFDVLQPTAADKDEVRPVERVRALEV

>Bc\_h\_081564044.1 benzoate 1,2-dioxygenase large subunit [Pseudomonas sp. Bc-h]  
 MISTLDRLARQLSESVQDDPATGVFRCRRDIFTDAELFALEMKHIFEGGWVYLAHESQVPEINDYFTTYIGRQPVVITRDKQGDL  
 HGLVNACAHRGAMLCRRKQGNKGSGFTCPFHGWTFSNAGKLLKVKDAKTGAYPDSFDGSHDLKRLSRFENYRGFLFGSLSD  
 TVPELSDYLGETRVIIDQMVQDQAPEGLEVLRGSSSYIYDGNWKLQIENGADGYHVS SVHWNYSATMGRNNYETEGTRTVDANG  
 WSKSLGGVYAFEHGHILLWTRLLNPVRPVHARAALAEERLGQERADFIVDQTRNLCLYPNVYLMDQFSTQIRVVRPISVNQTE  
 VTIYCMAPKGESAQERTTRIRQYEDFFNVSGMGTDDLEEFRACQTGYQGATNLWNLDSRGAKQWIEGADENARAMGMNPQL  
 SGVKTEDEGLFVRQHAWAASLKKAIEVEQQSLIATDKEAR

>Bc_h_081564045.1	benzoate	1,2-dioxygenase	small	subunit	[Pseudomonas	sp.	Bc-h]
MSFSRDDLALFLYRARLDDRWDEWLECYQQVFWMPAWDDYDTLTEDPQSEISLIYPNRDGLEDRVFRIKTERSSAST PEPRTAHFIANLEVLSEDAGHLELRFNWQTLSHRYKTDTYFGTSYRLDSGEQPLTRKKVLKNDYIHQVIDIYHI							
>Bc_h_081564075.1	protocatechuate	3,4-dioxygenase	[Pseudomonas	sp.	Bc-h]		
MARIIGGLAVSHTPTIGFAVDHDKQEAAWAPIFESFKPIKNWLADNKPDLFYIFNDHVTSSFDHYSAFLGVDERYEVADEGG GKRDLPAIGGHAALSRHIGNSLMADEFDMSSFRDKPVDHGLFSPMSALMPFKEGWPDVVPLQVGVLQFPPIPSAKRCYNLGKA LRRAIESTPEDLNVAIVATGGVSHQVHGRCGFNNPEWDEQFVDFVLNPERLTIETLAEYATLGGMEGSEVITWLIMRGALSAN VNVLHKDYYLPSMTGIATLLENQSREVPPVQLQRHRDHINHQLAGVEKLEGTPFTLERSHKGYRLNRFHLHNIDPSWRARFLQ NPQPLFDEHQLEEEQQLQARDWRLGIQYGVIFFLLEKLGAVVGVSNLHISAMKGMLTEEFQKTRNNQVTVSAGRQPAKAT							
>Bc_h_081564158.1	2,3-dihydroxybiphenyl	1,2-dioxygenase	[Pseudomonas	sp.	Bc-h]		
MDIIIGIGYLGFETPDLDWREYGPQVMGFGIAPSPASDKESSLFYKIDDRRHRAFHGPKVDRLAYIGWEAMGRQAFDAAIKTFEA NHVEITRGDAALCEKRGVREIRFRDPVGYQHELFYQQKWTPRSFMPGRPHGGFLANERGAGHVVITPEYDTELEDFLTRIMG FHWWGAGAGKGRTGFFRSKLNHHHTSHDIAYGHGVGRMGVQHVGLFVN SIRDVGETYDIVKKRELPMMMTLLGQHTQDPHLSFY HFTPSGFAFETIAEIEPWPQGDFELNPECLSLWGHEMVGPILGPSVKTPEEVLDPEYLASTR							
>Bc_h_074750867.1	MULTISPECIES: aromatic ring-hydroxylating	dioxygenase subunit alpha	[Pseudomonas]				
MLTRTSPVLSDGTKVADLIPSTREVQMRVLSDREIYEIEIMEKIFGKIVVLLGHESEIPNSGDFMVRDLGSDSVIVARDKEGEVHV TLNVCPhRGMRISTADCGNTQIHKCIVHGWAFRNGDFIGSPVDRCMHGKMLPKEQGLRKLARVTLYGGLVFATWNVDGPTF DEFLGDAKWWYDMLFLRSDKGMELVGPPQRFIVNANWKTAGEQSAADGFHTLTLHWRWLGEVGNYAKKDENGQSADSLSPEMY GVEISSPHGHALRCIDLARKIKRLTGLDPESLTVEEKLQLALPPAGMTADMVEQLARNLSEDQLKVLTSMPPQVGMFPNILFGFV YIPQPDGTVGSMTLHAYVPQGPDKLEFVNWIFAEKDASPELREKMLQTQLFGTSGMVEQDDSDTWPHMTLAAGAMGRKS TLKYQAVFETGAPEGWPGPGIVNEGFTKDDTQWHWWLYWHELMATPGEDQ							
>Bc_h_081564165.1	aromatic-ring-hydroxylating	dioxygenase subunit beta	[Pseudomonas	sp.	Bc-h]		
MSDTQLAEKPRDVQQRGADHVQPGSPLGIKRPVPGSPVYNEVVTFLYEEATL LDQIRLQEWAA RLATD LIYT VPLRHTRTAAEL SATIVRSVQHYHDDYRSIMGRILRLSGKSAWAEDPPSRTRRLVTNVFVEETEKPDEFIVTSYLLTRSRFKDHHVDIISGERRDLL RVDGDSFKLARREVILDQAVLGTPNLAVFL							
>Bc_h_081564579.1	4,5-dioxygenase	[Pseudomonas	sp.	Bc-h]			
MSPVEGYHAHVYFDAQTIEQARALCESVAAKFDIMGRVHERPVGPHPDWSCQLAFEHEKFADVMLHLALHRDGLVIFTHPNT GDDLADHTRHAIWMGGIRDLNVGMFRR							
>Bc_h_081565629.1	Fe2+-dependent	dioxygenase	[Pseudomonas	sp.	Bc-h]		
MLLHIPGLAREEVLRVREALEQTEWADGKITAGHQSAKAKHNLQLPEGHPLAKEIGAACMLELWQNPLFMSAALPHKVFPPVLN CYTGGGSFDHFIDNSVRQARGSVERVRTDLSSTLFFSDPDDYDGELVIQDTFGTRQIKLPAGDMLLYPATSLHKVNAVTRGAR YASFFWTQSQLVRDDGHRTLLFEMDTAIQQLSRDVPDHPSLIQLTGTYHNLLRQWVEV							
>Bc_h_081567492.1	dioxygenase	[Pseudomonas	sp.	Bc-h]			
MFPSLFISHGSPMLALEPGESGPALQRLAAELPRPKAIVVSAHWESNELLVNGNPQPETWHDFGGFPAA LF AVQYPAPGLPEM TRHVTELLAAADLPARIDSRRPFDHGVVWPLSLMYPQADIPVQVSLPTRMGPALQTRVGQALSRLREEDVLVIGSGSITHNLRE LDWHAGPESIEPWALSFRDWVMEKLAANDEEALHDYRRQAPNAVRNHP SDEHLLPLYFARGAGGDFGIAHQGFTM GALGMDI YRFG							
>Bc_h_081568136.1	protocatechuate	3,4-dioxygenase	subunit alpha	[Pseudomonas	sp.	Bc-h]	
MPVQILPETPSQTAGPYVHIGLA EAAGNPPREQE IWNEMARPDAPGEHILLGHVYDGNGHLIRDSFLELWQADADGHYCDY DL SKAFNSFGRTATTDEGEWLVKTIKPGVVRNAAGVPMAPHVN VSLFARGINIQLQTRLYFDDEAQNNAVDPVNLIEQPQRQ TLIAKRCTVDGKLAYRFDIRVQGIDETVFFDF							
>Bc_h_081568137.1	protocatechuate	3,4-dioxygenase	subunit beta	[Pseudomonas	sp.	Bc-h]	
MSDAHDSRFAIRDRNWHPKALTPDYKTSILRSPRQALVSI PQSIS ET SGPDFTHLQFGRHDADLLNF DNGGLPIGERIIVAGRVID QYGKPV/PHTL VEMWQANAGGRYRHKKDAYLAPLDPNFGGVGRCLTD RDGNYSFR TVKPGPY PWRNGPNDWRPAHIFSISG PSISTKLITQLYFEGDPLIGMCPI/KSIA DPAVQSLIARLDMMSMANPMDCLAYRF DIVL RGQRKTHFEN V							
>Bc_h_081568994.1	homogentisate	1,2-dioxygenase	[Pseudomonas	sp.	Bc-h]		
MFSAPASEALRYQSGFGNQFSSEAVPGGLPTGQN SPQRHPLGLYAEQFSGTAFTVARAEARRTWLYR KPSAAHPRFQRLER QITGQQQGPITPNRLRN AFDVPAEPTDFIDGLIALASTSAADQAEGVSVYVTANRSM QRAFFNSDGEW LIVPQQGRLRIITEL GLLDIEPQEI A VLP RGLKFSVQLLDGEA RGYICENHGCA RL PDLGPIGSNGLANPRDFQAPVACFENSEQPT ELVQKFLGELWA AQLDHS PFDV/VAWHGNVNPVYK YDLRLFNTIGTVSYDHPDPSI FT VLTSPSATHGQANVDFVIFPPRWMVAENTFRPPWFHRL MNEFMGLIDGAYDAKAEGFMPGGVSLHNCMSA HGPDNATAEKAMAADLKPHKIEQTMAFMFETGKVLRPSRHALECPQLQSD YDACWNGIARTFKPFDTSQR							
>Bc_h_081564050.1	2Fe-2S	ferredoxin	[Pseudomonas	sp.	Bc-h]		
MSATVFD PGVQNLAI PQLATFPVNQWYVAALSKELKDAPLARTLLGFPVLFRCADG SVA ALEDRC CCHRALPLSNGTLEERGIR CGYHGLLFD SAGK CIEV PGQDRIPG KAKV PAYV VREK DQIWI WHGSEAH P EPLFEP PAYDVHSS GLY LYDGDV YHYDAP YQLI HDNLLDLSHLGYVHLHTIGG N ASIHMN ARMEVQ SDDQ KV RV VRQMLD SVP PPTY TAAY PFLGN DRWQEIEFHV SHL RIWTGA VDAGTESIDDPDRGGFHM RGFHG VTPET TSHY FW TIATNPL SDPEAVKAKV VEQTVLTFDEDK VVIEAQYRN MCR FGK PATV DIHVDVGANRARIIERL RQD							

