

Laboratorio de procesos biotecnológicos

Facultad de Ciencias Exactas UNLP

**“Estudio de megaplásmidos  
en *Sphingomonas*  
degradadoras de hidrocarburos  
policíclicos aromáticos”**

**Autora: Starevich Viviana A.**

**Directora: Dra. Madueño Laura**

**2016**



***El presente trabajo ha sido realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales de la Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección de la Dra. Laura Madueño.***

Quiero agradecer:

A la Dra. Laura Madueño, por ser mi directora, enseñarme, dejarme equivocarme y tenerme paciencia, incluso a la distancia. Me gusto mucho trabajar juntas!!

A la Dra. Irma Morelli, por darme un lugarcito para hacer el trabajo, por estar atenta a cada cosa que hacíamos y por su ayuda en estos últimos días.

Al Dr. Mariano Pistorio, por colaborar en este trabajo y a Ileana Salto, por su ayuda y buena predisposición para responder mis consultas.

A Tere por ser tan amable y atenta.

A Bibi, por su opinión, consejos y correcciones del trabajo.

A todo el L5: Marti, Mari, Sabri, Pau, Ro y Vero, por ayudarme y enseñarme desde el principio, a Marian que además de eso me adopta de vez en cuando y a Clau que me aguanta tantas horas. A Nati, Lina, Ines, Franco y Nico, por las charlas locas y bailes. Gracias por compartir todos los días y hacer que sea divertidísimo ir a trabajar.

A Ari y mis Murallas: Mili, Steph, Eli, Beti y Sol que están conmigo y me escuchan siempre.

A mis amigos de la facu, por todos los días compartidos. Sobre todo a Manu, Cori, Pau y Leo por haber tenido siempre un lugar para mí en sus casas y por seguir estando ahora.

A mi FAMILIA: primos, tíos y cuñados, por interesarse. A mis HERMANAS quienes soportan lo peor de mí y me quieren igual. Gracias Ca por tu edición artística!

PAPÁ y MAMÁ gracias por tanto trabajo. Má, gracias por madrugar conmigo, por buscarme en la parada cuando llegaba tarde y por lo que haces por todos cada día. Gracias a los dos por darme la oportunidad de hacer lo que me gusta.

A mi NONNA y NONNO por esperarme todas las tardes, dejarme invadirlos, tomarme lección, preocuparse, cuidarme y quererme tanto como yo a ustedes.

## 1. Introducción ..... 2

1.1 Hidrocarburos policíclicos aromáticos: características generales y liberación en el ambiente	2
1.2 Degradación microbiana de PAH .....	3
1.2.1 Detección de enzimas claves en el proceso de biodegradación.....	4
1.3 Los microorganismos como mediadores de la eliminación los PAH del ambiente.....	6
1.3.1 Estrategias de biorremediación .....	6
1.3.2 Género <i>Sphingomonas</i> .....	7
1.3.3 Organización genética de genes degradadores en <i>Sphingomonas</i> .....	8
1.3.4 Plásmidos en <i>Sphingomonas</i> .....	10
1.4 Hipótesis.....	12
1.5 Objetivos .....	12
1.5.1 Objetivo general.....	12
1.5.2 Objetivos específicos.....	12

## 2. Materiales y Métodos ..... 14

2.1 Materiales .....	14
2.1.1 Medios <i>de</i> cultivo .....	14
2.1.2 Medio-PAH .....	15
2.1.3 Buffers .....	15
2.1.4 Antibióticos .....	15
2.1.5 Cepas bacterianas .....	16
2.2 Métodos .....	17
2.2.1 Extracción de ADN total de las cepas bacterianas.....	17
2.2.2 Extracción de ADN plasmídico por miniprep (Sambrook y col., 1989).....	17
2.2.3 Extracción / purificación de ADN plasmídico (Kieser y col.1984) .....	18
2.2.4 Gel de lisis " <i>in situ</i> " (Eckhardt, 1978).....	19

2.2.5 Digestión con enzimas de restricción.....	19
2.2.6 Curación de plásmidos .....	20
A- Método de curación según Xihong-Feng y col., 1997 .....	20
B- Método de curación según Tamara Basta y col., 2004 .....	20
2.2.7 Electrotransformación de <i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$ con megaplásmidos de <i>Sphingomonas</i> degradadoras.....	20
2.2.8 Transformación química de <i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$ con mega plásmidos de <i>Sphingomonas</i> degradadoras.....	21
2.2.9 Conjugaciones .....	22
A- Conjugaciones biparentales: .....	22
B- Conjugaciones triparentales: .....	22
2.2.10 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	22
2.2.1 Secuenciación.....	25

### **3. Resultados y discusión ..... 27**

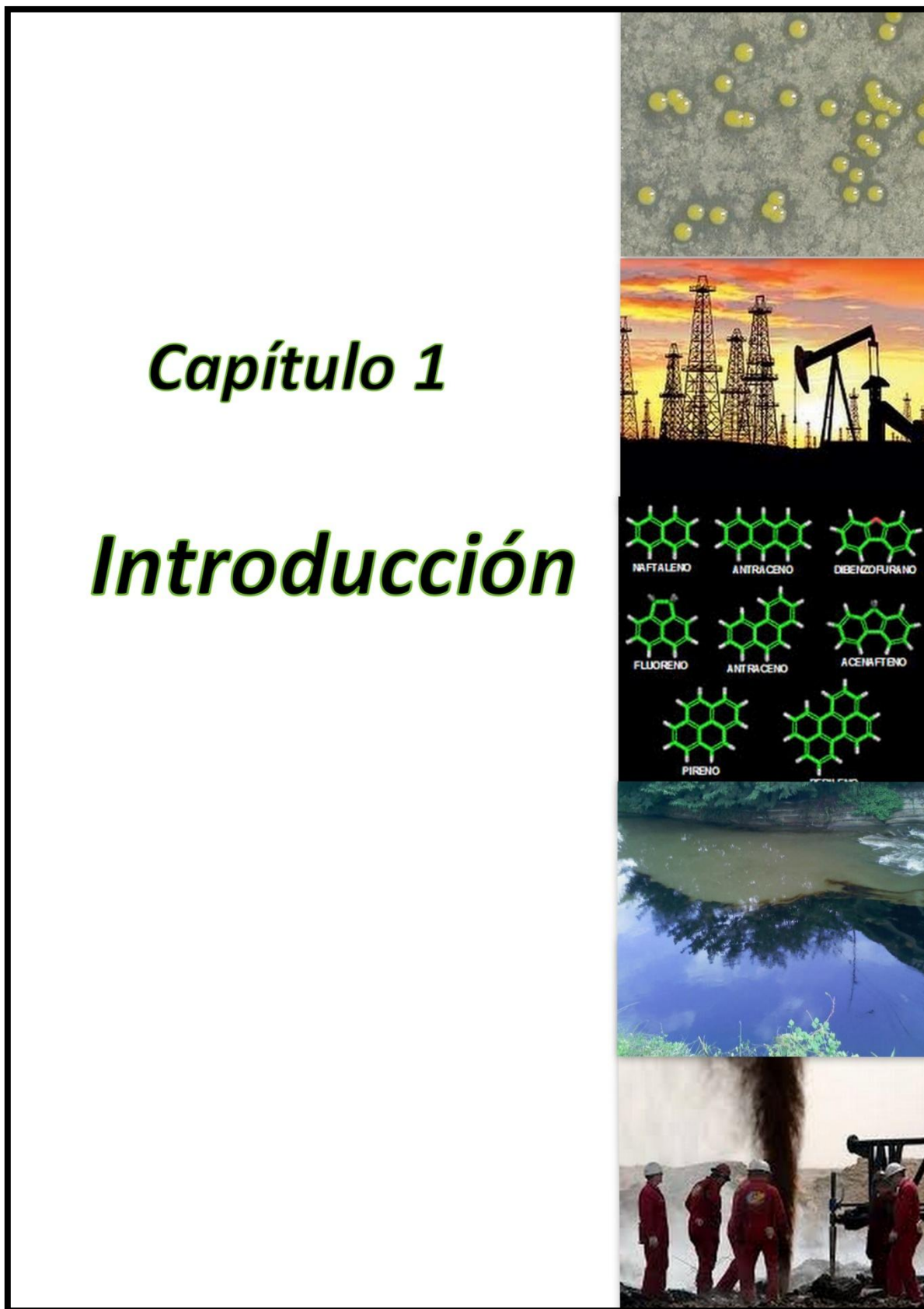
3.1 Detección y purificación de megaplásmidos.....	27
3.2 Caracterización de los megaplásmidos .....	29
3.2.1 Estudio de la presencia de genes de la vía alta y baja de degradación de PAH mediante amplificación por PCR.....	30
3.2.2 Determinación del peso molecular del megaplásmido mediante perfiles de restricción.....	34
3.2.3 Ensayos fisiológicos para corroborar la ubicación de los genes degradadores... 36	
3.2.3.1 Adquisición de la propiedad degradadora .....	36
3.2.3.1.i Conjugaciones.....	36
3.2.3.1.ii Electrotransformación de <i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$ con megaplásmidos de <i>Sphingomonas</i> degradadoras .....	41
3.2.3.1.iii-Transformación química de <i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$ con megaplásmidos de <i>Sphingomonas</i> degradadoras .....	42

3.2.3.2 Pérdida de la propiedad degradadora .....	43
3.2.3.2.i Curación.....	43
<b>4. Conclusiones.....</b>	<b>45</b>
<b>5. Bibliografía .....</b>	<b>47</b>

## Índice de figuras y tablas

<b>Figura 1.2.1:</b> Vía de degradación aerobia de fenantreno en <i>Sphingomonas</i> .....	5
<b>Figura 1.3.1:</b> Membrana externa de <i>Sphingomonas paucimobilis</i> .....	8
<b>Figura 1.3.2:</b> Número y tamaño de elementos genéticos y enzimas biodegradativas en los genomas de 7 <i>Sphingomonas</i> secuenciadas.....	10
<b>Figura 1.4.3:</b> Clasificación en tres grupos de los genes rep y par de megaplásmidos de <i>Sphingomonas</i> .....	11
<b>Figura 3.1:</b> Gel de “ <i>lisis in situ</i> ” de células de <i>Sphingomonas</i> degradadoras de PAH 1A, 22A, 22B, 36, SP y AM.....	28
<b>Figura 3.2:</b> ADN plasmídico de las cepas de <i>Sphingomonas</i> purificado por el método de Kieser.....	29
<b>Figura 3.3:</b> Gel agarosa 1,2%. Productos de PCR nested primers nah F y nah R2.....	31
<b>Figura 3.4:</b> Gel agarosa 1,2% de productos de PCR con primers C230.....	31
<b>Figura 3.5:</b> PCR con primers dirigidos al gen cromosomal 16S rRNA.....	33
<b>Figura 3.6:</b> Perfiles de digestión de las cepas 22B, SP y AM con las enzimas de restricción EcoRI, y HindIII.....	35
<b>Figura 3.7:</b> Curva de relación Log (número de pares de bases de ADN del patrón del fago $\lambda$ ) en función de la distancia recorrida en un gel de agarosa (cm) para las digestiones plasmídicas con EcoRI.....	35
<b>Figura 3.8:</b> Estrategia general de las conjugaciones.....	37
<b>Figura 3.9:</b> Resultados de la conjugación biparental.....	39
<b>Figura 3.10:</b> Resultado de la conjugación triparental.....	40

<b>Tabla 2.1.1:</b> Medios de cultivo.....	14
<b>Tabla 2.1.2:</b> Buffers.....	15
<b>Tabla 2.1.3:</b> Antibióticos.....	15
<b>Tabla 2.2.1:</b> Reacciones de PCR.....	23
<b>Tabla 2.2.2:</b> Mezclas de reacción.....	24
<b>Tabla 3.1:</b> Resultados del alineamiento de las secuencias de los productos PCR obtenidos con los primers nah y C230 mediante BLAST con la base de datos del NCBI.....	33
<b>Tabla 3.2:</b> Crecimiento de <i>Sphingomonas</i> en medio de cultivo R3 Agar adicionado con distintos antibióticos.....	37





## **1. Introducción**

### **1.1 Hidrocarburos policíclicos aromáticos: características generales y liberación en el ambiente**

Los hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH) son un grupo de compuestos formados por la fusión de dos o más anillos aromáticos de 6 átomos de carbono. La mayoría contiene anillos de benceno unidos, aunque algunos pueden tener grupos alquilo formando parte de su estructura. Los PAH se consideran riesgosos para la salud humana debido a que presentan elevada toxicidad, mutagenicidad y carcinogenicidad (Mrozik y Piotrowska-Seget, 2010). La Environmental Protection Agency (EPA) y la Organización Mundial de la salud (OMS) consideran 16 de ellos contaminantes prioritarios por poseer efectos carcinogénicos. Son moléculas hidrofóbicas, a medida que aumenta su tamaño y peso molecular disminuye su solubilidad en agua y aumenta su persistencia en el ambiente (Juhasz y col., 2000). Además por su carácter lipofílico se pueden bioacumular y adsorber en sedimentos y suelos (Hughes y col., 1997).

Estos compuestos son producidos y liberados al ambiente por fuentes naturales como la actividad volcánica, incineración de materia orgánica (Blumer y col., 1976) y la producción por plantas (Azuma y col., 1996) entre otros. Sin embargo, la mayor producción y liberación de PAH ocurre a partir de fuentes antropogénicas como la combustión y derrame de productos derivados del petróleo, la incineración de desechos y el uso de combustibles fósiles para calefacción doméstica (Freeman y col., 1990; Peressuti y col., 2000).

Los PAH han sido detectados en una gran variedad de muestras ambientales como, aire (Freeman y col 1990), suelos (Jones y col., 1989), sedimentos (Youngblood y col., 1975) y agua (Cerniglia y col., 1989). Una vez allí, pueden seguir diferentes procesos químicos, físicos y biológicos como la fotooxidación y/o volatilización, lixiviación a aguas subterráneas, sorción a la materia orgánica del suelo, bioacumulación y degradación

microbiana (Okere y col., 2012). El proceso de degradación microbiana es de gran importancia dado que lleva a la decontaminación de suelos y sedimentos (Cerniglia., 1992).

## 1.2 Degradación microbiana de PAH

Se ha demostrado que numerosos procariontes y eucariontes como eubacterias, levaduras, hongos filamentosos e inclusive cianobacterias y algas metabolizan, mineralizan o cometabolizan PAH. Particularmente las bacterias, se encuentran activamente involucradas en la degradación de este tipo de compuestos. Se conocen muchas con capacidad de degradar PAH, entre ellas cepas del género *Pseudomonas* (Deziel y col., 1996), *Mycobacterium* (Bastiaens y col., 2000), *Rhodococcus* (Uz y col., 2000), *Sphingomonas* (Fida y col., 2012), *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Burkholderia* (Aitken y col., 1998) y *Flavobacterium* (Trzesicka-Mlynarz y col., 1995).

En condiciones aerobias, la degradación bacteriana de PAH generalmente comienza con una oxidación del hidrocarburo a cis-dihidrodiol, la cual involucra la incorporación enzimática de dos átomos de oxígeno atmosférico al núcleo aromático. Dicha reacción es catalizada por la enzima multicomponente, dioxigenasa que hidroxila anillos de PAH, RHD (Ring Hydroxylating Dioxygenase). Los intermediarios cis-dihidrodiol son luego oxidados por un sistema multienzimático de deshidrogenasas para formar compuestos dihidroxiaromáticos como el catecol, concluyendo lo que se conoce como “*vía alta de degradación de PAH*”. El catecol puede ser luego oxidado a través de dos rutas, *orto* o *meta* clivaje. El clivaje de los anillos deriva en la producción de los ácidos succínico, fumárico, pirúvico y acético, todos intermediarios del ciclo de Krebs. Una vez que el primer anillo hidroxilado es convertido en dióxido de carbono y ácido pirúvico finaliza la “*vía baja de degradación de PAH*” y el siguiente anillo es oxidado de la misma manera, hasta completar la mineralización del compuesto (Juhász y col., 2000).

