

BÚSQUEDA DE MICROORGANISMOS DEGRADADORES DE BTX A PARTIR DE SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS



Autor: Daniel Cruz Sáez

Titulación: Grado en Biotecnología

Directores: José Joaquín Moreno Casco

Macarena del Mar Jurado Rodríguez

Departamento: Biología y Geología

Área: Microbiología

Facultad de Ciencias Experimentales

Universidad de Almería

Trabajo Fin de Grado. Curso 2019/2020.



**UNIVERSIDAD
DE ALMERÍA**

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer en primer lugar a D. Joaquín Moreno Casco, a quien considero mi padre académico, por permitirme realizar este Trabajo Fin de Grado en su laboratorio. Darle las gracias por escucharme y entenderme, realizando a veces incluso labores de psicólogo. Por darme su apoyo y consejos siempre que los he necesitado. Él es uno de los responsables de que esté actualmente redactando estas palabras. Hace unos años estuve a punto de tirar la toalla y quizá cometer uno, por no decir, el que hubiera sido el mayor error de toda mi vida, pero gracias a sus palabras y a sus enseñanzas aquí sigo, a punto de cumplir un sueño que solo acaba de empezar. Me llevo para siempre todas esas lecciones tanto académicas como de vida que he aprendido gracias a él.

En segundo lugar, quisiera agradecer a Macarena Jurado Rodríguez, mi "Maca", por todo lo que hemos vivido a lo largo de este TFG (por vivir, hemos vivido incluso una pandemia de por medio). Gracias por el esfuerzo que has hecho a lo largo de todo esto. Siempre con una sonrisa puesta y con ganas de enseñarme y ayudarme en meses de trabajo y de eternas siembras, ganándole todos los días la partida al reloj. Gracias por transmitirme ese "buenrollismo", ese ánimo energético y siempre alegre. Gracias también por esas charlas filosóficas que siempre te hacen crecer como persona, las echaré de menos.

Agradecer también a la gente que forma parte del laboratorio, a Paqui y Juan, junto a Joaquín y Macarena por su excelente labor docente estos años atrás inculcándonos ese amor hacia esos seres que no podemos ver. Al resto de componentes de este laboratorio, Ana Siles, María José López, María Rosa y de una manera más especial a Ana Toribio y a María José Estrella, por su buen hacer y por su ayuda y consejos microbiológicos cuando se han necesitado. Es por esto mismo que el buen ambiente creado ha conseguido formar una pequeña familia "microbiológica".

A los descubrimientos de este año, Nacho, Jesús y Marta, por los ratos de risa, los descansos y los cafés que hemos disfrutados juntos mientras estábamos en el laboratorio.

No puedo olvidarme de mis compañeros y amigos de quinta, Reyes, Michael, Rebeca, Abraham, Irene, Rachel, José Luis y Rosario por todos esos buenos ratos vividos juntos en este lugar y durante tantos años, que dan para muchas anécdotas.

Agradecer también a Mar, por convertirse en una de las personas a las que más aprecio y ser una de mis mejores amigas, qué le voy a contar que ella ya no sepa. A Riki, por ser y estar siempre, un amigo de los que ya no quedan. A Juanma, por echarme un cable siempre que puede y ser mi fiel compañero de maltas y cebadas.

Por último, dar las gracias a mi familia, a mis padres y a mi hermana, por todo lo que han hecho por mí, por creer en mí cuando ni siquiera yo lo hacía. A mi padre, por levantarme cuando más fuerte fue la caída. A mi madre por enseñarme que hay que sacar fuerzas de donde no las hay solo para seguir adelante.

Ahora toca mirar al frente y seguir caminando.

ÍNDICE

.....	1
RESUMEN	2
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	4
1.1 Contaminación de suelos por hidrocarburos: causas y consecuencias.	4
1.2 Métodos para la descontaminación de suelos: técnicas biológicas.	8
1.3 Microorganismos degradadores de hidrocarburos.	13
1.4 Objetivos	17
2. MATERIAL Y MÉTODOS	18
2.1 Diseño experimental.....	18
2.2 Muestreo y adecuación de las muestras.....	18
2.3 Aislamiento de microorganismos de muestras de suelo contaminadas con hidrocarburos.....	19
2.4 Estudio del metabolismo y cometabolismo	22
2.5 Identificación molecular de las cepas seleccionadas.....	24
2.6 Análisis estadístico.....	26
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
3.1 Colección de microorganismos de muestras de suelo contaminadas	26
3.2 Selección de microorganismos en base a su capacidad para utilizar hidrocarburos.....	30
3.3 Identificación de las cepas con mayor potencial biorremediador: Resultados esperables	41
4. CONCLUSIONES	42
5. BIBLIOGRAFÍA	43

RESUMEN

Las actividades derivadas de la industria petrolífera, el peligro de vertidos y derrames, así como las emisiones procedentes de vehículos con motor de combustión, conforman un conjunto de actuaciones que suponen un grave peligro para el ecosistema y la salud de los organismos que lo habitan. Por ello, es necesario encontrar soluciones con las que se pueda hacer frente de una manera eficaz, a nivel técnico, y asumible, a nivel económico, a esta problemática creciente.