>Bc_h_081564056.1	(2Fe-2S)-binding	protein	[Pseudomonas	sp.	Bc-h]
MTFSRIFLCRQDEIVDGSARGFDPHAQGRDTLLVWRWGRVLRAWLNRCPHMDVAMQYRKDRMSGDGQHIVCFAHGALFQP DDGRCVLGPGCLQQPIIDEGGAVVLMTPAQPLTA					
>Bc_h_074750895.1	MULTISPECIES:	(2Fe-2S)-binding	protein	[Pseudomonas]	
MPVLTIEFNTEHRVNADIGQSVMQAANFANVPGHQACGGACSCATCHAFIDDAWLARVPAAEETESDMLDYACGRAENSR LTCQLIVSDALDGLVLRLPESQY					
>Bc_h_081564303.1	(2Fe-2S)-binding	protein	[Pseudomonas	sp.	Bc-h]
MELRINQKTYQVDADADTPLLVIRDDLGMTKYGCGLAQCGACSVLVDGNVRSCVTPVAGVVGVREVTIEAIEADEVGKRV VATWVDLQVAQCGYCQSGQVVAATALLQNPKPSDAQIEAMVNLCRCGTYNIAHAAVHELARGRGDAS					
>Bc_h_081565022.1	Rieske	(2Fe-2S)	protein	[Pseudomonas	sp.
MDVTATLSLGDPLEPARKATAEMLQNRRERTFSLPQPFYSDERLFEIDMQUEIFQKEWLAVGMTCEIPAKGNFLTLQIGKNPILVVRA PDGSVNAFHNVCRHRSRLCTKEKGKVALVCPYHQWTYELDGRLLYAGTEMGADFDMKQFSLKPVNCKVAGGYIFSLAANP PAIDEFLQTNHYMEPYDMENTKVAVQTTLMEKANWKLVLENNRRECYHCNGSHPELLNTLEWDVDVTDPRADQAFKDHVAAASA AAWEAEKIPFAHKSFGLRNRRIVRMPPLLKGTVSMTMDGKQGSQKLMGRIKNPDLGSMRILHLPHSWNHCMGDHVIVFTVWPISA QETMVSTKWLVHKDAVEGVVDYDVARLREVWDATNDQDRRLAENQRGINSIAYQPGPYSKTYEFGVVNFIDWYSAKLLENMG AEPAPYLKGAVAVNHE		Bc-h]			
>Bc_h_062383494.1	MULTISPECIES:	ferredoxin,	2Fe-2S type,	ISC system	[Pseudomonas]
MPQVIFLPHEHCPDMVVAETGKSILEVHDNHIEIESACGGVCACTTCHCIIREGFNSLEEADELEEDYLDRAWGLEAQSR LSCQAKVGTEDLTVEIPKYSLNHAAEAPH					
>Bc_h_081566460.1	(2Fe-2S)-binding	protein	[Pseudomonas	sp.	Bc-h]
MQTVNINGENHQLDPDQMPLLWVLDVLGLTGKTYGCIAQCGACTVHLDGTAURSCVLPVSAAGHAITTEIEGVGETPVGRS VQQAWLAHEVVQCGYCQSGQIMAASALLHHTPKPDDQAIIDSAMSGNLRCATYTRVRAAIKAVNL					
>Bc_h_081566511.1	(2Fe-2S)-binding	protein	[Pseudomonas	sp.	Bc-h]
MSATNLKEFAEHAIALTNGQTRQLNVNPWATLLDVLREQLDLVGTKKGCDHGQCGACTVLRDGKRINACLTAVMCDGAELTT IEGLAEVDVLHPMQQAFIKHDAFQCGYCTPGQICSAVGLANEGRARTADEIKELMSGNLRCGAYSNILAAVEEALPQSATKDG GRQA					
>Bc_h_081567279.1	(2Fe-2S)-binding	protein	[Pseudomonas	sp.	Bc-h]
MSEQQPAQKTVTLNVNGQSSVTAMADTPLLLIRNDLQLNGPKYGCGLGECGACTVIIDGVAARSCVPLAGAEGREITLEG GSRQCPHPVQQAFIDEQAAQCGYCMNGMIMTAKALLDRNPHPSETEVRHESANLCRCGTHIEILRAVMRAARQQS					
>Bc_h_081567613.1	(2Fe-2S)-binding	protein	[Pseudomonas	sp.	Bc-h]
MPELSIDGQPFRFAQGTTVAAALMSSGDRCSRTSVSGQRRAPLCGMGICQECCRVNIDGLRRRACQTICREGMRVETH					
>Bc_h_081567800.1	(2Fe-2S)-binding	protein	[Pseudomonas	sp.	Bc-h]
MYVCLCQGVTDGQIREAIMEGCCSYREVRETLGVASKCGCACLAKEVRETTELQTTQAALAYPAEYSA					
>Bc_h_081568486.1	(2Fe-2S)-binding	protein	[Pseudomonas	sp.	Bc-h]
MITLNVNGKDHQLDIDPDMPLLYALRNHLQLNGAKYGCGLGQCGACTVMVGDKPVFSCLLPAEAASGKAVRTVEGLGSAEKPG TLQKAFIEQQAAQCGYCIAGMIMRAQALIEEVANPSDEQIREHMAPNLRCGTHLRFSAIKAVIASGVKP					
>Bc_h_081568541.1	(2Fe-2S)-binding	protein	[Pseudomonas	sp.	Bc-h]
MNLIAVSSHQPVTAADGCQDPVLLNDWHVVGYSDFVAGTIYPRVLLERELIWRSEDGSIHVWEDLCIHRGARLSKGWIKNDS VVCYHGWEYNGSGACTLMPAAPDEKPMKKAKAFPSAVERYGFVWTCLEGPEDAIPVFPEWDDDEVFMVKHSGPYPYAANG FRAVENFIDASHFPFVHAGLNGVMDKDRLEPYTVEEVDSGLRSSEVRVFPWGDARGKPLVAFYTYHAFRPLVGYFSKRTQD SDTEGNVISDQSDTFATLFTVQPLDAVNCIVRVCAAMNVSPRPDEAVERADVVFGQDRDIVESQRPERIPTELRYELHRTDL MGQRYRTWLRNKGISYGV					
>Bc_h_081569084.1	Rieske	(2Fe-2S)	protein	[Pseudomonas	sp.
MTYTKSRHIAPQLVKAYWHPLCLKSQVADDKDFVRFNVLDFEVVFNDAgnLIAFDNRCPHRGTRFFTEDSGRQRILCPYHW NYSAQQLRIPDAKSFGCIGKANLNNFKLAFCGDLVFFGIEPRATLIDQLGKDIYALIEQTTTHLQRADVDFNRYAFESDWPISEN ALEPYHIPLVHRDTLATLKLKGGENVFGGENSIWYSPVENEKVARRLESLSKFFVPHEAFSGYMSIFLYPFSMLSSTYGYWSMSQ NFFPSTHADRTWFTSQLYPLSAASDRYQEIVSTFMASTAQNNAFVDEDHSICKRIPGDTWSWDAPRFHSSLEAKLLHFRASCA EWAQQAGAITTSDEDPV		Bc-h]			
<b>T Pseudomonas sp.</b>					
>WP_081516585.1	protocatechuate	3,4-dioxygenase	subunit	beta	[Pseudomonas sp. T]
MSDAENSRFVIRDRNWHPKALTPDYKTSIARSPRQALVSIPQSSETSGPDFSHLKMGHEHDNDLLNFNNGLPIGERIIIVSGRV MDQYGKPVPTHLVEMWQANAGGRYRHKNDRYALAPLDPNFGGVGRALTSEGRYFRTIKPGPYPWRNGPNDWRPAHIHSIS GPSISTRLITQLYFEGDPLIPMCPIVKSIANPDAVESLIAKLDMSNANPMDCLAYRFDIVLRGQRKTHFENQ					
>WP_081516586.1	protocatechuate	3,4-dioxygenase	subunit	alpha	[Pseudomonas sp. T]
MPIELLPETPSQTAGPYVHIGLALAAAGNPARDQEIWSEMAMKPGAPGEHILLIGNVYDGNGHLLRDSFLELWQANHEGVYDAAYD QEKPFGNGFGRATTDFAGEWQVQTICKPGVVKNAAGVPMAPHINLSLFARGINIHLQTRLYFEDEAQANAADVPLNLIEQPERRQT LIAKRCEVDGKLAYRFDIRVQGNAETVFFDF					