### 1.2.1 Detección de enzimas claves en el proceso de biodegradación

Los genes que codifican dioxigenasas (RHD) se utilizan para detectar bacterias degradadoras de PAH, algunos ejemplos de estos genes son los del tipo *nahAc* y *phnAc* en Gram negativas (GN) y *nidA* y *pdoB* en Gram positivas (GP) (Guo y col., 2010). Estos genes se han hallado en bacterias degradadoras tanto en ADN cromosomal como plasmídico (Cebren y col., 2008). La enzima dioxigenasa interviniente en el primer paso de la vía alta de degradación de PAH es un sistema multienzimático que incluye una ferredoxina, una ferredoxin reductasa y una dioxigenasa compuesta por dos subunidades, una grande  $\alpha$  y una pequeña  $\beta$ . La dioxigenasa mas estudiada es la naftaleno 1,2 dioxigenasa de *Pseudomona putida* (Kauppi y col., 1998) donde la subunidad  $\alpha$  esta codificada por los genes *nahAc* y está más conservada que otros componentes de la enzima, motivo por el cual se utiliza para determinar la presencia de PAH-dioxigenasas en muestras ambientales.

Por otro lado, los genes C230 que codifican la enzima catecol 2,3 dioxigenasa también han sido un blanco de interés en este tipo de ensayos, debido a que la ruta más habitual por la que se inicia la vía baja de degradación parece ser el meta clivaje del catecol, paso catalizado por dicha enzima (Meyer y col., 1999).

Los genes C230 en combinación con los genes que codifican RHD han permitido determinar mediante técnicas de PCR, la capacidad de bacterias o comunidades bacterianas para mineralizar por completo un PAH determinado (Meyer y col., 1999). La figura 1.2.1 muestra las vías alta y baja en la degradación del fenantreno donde actúan las dioxigenasas y catecol 2,3 dioxigenasa respectivamente.

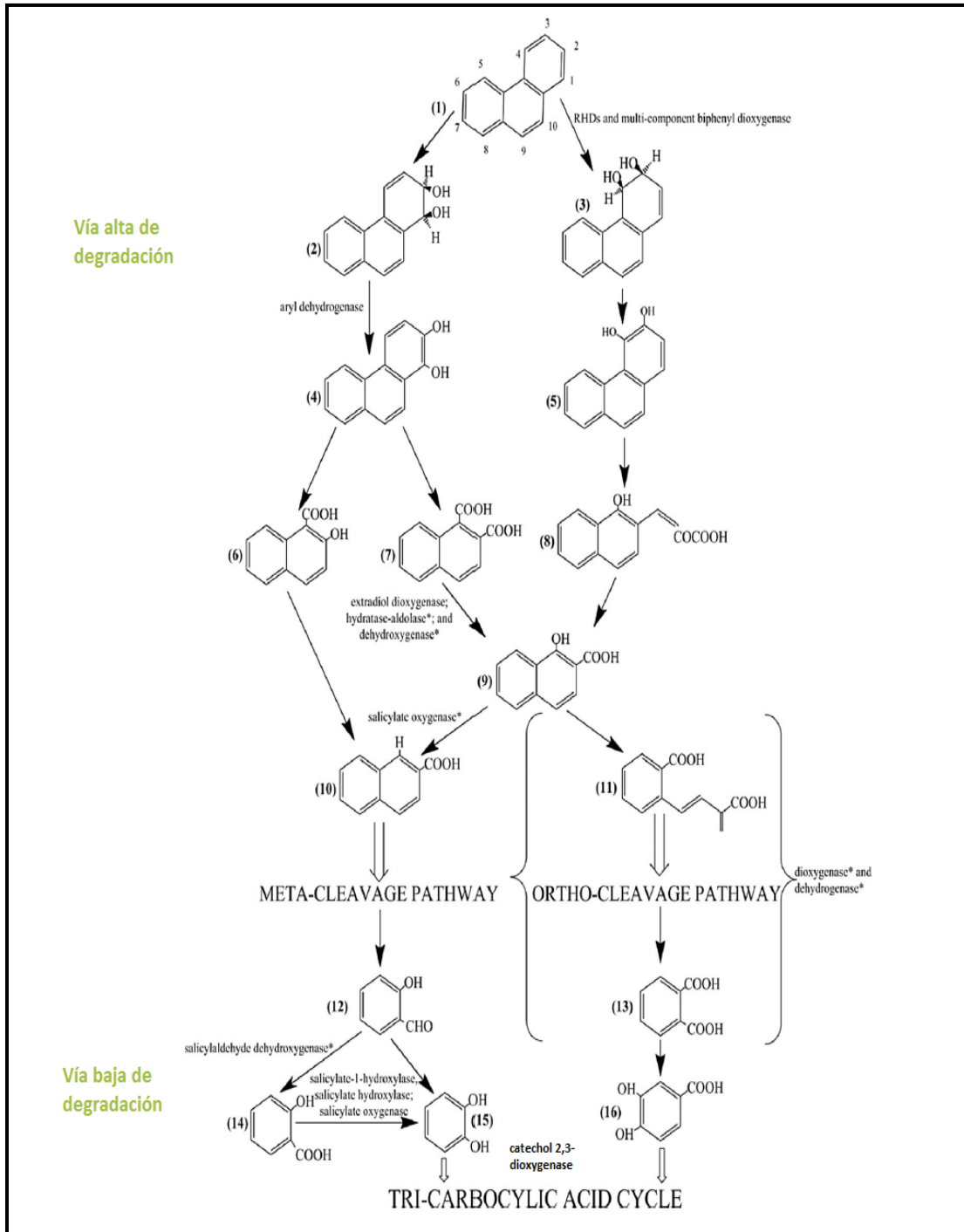


Figura 1.2.1: Vía de degradación aerobia de fenantreno en *Shingomonas*. Tomado de Waigi y col., 2015.

## 1.3 Los microorganismos como mediadores de la eliminación los PAH del ambiente

### 1.3.1 Estrategias de biorremediación

La biorremediación utiliza organismos vivos y/o partes de los mismos (plantas, algas, hongos y bacterias) para absorber, degradar o transformar los contaminantes y retirarlos, inactivarlos o atenuar su efecto en suelo, agua y aire (<http://biorremedia.com.mx/Biorremediacion/BiorremediacionDefinicion.html>).

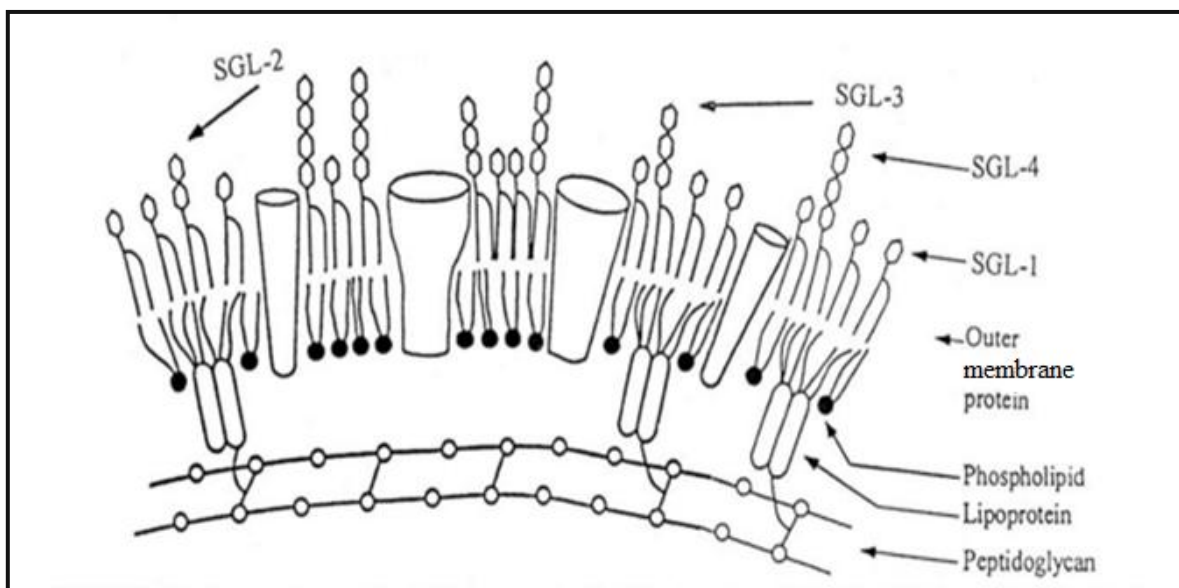
Gracias a la capacidad de mineralizar compuestos complejos como los PAH por parte de los microorganismos, se han propuesto a través de los años diferentes tecnologías de biorremediación que buscan sanear ecosistemas afectados por la contaminación de un compuesto xenobiótico. La **bioestimulación** es una de ellas, y se basa en estimularlos microorganismos autóctonos mediante el aporte de nutrientes, oxígeno y otros procesos, con el fin de mineralizar el contaminante; sin embargo este proceso implica el conocimiento previo de la capacidad potencial degradadora de esa comunidad microbiana, de las necesidades puntuales de la comunidad para estimular el proceso, de las propiedades fisicoquímicas del ecosistema afectado y del contaminante presente en ese sitio (<http://ingenierosdeminas.org/docu/documentos/fundamentos%20biorremediacion-.pdf>). La introducción de microorganismos degradadores de un contaminante en forma libre (Coppotelli y col., 2008), encapsulados (Weir y col., 1996), inmovilizados en soportes (Del Panno y col., 2005) o incluso modificados genéticamente en el medio, con el fin de mejorar la biodegradación del ecosistema afectado constituyen la técnica de **bioaumentación**. En los últimos años algunos autores han sugerido que es posible llevar a cabo esta estrategia mediante la inoculación con microorganismos que poseen elementos genéticos móviles (como plásmidos y transposones) portando genes degradativos, los cuales serían transferidos horizontalmente a las poblaciones bacterianas indígenas contribuyendo a la remediación (Weekers y col., 2001; Top y col., 2002).

### 1.3.2 Género *Sphingomonas*

El género *Sphingomonas* se ha vuelto de gran interés para el diseño de estrategias de bioaumentación debido a que han sido aisladas de ecosistemas muy diversos y presentan la capacidad de degradar una gran cantidad de compuestos xenobióticos entre los cuales se encuentran los PAH (Fredrickson y col., 1995). Se han aislado *Sphingomonas* degradadoras de ambientes prístinos terrestres y acuáticos, y con contaminación antropogénica (Madueño y col., 2011; Fujii y col., 2001; Takeuchi y col., 2001; Wittich y col., 1992 Gibson y col., 1973).

Son microorganismos Gram negativos (GN), quimioheterotrófos, aerobios estrictos pertenecientes al subgrupo  $\alpha$ -4 de *Proteobacteria*; cuyas colonias usualmente presentan forma redondeada y pigmentación amarilla. En el año 2001, *Sphingomonas* (“*sensu lato*”) fue dividido en cuatro nuevos géneros, *Sphingomonas* (“*sensu stricto*”), *Sphingobium*, *Novosphingobium* y *Sphingopyxis* (Takeuchi y col., 2001), siendo una de las causas de la división la presencia de glicoesfingolípidos (GLS) formados por monosacáridos u oligosacáridos en su membrana externa (Fig. 1.3.1) (Yabuchi y col., 1990) (Figura 1.3.1).

Se cree que los glicoesfingolípidos reemplazan y desempeñan un papel similar a los lipopolisacáridos presentes en la mayoría de otras bacterias GN, (Kawahara y col., 1991), manteniendo la fluidez de la membrana, otorgando cierta permeabilidad contra algunas sustancias bacterianas y dando antigenicidad a la superficie celular (Kawasaki y col., 1993). Se ha sugerido que otorgan gran hidrofobicidad a la membrana generando mayor afinidad por compuestos hidrofóbicos como los PAH y que podrían estar relacionados con la producción de surfactantes para favorecer la degradación de PAH (Johnsen y col., 2004). Además, muchas *Sphingomonas* pueden excretar heteropolisacáridos aniónicos (sphinganos) y formar biofilms, habilidades que podrían estar vinculadas con la degradación de PAH de alto peso molecular (Uyttebroek y col., 2006).



**Figura 1.3.1: Membrana externa de *Spingomonas paucimobilis*.** SGL-1 ácido glucurónico- ceramida, SGL-2 glucosamina- ácido glucurónico- ceramida, SGL-3 galactosa- glucosamina-ácido glucurónico- ceramida, SGL-4 manosa-galactosa- glucosamina- acido glucurónico- ceramida. Tomado de Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume two.

### 1.3.3 Organización genética de genes degradadores en *Spingomonas*

Estudios comparativos de las vías de degradación de PAH utilizadas por *Spingomonas* y bacterias “no *Spingomonas*” no han evidenciado diferencias significativas entre las mismas (Chadhain y col., 2007; Kuhm y col., 1991). Sin embargo, la imposibilidad de detectar genes biodegradativos de *Spingomonas* mediante hibridación con genes catabólicos de bacterias filogenéticamente distintas, como por ejemplo las del género *Pseudomonas*, sugiere que los genes de *Spingomonas* evolucionaron de forma independiente (Kim., 1995 y 1996). La organización de genes relacionados con la degradación de PAH difiere entre *Spingomonas* y microorganismos de otro género bacteriano ya que en la mayoría de los otros géneros estos genes están organizados en operones coordinadamente regulados. En muchas cepas de *Spingomonas* los genes degradativos se encuentran separados unos de otros o al menos no están organizados en operones regulados coordinadamente (Nagata y col., 2007).

Estudios en las cepas degradadoras *Spingobium yanoikuyae* B1 y *Novospingobium aromaticivorans* F199 mostraron que en una región de aproximadamente 40 kb están

codificados cerca de 35 genes, en al menos 6 unidades transcripcionales, que participan en la degradación de naftaleno, bifenilo, fenantreno y compuestos monoaromáticos (Romine y col., 1999). La comparación de la organización de estos genes, con los involucrados en la degradación de naftalensulfonatos en la cepa *Sphingomonas xenophaga* BN6 demostró que al menos tres de estos grupos génicos, que presumiblemente, comprenden cinco unidades transcripcionales están también presentes en la cepa BN6. Además, mediante reacciones de PCR con primers específicos para cada uno de estos clúster génicos individuales, se demostró la presencia de estos genes en otras cepas de *Sphingomonas* degradadoras, sin embargo, la posición y la distancia entre cada uno varió fuertemente entre ellas (Basta y col., 2005).

Algunas cepas de *Sphingomonas* tienen los genes vinculados con la degradación de un PAH particular distribuidos en operones múltiples que además poseen genes para la degradación de otros compuestos aromáticos (Zylstra., 1997). Los análisis realizados por Aylward y col., 2013, donde compararon las secuencias de los genomas de 26 *Sphingomonas* revelaron la existencia de numerosos marcos de lectura abiertos (ORFs) específicos de la especie, pero pocas secuencias específicas del género. Encontraron que la organización de los genomas de *Sphingomonas* parece ser altamente variable y que la transferencia de genes mediada por plásmidos, la recombinación plásmido-cromosoma junto con los rearrreglos mediados por profagos y transposones podrían ser mecanismos de importancia en la evolución de estos genomas. Por otro lado, en este estudio como en otros realizados en años anteriores (Romine y col., 1999; Basta y col., 2004; Shinitani y col., 2007) se demostró la presencia de uno o más plásmidos o megaplásmidos en *Sphingomonas* (Figura 1.3.2) muchos de los cuales codifican genes relacionados con la degradación de PAH.



Organism	Size (kb)	No. of:					
		Putative prophage	Phage-like proteins (% of total proteins)	Transposons	Monooxygenases	Dioxygenases	CAZymes
<i>Novosphingobium aromaticivorans</i> DSM 12444							
Chromosome	3,561.6	5	309 (9.3)	16	13	19	58
Plasmid pNL1	184.5	1		1	1	13	1
Plasmid pNL2	487.3				2	3	8
<i>Novosphingobium</i> sp. strain PP1Y							
Chromosome	3,911.5	3	113 (3.3)	24	10	33	36
Plasmid Lpl	192.1	1		5			2
Plasmid Spl	48.7			1			1
Plasmid Mpl	1,161.6			17	5	6	41
<i>Sphingobium chlorophenicum</i> L-1							
Chromosome 1	3,080.8	1	107 (3.8)	15	9	4	30
Chromosome 2	1,368.7	1	74 (6.7)	8	6	15	17
Plasmid pSPHCH01	123.7			2			1
<i>Sphingobium japonicum</i> UT26S							
Chromosome 1	3,514.8	2	95 (2.7)	37	9	6	28
Chromosome 2	681.9			7	2	2	22
Plasmid pUT1	31.8			5			
Plasmid pUT2	5.4						
Plasmid pPCHQ1	191.0	2		6	2		2
<i>Sphingobium</i> sp. strain SYK-6							
Chromosome	4,199.3	1	88 (2.3)	29	16	23	25
Plasmid pSLPG	148.8			6			1
<i>Sphingomonas wittichii</i> RW1							
Chromosome	5,382.26	2	183 (3.8)	36	42	38	33
Plasmid pSWIT01	310.2	2		9		2	1
Plasmid pSWIT02	222.8	1		31	1	6	2
<i>Sphingopyxis alaskensis</i> RB2256							
Chromosome	3,345.2	1	62 (2.0)	36	9	7	33
F plasmid	28.5						

Figura 1.3.2: Número y tamaño de elementos genéticos y enzimas biodegradativas en los genomas de 7 *Sphingomonas* secuenciadas. Tomada de Aylward y col., 2013.

### 1.3.4 Plásmidos en *Sphingomonas*

Como se ha mencionado, los microorganismos del género *Sphingomonas* generalmente poseen uno o varios plásmidos cuyos tamaños pueden variar desde menos de 50kb (no tan frecuentes) hasta 500kb, por lo que se los suele denominar “megaplásmidos”. Varios trabajos demostraron la presencia de genes vinculados con la degradación de PAH en dichos megaplásmidos (Stillwel y col., 1995; Basta y col., 2004; Aylward y col., 2013).

En los últimos años se han secuenciado los genomas de algunas bacterias de la familia *Sphingomonadaceae* y sus plásmidos, entre los que es interesante remarcar: pNL1

de *N. aromaticivorans* F199 (Romine y col., 1999) que contiene genes de degradación de PAH, pCAR3 de *Sphingomonas* sp. KA1 que contiene todos los genes para la mineralización del carbazol (Shintani y col., 2007) y pCHQ1 que codifica los genes que participan en la degradación de gama-hexa cloro ciclohexano (Nagata y col., 2011).

La presencia de más de un plásmido o megaplásmido en una misma cepa de *Sphingomonas* sugiere que deben existir diferentes grupos de incompatibilidad. El estudio comparativo de las secuencias de plásmidos de *Sphingomonas* permitió determinar qué tipo de proteínas Rep (relacionadas con la iniciación de la replicación de plásmidos) y qué tipo de proteínas Par (involucradas en la segregación plasmídica) estaban codificadas en los mismos. Los resultados obtenidos llevaron a proponer la división en tres grupos diferentes, que se detallan en la Figura 1.3.3. Por otro lado, los estudios de las secuencias también indican que todos los megaplásmidos estudiados poseen genes que permitirían la transferencia conjugativa de los mismos (Stolz., 2014).

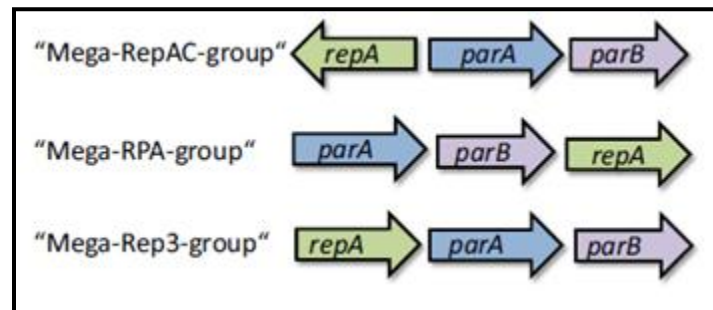


Figura 1.4.3: Clasificación en tres grupos de los genes rep y par de megaplásmidos de *Sphingomonas*. Imagen tomada de Stolz, 2014.

## 1.4 Hipótesis

- ✓ Los microorganismos de nuestra colección de *Sphingomonas* degradadoras de PAHs poseen plásmidos.
- ✓ Los plásmidos de las cepas de *Sphingomonas* estudiadas son portadores de genes vinculados con la degradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos.

## 1.5 Objetivos

### 1.5.1 Objetivo general

Aportar conocimientos básicos sobre la organización genética en *Sphingomonas* degradadoras de hidrocarburos policíclicos aromáticos potencialmente útiles en estrategias de biorremediación.

### 1.5.2 Objetivos específicos

- ✓ Aislar, purificar y caracterizar megaplásmidos de *Sphingomonas* degradadoras de PAH.
- ✓ Aplicar diferentes estrategias experimentales que permitan sugerir la presencia de genes de degradación de PAH en los megaplásmidos estudiados.

**Capítulo 2**  
 **Materiales**  
 **y**  
 **métodos**



## 2. Materiales y Métodos

### 2.1 Materiales

#### 2.1.1 Medios de cultivo

Medios / Componentes (g/l)	Caldo R3 (Reasoner & Geldreich 1985)	Medio mineral liquido(MML) (Vecchioli y col., 1990)	Medio Mineral suplementado (MMsupl)	LB (Sambrook y col.,1989)	Caldo Nutritivo (CN) (Britania)	TY (Beringer, 1974)
Triptona	-----	-----	-----	10	-----	5
Extracto de levadura	1	-----	-----	5	-----	3
Extracto de carne	-----	-----	-----	-----	3	-----
Proteosa peptona	1	-----	-----	-----	5	-----
Casamino	1	-----	-----	-----	-----	-----
Glucosa	1	-----	1	-----	-----	-----
Almidón	1	-----	1	-----	-----	-----
Acido pirúvico	0.5	-----	0.5	-----	-----	-----
NaCl	-----	5	5	5	-----	-----
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.6	1	1	-----	-----	-----
(NH <sub>4</sub> )H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-----	1	1	-----	-----	-----
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-----	1	1	-----	-----	-----
MgSO <sub>4</sub>	0.1	0.2	0.2	-----	-----	-----
KNO <sub>3</sub>	-----	3	3	-----	-----	-----
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	-----	-----	-----	-----	-----	0.7
H <sub>2</sub> O destilada	1000ml	1000ml	1000ml	1000ml	1000ml	1000ml

Tabla 2.1.1: Medios de cultivo

Para obtener los medios sólidos se agregó a las soluciones 15 g/l de agaragar.

Los medios se esterizaron en autoclave a 121°C durante 15 min.

### 2.1.2 Medio-PAH

Con el fin de obtener una placa conteniendo PAH, al MMS, MMSupl o R3 previamente plaqueado se le agregó una suspensión de 3,5 ml de agarosa fundida al 1% y 200µl de solución de fenantreno en etanol absoluto (8.5mg/ml), quedando así una capa superficial de agarosa que le confiere turbidez al medio debido a la baja solubilidad del PAH en la misma. (Bogardt & Hemmingsen 1992).

### 2.1.3 Buffers

Componentes	TE	TBE	TAE
Tris	10 mM	0.089M	8M
EDTA	1 mM	0.020M	0.325M
Ácido bórico	-----	0.089M	-----
Ácido acético glacial	-----	-----	228.5 ml*

Tabla 2.1.2: Buffers

\*volumen agregado cada 1000ml de agua destilada.

### 2.1.4 Antibióticos

Antibiótico	Concentración
Ácido nalidíxico (Ac.N)	5µg/ml
Ampicilina (Amp)	200µg/ml
Ciprofloxacina (Cp)	1µg/ml
Cloranfenicol (Ch)	20µg/ml
Estreptomicina (Str)	50µg/ml
Gentamicina (Gm)	10µg/ml
Neomicina (Neo)	120µg/ml
Piperacilina (Pip)	50µg/ml
Rifampicina (Rif)	200µg/ml
Spectomicina (Sp)	100µg/ml
Tetraciclina (Tc)	2µg/ml

Tabla 2.1.3: Antibióticos

Se prepararon soluciones concentradas de los antibióticos en agua desionizada y se esterizaron por filtración usando membranas de nitrocelulosa con poros de 0.2  $\mu\text{m}$ . Las soluciones de tetraciclina y rifampicina se realizaron en etanol y metanol respectivamente.

### 2.1.5 Cepas bacterianas

Las cepas degradadoras de PAH pertenecientes al género *Sphingomonas* estudiadas en este trabajo, provienen de suelos de distintas regiones de la Argentina y fueron aisladas mediante diferentes estrategias en trabajos previos:

-*Sphingobium* 1A, 22A y 22B fueron aisladas mediante la estrategia de aislamiento directo a partir de suelos crónicamente contaminados con hidrocarburos cercanos a un sitio de excavación petrolera en la región Patagónica Central (Madueño y col., 2011). *Sphingobium* sp. 36 fue aislada de la misma muestra de suelo, sin embargo se utilizó la estrategia de enriquecimiento con repiques sucesivos en MML con fluoreno como única FCE.

-*Sphingobium* AM se aisló de un consorcio degradador, obtenido del enriquecimiento con fenantreno de una suspensión de suelo crónicamente contaminado de un polo petroquímico del gran La Plata. Fue seleccionada por su capacidad de degradar fenantreno como única fuente de carbono y energía (Festa y col., 2013).

- *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA (SP) fue aislada luego de 69 días de tratamiento de un microcosmos de suelo prístino de Gran La Plata contaminado artificialmente con 2 g kg<sup>-1</sup> de fenantreno e incubado a temperatura ambiente (20 $\pm$ 2°C) (Coppotelli y col., 2008).

Además en los ensayos realizados durante este trabajo se utilizaron las siguientes cepas bacterianas:

-*Ensifer meliloti* MVII/1 (Hynes y col., 1986).

-*E. coli* DH5 $\alpha$  Rk600 Helper (Kessler y col., 1992).

-*E. coli* S17-1, pSUP102Cm::Tn5B13 Tc<sup>R</sup>,Gm<sup>R</sup>, mob (Simon y col., 1989).-*E. coli* HB101 pRK2013 Km<sup>R</sup>(Sambrook J., y col.,1989; Figursky y col., 1979).

## 2.2 Métodos

### 2.2.1 Extracción de ADN total de las cepas bacterianas

La extracción del ADN total de las cepas estudiadas fue realizada mediante el método del hervido (Sambrook et al. 1989). Se centrifugó 1 ml de cada cultivo crecido 18 a 24 h en caldo R3 y el precipitado obtenido se re suspendió en 1 ml de agua destilada. Las suspensiones se colocaron en un baño de agua a 100°C durante 10min. Luego se centrifugaron a 7000 rpm durante 7min. El sobrenadante, con el ADN total, fue transferido a un nuevo tubo y almacenado a -20°C.

### 2.2.2 Extracción de ADN plasmídico por miniprep (Sambrook y col., 1989)

Partiendo de cultivos en caldo R3 crecidos durante 24 hs y en agitación, se tomaron 1.5 ml y se centrifugaron a 7000 rpm durante 7 min. Luego 200 µl de solución P1 (50 mM Tris/HCL, 10 mM EDTA pH 8) y 300 µl de solución P2 (NaOH 0,2 M, SDS 1%) fueron agregados sobre el pellet mezclando suavemente para producir la lisis bacteriana. Con el fin de precipitar el ADN cromosomal y los restos de membrana bacteriana se agregaron 300 µl de solución P3 (CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>K 3M pH 5.5), se mezcló y se centrifugó a velocidad máxima 10 min. El sobrenadante, con el ADN plasmídico, fue trasvasado cuidadosamente a un nuevo tubo, donde se precipitó mediante el agregado de 1 V de isopropanol frío. La preparación se centrifugó 10 min a máxima velocidad. El pellet se lavó dos veces con 400 µl de etanol 70% y se dejó secar por inversión sobre papel absorbente. Finalmente el pellet se re suspendió en agua bidestilada estéril. En un gel de agarosa 0,8 % se sembraron 15 µl de extracto plasmídico y 5 µl de patrón de peso molecular del fago λ (Productos biológicos<sup>®</sup>) digerido con la enzima de restricción Hind III. Se corrió durante 70 min a 70 V utilizando buffer TAE 1X como buffer de corrida. El gel se coloreo con Syber Gold (40 ul en 400 ml de buffer TAE 1X) y se visualizó con transiluminador ultravioleta de λ = 260 nm. El registro de los resultados se realizó mediante fotografía de los geles con una cámara digital.



### **2.2.3 Extracción / purificación de ADN plasmídico (Kieser y col.1984)**

Se tomaron 2 ml de un cultivo crecido durante 24 hs en caldo R3, se centrifugaron a 7000 rpm durante 7 min, el pellet se lisó suavemente con el agregado de 500  $\mu$ l de solución de lisozima (2mg/ml en TE) y un paso de incubación en hielo por 30 min. Para conseguir la hidrólisis del ARN, se agregaron 250  $\mu$ l de SDS 2% en NaOH 0,3 M se mezcló con vortex e incubó a 55 °C durante 30 min.

Luego se agregaron 80  $\mu$ l de fenol/cloroformo ácido, que se mezcló con la muestra y se centrifugó a 14000 rpm por 10 min. La fase acuosa fue transferida a un nuevo tubo conteniendo 70  $\mu$ l de acetato de sodio 3 M, se le agregaron 700  $\mu$ l de isopropanol, se agitó por inversión y se dejó a temperatura ambiente 5 min, consiguiendo la precipitación de proteínas y de ADN simple cadena. Luego se centrifugó 15 min a 1200 rpm y se eliminó todo el sobrenadante con pipeta. El pellet, conteniendo el ADN circular, se disolvió en 50  $\mu$ l de buffer TE adicionado con 10  $\mu$ l de ARNasa (4mg/ml) para degradar el ARN remanente.

El segundo paso de purificación consistió en añadir 5  $\mu$ l de acetato de sodio 3 M y 25  $\mu$ l de fenol/cloroformo neutro que se mezclaron y centrifugaron a 12000 rpm hasta que la fase acuosa estuvo límpida. Esta fue transferida a un nuevo tubo conteniendo 50  $\mu$ l de isopropanol, se mezcló y centrifugó entre 10-15 min a 12000 rpm. Se utilizó una pipeta para remover por completo el sobrenadante. A continuación se re disolvió el pellet en 50  $\mu$ l de buffer TE y se le adicionaron 25  $\mu$ l de espermina 100mM, luego de agitar por inversión e incubar a temperatura ambiente 5 min se consiguió la precipitación de ADN plasmídico. Se volvió a centrifugar a velocidad máxima 15 min y se eliminó el sobrenadante con pipeta. El pellet fue re suspendido en 300  $\mu$ l de solución de acetato de sodio 0,3 M, CaCl<sub>2</sub> 10mM, se le agregaron 700  $\mu$ l de etanol y se incubó a temperatura ambiente durante una hora. Finalmente, se centrifugó 10 min a 14000 rpm, se eliminó por completo el sobrenadante con pipeta y se re disolvió el pellet en buffer TE (20 $\mu$ l).

#### **2.2.4 Gel de lisis “*in situ*” (Eckhardt, 1978)**

Los ensayos de geles de lisis “*in situ*” se realizaron utilizando cultivos frescos crecidos en caldo R3 o TY en agitación. Se realizaron medidas de DO (600nm) y se tomaron 250µl de aquellos cultivos cuyas DO fueron superiores a 0,4 y 500µl de aquellos con DO inferiores a 0.2. Se centrifugaron 3 min a 12000 rpm y el pellet se lavó con 1 ml de sarcosilato de sodio 0,3 % en buffer TE frío. Se eliminó el sobrenadante y secó por inversión. Luego se agregaron 15 µl de ficol 20 % P/V y se dejó en hielo hasta el momento de siembra; antes de sembrar se agregó a cada muestra 15 µl de buffer de lisis (500 µl buffer TE, punta de tip de lisozima y 10 µl de ARNasa 4mg/ml).