>WP_081516597.1	benzoate	1,2-dioxygenase	large subunit	[Pseudomonas sp.	T]
MSLGIDYRLSLEEDPAKGVYRCRREMFTDPRLFDEMKHIFEGNWWYLAHESQIPEKNDLTTMIGRQSVFIARNKDGVLAFL NACSHKGAMLCRHKGNSRASYTCPFHGWTNFNSGKLLKVKDPAEAGYPEGFNCEGSHDLTKVARFESYRGFLFGSLKAEVKP LVEHLGESAKIIDMIVDQSPEGLEVLRGSSSYIYEENWKLTAENGADGYHVSSVHWNYAATQSQRQQREAGEEVKTMSAGGW AKHGGGFYSDHGHLWSRWANPEARPAFERRDELARDHGRARADWMIENSRNLCYPNVYLMDFSSQIRIARPIDVNRT ITIYCIAPRGESSEARAQRIRQYEDFFNVSGMATPDDLEEFRSCQQAYQGSAGGWNDMSRGAQHWIDGADDAAREIDLAPALS GVRTEDEGLFVLOHQYWQQIMIDALAAEQANRIAVTEEVG					
>WP_081516598.1	benzoate	1,2-dioxygenase	small subunit	[Pseudomonas sp.	T]
MSRYESVRDFLYREARYLDDKDWDWAWLELYAADATFWMPSWDDRDQLTEDPQREISLIWYGSRGGLEDRVFRIKTERSSATLP DTRTSHNLSNIEVLGEADGQCQVRFNWHTLSFRYKTVDSYFGTSYLDVRGEQPLVKAKKVLKNDYVRQVIDIYHI					
>WP_081517413.1	Fe2+-dependent	dioxygenase	[Pseudomonas sp.	T]	
MLLHIPGVFTRDEVTRIRAALQAWEADGKVTAGYQSSRAKHNQLPQDHPLAREIGEAMLQLRWSNPLFQSAALPSKVFPPLF NCYTGGGSFDHFIDNAVRDTQGGRERVRTDVSSLFFSDPEDYDGELVIQDITYGTQQVQLPAGDLVLYPATSLHKVNPVPRG ARIASFFWTQSLVREDSQRALLFQMDQSIQLTRDVPDHAPIELTGTYHNLLRRWVVD					
>WP_081518632.1	dioxygenase	[Pseudomonas sp.	T]		
MLPALFISHGSPMLALTGPASDAPLKLARELPRPKAILVVSAHWETPDLRVTASARPDTWHDFYGFPPELYAVQYPAAGSPEL AQRVVELLAEDGLPATLDAERPLDHTWVPLSLMYPAADIPVVQLSPLSPRLGATMQHРИGAALRALREEGILLIGSGSITHNLGEL DWHAGPEVITPWAKVFRDWVMQHLEADDEAALFDYRQQAPHAARNHPRDEHLLPLYFARGAGGSAMTVEHAGFTLGALGMDI YRFG					
>WP_081518917.1	dioxygenase	[Pseudomonas sp.	T]		
MSDVQALREDGFVLLHGLLDAEQVAEVTLIDDLRPLHWDYEGLVDHYKCVFNRSPSWLPFLDPPGLIELAEAAALGADCHVGQ TAWRCHPGFIGAEMHQDYLPLVALPGADLELPMFICTAQIYLDDIDDALCPTWVPGSHRAGRAPPDEREWAGRATPEVLCRAG DCLLFRSDLWHAGSCNLSERTRYLLQVHYGRRMVAQKFSPYLDWTFNPEVLAACTPRQRLLGDHEEAEYD					
>WP_081518947.1	4,5-dioxygenase	[Pseudomonas sp.	T]		
MSEIQDFHAYVYFDAGSIERARALCEEARRFGAKMGRVHERPVGPHPDWSCQLAFDNATFATLVPWLALNREGLVILIHPNTG NDLRDHRDYAMWLGAVRPLDSLQFTS					
>WP_081519226.1	4-hydroxyphenylpyruvate	dioxygenase	[Pseudomonas sp.	T]	
MNAVTKIEQHNPIGTDGFVFETAPDAQGIQQLRQLFTGMFTETAKHRSKEVFLFQQNDINIVLNGSPTGHVHEFAKKHGPSA CAMAFRVKNAAAQAAAYVESQGAKLVGSHANFGELNIPCVEGIGGSLLYLVDRYGDKSIFYDVFEEFIEGRTANDNAVGLLCIDHLT HNVKRGQMDVWSGFYERIANFREIRYFDIEGKLTGLLSRAMTAPCGKIRIPINESADDKSQIEEFIREYHGEQIQHIALTTEDIYATV RQLRANGVDFMSTPDTYYAKVDTRVAGHGEPLEQLRELNILIDGAPGDDGILLQIFTNTVIGPIFFEIIQRKGNQGFEGNFKALFE SIEEDQIRRGVISDQ					
>WP_081519703.1	dioxygenase	[Pseudomonas sp.	T]		
MSDDLIDWLQTLMRERAERAGARVMLDSLRLQADEAVARNRLERLHQGEAESCRRLRRCLERLGATPDTGVGDFHASAMAIDDLEL RFDFIGRGQRWVARQITQRLPEIHEPWLRREELEAVRLRLHQ					
>WP_081519806.1	homogentisate	1,2-dioxygenase	[Pseudomonas sp.	T]	
MTASPAYQSGFGNEFTSEALPGALPGVMNSPQQVPLGLYAEQFSGTAFTVPRSEARRTWMYRIRPSAAHPRFERLERQITGTA LGPVTPNRLRWNSFATPPEPTDFVGGLCMAANAEAEACSGVSLYAYRANISMRRFFNADGELLIVPQAGRLRLTELGVLELE PLEIAVIPRGMRLRVELLEAGAAGYVAENHGAALRLPDGLPIGSNGLANARDFLAPVAHYEDVEGPVQLVQKFLGELWATQLDH SPLDVVAWHGNNVPYKYLRLRFNTIGSISYDHPDPSIFTVLTSPSDTHGMANMDFVIFPPRMVAESTFRPPWFHRNLMNEFM GLIQGVYDAKADGFVPGGASLHNCMSAHPDNATTQAIADLKPHKIDKTMFETGRVLRPSRFALDCPQLQRDYDSCWS GMQKTFDPSSEQ					
>WP_081516727.1	(2Fe-2S)-binding	protein	[Pseudomonas sp.	T]	
MADPLSLVNVNGPQRQLAVAADTPLLYVRLNDLQLNGPKFGCGLGECGACTVHLDGVATRSCITPVSAAALGRQVTTLEGLGTLES PHPVQQAFIDEQAAQCGYCTNGMVMTSAALLARNPKPSDDEIRQELAYNLCRCGTHIEILNAVRRAAGRGDDGQGSPA					
>WP_081516800.1	(2Fe-2S)-binding	protein	[Pseudomonas sp.	T]	
MITVNNGKDHELDAPGEMPLLWAIRDVAGLTGKYGCGMALCGACTVHIDGQPTRSCVTPLAAVAGKKITIEAVAEEQAAGKA VQEAWRKLDVVQCGYCQSGQIMSATALLASNKPSDADIDAAMSGNICRCATYARIRAAIHDAQTLA					
>WP_081516811.1	Rieske	(2Fe-2S)	protein	[Pseudomonas sp.	T]
MSAHEYRLIARSRSVEELVGDDRVDSLYNDPQLFEVEMDKIFYRTWVVAHESEVRNAGDFKTTSGVRRPVIVVRDKKGTTINV LENRCRHRGATCEKHKGNAFTGFTCPYHSWSYALDGKLRALPYPDGYEDILDKSELPLTLSRVESYAGMVFATYDEIEPLEDF LGGAKHWMDFMKQGAGYPIKTQGEHKFTFRGNWKIQLENTTDGYHFPVHKSFMSVDEETEELMSFMSDEQAVTHALGNG HSVVMVMPEHVLDHDDGTEQLQERFAHYTEELSKTMPEQVRRIVRSLHAGFNLNLFPNVAMMSMSFFRVLRPISVTETEIRH VALGMDGGPEIANRERMRIHEHFQGPFGFGSPDAEAWDRVQRGSYAGVDAPILVNRGLNREVVAENGDKVSHATDEGGMR EAYQMWKRMMSQ					
>WP_081516847.1	Rieske	(2Fe-2S)	protein	[Pseudomonas sp.	T]
MSCSIRIPADRLPARGGRSLLHHEKGIIILFDIDGELHAIDDRCPHAGASLFSGRLDGRWLQCPAHGLRFDLATGCPAGIKGFLQ RYEIEWRANEKYVVLARQEVP					