Se preparó un gel de agarosa al 0,8 % en buffer TBE 1X, se colocó en la cuba sin que el buffer lo cubra. Previo a la siembra de las muestras, se colocaron 25 µl de xilen-cianol en cada una de sus fosas, para seguir luego el avance de las muestras lisis, y se corrió 10 min a 110 V con la polaridad invertida. Finalmente se cubrió el gel con el buffer y se sembraron 15 µl de la mezcla de lisis, se corrió una hora a 30 V luego se subió el voltaje a 110 V y se corrió una hora más. El gel se lavó con agua destilada y se coloreó con bromuro de etidio (0,5 mg/ml) durante 10-20 min.

#### **2.2.5 Digestión con enzimas de restricción**

Para las digestiones enzimáticas se utilizaron 10 µl de ADN plasmídico, 2 µl de buffer 10X respectivo a la enzima de restricción a utilizar y 1 unidad de enzima en un volumen final de 20 µl, en las condiciones indicadas por el fabricante (Fermetas y Promega). Las mezclas de reacción se incubaron 24hs a 37 °C. Luego se realizaron corridas electroforéticas en geles de agarosa 0,8% para visualizar los perfiles de restricción.

### **2.2.6 Curación de plásmidos**

#### **A- Método de curación según Xiuhong-Feng y col., 1997**

Se inoculó el microorganismo en medio LB líquido y se creció a 42 °C con agitación durante 48 hs. Se realizaron diluciones seriadas del cultivo utilizando solución fisiológica (SF). La dilución correspondiente se plaqueó en medio LB sólido e incubó a 28°C durante 2-4 días. Las colonias obtenidas se repicaron en MMS- agarosa con fenantreno (sección 2.1.2 materiales), para evidenciar la propiedad degradadora. A las colonias que no mostraron capacidad degradadora se les realizó el ensayo de lisis “*in situ*” en geles de agarosa para verificar la ausencia de plásmido.

#### **B- Método de curación según Tamara Basta y col., 2004**

Se inocularon colonias en caldo nutritivo (CN) e incubaron a 32 °C con agitación durante 7 días (aproximadamente 100 generaciones). Se realizaron diluciones seriadas en SF del cultivo y se plaquearon en MMS- agarosa suplementado con glucosa al 1 % y fenantreno. Aquellas colonias en las que no se evidenció halo de degradación del PHA y que además presentaron una morfología diferente de las degradadoras, fueron repicadas y se les realizó “lisis *in situ*” (Eckhardt y col., 1978) para corroborar la ausencia de plasmido.

### **2.2.7 Electrotransformación de *Escherichia coli* DH5α con megaplásmidos de *Sphingomonas* degradadoras**

Se prepararon células electrocompetentes utilizando la técnica de Tung – Chow (1995). Se realizaron electrotransformaciones usando un equipo Gene Pulser (Bio-Rad), en cubetas de 0,2 ml bajo las condiciones recomendadas por el fabricante (25mF, 200W, 2,5 kV). Luego de la electrotransformación se adicionó a las células 1 ml de medio LB, se incubó durante 1 hora a 37°C para permitir que la información contenida en el ADN introducido se exprese. Luego la suspensión se plaqueó en MMS (al que se le agregó extracto de levadura)-agarosa con fenantreno y también en R3- agarosa con fenantreno sección materiales 2.1.2 y se incubó 24 hs a 37°C. Se observaron las placas para detectar la

presencia de halo de degradación del fenantreno alrededor de las colonias. Las colonias, aparentemente degradadoras, fueron aisladas y se les realizó miniprep (sección 2.2.2 materiales y métodos) para evidenciar la adquisición del plásmido.

### **2.2.8 Transformación química de *Escherichia coli* DH5α con mega plásmidos de *Sphingomonas* degradadoras**

En un tubo de 1,5 ml se colocaron 50 µl de *E. coli* competentes químicas (mediante tratamiento de las células con solución de CaCl<sub>2</sub>) a las que se les adicionó 1,3 µl de ADN plasmídico purificado por el método de Kieser (sección 2.2.3 métodos) y se dejó reposando en hielo durante 30 min. Pasado este tiempo se colocó a 42 °C por 2 min e inmediatamente después se volvió a incubar en hielo por 5 min. Luego, se agregaron 450 µl de medio LB y se incubó a 37°C por 1 hora. Se realizó el mismo procedimiento sobre células de *E. coli* pero sin el agregado de ADN plasmídico como control del ensayo. Posteriormente se plaqueó la transformación en placas con MMS (al que se le adicionó glucosa al 1% mediante filtrado)- agarosa con fenantreno (sección 2.2.1 materiales).

Para identificar las colonias degradadoras se colocaron en las tapas de las placas crecidas cristales de indol, que luego de aproximadamente 20 días de incubación a temperatura ambiente permite visualizarlas de color azul. El método se basa en la conversión del indol a índigo por la acción de las dioxigenasas, enzimas vinculadas en la degradación de PAH (Zocca et al. 2004).

### **2.2.9 Conjugaciones**

#### **A- Conjugaciones biparentales:**

Se realizaron conjugaciones basadas en la técnica de Simon y col., 1989. Se mezclaron en tubos de 1.5ml, 0.7 ml de cultivo de la cepa donadora con igual volumen de la cepa receptora, ambos en fase exponencial. Luego se centrifugó la mezcla a 2400rpm durante 8 min. El sobrenadante fue descartado y el pellet fue resuspendido suavemente en 50µl de caldo R3. La suspensión se colocó en forma de gota en una placa de Petri conteniendo medio R3 sólido sin antibióticos y se incubó 24 hs a 30°C. Pasado el tiempo de incubación la gota fue levantada, resuspendida en 1ml de R3 y 100 µl fueron plaqueados en R3 sólido con los antibióticos adecuados. Se realizaron controles de la cepa donadora y la receptora con el fin de verificar la ausencia de crecimiento en los medios con el agregado de los antibióticos.

#### **B- Conjugaciones triparentales:**

Se colocaron volúmenes iguales de las cepas donadora, receptora y movilizadora o helper (400 µl de c/u), todas en fase exponencial de crecimiento, en un tubo de 1.5 ml. Luego se centrifugó 8 min a 2400rpm, el pellet se resuspendió en 50 µl de medio LB líquido y se colocó en forma de gota en placa de Petri con medio LB sólido sin antibióticos. Se incubó a 37°C, después de 24 hs la gota se resuspendió en 1ml de medio LB y se plaqueó 100 µl en medio LB sólido con los correspondientes antibióticos. Procediendo de la misma forma se realizaron controles utilizando solo la cepa donadora, receptora o helper.

### **2.2.10 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Se aplicó la técnica de PCR con primers específicos para genes de dioxigenasas de microorganismos degradadores descritos en bibliografía, utilizando como molde el ADN total obtenido mediante el método del hervido (Sambrook y col., 1989) y el ADN plasmídico obtenido según Kieser y col. 1984. El termociclador utilizado fue Eppendorf Mastercycler thermocycler (Eppendorf, Hamburg, Germany). Los programas y las mezclas de reacción se detallan en las tablas 2.2.1 y 2.2.2 respectivamente.

Tabla 2.2.1: Reacciones de PCR

Primer	Gen blanco	Experimento	Referencia	Programa
<b>PAHRHDaGNF:</b> GAGATGCATACCACGT KGGTTGGA  <b>PAHRHDaGNR:</b> AGCTGTTGTTCCGGGAA GAYWGTGCMGTT	Dioxigenasa (PAH-RHD $\alpha$ )	PCR	Cebren y col., 2008	95°C 5 min. 30 ciclos: 95°C 30seg, 43°C 30seg, 72°C 30seg. 1 ciclo 72°C 7 min.
<b>AC114F:</b> CTGGC(T/A)(T/A)TT(T/ C)CTCAC(T/C)AT  <b>AC596R:</b> Z(G/A)GGTG(C/T)CTTC CAGTTG	Naftaleno Dioxigenasa	PCR	Wilson y col.,1999	94°C 1 min 1 ciclo: 94°C 1 min,57°C 1 min, 72°C 1.5 min. 29 ciclos en los cuales la T <sup>o</sup> de annealing se reduce 0.5°C por ciclo. 15 ciclos: 94°C 1 min, 42°C 1 min, 72°C 1.5min, 72°C 5 min
<b>nahrev 1:</b> CCCGGTARRWANCCDC KRTA  <b>nahf:</b> TGCMVNTAYCAYGGYT GG  <b>nah rev2:</b> CRGGTGYCTCCAGTTG	Dioxigenasa	Nested PCR	Zhou y col., 2006	<b>Primera ronda</b> 94°C 3 min. 40 ciclos: 94°C 45seg, 55°C 45seg, 72°C 45seg. 1 ciclo 72°C 5 min. <b>Segunda ronda.</b> 94°C 3 min. 30 ciclos: 94°C 45 seg, 55°C 45 seg, 72°C 45 seg. 1 ciclo 72°C 5min.
<b>nahAcF:</b> TATCACGGCT GGGRCTTC  <b>nahAcR:</b> GAASCCATGG AAGCTCTC	Naftaleno Dioxigenasa	PCR	Marcos y col.,2012	5 min 95°C, 40 ciclos: 95°C 30seg 63°C 30seg 72°C 30seg
<b>C230F:</b> AAGAGGCATGG GGGCGCACCGTTTCGA TCA  <b>C230R:</b> CCAGCAAACAC CTCGTTGCGGTTGCC	Catecol2,3- dioxigenasa	PCR	Sei y col.,1999	10ciclos: 94°C60seg, 59°C30seg, 72°C 30seg. 15 ciclos: 94°C 60seg, 57°C 30seg, 72°C 30seg. 15ciclos: 94°C 60seg, 55°C 30seg, 72°C 30seg.

Tabla 2.2.2: Mezclas de reacción

Referencia /Reactivos	Cebren y col., 2008	Wilson y col.,1999	Zhou y col., 2006 1° ronda	Zhou y col., 2006 2° ronda	Marcos y col.,2012	Sei y col.,1999
<b>Primer F</b>	1.2µl (5µM)	6µl  (1 µM)	1µl  (100µM)	1µl  (100µM)	2,5µl  (5µM)	2.5µl  (0,2µM)
<b>Primer R</b>	1.2µl (5µM)	6µl  (1 µM)	1µl  (100µM)	1µl  (100µM)	2,5µl  (5µM)	2.5µl  (0,2µM)
<b>dNTPs (2,5mM)</b>	2.4µl	0.6 µl	4,5µl	3µl	2.4µl	2.4µl
<b>Taq buffer 5X</b>	6µl	6µl	6µl	6µl	6µl	6µl
<b>Taqpolimerasa(5U/ml)</b>	0,15µl	0.18µl	0,2µl	0,2µl	0,12µl	0,12µl
<b>Albumina (10mg/ml)</b>	0,75µl	0.9 µl	1µl	1µl	0,6µl	0,6µl
<b>Molde ADN</b>	2µl	2µl	1µl	0,1µl	1µl	1µl

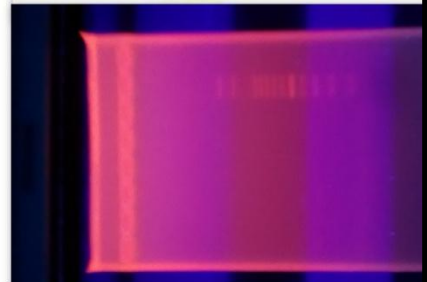
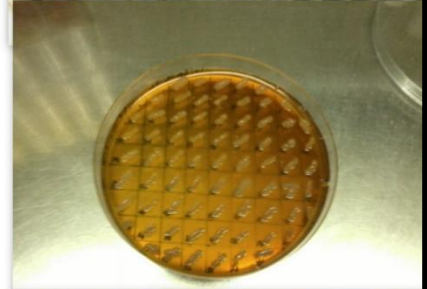
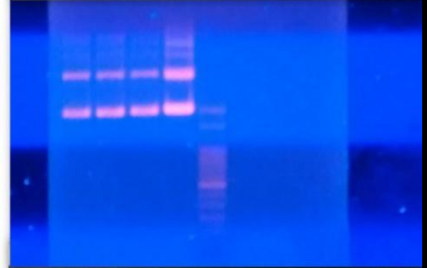
Se realizaron geles de agarosa al 1,2% corridos a 90 V y coloreados con bromuro de etidio durante 15 min, para visualizar los productos de PCR.

### **2.2.1 Secuenciación**

Los productos de PCR fueron purificados utilizando el kit comercial **Nucleo Spin Extract II** y fueron secuenciados por el servicio de secuenciación Macrogen, Korea. Las secuencias de nucleótidos fueron comparadas con las bases de datos de secuencias pertenecientes al National Center for Biotechnology Information Gen Bank, utilizando el programa BLAST.



***Capítulo 3***  
***Resultados***  
***y***  
***discusión***



### 3. Resultados y discusión

En estudios previos de nuestro grupo de trabajo, se realizaron mini preparaciones con el fin de extraer plásmidos a partir de *Sphingomonas* patagónicas degradadoras de PAH (Madueño y col, 2011) y de *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA (SP), aislada de suelo pampeano (Coppotelli y col, 2008). Se observó en todos los casos la presencia de al menos una banda de igual movilidad electroforética en todas las cepas ensayadas, demostrando que éstas podrían tener al menos un plásmido (Madueño 2013). Debido a estos indicios, y a los datos bibliográficos de los últimos años que muestran que muchas *Sphingomonas* poseen megaplásmidos que codifican genes relacionados con vías de degradación de PAH (Stolz y col., 2013); en este trabajo hemos ampliado el estudio con el fin de caracterizarlos plásmidos de una colección de *Sphingomonas* degradadoras provenientes de suelos de distintas regiones y aisladas mediante diferentes estrategias.

#### 3.1 Detección y purificación de megaplásmidos

Inicialmente en este trabajo se realizaron aislamientos y purificaciones de plásmidos mediante mini preparaciones (Sambrook y col., 1989) con el objetivo de corroborar la presencia de plásmidos en la colección de cepas de *Sphingomonas* degradadoras (1A, 22A, 22B, 36, SP y AM). Una vez obtenidas, las minipreparaciones se corrieron mediante electroforesis en gel de agarosa 0,8% durante 70 min a 70 V. Se observó en geles de agarosa, a diferencia de ensayos previos (Madueño, 2013), bandas muy tenues correspondientes probablemente a plásmidos (datos no mostrados) y contaminación con ARN y ADN cromosomal. Por lo tanto, se decidió realizar técnicas más específicas para la correcta visualización y purificación de megaplásmidos en las cepas estudiadas.

Se realizaron entonces, geles de “*lisis in situ*” según la técnica de Eckhardt, 1974. En la figura 3.1 se muestran los perfiles obtenidos y se comparan con los de la “*lisis in situ*” de *Ensifer meliloti* MVII/1 (Hynes et al; 1986) el cual posee cinco megaplásmidos cuyos tamaños son: 1500Kb, 156Kb, 135Kb, 81Kb y 54kb.

Los geles obtenidos por “*lisis in situ*” (Fig. 3.1) muestran por encima del ADN fragmentado dos bandas con igual movilidad electroforética para todas las *Sphingomonas*, evidenciando así la presencia de al menos un megaplásmido en todas las cepas estudiadas.

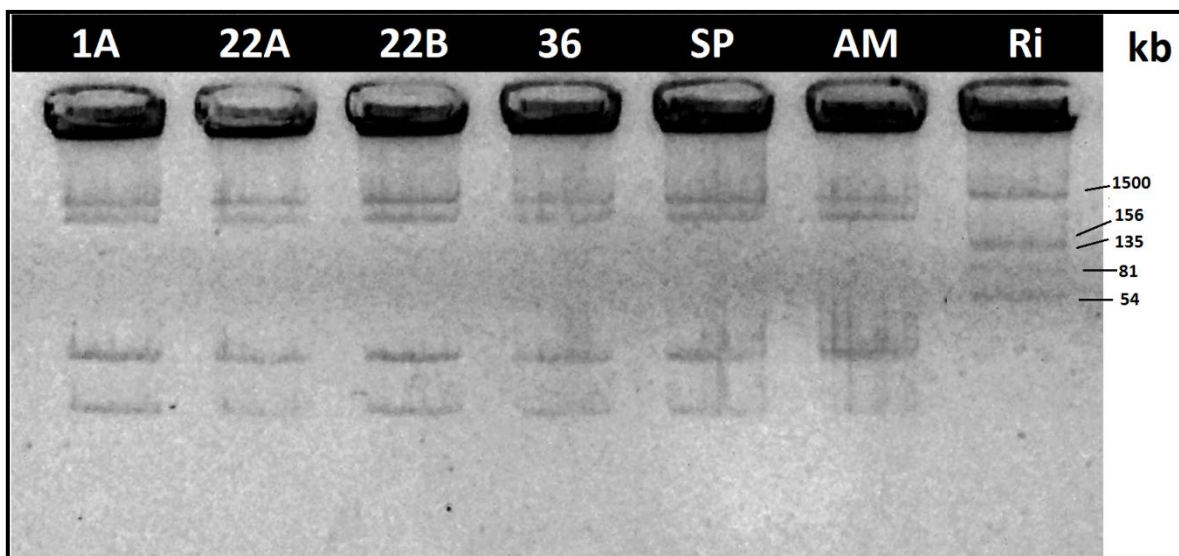


Figura 3.3: Gel de “*lisis in situ*” de células de *Sphingomonas* degradadoras de PAH 1A, 22A, 22B, 36, SP y AM. Ri: mega plásmidos de *Ensifer meliloti* MVII/1.

Los megaplásmidos evidenciados por “*lisis in situ*” (Figura 3.1), de las cepas 1A, 22A, 22B, AM y SP fueron purificados mediante el protocolo de Kieser con el fin de utilizarlos posteriormente en ensayos de caracterización molecular. La Figura 3.2 corresponde a las preparaciones de ADN plasmídico obtenidas por éste método que fueron sembradas en un gel de agarosa 0,8% y corridas a 70V por 1 hora. En todos los casos, al igual que en los geles de “*lisis in situ*” (Figura 3.1), pudo evidenciarse la presencia de dos bandas con igual movilidad electroforética, indicando que cada una de las cepas posee al menos un plásmido. Por otra parte, no se observó la presencia de ARN ni ADN cromosomal fragmentado en la preparación plasmídica obtenida, comprobando el correcto nivel de purificación del o los megaplásmidos que permite obtener ésta técnica.

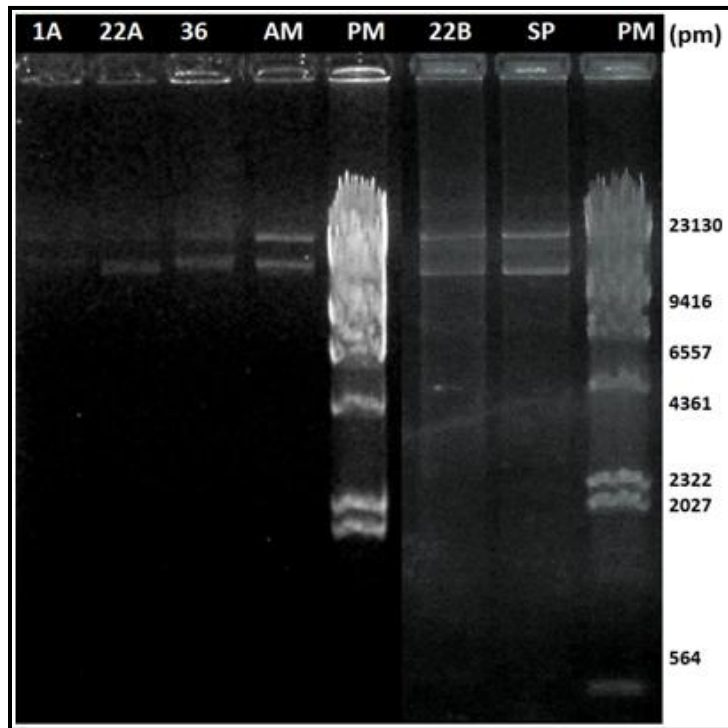


Figura 3.4: ADN plasmídico de las cepas de *Sphingomonas* purificado por el método de Kieser. pM: marcador de peso molecular ADN fago  $\lambda$  digerido con HindIII.

Los plásmidos degradativos de *Sphingomonas* generalmente parecen ser de mayor tamaño que los plásmidos degradativos conocidos de otros géneros bacterianos. Esta podría ser la razón por la que algunos autores solo han podido detectarlos mediante *PFGE* (electroforesis en gel de campo pulsante) y no a través de las técnicas convencionales de aislamiento plasmídico como electroforesis en geles de agarosa o centrifugación en gradiente de CsCl (Basta y col., 2004). En el presente trabajo las “minipreparaciones” tampoco han sido de gran utilidad para visualizar y aislar plásmidos de *Sphingomonas*, por lo que se han realizado las técnicas descritas por Eckhardt y col., 1978 y Kieser y col., 1984, con dichos fines, consiguiendo detectar la presencia de megaplásmidos en las cepas estudiadas.

### 3.2 Caracterización de los megaplásmidos

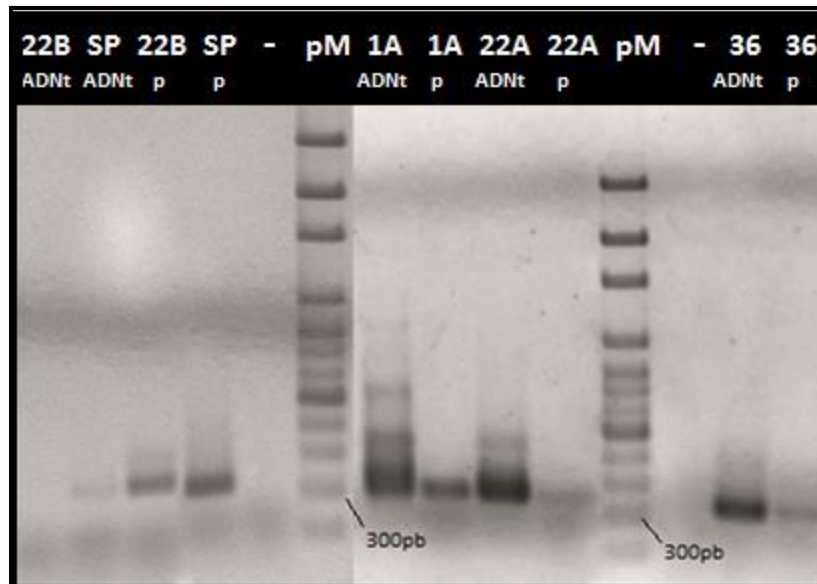
La caracterización de los megaplásmidos identificados en los ensayos previos se llevó a cabo utilizando diferentes técnicas moleculares y fisiológicas. Se realizaron PCR con

primers específicos con el fin de sugerir la presencia de genes de la vía alta y baja de degradación de PAH en los megaplásmidos, se detectaron los probables pesos moleculares de los megaplásmidos mediante perfiles de restricción enzimáticos, y por último se realizaron ensayos fisiológicos para corroborar la ubicación de los genes degradadores (conjugación, electrotransformación, transformación química y curación).

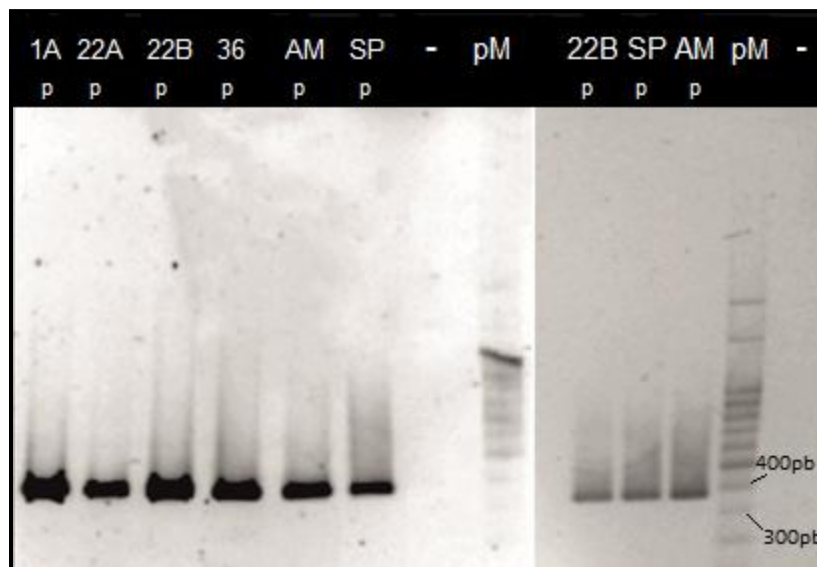
### **3.2.1 Estudio de la presencia de genes de la vía alta y baja de degradación de PAH mediante amplificación por PCR**

Para determinar la presencia de genes relacionados con la degradación de PAH en las *Sphingomonas* estudiadas, se realizaron sobre muestras de ADN plasmídico y ADN total reacciones de PCR utilizando primers específicos para enzimas dioxigenasas de la vía alta y baja de degradación de PAH (Marcos y col., 2012, Zhou y col., 2006, Sei y col., 1999, Cebron y col., 2008, Wilson y col., 1999). En la sección 2.2.10 materiales y metodos, tabla 2.2.1 se detallan todas las reacciones ensayadas. La Figura 3.3 muestra los gels de agarosa 1,2% con los productos PCR. Se observa en las muestras de ADN total y plasmídico de las cepas 22A, 22B, SP y 36 la presencia de un amplicón del tamaño esperado (317 pb) al utilizar los primers específicos nah F y nah R2 dirigidos a genes del tipo *nahAc* que codifican la subunidad  $\alpha$  de una enzima dioxigenasa (Zhou y col., 2006) que interviene en las vías altas de degradación de PAH.

La Figura 3.4 muestra los resultados al utilizar los primers C230 F y C230 R dirigidos a la enzima catecol 2, 3-dioxigenasa (Sei y col., 1999), que actúa en las vías bajas de degradación de PAH. Se observa un producto PCR único de peso molecular esperado (380 pb) en todas las muestras de ADN plasmídico, lo que daría indicios de la presencia del gen en las cepas.



**Figura 3.3:** Gel agarosa 1,2%. Productos de PCR nested primers nah F y nah R2. ADNt: corresponde al ADN total de cada cepa obtenido mediante el método del hervido. p: corresponde al ADN plasmídico de cada cepa obtenido mediante el método de Kieser. pM: marcador de peso molecular.



**Figura 3.4:** Gel agarosa 1,2% de productos de PCR con primers C230. Utilizando como molde ADN plasmídico de las cepas de *Shingomonas* 1A, 22A, 22B, 36, SP y AM.

Con el fin de comprobar la especificidad de la reacción de PCR, los productos obtenidos a partir del ADN plasmídico de las cepas 22B con los primers C230 F y C230 R, y SP con los primers nah F y nah R2, se purificaron y se secuenciaron. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con la base de datos del National Center for Biotechnology Information Gen Bank, mediante el programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). La alineación de la secuencia del producto PCR amplificado con los primers C230, utilizando como molde el ADN plasmídico de la cepa 22B, mostró un 100% y 87% de identidad, y un 97% y 95% de cobertura con el gen que codifica la enzima catecol 2,3 dioxigenasa de *Sphingomonas* BNQ31 y con el plásmido pNL1 de la cepa degradadora de PAH *N. aromaticivorans* DSM 12444 respectivamente (Tabla 3.1). El plásmido pNL1 tiene un tamaño de 180.4 kb, ha sido completamente secuenciado y los estudios de su secuencia indican aproximadamente el 50% del ADN plasmídico codifica para genes involucrados en el catabolismo o en el transporte de compuestos aromáticos. Se hallaron genes homólogos a los codificantes para la subunidad  $\alpha$  de dioxigenasas, y a otras enzimas del catabolismo de bifenilo, naftaleno, m-xileno y p-cresol. Los genes restantes del megaplásmido pNL1 codifican enzimas con funciones asociadas con la replicación, mantenimiento o transferencia plasmídica y transferencia conjugativa del plásmido, homólogos a los del plásmido F de *E. coli* (Romine y col., 1998).

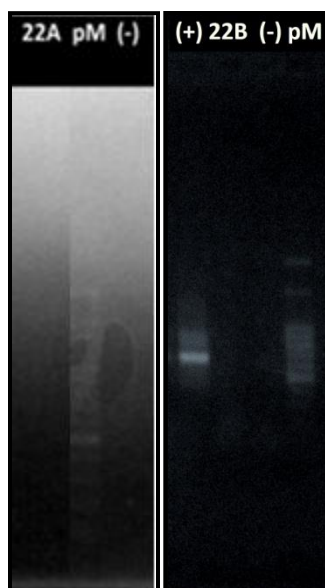
Por otro lado la secuencia amplificada con los primers nahF y nah R2 a partir de la preparación plasmídica de *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA (SP), mostró un 95% de identidad con la secuencia de la subunidad  $\alpha$  de una dioxigenasa de la cepa degradadora de PAH *Sphingomonas* sp. HL4.

Estos resultados confirman la especificidad de las reacciones de PCR y la presencia de genes específicos de degradación de PAH en las cepas estudiadas.

Cepa	Primer utilizado	Alineamiento significativo	Identidad	Cobertura
<b>22B</b> <i>Sphingobium</i> sp. 22B	<b>C230</b> (Sei y col.,1999 )	Gen catecol 2,3 dioxigenasa de <i>Sphingomonassp.</i> BNQ31	100%	97%
		Plásmido pNL1 de <i>Novosphingobium aromaticivorans</i> DSM 12444	85%	97%
<b>SP</b> <i>Sphingomonas</i> <i>paucimobilis</i> 20006FA	<b>nah R2</b> (Zhou y col., 2006)	<i>Sphingobium</i> sp. YBL2	95%	70%
		Gen subunidad $\alpha$ de dioxigenasa de <i>Sphingomonas</i> sp. HL4	95%	66%

**Tabla 3.1: Resultados del alineamiento de las secuencias de los productos PCR obtenidos con los primers nah y C230 mediante BLAST con la base de datos del NCBI.** <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Debido a que los protocolos de extracción de ADN plasmídico muchas veces no logran eliminar completamente las trazas de ADN cromosomal, lo que podría resultar en amplificaciones inespecíficas en las reacciones de PCR o en falsos positivos, se corroboró la ausencia de ADN cromosomal en las preparaciones plasmídicas realizando PCR con primers dirigidos al gen cromosomal 16S rRNA. En la Figura 3.5 se observa que no hubo amplificación positiva en las preparaciones plasmídicas de las cepas 22B y 22A, corroborando la ausencia de ADN cromosomal. Estos resultados permiten sugerir la presencia de genes degradativos en el o los megaplásmidos de las cepas 22A y 22B.



**Figura 3.5: PCR con primers dirigidos al gen cromosomal 16S rRNA.** (+): Control positivo (-): control negativo de la reacción. **pM**: patrón de peso molecular Ladder 100 bp.



### 3.2.2 Determinación del peso molecular del megaplásmido mediante perfiles de restricción

Se realizaron digestiones enzimáticas del ADN plasmídico purificado a partir de la técnica de Kieser de todas las cepas de *Sphingomonas* estudiadas con las enzimas de restricción EcoRI, HindIII y XbaI. Sin embargo, solo se lograron visualizar claramente las digestiones del ADN plasmídico de las cepas 22B, SP y AM (Fig.3.6). Se observa en los perfiles de digestión la presencia de varias bandas evidenciando las correctas digestiones de los mismos. Notoriamente, al comparar los perfiles obtenidos con las enzimas EcoRI y HindIII (Fig. 3.6) la movilidad electroforética de las bandas obtenidas coincide para las tres cepas. Este resultado demostraría la alta similitud entre el o los megaplásmidos de las *Sphingomonas* degradadoras estudiadas. Los perfiles de digestión obtenidos con las enzimas EcoRI y HindIII fueron utilizados para predecir el peso molecular aproximado del o los megaplásmidos. El perfil de bandas del patrón de peso molecular del fago  $\lambda$ , se relacionó con el obtenido en las digestiones de los megaplásmidos con EcoRI mediante un gráfico que vincula la distancia recorrida en el gel de agarosa (cm) vs log pM (Figura 3.7). Considerando que las dos bandas que aparecen por encima del ADN fragmentado en las electroforesis de las Figuras 3.1 y 3.2 corresponden a un plásmido con dos grados de superenrollamiento, la Figura 3.7 permite sugerir que los plásmidos únicos de las cepas 22B, SP y AM tendrían un tamaño de 45,211kpb, 47,877 kpb y 47,924 kpb respectivamente. Los perfiles de restricción con HindIII (Fig. 3.6) muestran una banda ancha de alrededor de 23 kpb (según la banda de mayor tamaño del marcador de pM) en los perfiles de las tres cepas estudiadas, la cual podría corresponder, basándonos en el pM obtenido con EcoRI previamente, a dos bandas de peso molecular muy similar entre sí, imposible de separar bajo las condiciones de corrida de este protocolo (gel agarosa 0.8% 90 min, 70 V).