>WP_081516880.1	(2Fe-2S)-binding	protein	[Pseudomonas	sp.	T]
MELRINQKTYEVDAEADTPLLVIRDDLGLTGYCGLAQCGACSVLDGNVVRSCVTPVAGVVGREVTITIAIEEDEVGKRV VTAWVEHQVAQCGYCQSGQVMAATALLKQTPEPTDAQIDAAMINLCRCGTYNAIHAAVHDLATAATSQEKV					
>WP_081517234.1	(2Fe-2S)-binding	protein	[Pseudomonas	sp.	T]
MPELILDGRPLRVAAGTTAAALALGGDGTRTSVSGQRRA PLCGMGVCQECRVSIDGQRRACQTL RDGMQVETRP					
>WP_081517708.1	(2Fe-2S)-binding	protein	[Pseudomonas	sp.	T]
MYVCLCNGVTDTQIRDAYDGA NYREVRECTGVGTQCGKACLA KVQVRDTLGELQSAQM NYN LAYAAG					
>WP_081518477.1	2Fe-2S	ferredoxin	[Pseudomonas	sp.	T]
MIPSPIATFDPAAPTGPQDFPQDRWYVAGFAWELGDKPLARTLLGQPLVLFRTAEGSVA ALEDRCCHRALPLSLGTLEQDGLRC GYHGLLFGADGRCLEIPGQAKVPGKALVKA FVL RERDQILWLWHGSGAPDREPPAYPHD SGQYRF GG DVYHYAAPWQLIHD NL LDLSHLGYVHLRTIGGNARIHMNAQM QVSGDEQS VRVVRHMLDSEPP TYRDAYPFKGRIDRWQEIEFQPSHLCIWTGAVD AGSEPIDT PERGGFHLRGFH GVT PETKETCHYFWTQATNPQADPEENLSRVLEQTRLTFDEDKQVIEAQYANLLRFGERPMVDI HVDAGANRARIIASLLAGQA					
>WP_081518485.1	(2Fe-2S)-binding	protein	[Pseudomonas	sp.	T]
MDCVALCRLDELGE GQS RGFDPQGRGADSLF ALR HQGRV RVRN LCP HLS VPLEYRKDRFLSADGQWVICYAHGARFRPED GACVHGPCRGDVLPALQHREADGWLLLPLAQLDA					
>WP_081519128.1	Rieske	(2Fe-2S)	protein	[Pseudomonas	sp.
MDVTTLSLGDPLEPARKATAEMLRSRDHSFSLPQPFYNDERLFLQ LDMQEIFHKEWLIA GMCTEIPAKGNFLTLQIGDNPVIVLR GAEGKJIAHFHN VCRHRSR LCVSDKGKVAKLVC P YHQW TYE LDG RLL FAG TEMGADFD MKNYS LKP VN VTAGGYI FISLSEN PPAIDDFLRTLEH YM EPY DMENT KVA QTTL MEK ANK VKL VLENN RECYHCNGSHPE LLNT LEW D D V DP R ASQ AFKD QVA AC TTAWEA KI PYA HES FGL RN R VRM P L L Q GT VSM TMDG KQGS KKL MGR I QNP DL GS MR IL H L P HS W NH CM GD H LIV FT VWP ISA QETMVTTKWL VHK D AVE G VD Y D V ARL R E VWD AT ND QD R R L A E EN Q R G I N STAY Q PG P Y SK T Y E F G V I N F L DW Y S E R L L N LG EE SAH AR L V AE K					T]
>WP_024764769.1	MULTISPECIES:	(2Fe-2S)-binding	protein	[Pseudomonas	
MANRPLNLNTLNGQT VGP VEPEDLPMIDYLHEYQNL TGS RL GCG QGICHACVVIVDNP DTSEE VRTC ITGA HYFEGKKV RTIE GHAKREEDGSV KELN PIQQKF VDR FAF QCS YCAP GFVN AAT VL V EKA QR QPL K SELE STIE A SL GH HIC R CTG YV R YY DATRE VLT D GLV KEG					
>WP_081516727.1	(2Fe-2S)-binding	protein	[Pseudomonas	sp.	T]
MADPLSLVNVQPRQLAVAADTPLLYVLRNDLQLNGPKFGCGLGECGACTVHLDGVATRSCITPVSAALGRQVTTLEG LGTLES PHPVQQAFIDEQAAQCGYCTNGMVMTSA ALLARNP KPS DDEIRQELAYNLCRCGTHIEILNAV RRAAGRGDDGQGSPA					
>WP_081516800.1	(2Fe-2S)-binding	protein	[Pseudomonas	sp.	T]
MITVN LNGKDHELDAPGEMPLLWAIRDVAGLTGYCGC M ALCG ACTVHIDQ P T R S C V TPL A AVAGK KIT TIE A VAE Q AAG KA VQEAWRKLDV VQCGY CQSGQ I MSAT ALLA SNK P S DAD IDAAMSGN I RCAT YARIRAAIHDAAQTLA					
>WP_081516811.1	Rieske	(2Fe-2S)	protein	[Pseudomonas	sp.
MSAHEYR LIARS RS VEELV GDD R DVDS LYNDP QL FEV EMDK I F YRTW VVVAHESEVRNAGDFKTT SVGRRP VIV/ RD KKG TINV LENRCRHRGATVCEKHKG NATGFTCPYHSWSYALDGKLR ALPYPDGYEIDL KSEPLTSLR VESYAGMVFATYNDIEPLEDF LGGAKHWMDFMKQGAGYPIKTQGEHKFTFRGNWKIQL EN TDG YHFPVHKS FMSS VDEETE EMLS FMS D EQAVTH ALG NG HSV MV MV PEH VD LHD DGTEQLQERFAH VTEELSKTM PPEQ VRR I VRS LHAG FNL NLFP NVAMS MSFF R VLR PIS V TET EIR H VAL GMDGGPEI A N RER M R I HE HF QGP FG F GSP D DAE AWDR V QRG SYAG V DAPI LVNR GLN REV AENG DKV SHAT DEGG M R EAYQMWKR MMSQ					T]
>WP_081516847.1	Rieske	(2Fe-2S)	protein	[Pseudomonas	sp.
MSCSIRIPADRLPAR GGRSLLHHEKG ILLFDIDGELHAID DRCPHAGASL FS GR L DGR WL QCPA HGL RF D L AT GCPA GIKG FGL Q RYEIEWRANE CYV V LAR QEV PA					T]
>WP_081516880.1	(2Fe-2S)-binding	protein	[Pseudomonas	sp.	T]
MELRINQKTYEVDAEADTPLLVIRDDLGLTGYCGLAQCGACSVLDGNVVRSCVTPVAGVVGREVTITIAIEEDEVGKRV VTAWVEHQVAQCGYCQSGQVMAATALLKQTPEPTDAQIDAAMINLCRCGTYNAIHAAVHDLATAATSQEKV					
>WP_081517234.1	(2Fe-2S)-binding	protein	[Pseudomonas	sp.	T]
MPELILDGRPLRVAAGTTAAALALGGDGTRTSVSGQRRA PLCGMGVCQECRVSIDGQRRACQTL RDGMQVETRP					
>WP_081517708.1	(2Fe-2S)-binding	protein	[Pseudomonas	sp.	T]
MYVCLCNGVTDTQIRDAYDGA NYREVRECTGVGTQCGKACLA KVQVRDTLGELQSAQM NYN LAYAAG					
>WP_081518477.1	2Fe-2S	ferredoxin	[Pseudomonas	sp.	T]
MIPSPIATFDPAAPTGPQDFPQDRWYVAGFAWELGDKPLARTLLGQPLVLFRTAEGSVA ALEDRCCHRALPLSLGTLEQDGLRC GYHGLLFGADGRCLEIPGQAKVPGKALVKA FVL RERDQILWLWHGSGAPDREPPAYPHD SGQYRF GG DVYHYAAPWQLIHD NL LDLSHLGYVHLRTIGGNARIHMNAQM QVSGDEQS VRVVRHMLDSEPP TYRDAYPFKGRIDRWQEIEFQPSHLCIWTGAVD AGSEPIDT PERGGFHLRGFH GVT PETKETCHYFWTQATNPQADPEENLSRVLEQTRLTFDEDKQVIEAQYANLLRFGERPMVDI HVDAGANRARIIASLLAGQA					

>WP\_081518485.1 (2Fe-2S)-binding protein [Pseudomonas] sp. T]  
 MDCVALCRLDELGEQGSRGFPQGRGADSLFALRHQGRVRVYRNLCPHLSVPLEYRKDRFLSADGQWVICYAHGARFRPED  
 GACVHGPCRGDVLPALQHREADGWLLLPLAQQLDA

>WP\_081519128.1 Rieske (2Fe-2S) protein [Pseudomonas] sp. T]  
 MDVTTLISLGDPLEPARKATAEMLRSRDHSFSLQPFYNDERLFQLDMQEIFHKWEWLIAGMTCEIPAAGNFLTQIGDNPVIVLR  
 GAEGKIHAFHNVCRHGRSRLCVSDKGKVAKLVCPTYHQWTYELDGRLLFAGTEMGADFDMKNYSLKPVNVKTAGGYIFISLEN  
 PPAIDDRLTLEHYMEPYDMENTKAVAVQTTLMEMANWKLVLLENRECYHCNGSHPELLNTLEWDDVTDPRAASQAFKDQVAAC  
 TTAWAEAKIPIYAHESFGLRNRRVMPPLLQGTVSMTMDKGQSKKLMGRIQNPDLGMSMRILHLPHSWNHCMGDHLIVFTWPISA  
 QETMVTTKWLVLHKDAVEGVVDYDVARLREVWDATNDQDRRLAENQRGINSTAYQPGPYSKTYEFGVINFLDWYSERLLNNLG  
 EESAHLVAK

>WP\_024764769.1 MULTISPECIES: (2Fe-2S)-binding protein [Pseudomonas]  
 MANRPLNLTLNGQTVGVPVEVPEDLPMIDYLHEYQNLTGSRLCGCGICHACVVIVDNPDTSEEVRTCITGAHYFEGKKVRTIE  
 GHAKREEDGSVKELNPIQQKFVDRFAFQCSYCAPGFVNAATVLEKAQRQPLKSELESTIEASLGHICRCTGYVRYYDATRE  
 VLTDLGLVKEG

### I *Inquilinus limosus*

>WP\_088149737.1 ring-cleaving dioxygenase [Inquilinus] limosus  
 MRSNGIHHVTAIAGGAQRNLDFFYTRVLGLRLVKKTVNFDPPGTYHLYGGDETQPGTILTFFPWAHVAPGRVGVGETQETVFRV  
 PEGSGVYWLQRFVEKSVPHQAVEQRFGETILAFKDPDMRLLAVPGIAGEPGWAGGDIPAEHAIRGFSVSLLEETAPTGD  
 VLTDLVGFTEAGREGSVVRYRAGDTGIGGIQVLDRAAGGFLPSRPGAGSVHIAFRAADDAAQAEMVKRLADNHRLLTTEQKDR  
 NYFRSVYFREPQHVLFEIATDIPGFAVDEPAETLGRALKPQFLEAHRAEIERALPAIN

>WP\_088150595.1 dioxygenase [Inquilinus] limosus  
 MSTMPALFVSHGSPMLALSDEPAGRFFDALGPSLPRPDAILLASAHFETEVPTVGAQVTPETIHDFYGFPEPLYQVRYPATGAP  
 GLARLAAERIAAAGLPVEIDQTRGLDHGAWVPLRRMYPAADIPVATLSIQPHRDPAAHYAVGQALGLRKEGMVMSLTHN  
 LRALDWRRGGPDAPVSGWAQAFIDWVAAAEEGRVDDLLNYRRLAPEAVKNHPADEHFPLFFVALGAGDLPGRRLHASVTMGA  
 LAMDAYSF

>WP\_088150734.1 gentisate 1,2-dioxygenase [Inquilinus] limosus  
 MTDTRAAGQASNRDAALKALYDDVFTKNMFPFWASSTGIDHDEIKQLMGTQKAVPFLWRYQDDIAPILQRSAELIHMDDSERR  
 SLILVNPGLSPRRATVSTMYTAYRLNDPNEVMPPHRHSPSAIRFGLTGKSNFTGVEGEDITFGPGDMVLTPTDAWHNHGNTGD  
 EPNAVNLSVLDPLVETLNavyFEHDYAEENGVARKVQSARFPSSDYSARVYAGGLRPRFIDHHRGSGLSSPMVYRWDMAREQ  
 LERFKDWDGDPYEALMIEYDPLTGGPVFKTITFFAQMLRPGERTRPLRQTASLLVAPFQGSQHSSVVDGKRFDWAEFDTLAVP  
 GGSWCHEVNGSDTEPAILFVASDEPALKAFLFHRWGRDASGDVVRM

>WP\_088152996.1 protocatechuate 3,4-dioxygenase subunit beta [Inquilinus] limosus  
 MSFQPRDWRIHPPHYEGYRSTVLRAPSQKLIPLTGALSEHQGPTFPAAPEGEADLTRNGRVNGEPLGERIIIVAGRVLDEDARP  
 VANLTVLWQANAAGRYIHKVDQHDAPLDPNFLAGRCVTDAGEGRYRFLTIKPGAYPWRNHANAWRPQHIFSLFGPAFATRL  
 VTQMYFPGDPLHALDPMFNSIPDPAGRERLIAAFKLDLTEPEVALGYEFDIVLRGRLATPMEDGHR