Por otro lado, si se considera la presencia de dos plásmidos por cepa (Fig. 3.1 y 3.2), los perfiles de restricción obtenidos con HindIII y EcoRI (Fig3.5) muestran entonces que los plásmidos poseen un tamaño muy similar, siendo de alrededor de 23 kpb para ambos

casos. Sin embargo, se necesitan realizar más estudios que comprueben fehacientemente el tamaño y el número de plásmidos por cepa.

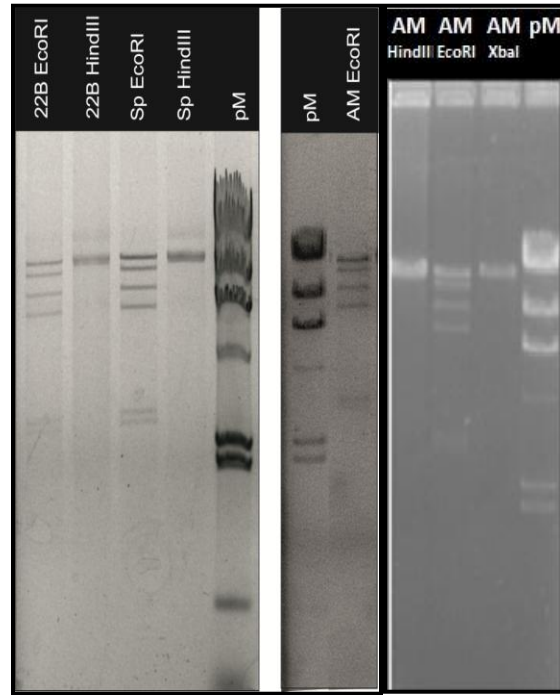


Figura 3.6: Perfiles de digestión de las cepas 22B, SP y AM con las enzimas de restricción EcoRI, y HindIII. pM: Marcador de peso molecular del fago  $\lambda$ , digerido con HindIII.

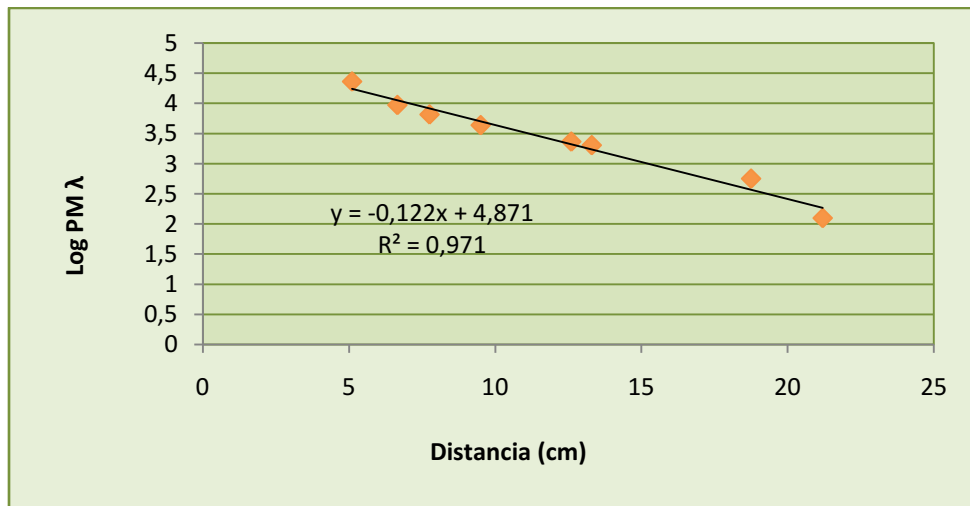


Figura 3.7: Curva de relación Log (número de pares de bases de ADN del patrón del fago  $\lambda$ ) en función de la distancia recorrida en un gel de agarosa (cm) para las digestiones plasmídicas con EcoRI.

### **3.2.3 Ensayos fisiológicos para corroborar la ubicación de los genes degradadores**

Para corroborar si efectivamente los genes degradadores de PAH en las *Sphingomonas* estudiadas se encuentran en plásmidos, se decidió realizar ensayos fisiológicos que evidencien la pérdida o la adquisición de ésta propiedad en *Sphingomonas* y en cepas de *E.coli* no degradadoras de PAH respectivamente. Mediante protocolos de conjugación, electro-transformación, y transformaciones químicas se estudió la adquisición de la propiedad degradadora y del megaplásmido en cepas de *E.coli*. Además se utilizaron diferentes estrategias de curación de plásmidos con el fin de que las *Sphingomonas* pierdan el megaplásmido y consecutivamente la propiedad degradadora. La pérdida de la propiedad, en el caso de las curaciones de plásmidos, como la ganancia en el caso de la conjugación y/o la transformación sería prueba fehaciente de la ubicación plasmídica de estos genes.

#### **3.2.3.1 Adquisición de la propiedad degradadora**

##### **3.2.3.1.i Conjugaciones**

El diseño experimental de un ensayo de conjugación, requiere conocer previamente los perfiles de resistencia y/o sensibilidad de antibióticos (genes reporteros) de las cepas involucradas en el proceso; es por esto, que para optimizar este ensayo se estudió previamente de forma cualitativa el comportamiento de todas las cepas de *Sphingomonas* frente a diferentes antibióticos. Para ello, se determinó la capacidad de las cepas de desarrollar crecimiento en placas con agar R3 y el correspondiente antibiótico. Se observó que todos los microorganismos ensayados presentaron similitud en cuanto a sensibilidad y resistencia en presencia de los antibióticos utilizados (Tabla 3.2). Las cepas ensayadas son resistentes a un 70% de los antibióticos testeados en esas condiciones siendo los resultados obtenidos comparables con los datos existentes para 36 cepas de *Sphingomonas* descritas en Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 2, tanto para los antibióticos tetraciclina, gentamicina como para ampicilina.

Teniendo en cuenta estas observaciones y comparándolas con la información de las cepas de *E.coli* que participarían en las conjugaciones se concluyó que los antibióticos a

utilizar como marcadores de selección en dichos ensayos serían: *tetraciclina*, *rifampicina* (*Sphingomonas* sensibles) y *gentamicina*, *estreptomicina* (*Sphingomonas* resistentes).

Antibiótico	Concentración	1A	22A	22B	36	SP	AM
Ampicilina (Amp)	5µg/ml	+	+	+	+	+	+
Acidonalidíxico(Ac.N)	200µg/ml	-	-	-	-	-	-
Ciprofloxacina(Cip)	1µg/ml	-	-	-	-	-	-
Cloranfenicol (Ch)	20µg/ml	+	+	+	+	+	+
Estreptomicina (Str)	50µg/ml	+	+	+	+	+	+
Gentamicina(Gm)	10µg/ml	+	+	+	+	+	+
Neomicina(Neo)	120µg/ml	+	+	+	+	+	+
Piperacilina(Pip)	50µg/ml	+	+	+	+	+	+
Rifampicina(Rif)	200µg/ml	ND	ND	-	ND	ND	ND
Spectomicina(Sp)	100µg/ml	+	+	+	+	+	+
Tetraciclina (Tc)	2µg/ml	-	-	-	-	-	-

**Tabla 3.2: Crecimiento de *Sphingomonas* en medio de cultivo R3 Agar adicionado con distintos antibióticos.**+: Indica desarrollo de una estría de crecimiento luego de 7 días de incubación a 30°C.-: indica ausencia de crecimiento luego de 7 días de incubación a 30°C. **ND**: no determinado.

El seguimiento de las estrategias de conjugación clásica, posee algunas limitaciones metodológicas cuando no se conoce el ADN plasmídico que se pretende transferir por conjugación desde una cepa donadora hacia una aceptora. Es por esto, que se hace necesario la inserción mediante métodos de ingeniería genética de algún gen reportero en el plásmido a transferir, que evidencie así la adquisición del mismo por la cepa aceptora. La primer conjugación (biparental) (Figura 3.8) que se realiza en este trabajo tiene como objetivo, transferir la resistencia a tetraciclina, ubicada en el transposon Tn5 de un plásmido suicida, desde la cepa donadora *Escherichia coli* Gm<sup>S</sup>, Tc<sup>R</sup>, al megaplásmido de la bacteria aceptora *Sphingomonas* 22B Gm<sup>R</sup>, Tc<sup>S</sup>. Los transconjugantes *Sphingomonas* 22B Gm<sup>R</sup>, Tc<sup>R</sup> (22Bt) que se obtienen en la conjugación biparental adquieren esta resistencia por inserción al azar del transposon en el ADN cromosomal y/o plasmídico, sin embargo

solo aquellos transconjugantes donde la inserción haya ocurrido en el plásmido, serán capaces de transferir la resistencia a tetraciclina junto “con los genes de degradación de PAH” (si es que efectivamente éstos últimos se encuentran codificados en el megaplásmido ) en un nuevo ensayo de conjugación (triparental) (Figura 3.8), utilizando los transconjugantes 22Bt como cepa donadora y *E.coli* HB101 Tc<sup>S</sup> como cepa aceptora. Los transconjugantes *E.coli* HB101 Tc<sup>R</sup> podrían idealmente, con todo lo que ello implica, degradar PAH y de ésta manera corroborar nuestra hipótesis.

Para realizar los ensayos que se muestran a continuación, se seleccionó la cepa degradadora de PAH *Sphingobium* sp. 22B debido al alto grado de purificación obtenido en las preparaciones plasmídicas (Fig. 3.3).

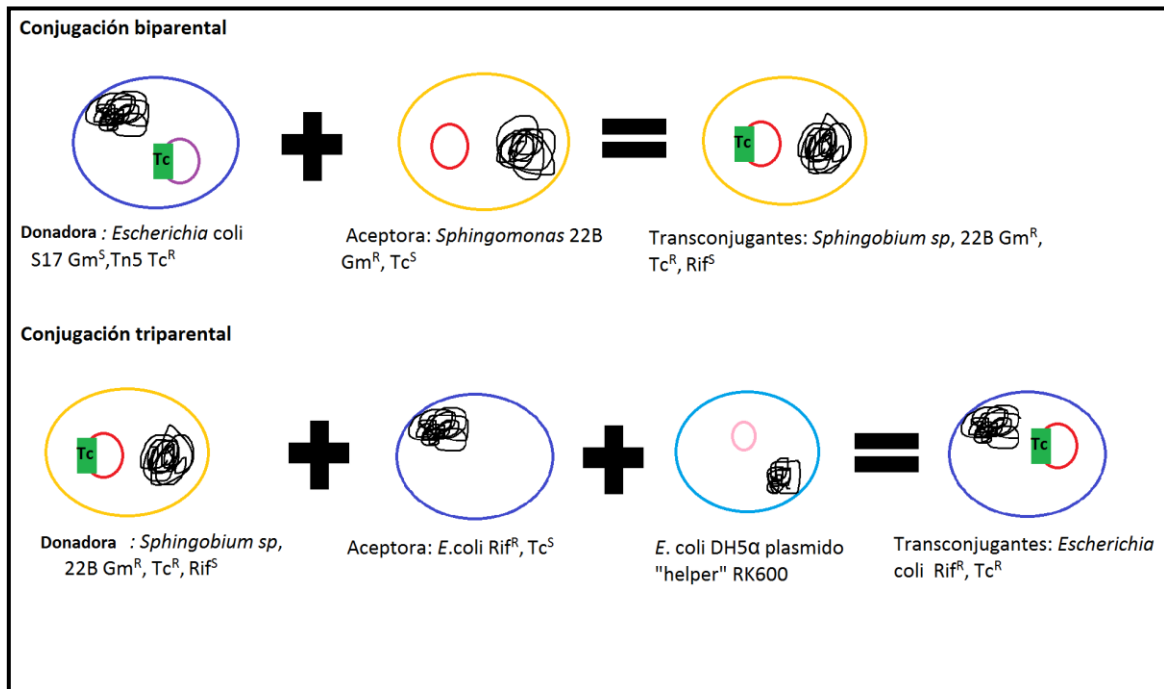
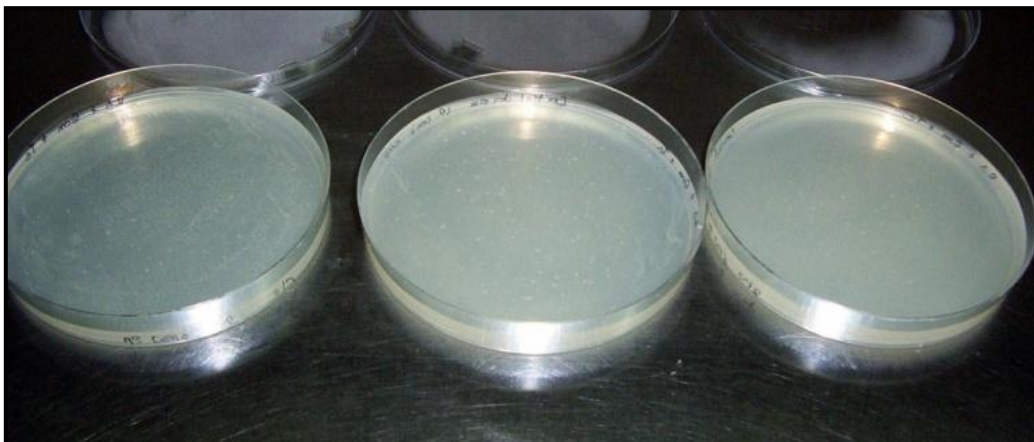


Figura 3.8: Estrategia general de las conjugaciones.

Con el fin de optimizar el ensayo de conjugación biparental, el mismo fue realizado varias veces modificando los antibióticos de selección de los transconjugantes: se utilizaron las combinaciones Gm (10µg/ml) y Tc (10µg/ml), Ch (100 µg/ml) y Tc (10µg/ml), Str (300 µg/ml) y Tc (10µg/ml), obteniendo en ésta última combinación los mejores resultados. El botón de conjugación crecido 24 hs a 30°C fue sembrado en placas con

medio R3 con Str (300 µg/ml) y Tc (10 µg/ml) para evidenciar el crecimiento exclusivo de los transconjugantes. Los resultados mostraron crecimiento de la cepa donadora en los controles de la conjugación biparental, sin embargo se observaron un mayor número de colonias en la placa de conjugación en comparación con los controles, las cuales fueron seleccionadas para ser utilizados luego en la conjugación triparental.



**Figura 3.9: Resultados de la conjugación biparental.** Muestras sembradas en placas de agar R3 con el agregado de Str (300 µg/ml) y Tc (10µg/ml) e incubadas 24 hs a 30°C. **Izquierda:** transconjugantes. **Centro:** control donora. **Derecha:** control aceptora.