>WP\_088152997.1 protocatechuate 3,4-dioxygenase subunit alpha [Inquilinus] limosus  
 MSKLPQTGSQTVGPFFAYGLTPRQYGYDFPQIADGAMAGDAVPGERIRVAGRVLGAGQPVEDALIEIWQADSKGMFPGPQR  
 TANDGFTGFGRCGTGDPERRVFDTIRPGAPRPGQAPHLSVIVFMRGLLVHCFTRIYFPEEAANAQDPVLLAVPEARRSTLIAQ  
 PDGPGRYRFDIRMQGDGETVFFEI

>WP\_088153816.1 catechol 1,2-dioxygenase [Inquilinus] limosus  
 MTESLLNTQEVKSLLDKVAGFGQVGDERLKRIVHRVVSDFRTVEEFDVQPGFWASAVYLTRLGQANEVGLLVPGLGLETF  
 DLRLEAERKAGIEGGTPRTIEGPLVAGAPLSKGEARLDDGNEQGEVLFMDGQVRDADGTPVAGAVVVDVWHANTLGGYSFF  
 DPSQEKFNLRRRIETDAEGRYRFRSLPAGYGCPPDGPTQALLTRLGRHGRPAHIFFVSAPGHRKLTQINIDGDAYLHDDFA  
 FATRDGLIPAVHRVDDPAEIHARGLNAPFARITFDVNLREAGNAPTVVQRAHAEAA

>WP\_088155832.1 homogentisate 1,2-dioxygenase [Inquilinus] limosus  
 MTLRYMPGFGNDFETEALDGalPQGQNSPQRCAAYGLYAEQLSGSPFTAPRGTNERSWLYRLRPSVKHVGRFREIELPHWKTA  
 PHIVRHGLPLGQLRWDPTPIPDEALTFLTMRTAGDVFTQAGMAAHVYLATESMADEVFFNADGELLIPQQGSRLVTEL  
 GVIIEGPAAIVPRGKFKAEVLVDGPSRGYVCENYGAFTLDPDRGPIGANCLANPRDFKTPAAAFEDKETPHRVVVKWCGGFHE  
 TTIGHSPLDVVAWHGNYAPYKYDLRNFSVGAIADFHDPSIFTVLTAPSGEAGTANVDFVIFPERWLVAEHSFRPPWYHMNIMS  
 EFMGLIYGRYDAKEEGFLPGGMSLHNCLMLPHGPDTDAFAKASTAELPKVLTGTMFMFETRFPQLTRYAADLPTLQDDYPA  
 CWSGLEKQFDKREDTGR

### Bk *Burkholderia* sp.

>WP\_088173090.1 homogentisate 1,2-dioxygenase [Burkholderia] sp. Bk  
 MDTSTRQPNTVRSRLEIEPGYQSGFGNEFATEALPGALPEGRNNSPQRCAAYGLYAEQLSGTAFTAPRGRHNRRTWLYRIRPAAVH  
 KPFTPLPSERLVANFAEVPPTPNQLRWDALPMPTESTDFVDGWVTMAGNGAAESMSGCAIHLYAANRSMTDRFFYSADGELL  
 IVPQEGRLDIATELGRLEVGPFEIAVPRGVRFASVLPDGTTARGYICENFGALLRLPDGLPISNGLANPRDFLTPHAAYEDREGD  
 FELVAKMNGNLWRADIGHSPLDVVAWHGNYAPYKYDLRRFTNTIGSISFDHDPDSIFLVLSQSTDTPGVDSLDFVIFPPRWLA  
 TFRPPWFHRNVASEFMGLVHGVDAKAEGFVPGGASLHNCCMSGHGPADTFEKASHSDTSKPVKVGDTCMAFMFETRFPQLTRY  
 AADLPTLQDDYPA RFALETAQLQAHYYECWQGLKKHFNPEQR

>WP\_088173983.1 protocatechuate 3,4-dioxygenase [Burkholderia sp. Bk]  
 MNPQLIGVEELTGTYPFDIRQSIAKMLRNRFWQMREAAARALWLENRQAAYDKAGLTPQERTLVNADWIGLIRYGVCFVLE  
 KFARVVKITNLGMYASMRGETLEAFLKTRNVPDAV

---

>WP\_087753432.1 MULTISPECIES: protocatechuate 3,4-dioxygenase [Burkholderiaceae]  
 MARIIGGIGTSHVPTIGMAYDKGKQNDAWAPLFKGYEPVANWLAERKPDAVMFYNDHANSFFDCYPTFALGVSGNHEFAD  
 EGAGKRPLPDIAGHPDLAIHIAEQLVNDEFDLTIFQDRPLDHGCNSPLSMLPHAGGWPLALVPQVNVLQYPLPTANRCYRLGQ  
 ALRRAIESFGEDLDVVVGTLGGSHQVHGERSGFNTEWDMEFLDLIVHEPQRLAAMKHVDYVRLGGAESVETIMWLAMRGAL  
 GSKVRELHRNYYLATSTAMAVTIYEDEVAQ

---

>WP\_088174421.1 benzoate 1,2-dioxygenase small subunit [Burkholderia sp. Bk]  
 MSFDYQKVCRALYQEAFRLDDQRWDEWLACYTEDVTYWMPAWDDDRRLTEDPQTQISLMYYPDRGGLEDRVFRIKTERSGA  
 SMPEPRTSHNVTNVEVLAERDNEVDRYNTLIHRYRITDQFFGTMYVTLRKVDDRLIASKKIALKNDYIRQVLDVYHV

---

>WP\_088174422.1 benzoate 1,2-dioxygenase large subunit [Burkholderia sp. Bk]  
 MSAIDKALKLEDLLSNAVQDDKENGVFRCRRDIFTNADLYELEMKHIFESNWVYLAHDSDQIPDNNDYTTSIGRQPIVTRDKTGE  
 LHAVINACAHKGAMLCRRKHNKSSFTCPFHGWTFSNAGKLLKVDEKTTEYPVQFNKQGSNDLKKVARFESYRGFLGSLNA  
 DVMPLEDYLGETKVIDQIVAQAPDGLEVRGNSSYIYDGNWKMQMENGCDGYHVSTVHWNYAATMGRRKEEGTKAVDANSW  
 SKSVAGVYGFEGHILLWTNTMNPEVPRPVYHRDEITARVEDKGKFVINQTRNLCLYPNVFLMDQFSTQIRVVRPISVDRTEVS  
 IFCFAPKGESAEDRATRIRQYEDFFNVSGMGTSSDLEEFRACQSGYAGSTTMWNDSRGAPLWIHPDENAKSMGLNPLISGE  
 RSEDEGLFIVQHEYWLQVMRDALRKEQAEATV

---

>WP\_088174423.1 catechol 1,2-dioxygenase [Burkholderia sp. Bk]  
 MNAKVFETNEVQNLLAAAANLGREDGNARAKEITHRLLSDMFKAIDDDLMTPDEIWAQVTVYFNKLQGDGEAALLAAGLGLEKYL  
 DIRMDAQDLEADIHGGTPRTIEGPLYVAGAPVRDGVSKIDINPDEDAGPLIIHGTGPDPRKPVAGAVVCEWHANSKGFYSHFPD  
 TGAQSEFNLRGAVRTGADGKYEFRTLMPVGYGCPPQGATQQLLNMLARHGNRPAHVFFFASDKTRKLTTQINIEGDPLIWDD  
 FAYATREELVPHVVEKTGGIALGLKADAYKEIQFDIALSPLIEGKDQLVNRPRASAAV

---

>WP\_020066083.1 MULTISPECIES: aromatic ring-hydroxylating dioxygenase subunit alpha [Burkholderiaceae]  
 MLVTRQVKLRRFWYAVMPISQLDAGQPFTLLDEPIVLWKAGGKGPHALRDRCCHTAKLSKGFVADGNIACGYHGWTYDC  
 SGKCVRIPQNAGGEIPSRAIVQSYRCEERYGYAWVALDDPLQPIPEFAEETAPGYRRLQFYEQWNTSPRLMMENSFDNSHFSF  
 VHKSNFGLFDNPKPSKYEFRPNEWGFEATRVPIRNPQASFITGTTDITERHLMNRWYLPFARRFCMCYPAVGHHIYNCA  
 TPIDDRTMMVLQWLYRNDEEQCSTQELIDWDRPITDEDREILEATDYDACIDVRRQQECHMASDQPGLLMRRMLLELLEKHGE  
 REVFRIDTEEA

---

>WP\_088174459.1 ring-hydroxylating dioxygenase subunit beta [Burkholderia sp. Bk]  
 MSSTTRYPDLEVGTQTAGSIAIRLMAHYCSSIDNGDFDRWPEFTEDCTYRILTRTDFAEGRDFGIWFCNTRGMLLDRVSSIQSV  
 NVFEPHVYRHILGPTEVSVEDGLIGCETSYMVVRTGYEGGMVVFSVGRYIDQIVVEGGRALLRERTV/TDSCRYDTLVALPL

---

>WP\_020068706.1 MULTISPECIES: aromatic ring-hydroxylating dioxygenase subunit alpha [Burkholderiaceae]  
 MHAVPPLQDTVEASSTHATSPKAAPTLGQAASGAPVRDRLRVRGIHPDYWYPLAWSHEVKRGKTHGVTFAGDPIVLARTESGK  
 VFALEDRCARHQVPLHQGVVGDGESIRCQYHGWTYDCSGKCVDPYLRERLPGVRSPYCREVEGLVFPGDPAMAERPLP  
 TFGSVDKSKYKTRRGFRPVNCHYSFMHENLMDMNHQFLHRRQMGQMRARSGLRRGEGWVEVDYTARMAGQQPIGEAIVF  
 GQSRKTGGDNDKDVMTRTEYPYQLQIRTSEQLVMDLWIVYVPLDREQRTNRTFGLLSIRKPGVPGVNLAWPLLWFTTERIF  
 KEDREIVEAEQRAHDSQGADWNHEVFPVINELALLRESGAPDQVGAGTDTEIIRFWDSRSGSPLAKT