Se realizó una segunda conjugación (triparental) en la cual se utilizó como cepa donadora las colonias obtenidas en la primer conjugación 22Bt Str<sup>R</sup>, Tc<sup>R</sup>, Rif<sup>S</sup>, y como aceptora a *E.coli* HB101 pRK2013 Rif<sup>R</sup>, Tc<sup>S</sup>. *E.coli* DH5α con el plásmido “helper” RK600 fue utilizada para permitir la movilización del megaplásmido de 22Bt a la cepa aceptora, debido a la complementación en *trans* mediante genes vinculados con este mecanismo codificados en el plásmido helper. Se procedió según el protocolo indicado en materiales y métodos sección 2.2.9 B y se seleccionó en placas con medio LB y los antibióticos tetraciclina (10 µg/ml) y rifampicina (200 µg/ml). De esta forma se esperaba obtener transconjugantes *E.coli* resistentes a rifampicina y tetraciclina por adquisición del plásmido proveniente de *Sphingobium* sp. 22B. Se observó crecimiento de la cepa aceptora (aproximadamente 20 colonias) aunque éste fue significativamente menor al

crecimiento obtenido en la placa de conjugación, donde el crecimiento superó las 300 colonias (Fig. 3.10).



**Figura 3.10: Resultado de la conjugación triparental.**Placas agar LB con tetraciclina (10 $\mu$ g/ml) y rifampicina (200 $\mu$ g/ml), luego de 24hs de incubación. De derecha a izquierda: Conjugación triparental, control aceptora, control donora y control *E. coli* con plásmido helper.

Se seleccionaron 71 colonias crecidas en la placa de conjugación y se les realizó “*lisis in situ*” para comprobar la presencia de plásmido. Las colonias seleccionadas fueron repicadas en erlenmeyers con MML y fenantreno (concentración 25 ppm) como única FCE para corroborar la capacidad degradadora mediante la observación de turbidez y/o color propio de los productos de degradación de PAH en MML. En ambos casos no se pudo evidenciar la presencia del plásmido en los geles ni el desarrollo de turbidez y/o color en los medios de cultivos. Estos resultados permiten sugerir que no ha sido posible obtener transconjugantes en la primera y/o en la segunda conjugación.

En el desarrollo de este trabajo ha sido necesario optimizar variables al intentar conjugar la cepa *Sphigobium* sp. 22B con *E. coli*. El desconocimiento de genes de resistencia y/o sensibilidad y la concentración de antibióticos que puedan utilizarse como marcadores de selección en los ensayos de conjugación fue la primera pregunta a resolver, pudiendo escoger gracias a los resultados obtenidos (Tabla 3.2), varias combinaciones posibles de antibióticos para realizar el ensayo. Sin embargo, el diseño y posterior seguimiento de las conjugaciones bi y triparentales ha sido difícil de optimizar debido a que las cepas de *Sphingomonas* poseen una velocidad de crecimiento significativamente menor en comparación con *E. coli*, tardando 2 a 3 días en desarrollar

colonias en las condiciones del experimento. Esto podría explicar en parte el crecimiento obtenido en los controles de las conjugaciones, donde en ambos casos el control con mayor crecimiento obtenido correspondía a una cepa de *E.coli* (Fig. 3.3 y Fig. 3.4).

Por otro lado, ha sido demostrado por otros autores que en condiciones de laboratorio la transferencia conjugativa de megaplásmidos entre *Sphingomonas* ocurre normalmente (Romine y col., 1999). Sin embargo, y al igual que en el presente trabajo, la transferencia conjugativa de dichos megaplásmidos degradadores a otras Proteobacterias, no ha sido lograda (Shinitani y col., 2007; Basta y col., 2004). Este hecho probablemente contribuya a reducir el flujo de genes de *Sphingomonas* a otras bacterias. Tal vez sea una de las principales razones por las que existen tantas cepas de *Sphingomonas* con la capacidad de degradar compuestos xenobióticos con baja homología con los genes de otras *Proteobacterias* (Stolz, 2009). Una posible explicación a esta transferencia restrictiva de plásmidos podría estar relacionada con la presencia de glicosfingolípidos en las membranas externas de *Sphingomonas*, los cuales podrían interferir en la transferencia conjugativa a no-*Sphingomonas* (Introducción sección 1.3.2).

### **3.2.3.1.ii Electrotransformación de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ con megaplásmidos de *Sphingomonas* degradadoras**

Se utilizó el producto plasmídico de la cepa 22B obtenido mediante el método de Kieser para electro transformar *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ . Se agregó medio LB a las células de *E. coli* electroporadas con el plásmido de *Sphingobium* sp. 22B y se las incubó a 37°C durante una hora. Luego de este tiempo, 300  $\mu$ l de la suspensión fueron plaqueados en MMS–agarosa fenantreno como fuente de carbono prioritaria, suplementado con extracto de levadura (0.05 g/l) que aporta factores de crecimiento que podrían ser necesarios para *E.coli* transformada. Además, se realizaron diluciones seriadas de la suspensión en medio LB y se plaquearon 100  $\mu$ l de las diluciones  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  y  $10^{-7}$  en placas con medio R3 – agarosa fenantreno (materiales y métodos 2.1.2) con el objetivo de detectar aquellos microorganismos que adquirieron la propiedad degradadora del PAH mediante la visualización de un halo de degradación translúcido y/o coloreado alrededor



de las colonias. De las placas correspondientes a la dilución -5 se aislaron 8 colonias, las cuales parecían presentar halo de degradación luego de un repique a MMS-PAH (fenantreno) como única FCE y en medio LB con el mismo PAH. Con las ocho colonias seleccionadas se realizaron minipreparaciones y los productos obtenidos se corrieron en electroforesis en gel de agarosa al 0.8% a 70V durante 60 min. No se detectaron bandas correspondientes a ADN plasmídico en el gel obtenido.

### **3.2.3.1.iii-Transformación química de *Escherichia coli* DH5α con megaplásmidos de *Sphingomonas* degradadoras**

Un cultivo de *Escherichia coli* DH5α competente fue transformado con el ADN plasmídico de *Sphingobium* sp. 22B obtenido mediante el protocolo de Kieser. La transformación y el control sin plásmido fueron plaqueados en MMS con glucosa 1% - agarosa fenantreno. Se seleccionaron 80 colonias de la transformación, se repicaron en una placa MMS con glucosa 1% - agarosa fenantreno a la cual se le agregó cristales de indol en la tapa y se incubaron a temperatura ambiente durante 20 días. Pasado el período de incubación se examinó la placa y no se encontraron colonias azules que corroboran la acción de las dioxigenasas y por ende tampoco la adquisición de la propiedad degradadora.

Utilizando las metodologías de transformación química y shock eléctrico, no se ha logrado obtener bacterias de *E.coli* transformadas con el o los megaplásmidos de *Sphingobium* sp. 22B. La replicación de un plásmido foráneo en una bacteria transformada y/o conjugada, implica la complementación en *trans* de la maquinaria replicativa del huésped. Si la DNA polimerasa del huésped no reconoce el origen de replicación del plásmido foráneo, éste no replicará y por lo tanto no podrá ser heredado a las células hijas. Esta podría ser una de las explicaciones de por qué no detectamos *E. coli* transformadas, ni transconjugantes, con el o los megaplásmidos de *Sphingobium* sp. 22B.

### **3.2.3.2 Pérdida de la propiedad degradadora**

#### **3.2.3.2.i Curación.**

Entre los estudios fisiológicos propuestos en este trabajo para corroborar la presencia de genes involucrados en la degradación de PAH ubicados en megaplásmidos se encuentran las curaciones plasmídicas. Mediante estos ensayos se espera demostrar que al perder el plásmido, el microorganismo pierde también la capacidad degradadora. Para estos se utilizó la cepa *Sphingomonas* 22B y se procedió a realizar la curación por dos métodos diferentes reportados en bibliografía.

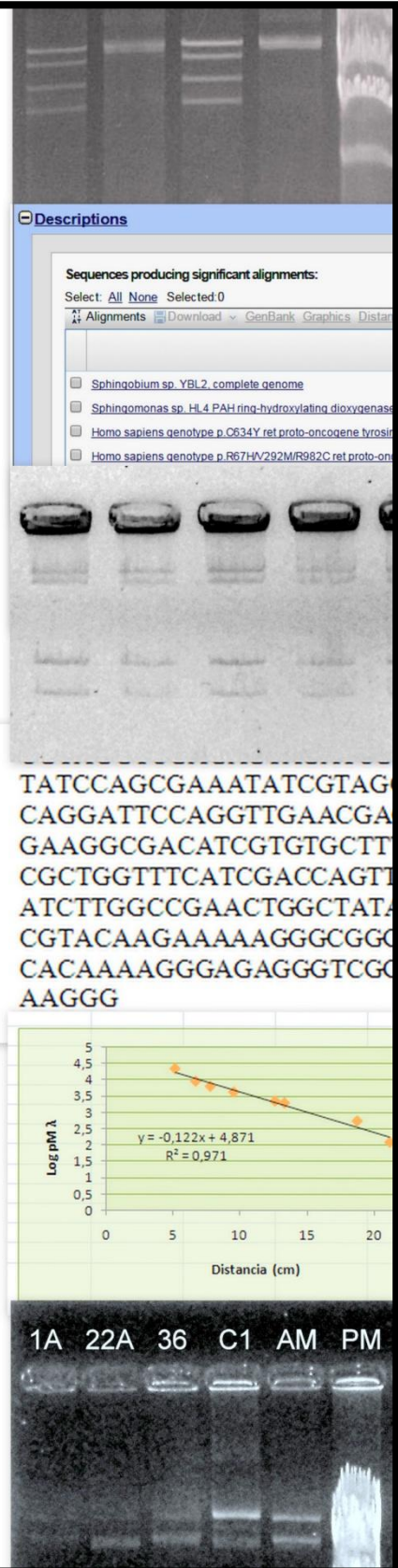
El primero de los métodos de curación (Xiuhong Feng y col., 1997) propone que la pérdida plasmídica ocurre al someter a la bacteria a una temperatura superior a su temperatura óptima de crecimiento. Se realizó el protocolo descrito en materiales y métodos sección 2.2.6 A. Luego de incubar 48 hs a 42 °C con agitación a la cepa 22B en medio LB el cultivo no presentó la turbidez característica, por lo que se plaquearon 100 µl y 500 µl directamente del cultivo en placas con LB. Luego de 5 días no se observaron colonias.

En el otro método utilizado (Basta y col., 2004) la pérdida plasmídica ocurre como consecuencia de crecer al microorganismo durante cien generaciones. Nuevamente se utilizó la cepa *Sphingomonas* 22B y se procedió según se indica en materiales y métodos sección 2.2.6 B. Se creció en caldo nutritivo durante 7 días (corresponden a 100 generaciones para la cepa 22B) a 32 °C, pasado este tiempo de incubación no se observó la turbidez característica. Se realizó un aislamiento directo en placa con R3 agar y se pudo corroborar que efectivamente no hubo crecimiento.

Los resultados de los métodos de curación mostraron ausencia de crecimiento de la cepa, lo que permite sugerir que las condiciones de crecimiento no permitieron el desarrollo de la cepa, o que el plásmido ha sido efectivamente perdido y que el mismo podría tener genes constitutivos esenciales para el crecimiento bacteriano. Consistentemente, se han reportado megaplásmidos pertenecientes a *Sphingomonas* (pNL2 y Mpl) que han sido asociados con un segundo cromosoma (Stolz, 2013).

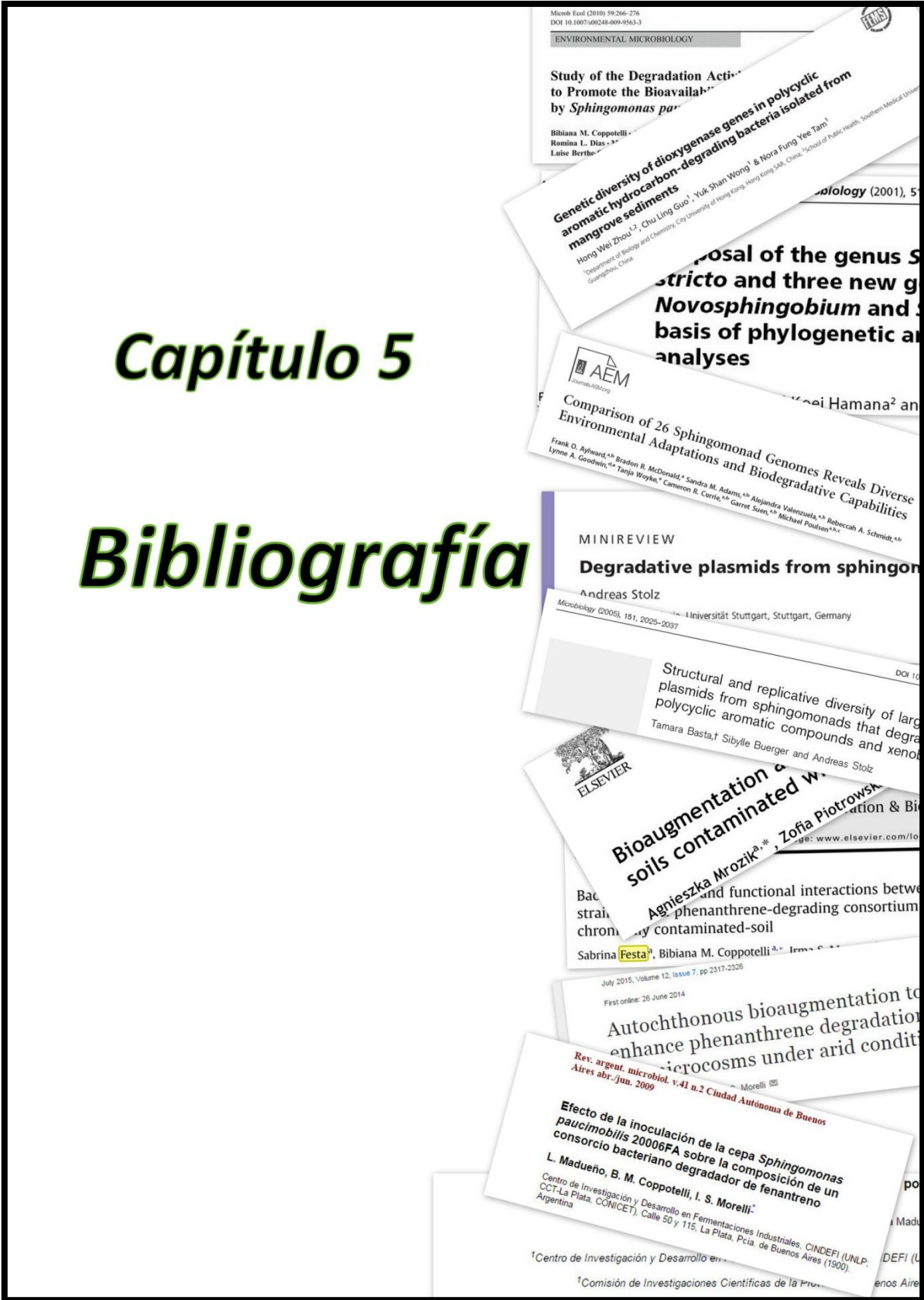
# Capítulo 4

# Conclusiones



## 4. Conclusiones

- ✓ Las técnicas de extracción y visualización de megaplásmidos elegidas mejoraron la observación y evidenciaron así la presencia de megaplásmidos en las *Sphingomonas* estudiadas.
- ✓ Se logró purificar con un buen grado de pureza los megaplásmidos de las cepas 22B y 22A.
- ✓ Las cepas de *Shingomonas* fenotípicamente diversas y aisladas de distintas regiones del país presentaron uno o dos megaplásmidos similares en cuanto a peso molecular y movilidad electroforética.
- ✓ A partir de las preparaciones plasmídicas obtenidas por el método de Kieser fue posible detectar mediante PCR la presencia de genes involucrados en las vías de degradación de PAH en la colección de *Sphingomonas* degradadoras.
- ✓ El o los megaplásmidos de *Sphingobium sp.* 22B portarían genes vinculados con las vías “alta y baja” de degradación de PAH.
- ✓ No fue posible eliminar ni movilizar el megaplásmido de *Sphingobium sp.* 22B por las técnicas empleadas en éste trabajo.