---

>WP\_027778249.1 MULTISPECIES: 4,5-dioxygenase [Burkholderiaceae]  
 MTLRDTSVIQSWHAHVYFDSATRDSAWAFREQIEARWHGKLMGRFHERPVGPHPMWSYQMAFAHEQFGEIGWLTLNHGT  
 LDIFVHPNTGDALRDHRDAAVWIGRSHELLAALI

---

>WP\_088175624.1 protocatechuate 3,4-dioxygenase subunit alpha [Burkholderia sp. Bk]  
 MTTLQQTSPQTVGPYFAYGLCPQQYDFDFRSLFTPVVADREAAGEHITIVGQVFDGDGKVVGDAMLEVSQV/DADGHYPESREE  
 ILKTGFRGFARVGTGDPQKRFVVEVTPKGRVSPDEAHLNVITMRGMLLHTFTRIYFEDEAQANERDPVLAAPPADRRETLIA  
 RREPSTANVYRFDIYMQGDKETVFFDL

---

>WP\_088175625.1 protocatechuate 3,4-dioxygenase subunit beta [Burkholderia sp. Bk]  
 MDDSFSLARDFASHPEYIYPGYGSSVKRGPTRPLIKEKL RDQRVPVYGTDDL GALSDLTRNA VRNGEPLGERIIVTGRVLDE  
 GGRPVRNTLVEIWQANAAGRYVHKMDQHDAPLDPNFLGAGRCITDNEG RYRFLTI KPGAYPWGNHPNAWRPNHIHFSLFGEH  
 FGSLRLTQMYFPGDPPLA FDPIFQGTPEQARDRLIAKFSLDTTQEAYALGYDFDIVL RGRNETPMER

---

>WP\_087752507.1 MULTISPECIES: extradiol dioxygenase [Burkholderiaceae]  
 MQLDHATIVTADLDTARRFFDVVGLTQGARPAFSV DGYWLYAKGSPV IHLVESTV PDTD SMRAAPR IDHIAFRLESAAEWQ ALLA  
 RLQATGV D YRTA QVPPMGPQEAQMIFVALAPS VVVEFVTALHHAQP

---

>WP\_020071004.1 MULTISPECIES: aromatic ring-hydroxylating dioxygenase subunit alpha [Burkholderiaceae]  
 MSNLSNALQLRSVHSQLPVTAYFDEALLTREIETLFRKGPRYVGHDLMVPEAGNYFALPSESEGRV LVRNQQSQVELLSNCRH  
 RQAIMLNGRGAENIVCPLHRWTYDLNGQLLGAPHFADNPCLNLGATPLQNWQGLLFEA QGRN VARD LANL GTK RH FDFSGF  
 MFDHVEVHECNWNTKTFIEVYLEDYHVAPFHPGLGSFVN CDDLTWEFGEWY SVQTVGVHKD LEQPGSPTYRKWH D E VLR  
 GGTPPEFGAIWVYYPGIMIEWYPHV LVV SWLIPRGPKTTNV VEYYP EEEIA FERE F VEAERA AY METARE DDEIA ERM DAG  
 RRALMERGESQVGPYQSPMEDGMQHFHEFLRRELGTI

>WP\_030101500.1 MULTISPECIES: aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase [Burkholderia]  
 MNEIIPVSGNERAEVESTLYREARLLENEELYREWLMKIHREVEYKAFNQQLRFRKEKRYNLPLDKVYSLDENYHFLEARIQQFESG  
 SQWTADPPERIRRFLTNVEVYKTSNDENYHVYLNFTVRNRRVYDETTFSYGREREWTRDGEQLKLKRVVNIDERFIHGKNLN  
 FFM

>WP\_088176819.1 naphthalene 1,2-dioxygenase [Burkholderia] sp. Bk  
 MGEYGTGVDVESLVDVRNGTQKKRIFDQQIYELEIERIFGRCWQFLTHDSLIPNPNDATGYMAEDEVLVIRQEDGSVKAFLN  
 YCSHXRGARLCAAEVGNGARFTCTYHGWSYGMDFGALKAVPFEKELYSGCLNKEKGLREIRVENYKGFYYGNFDPDAPSLSDYL  
 GEMKFYLDVWMDLNNGAELLGPVSRSLLNCNWKTPAENFAGDAYHVGWTHAASLKVLGEL SALAGNQVLPPDGAGIQITRF  
 GHGLGVLNAGAAIHPPASEEGKLYRKWFDDMRPKMIQKLGESRGRRLYGSFNGTVFPNNSYLWGNTTFKVVWPRGPHQIEV  
 FTWAIAEKDMDDVKKGQANMIRTFGSAGMLEADDSDNMETMTQNNRGRMVRDGVMNSQMGLGTDLDPNFPVGIGQSAV  
 GETSYRGFYRAYKDFLAENWNTLLGKNPDDWKHELIGK

>WP\_088176823.1 benzoate 1,2-dioxygenase large subunit [Burkholderia] sp. Bk  
 MRDGSCQEWWESGLTSRCLTGVRRDEMGTSGMLAGLSSLDLENDIVGDPGDAQMKGKRSIYTDLPIYQLEMEHLFEGCWVYAA  
 HESQLSKPHDYLTTISVGRQPVVLTRDETDXQIRALNVCSHRSRVRARKGNQRVHTCMFHGWCYNSAGELINISDEEDGAYP  
 AQFDCTERGLMPVRCESYRGFYVWSLNPVKQLLSYDLYNGVLFIDLMVDSQSPTEGELEVLPGETATYAGNWKLQGENGLDY  
 HVKSTHGNYIMTVGRRARGLSANDTKTLEASFKGGESGFFAEQGHGLIYGPYPNYSDRPNFEFRDQYLEHYGKVRTQWM  
 ERMRNLLIMPNVLLMDQMSTQIRVFRPLAVDRTEVTTYCIAPKGESAQARERRLRQYEDFFNASGMATPDLAEFRNCQIGFEA  
 KGAAYSDSLRSRGQRRWQTGSHALGQELGVQARMSSTNIGDEGLYVSIIEEWARRMRNIVADRLNGGEQ

>WP\_088176832.1 biphenyl-2,3-diol 1,2-dioxygenase [Burkholderia] sp. Bk  
 MENIGVTELGYIGVSDMDAWAREYAANVMGLEVLEEGDKDRFYLRDQHHRIVVHNSGSDLDYAGWRVAGPEEFQIKRN  
 LEKARVDFRQADAAECDERMVLDLVKFLDPGGNPTEIYHGPFRVDYHKPFHAGRRMHGRFSTGDQGLGHIIILRQENPQKAYEFY  
 ARVLGMRGSVEHIPHIGITAKPFLHSNDRHSHAFLGGPAAKRINHLMIEVDNIDDVGYTHDIVRKRQIPVAVQLGKHSNDQM  
 VSFYSANPSNWLFLEYGALGRATYQSEYYVSDIWGHEIEATGYGLDVKLKE

>WP\_030101477.1 MULTISPECIES: anthranilate 1,2-dioxygenase [Burkholderia]  
 MTEAELQFRVERLLAQYIECIDDRLLEDWPDLVWACNYRIIPRENADRGLPLTLIFCEGRGMLVDRV/SLRQANIYARHYYRHVL  
 SNVHVKSVDGAVIVQSNYVFQTRRNGATDVSAGKYMVKIVVSDSALLFKEKIVTVDTYRVDSLMTPI

>WP\_088176843.1 catechol 2,3-dioxygenase [Burkholderia] sp. Bk  
 MGVMRIGHHSVVKVMDVEAAKHYVNNGMDVTHRDSGTTYLKCWDEWDKYSVVLIPSDRAMLHHIAKVETEADLDVLGKR  
 VRDAGVEVTEVPAGQLPFCGRSRVFRRLPSAQTMYLYAQKEFLGKDVGVVKNPDPWPDTKHIGAHWLDHCLIGELDPEKGINR  
 VEETFRLTDALDFHLSERIMAGPNYSVMAGAFMFRSCKPHDIAVGAPTNGFHLSFLDDWKDVLLAGDILSKNRTRIELLPSR  
 HGTRGETVYFYDPGIRNETFAGLGYQAYPDMPVITWTEDELARAIFYTSREWVESFSTAYIPV

>WP\_088176949.1 naphthalene 1,2-dioxygenase [Burkholderia] sp. Bk  
 MELHILPAGKTVTQEGANLLDVLRQNDVSYSAGRCGTCRCKVIKGQVIQKQSASAMPQALLSDDHPQVLACQATLIENC  
 VIEIPEPDEIYHPAKILKATVEEINLTHDIKLLRLRPAKSISFSPGQYASLQFTPEHVRPYSMAGLDSDELLEFHIRLMPEGRVSSY  
 VAHSLRVGDTVRLSGPLGTSYLRRKHEGPMLCVAGGTGLAPVLSIIRGALSTGMRNPIHLYFGARSAEDVYQGERLADLAKRYP  
 NLHNVTVASGLTANGQRKGV/DAVFSDEELAGWRAYLCGAPPVVAATVALRGRGLRPEHIADAFYTTGI

>WP\_062085353.1 MULTISPECIES: gentisate 1,2-dioxygenase [Burkholderiaceae]  
 MSVSANEVANERQRYYEKIAEKSMTPLWEVLHSLVPLHPVSSIQPHLWRYSDLRDDLMEAGQLISAQEAERRVLILENPGVRGQ  
 SRITQSIYAGLQLILPGEIAPSHRHAQSAQRLVLDGEGAYTTVGDERTTMHRGDFIITPSNTWHDHNEGDPVVWLDGLDIPV  
 QFLGAGFAEKSSLETQISTRPEGDALSRYGRNMLPVDFRQSASEPTRLFVYPYAQTKDALHGIAGGAIDAHFGYKLRYVNPATG  
 ASPMPTMGAYAQLLPMGFETKGYRSTDGTVFGCLEGSGIAKIDNTFSFNANDIFVPSWTNLRLRAVDEVVLFSLSDRPVQEA  
 LGLWREQRLQ

>WP\_062085357.1 MULTISPECIES: naphthalene 1,2-dioxygenase [Burkholderiaceae]  
 MSGNWIFAAQRRAVVPDDDV/AIQVARELAFYGVDTIYATDNICHTGHARLCDGFLEGHEIECPLHQGKFDVRTGNALCAPLIE  
 GIKSYPKVEDGKVFVLD

>WP\_088176953.1 protocatechuate 3,4-dioxygenase [Burkholderia] sp. Bk  
 MAKIVGGFMMMPHDPLIPATPTAPPAAQREICMAYAIIVERLRLQVDTVVIADDHYTLNGPYCIPMAMIGIGDIEGPYEPWLGP  
 RAQIENNRPALAHIMQYGLEYCIDWA/ SKSLVLDHSATVPIHYAVRPVKGMRRAIPVYLNNTGIEPFITSWRAHEIGRVIGDAVANWQ  
 GDERVAIYGTGGLSHWPGMAEMGAINEGWDRKIMKLVAQGDVESLIALSDEEILRDGGNGGIEKNWICAMGALGACRGEVIY  
 EPVAEWVCGCGYMEMKVA

>WP\_088176955.1 naphthalene 1,2-dioxygenase [Burkholderia] sp. Bk  
 MDTTHTINFIDVEHGRQSHK1YQDQTLFELECECERIFARCWLFLTHECAIPNYGDFVTTRMGTDEVIVMRQKDNSIKAFLNCRHR  
 GARLCAVEAGNARGFACNYHGWAYGADGSLLSVPFENEIYQKRLDKCKNGLHEIGKVESYHGFVYGCFCFTDAPNLKEYLGDF  
 WYLDLWMEAGGGIELVGPPARCFIEANWKAPSENFGDAYHVGWTHASALRGSGQSGFAGMAGNNVLPPAGAGLQVTTRHGH  
 GIGALYDVYAGVHDNESELMAWGLAKEQVLKEKIGPIRARLYRSHLNNTIFPNTSFLTGSVFKVWQPHGPKKTEVLTWAMV  
 EKDMSPDMKERISRSVQRTFGIAGYWETEDNDNMESETHMGRGMAGKKMLNSQMGISGDRQDPDYPGIVGDSAVGETSYR  
 GYYRFYNALIQSSNWEVNARSNDWVNELITARPEK

```
>WP_088176956.1 naphthalene 1,2-dioxygenase [Burkholderia sp. Bk]
METNQATMETTQAPVKADLANEYPERYVSEDLRREVERFLFREARLMDTEQFREWHQQMLDPDIRYVVTQLRSRRERRYA
QPDKVFIYDDDHRLQLGIRVNQYYDPQHWRIDPPEKYCHTVTNIEAFESDREDQINVRSNCLIVRARRSYEVDQFFYTREDVRR
SSAGTLRLLSRVIDYPERCVQGRNMLIFL
```

**Tabla V.S8.** Código de acceso de las secuencias de referencia utilizadas en el análisis de relación filogenética entre homólogos de enzimas hidroxilantes de anillo aromático (Wanapaisan y col., 2018).

Nº de acceso a Genbank	Secuencias de bases de datos usadas para el árbol filogenético	Clasificación RHObase
AAB62707.1	Naphthalene-1,2-dioxygenase terminal oxygenase large subunit (plasmid) [Pseudomonas putida]	A
AAP44288.1	Naphthalene dioxygenase Fe-S protein large subunit (plasmid) [Pseudomonas putida ND6]	A
AAD09872.1	Dioxygenase alpha subunit PhnAc [Paraburkholderia sartisoli]	A
ABW37061.1	<i>NahA1f</i> [Sphingomonas sp. LH128]	A
ABM91740.1	Biphenyl/naphthalene dioxygenase alpha subunit [Sphingobium yanoikuyaee]	A
AAB62285.1	p-cumate dioxygenase large subunit [Pseudomonas putida]	A
AAC38616.1	Initial dioxygenase large subunit, partial [Sphingomonas sp. CB3]	A
ABV68886.1	<i>flnA1</i> [Sphingomonas sp. LB126]	A
YP_718182.1	Angular dioxygenase large subunit (plasmid) [Sphingomonas sp. KA1]	A
AGZ63478.1	<i>AhdA1b</i> [Sphingobium sp. PNB]	A
BAE45092.1	Dibenzofuran 4,4a-dioxygenase large subunit (plasmid) [Terrabacter sp. DBF63]	A
BAF48503.1	Biphenyl dioxygenase large subunit [Rhodococcus erythropolis]	A
AAY85176.1	PAH ring-hydroxylating dioxygenase large subunit [Mycobacterium vanbaalenii PYR-1]	A
BAA94708.1	Iron-sulfur protein large subunit [Nocardoides sp. KP7]	A
AAD25395.1	<i>NidA</i> dioxygenase large subunit [Rhodococcus sp. I24]	A
AAD28100.1	Naphthalene dioxygenase large subunit [Rhodococcus sp. NCIMB12038]	A
AAR05106.1	Naphthalene dioxygenase large subunit [Rhodococcus sp. P400]	A

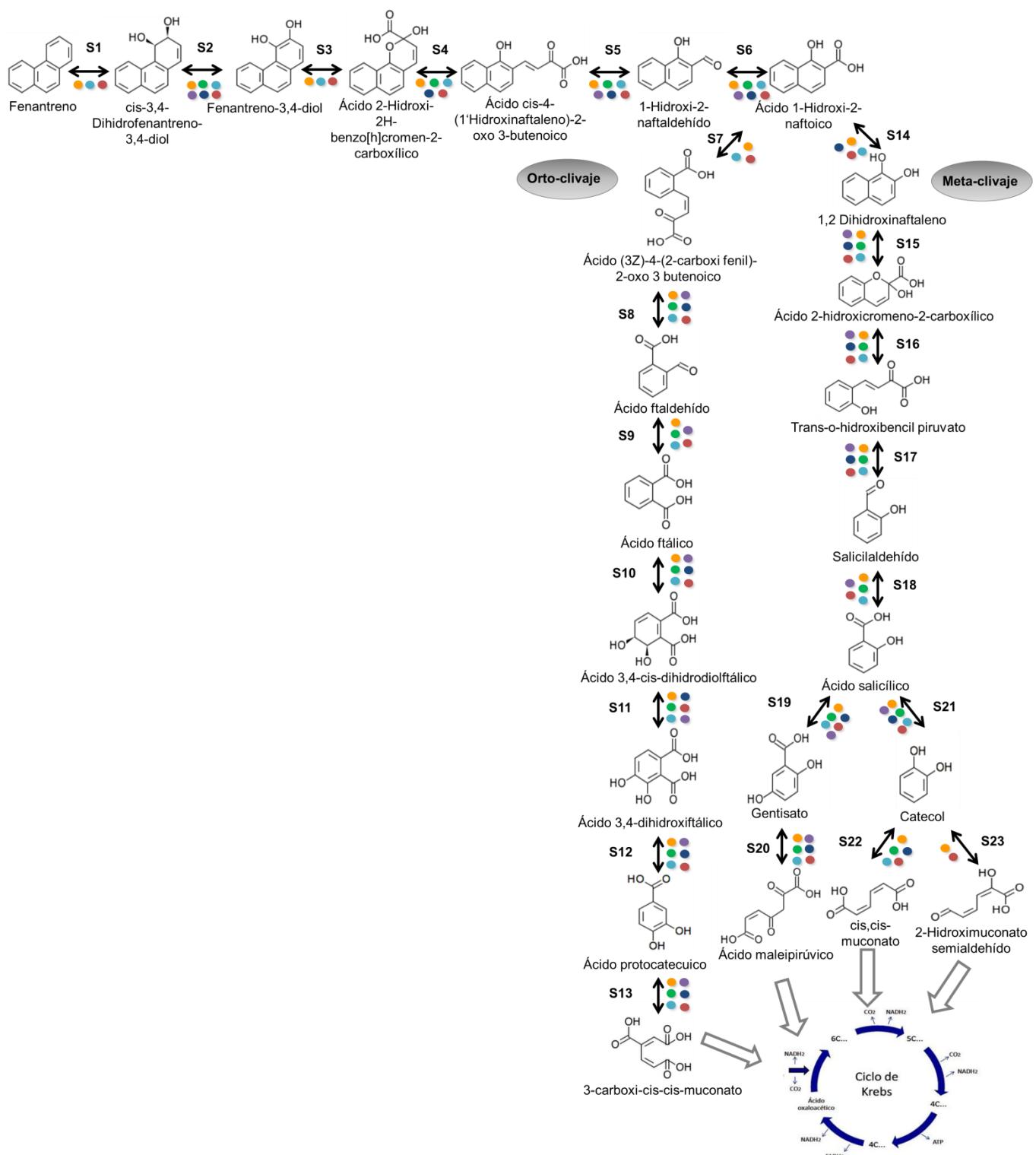
AAT51751.1	<i>NidA</i> [Mycobacterium vanbaalenii PYR-1]	A
AAG05906.1	Toluate 1,2-dioxygenase alpha subunit [Pseudomonas aeruginosa PAO1]	B
CAA55681.1	2-halobenzoate 1,2-dioxygenase [Burkholderia cepacia]	B
AAG05900.1	Anthrani late dioxygenase large subunit [Pseudomonas aeruginosa PAO1]	B
BAB70698.1	Benzoate 1,2-dioxygenase ISP alpha subunit [Rhodococcus jostii RHA1]	B
AAU46052.1	ortho-halobenzoate 1,2-dioxygenase alpha-ISP protein OhbB [Burkholderia mallei ATCC 23344]	C
AAD20006.1	Ortho-halobenzoate 1,2-dioxygenase alpha-ISP protein OhbB [Pseudomonas aeruginosa]	C
AAQ12033.1	Putative ring-hydroxylating dioxygenase large subunit, partial [Mycobacterium sp. S65]	C
AAD03558.1	Phthalate dioxygenase [Burkholderia cepacia]	D
AAC45716.1	3-chlorobenzoate-3,4/4,5-dioxygenase (plasmid) [Conidiobolus coronatus]	D
CAA55400.1	Phenoxybenzoate dioxygenase [Pseudomonas pseudoalcaligenes]	D
CAA73203.1	2-oxo-1,2-dihydroquinoline 8-monooxygenase, oxygenase component [Pseudomonas putida]	D
NP_254097.1	Protein GbcA [Pseudomonas aeruginosa PAO1]	D*
WP_011951187.1	Aromatic ring-hydroxylating dioxygenase subunit alpha [Sphingomonas wittichii]	D*
CAA73203.1	2-oxo-1,2-dihydroquinoline 8-monooxygenase, oxygenase component [Pseudomonas putida]	D*

**Tabla V.S9.** Secuencias de aminoácidos de las subunidades alfa de enzimas dioxigenasas de los géneros a los que pertenecen las cepas aisladas del consorcio natural, seleccionadas para utilizar como referencia en el análisis de relación de las subunidades alfa de enzimas hidroxilantes de anillo aromático (Figura V.10) . Estas secuencias se obtuvieron de las bases de datos NCBI y Uniprot.