## 5. Bibliografía

- **Aitken**, M.D, Stringfellow W.T, Nagel R.D, Kazunga C., Chen S.H., (1998). Characteristics of phenanthrene-degrading bacteria isolated from soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Can J Microbiol.* 44(8):743-52.
- **Aylward, F.O**, McDonald, B.R, Adams S.M., Valenzuela, A., Schmidt, R.A., Goodwin LA, Woyke, T., Currie, C.R., Suene, G. & Poulsen, M., (2013). Comparison of 26 sphingomonad genomes reveals diverse environmental adaptations and biodegradative capabilities. *Appl Environ Microbiol* 79: 3724–3733.
- **Azuma**, M., Toyota, Y.A., Kawano, S., (1996). Naphthalene a constituent of Magnolia flowers. *Phytochemistry* 42, 999–1004. Baker, R., Walmsley, S., 1982. Soldier defense secretions of the South American termites *Cortaritermes silvestri*, *Nasutitermes* sp. n.d. and *Nasutitermes kemneri*. *Tetrahedron* 38, 1899–1910.
- **Basta**, T., Buerger, S., Stolz A. (2005). Structural and replicative diversity of large plasmids from sphingomonads that degrade polycyclic aromatic compounds and xenobiotics. *Microbiology (Reading, England)*. 151:2025–37.
- **Basta**, T., Keck, A., Klein J. & Stolz, A., (2004). Detection and characterization of conjugative degradative plasmids in xenobiotics degrading *Sphingomonas* strains. *J Bacteriol* 186: 3862–3872.
- **Bastiaens**, L., Springael, D., Wattiau, P., Harms, H., DeWachter, R., Verachtert, H., Diels, L., (2000). Isolation of adherent Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH)-degrading bacteria using PAH-sorbing carriers. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1834–1843.
- **Beringer**, J. E., (1974). R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J Gen Microbiol.* 84, 188-98.
- **Bogart**, A. and Hemmingsen, B., (1992). Enumeration of phenanthrene degrading bacteria by an overlay technique and its use in evaluation of petroleum contaminated sites. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2579-2582.

- **Blumer, M., (1976).** Polycyclic aromatic hydrocarbons in nature. *Sci. Am.* 234:35–45.
- **Cebrón, A.,** Norini, M., Berguiristain, T., Leyval, C., (2008). Real time PCR quantification of PAH-ring hydroxylating dioxygenase (PAH-RHD $\alpha$ ) genes from Gram positive and Gram negative bacteria in soil and sediments sample. 73:148-159.
- **Cerniglia, C.E., (1992).** Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation* 3:351–368.
- **Cerniglia, C.E., (1989).** Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environments. CRC Press, Boca Raton, Florida, p. 41-68.
- **Chadhain, S.M.,** Moritz, E.M, Kim, E., Zylstra, G.J., (2007). Identification, cloning, and characterization of a multicomponent dioxygenase from *Sphingobium yanoikuyae* B1. *J Ind Microbiol Biotechnol* 34:605–613.
- **Coppotelli, B.,** Ibarrolaza, A., Del Panno, M.T., and Morelli, I., (2008). Effects of the inoculant strain *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA on soil bacterial community and biodegradation in phenanthrene contaminated soil. *Microbial Ecology.* 55: 173-183.
- **Del Panno, M. T.,** Coppotelli, B. M. Morelli, I. S., Berthe-Corti, L., (2005). Inoculation of soil microcosms with *Sphingomonas paucimobilis*. Impact of the inoculation protocol on phenanthrene degradation and soil community. 13th International Biodeterioration and Biodegradation Symposium (IBBS-13). 4-9 September. Madrid. Spain. Pp-275.
- **Deziel, E.,** Paquette G., Villemur, R., Lepine, F., Bisailon, J., & Le O. I. S., (1996). Biosurfactant production by a soil *Pseudomonas* strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(6), 1908–1912.
- **Eckhardt, T., (1978).** A rapid method for the identification of plasmid desoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid*, 1:584-588.

- **EPA** (1986) Method 418.1 mod. Petroleum Hydrocarbons, Total Recoverable Spectrophotometric Infrared. Environmental Protection Agency. Washington DC, EEUU. 8 pp.
- **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. *International Biodeterioration & Biodegradation* 85: 42-51.
- **Fida, T.T., Breugelmans, P., Lavigne, R., Coronado, E., Johnson, D.R., van der Meer, J.R.,** (2012). Exposure to solute stress affects genome-wide expression but not the polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading activity of *Sphingomonas* sp. strain LH128 in biofilms. *Appl Environ Microbiol* 78: 8311–8320.
- **Figurski, D. H., Helinski, D. R.,** (1979). Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in *trans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:1648–1652.
- **Freeman, D.J. & Cattell, F.C.R.,** (1990). Woodburning as a source of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Science & Technology*, 24(10), pp.1581–1585.
- **Fredrickson, J. K., Balkwill, D. L., Drake, G. R., Romine, M. F., Ringelberg, D. B. & White, D. C.,** (1995). Aromatic-degrading *Sphingomonas* isolates from the deep surface. *Appl Environ Microbiol* 61, 1917–1922.
- **Fujii, K., Urano, N., Ushio, H., Satomi, M., Kimura, S.,** (2001) *Sphingomonas cloacae* sp. nov., a nonylphenol-degrading bacterium isolated from wastewater of a sewage-treatment plant in Tokyo. *Int J Syst Evol Microbiol* 51:603–610.
- **Gibson, D.T., Roberts, R.L., Wells, M.C., Kopal, V.M.,** (1973) Oxidation of biphenyl by a *Beijerinckia* species. *Biochem Biophys Res Comm* 50:211–219.
- **Hughes, J.B., Beckles, D.M. Chandra, S.D. and Ward, C.H.,** (1997). Utilization of Bioremediation Processes for the Treatment of PAH-Contaminated Sediments. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 18, pp. 152–160.



- **Hynes, M.**, Simon, R., Müller, P., Niehaus, K., Labes, M., Pühler, A., (1986). The two megaplasmids of *Rhizobium meliloti* are involved in the effective nodulation of alfalfa. *Mol. Gen. Genet.* 202, 356–362.
- **Johnsen, A.R.**, Karlson, U., (2004). Evaluation of bacterial strategies to promote the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl Microbiol Biotechnol* 63:452–459.
- **Jones, K. C.**, Stratford, J. A., Waterhouse, K. S., Furlong, E. T., Giger, W., Hites, R. A., Schaffner, C., Johnston, A. E., (1989). Increases in the polynuclear aromatic hydrocarbon content of an agricultural soil over the last century. *Environmental Science & Technology*, 23(1), pp. 95–101.
- **Juhász, A.L.**, Naidu, R., (2000). Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 45, 57–88.
- **Kawahara, K.**, Seydel U., Matsuura, M., Danbara, H., Rietsche, I E. and Zahringer U., (1991). FEBS 10329 Volume 292, number 1,2, 107-110.
- **Kauppi, B.**, Lee, K., Carredano, E., Parales, R., Gibson, D., Eklund, H., Ramaswamy, S., (1998). Structure of an aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase-naphthalene 1,2-dioxygenase. *structure* 6, 571–586.
- **Kessler, B.**, (1992). A general system to integrate lacZ fusions into the chromosomes of gram-negative eubacteria: regulation of the Pm promoter of the TOL plasmid studied with all controlling elements in monocopy. *Mol Gen Genet.* 233, 293-301.
- **Kieser, T.** (1984). Factors affecting the isolation of CCC DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *Plasmid*, 12:19-36.
- **Kim, E.**, Aversano, P. J., Romine, M. F., Schneider, R. P. & Zylstra, G. J., (1996). Homology between genes for aromatic hydrocarbon degradation in surface and deep-subsurface *Sphingomonas* strains. *Appl Environ Microbiol* 62, 1467–1470.

- **Kim, E.**, and G. J. Zylstra (1995). Molecular and biochemical characterization of two *meta*-cleavage dioxygenases involved in biphenyl and *m*-xylene degradation by *Beijerinckia* sp. strain B1. *J. Bacteriol.* 177:3095–3103.
- **Kuhm A. E.**, A. Stolz, K.-L. Ngai, and H.-J. Knackmuss., (1991). Purification and characterization of a 1,2-dihydroxynaphthalene dioxygenase from a bacterium that degrades naphthalenesulfonic acids. *J. Bacteriol.* 173:3795–3802.
- **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. *International biodeterioration and biodegradation.* 65:345–351.
- **Madueño, L.**, (2013). Obtención de inoculantes bacterianos y evaluación de su aplicación en procesos de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH) de la Patagonia semiárida. pH D. Tesis, Universidad Nacional de la Plata. La Plata, Argentina.
- **Marcos, M.S.**, Lozada, M., Di Marzio, W.D., Dionisi, H.M., (2012). Abundance, dynamics, and biogeographic distribution of seven polycyclic aromatic hydrocarbon dioxygenase gene variants in coastal sediments of Patagonia. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 1589e1592.
- **Meyer, S.**, Moser, R., Neef, A., Stahl, U., and Kampfer, P. (1999) Differential detection of key enzymes of polyaromatic-hydrocarbon-degrading bacteria using PCR and gene probes. *Microbiology* 145: 1731–1741.
- **Mrozik, A.** & Piotrowska-Seget, Z., (2010). Bioaugmentation as a strategy for cleaning up of soils contaminated with aromatic compounds. *Microbiological research*, 165(5), pp. 363–75.
- **Nagata, Y.**, Ohtsubo, Y., Endo, R., Ichikawa, N., Ankai ,A., Oguchi, A., Fukui, S., Fujita, N., Tsuda M., (2010). Complete genome sequence of the representative  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane-degrading bacterium *Sphingobium japonicum* UT26. *Journal of bacteriology.* 192:5852–5853.

- **Nagata, Y.**, Kamakura, M., Endo, R., Miyazaki, R., Ohtsubo, Y., Tsuda, M., (2006). Distribution of  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane-degrading genes on three replicons in *Sphingobium japonicum* UT26. *FEMS Microbiology Letters*. 256:112–118
- **Okere, U.** & Semple, K. T., (2012). Biodegradation of PAHs in “Pristine” Soils from Different Climatic Regions. *Journal of Bioremediation and Biodegradation*, 01(S1).
- **Peressutti, S.R.**, (2000). Dinamica de las poblaciones bacterianas degradadoras de hidrocarburos en un ecosistema de suelo patagonico. Ph.D. Tesis, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Comodoro Rivadavia, Argentina.
- **Reasoner, D.J.** and Geldreich, E.E., (1985). A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Applied environmental microbiology*. 49:1-7.
- **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. *Journal of bacteriology*, 181:1585–1602.
- **Sambrook J.**, Fritsch, E.F., and Maniatis, T., (1989). *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- **Sei, K.**, Asano, K.I., Tateishi, N., Mori, K., Ike, M., Fujita, M., (1999). Design of PCR primers and gene probes for the detection of bacterial populations capable of degrading aromatic compounds via catechol cleavage pathways. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 88, 542-550.
- **Simon, R.**, (1989). New derivatives of transposon Tn5 suitable for mobilization of replicons, generation of operon fusions and induction of genes in gram-negative bacteria. *Gene*. 80:161-9.
- **Susarla, S.**, Medina, V.F., McCutcheon, S.C., (2002). Phytoremediation: an ecological solution to organic chemical contamination. *Ecol Engineer* 18:647–658.
- **Shintani, M.**, Urata, M., Inoue, K., Eto, K., Habe, H., Omori, T., Yamane, H. & Nojiri H., (2007). The *Sphingomonas* plasmid pCAR3 is involved in complete mineralization of carbazole. *J Bacteriol* 189: 2007–2020.

- **Stillwell, L. C.,** S. J. Thurston, R. P. Schnieder, M. F. Romine, J. K. Fredrickson, and J. D. Saffer., (1995). Physical mapping and characterization of a catabolic plasmid from the deep-subsurface bacterium *Sphingomonas* sp. strain F199. *J. Bacteriol.* 177:4537–4539.
- **Stolz, A.,** (2014). Degradative plasmids from sphingomonads. *FEMS Microbiol Lett* 350:9–19.
- **Stolz, A.,** (2009). Molecular characteristics of xenobiotic-degrading sphingomonads. *Applied microbiology and biotechnology*, 81:793–811.
- **Takeuchi, M.,** Hamana, K, Hiraishi, A., (2001). Proposal of the genus *Sphingomonas sensu stricto* and three new genera, *Sphingobium*, *Novosphingobium* and *Sphingopyxis*, on the basis of phylogenetic and chemotaxonomic analyses. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 51:1405–1417.
- **Top, E.M.,** Springael, D., Boon, N., (2002). Catabolic mobile elements and their potential use in bioaugmentation of polluted soil and waters. *FEMS Microbiol Ecol.* 42:199–208.
- **Tung, W.L.,** Chow, K.C., (1995). A modified medium for efficient electrotransformation of *E.coli*. *Trends Genetics.* 11:128-129.
- **Trzesicka-Mlynarz, D. & Ward, O.P.,** (1995). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by a mixed culture and its component pure cultures, obtained from PAH-contaminated soil. *Canadian journal of microbiology*, 41(6), pp. 470–476.
- **Uyttebroek, M.,** Ortega-Calvo J-J, Breugelmans, P., Springael D., (2006). Comparison of mineralization of solid-sorbed phenanthrene by polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading *Mycobacterium spp.* and *Sphingomonas spp.* *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72, pp. 829–836.
- **Uz, I.,** Duan, Y.P. & Ogram, (2000). Characterization of the naphthalene-degrading bacterium, *Rhodococcus opacus* M213. *FEMS microbiology letters*, 185(2), pp. 231–238.

- **Vechioli, G.I.**, Del Panno, M.T. and Paineira M.T., (1990). Fate and activity of microorganisms introduced into soil. *Microbial and Molecular Biology Reviews*, 61: 121-135.
- **Weir, S.C.**, Providenti, M.A., Lee, H. and Trevors, J.T., (1996). Effect of alginate encapsulation and selected disinfectants on survival of and phenanthrene mineralization by *Pseudomonas* sp. UG14Lr in creosote-contaminated soil. *J Ind Microbiol* 16,62–67.
- **Weekers, F.**, Rodriguez, C., Jacques, P., Mergeay, M., Thonart P., (2001). Dissemination of catabolic plasmids among desiccation-tolerant bacteria in soil microcosms. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 91, 219–232.
- **Wilson, M.S.**, Bakermans, C., Madsen, E.L., (1999). Applied and environmental microbiology, 65:80-87.
- **Wittich, R.M.**, Wilkes, H., Sinnwell, V., Francke, W., Fortnagel, P., (1992). Metabolism of dibenzo-p-dioxin by *Sphingomonas* sp. strain RW1. *Appl Environ Microbiol* 58:1005–1010.
- **Xiuhong- Feng, L.-T.** Ou, and A. Ogram., (1997). Plasmid-mediated mineralization of carbofuran by *Sphingomonas* sp. CF-06. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:1332–1337.
- **Yabuuchi, E.**, Yano, I., Oyaizu, H., Hashimoto, Y., Ezaki, T. & Yamamoto, H., (1990). Proposals of *Sphingomonas paucimobilis* gen. nov. and comb. nov., *Sphingomonas parapaucimobilis* sp. nov., *Sphingomonas yanoikuyae* sp. nov., *Sphingomonas adhaesiva* sp. nov., *Sphingomonas capsulata* comb. nov., and two genospecies of the genus *Sphingomonas*. *Microbiol Immunol* 34, 99–119.
- **Youngblood, W.W.** & Blumer, M., (1975). Polycyclic aromatic hydrocarbons in the environment: homologous series in soils and recent marine sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 39(9), pp.1314–1303.
- **Zhou, H.W.**, Guo, L.C., Wong, Y.S., Tam N.F.Y. (2006). Genetic diversity of dioxygenase genes in polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from mangrove sediments. *FEMS Microbiology Letters* 262:148–157.

- **Zocca, C., Di, G.S., Visentini, F., Vallini, G., (2004).** Biodiversity amongst cultivable polycyclic aromatic hydrocarbon-transforming bacteria isolated from an abandoned industrial site. *FEMS Microbiol. Lett.* 238, 375–382.
- **Zylstra, G.J., Kim, E., (1997).** Aromatic hydrocarbon degradation by *Sphingomonas yanoikuyae* B1. *J Ind Microbiol Biotechnol* 19:408–414.