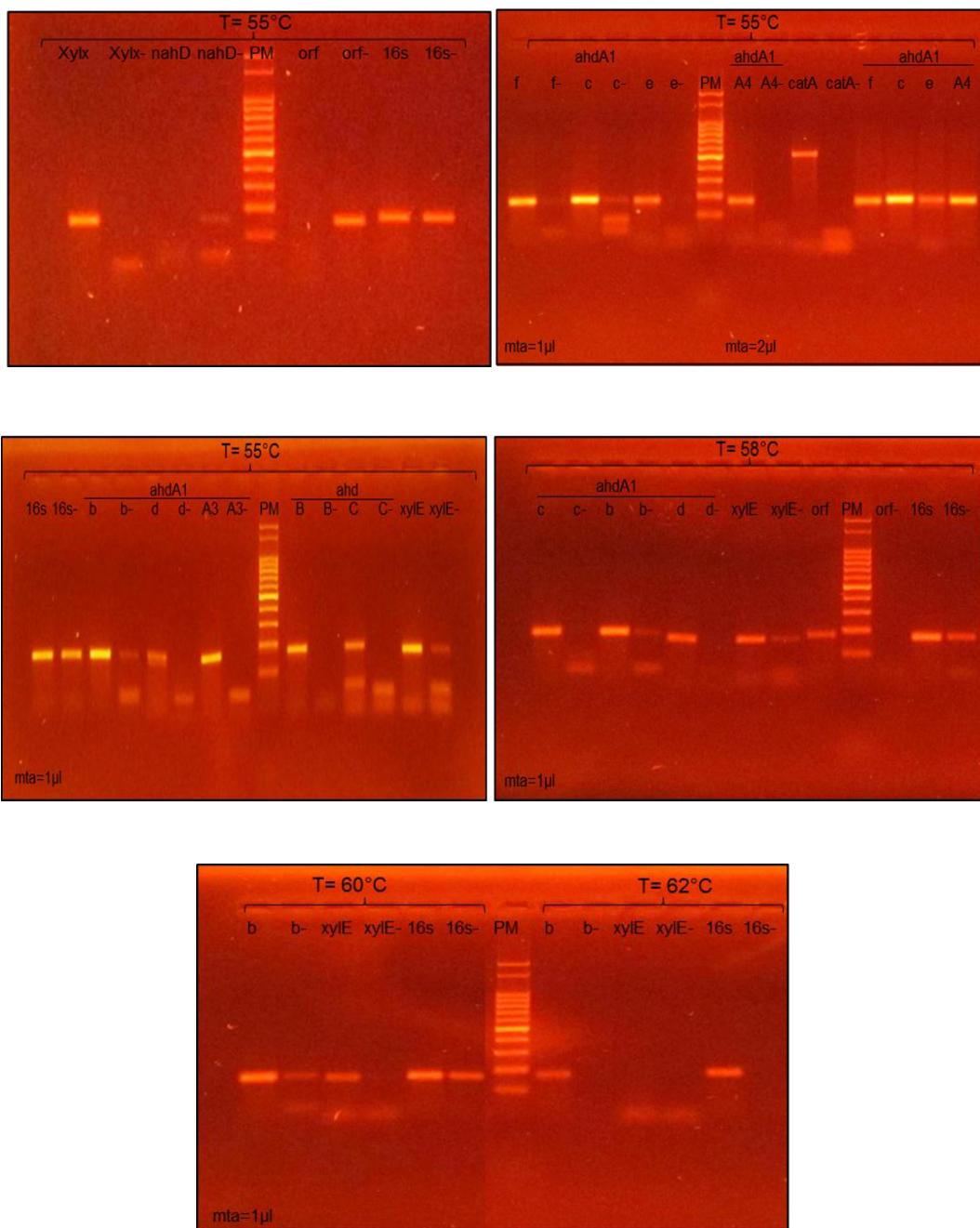
Nº de acceso	Secuencias de bases de datos usadas para el árbol filogenético	Clasificación RHObase
BAE92156.1	Large subunit NahAc of naphthalene dioxygenase[ <i>Pseudomonas putida</i> GN=nahAcPE=4]	A
A5W4F2	Benzene 1,2-dioxygenase subunit alpha <i>Pseudomonas putida</i> (strain ATCC 700007 / DSM 6899 / BCRC 17059 / F1)	A
AAC69484.1	2-hydroxybenzoate 5-hydroxylase alpha subunit [ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ]	C
AAA25743.1	Dioxygenase [ <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> KF707 = NBRC 110670]	A
AAA25902.1	Iron sulfur protein large subunit [ <i>Pseudomonas putida</i> ]	A
BAB32747.1	Large subunit of terminal oxygenase component of anthranilate 1,2-dioxygenase [ <i>Pseudomonas resinovorans</i> ]	B
Q1XGM0	Iron sulfur protein large subunit NahAc of naphthalene dioxygenase OS= <i>Pseudomonas putida</i> GN=nahAc PE=4 SV=1	A
A0A0E1CEA2	Benzoate 1,2-dioxygenase alpha subunit [ <i>Klebsiella pneumoniae</i> ]	B
WP_064153110.1	(2Fe-2S)-binding protein [ <i>Klebsiella pneumoniae</i> ]	D
WP_032715750.1	RHO subunit alpha [ <i>Klebsiella aerogenes</i> ]	B
WP_015366592.1	MULTISPECIES: aromatic ring-hydroxylating dioxygenase subunit alpha [Enterobacteriaceae]	D
WP_045392056.1	Aromatic ring-hydroxylating dioxygenase subunit alpha [ <i>Klebsiella aerogenes</i> ]	D
WP_045396616.1	Aromatic ring-hydroxylating dioxygenase subunit alpha [ <i>Klebsiella aerogenes</i> ]	B
YP_004590679.1	Ring hydroxylating dioxygenase subunit alpha [ <i>Klebsiella aerogenes</i> KCTC 2190]	B
WP_026872245.1	Benzoate 1,2-dioxygenase large subunit [ <i>Inquilinus limosus</i> ]	B
WP_081688978.1	Aromatic ring-hydroxylating dioxygenase subunit alpha [ <i>Inquilinus limosus</i> ]	D*
WP_052120059.1	Aromatic ring-hydroxylating dioxygenase subunit alpha [ <i>Inquilinus limosus</i> ]	D*
WP_034835541.1	Aromatic ring-hydroxylating dioxygenase subunit alpha [ <i>Inquilinus limosus</i> ]	D*
WP_034842722.1	Aromatic ring-hydroxylating dioxygenase subunit alpha [ <i>Inquilinus limosus</i> ]	D
WP_034835541.1	Rieske (2Fe-2S) protein OS= <i>Inquilinus limosus</i> MP06 GN=P409_11135 PE=4 SV=1	D*

WP_010891031.1	Llarge subunit aromatic oxygenase [Novosphingobium aromaticivorans]	C
ABM79781.1	Salicylate 1-hydroxylase alpha subunit [Sphingobium yanoikuyae]	C
WP_008827651.1	Ferredoxin subunit aromatic oxygenase [Sphingomonas sp. LH128]	D
WP_037508582.1	Biphenyl/naphthalene dioxygenase alpha subunit OS=Sphingobium yanoikuyae	A
A5V4T3	Rieske (2Fe-2S) [Sphingomonas wittichii]	A
Q6BDD0	Large subunit of PAH-dioxygenase [Sphingomonas sp. A4]	A
NP_049209.1	Large subunit toluate/benzoate dioxygenase (plasmid) [Novosphingobium aromaticivorans]	B
WP_088185259.1	Aromatic ring-hydroxylating dioxygenase subunit alpha [Sphingobium sp. Z007]	D
WP_088189919.1	Aromatic ring-hydroxylating dioxygenase subunit alpha [Sphingobium sp. Z007]	A
Q9ZHH3	Dioxygenase alpha subunit PhnAc [Paraburkholderia sartisoli]	A
Q84BZ1	Anthraniilate dioxygenase ferredoxin [Burkholderia cepacia]	D
Q45694.1	Ferredoxin [Burkholderia sp. RASC]	D
Q9ZHH3	Dioxygenase alpha subunit [Paraburkholderia sartisoli]	A
AAU46052.1	Ortho-halobenzoate 1,2-dioxygenase alpha-ISP protein OhbB [Burkholderia mallei ATCC 23344]	C
CAA55681.1	2-halobenzoate 1,2-dioxygenase [Burkholderia cepacia]	B

**Figura V.S.1.** Ruta propuesta de participación de las cepas aisladas en la ruta catabólica de degradación de fenantreno, basada en datos genómicos. Los colores de los puntos corresponden a la cepa que posee la enzima que actúa en ese paso de la vía; naranja: AM y 20006FA, verde: B, celeste: Bc-h, violeta: T, azul: I y rojo: Bk.



**Figura V.S2.** Corridas electroforéticas en gel de agarosa de los productos amplificados de PCR con los primers dirigidos a las secuencias de genes de las enzimas de la ruta de degradación de fenanreno y del gen 16S rRNA sobre el ADN de la cepa *Sphingobium* sp. AM en cultivo líquido. PM: Patrón de peso molecular (para corroborar tamaño del inserto). Optimización de la temperatura de hibridación.



**Figura V.S3.** Concentración de fenantreno en cultivos de las cepas AM y 20006FA en MML suplementado con 200 mg/L de fenantreno durante 4 días de incubación. Se grafican los valores promedio de tres réplicas biológicas y su respectiva desviación estándar.