El objetivo de este Trabajo Fin de Grado consistió en la búsqueda e identificación de microorganismos con capacidad biodegradadora de Benceno, Tolueno y Xileno (BTX), como componentes principales del petróleo, para ser utilizados en futuras tareas de biorremediación. Para ello se tomaron muestras del suelo de tres gasolineras pertenecientes al término municipal de Quesada (Jaén) y mediante procedimientos de siembra en medios selectivos constituidos por BTX, se consiguió obtener una colección de bacterias tolerantes a dichos compuestos. A continuación, éstas fueron sometidas a ensayos de metabolismo y cometabolismo con objeto de determinar su capacidad degradativa sobre los compuestos BTX. Finalmente, las bacterias que produjeron mejores resultados fueron seleccionadas para su posterior identificación molecular.

De las muestras de suelo potencialmente contaminadas por hidrocarburos, se seleccionaron en total 17 cepas que constituyeron la colección de estudio. Las cepas 1.1.2, 1.2.7, 1.3.1, 3.1.2 y 3.3.3 mostraron la capacidad no sólo de tolerar la presencia de BTX, sino de utilizar dichos compuestos aromáticos para su metabolismo. Adicionalmente, las cepas 1.2.7, 1.3.1 y 3.3.3 mostraron la capacidad de crecer sin una fuente directa de nitrógeno.

Palabras clave: Hidrocarburos, biorremediación, bacterias hidrocarbonoclasticas, fijación de nitrógeno, *Bacillus*.

ABSTRACT

The activities derived from the oil industry, the accidental and caused spills, as well as the transmissions of combustion engine vehicles, make up a set of actions that represent a serious danger to the ecosystem and the health of the organisms that inhabit it. Therefore, it is necessary to find solutions that address this growing problem in an effective and affordable way.

This bachelor thesis aims at searching and identifying microorganisms that have the ability to biodegrade Benzene, Toluene and Xylene (BTX), main components of petroleum, to be used in future bioremediation tasks. For this purpose, soil samples were taken from three gas stations of the municipality of Quesada (Jaén, Spain). By inoculating procedures in selected media made of BTX, a bacteria collection was obtained. Subsequently, they were subjected to metabolism and cometabolism tests in order to determine their degradative capacity on BTX. Finally, the bacteria with better results were selected for ulterior molecular identification.

A total of 17 strains, previously isolated from contaminated soil samples, were selected as the work collection. Bacteria strains 1.1.2, 1.2.7, 1.3.1, 3.1.2 and 3.3.3 showed the ability not only to tolerate the presence of BTX, but also to use these aromatic compounds for their metabolism. In addition, the strains 1.2.7, 1.3.1 and 3.3.3 showed the ability to grow without a direct source of nitrogen.

Keywords: Hydrocarbons, bioremediation, hydrocarbonoclastic bacteria, nitrogen fixation, *Bacillus*.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Contaminación de suelos por hidrocarburos: causas y consecuencias.

El petróleo es un producto procedente de transformaciones tanto químicas como biológicas de materia orgánica, previamente depositada y hacinada en el subsuelo, y que se forma durante un proceso de sedimentación. Dicho proceso es iniciado por ciertas bacterias anaerobias, pero a medida que se produce un incremento de profundidad, las bacterias van desapareciendo, debido principalmente al aumento de temperatura, efecto del denominado gradiente geotérmico, que puede ser acompañado por fuentes locales de calor. Finalmente, el proceso de formación definitiva del petróleo ocurre a temperaturas de entre 200 y 250 °C. Dichas transformaciones dan como resultado una pérdida de oxígeno y de nitrógeno en forma de H₂O, CO₂ y NH₃ y una ganancia relativa en hidrógeno y carbono (Meléndez, 1982).

Asimismo, el petróleo se compone de distintos tipos de hidrocarburos. Estos compuestos están formados por carbono e hidrógeno y, precisamente en función del número de carbonos y de su estructura química, poseen propiedades diferentes que permiten su clasificación (Olguín et al., 2007). Existe un gran número de hidrocarburos presentes en el petróleo (Ossai et al., 2020) tal y como se enumeran en la Tabla 1.

Tabla 1. Tipos y características de hidrocarburos presentes en el petróleo (modificado de Ossai et al., 2020).

Hidrocarburos	Características	Ejemplos
<u>Alifáticos</u>		
1. Alcanos	·Menos densos que el agua. ·El tamaño de la molécula es inversamente proporcional a su volatilidad y solubilidad en agua.	Metano, propano y butano (gaseosos a temperatura ambiente); hexano, octano, hexadecano (líquido a temperatura ambiente); eicosano, triacontano, pentacontano (sólidos a temperatura ambiente)
2. Alquenos		
3. Alquinos		
<u>Cicloalifáticos</u>		

1. Cicloalcanos aromáticos	·Contienen hasta 6 átomos de carbono en un anillo. ·Altamente resistentes a la degradación microbiana.	Ciclohexano, metilciclohexano, metilciclopentano, 1,2-dimetilciclopentano
2. Monoaromáticos BTEX	·Muy volátiles y relativamente solubles en agua. ·Poseen anillo bencénico. ·Algunos son resistentes a la degradación microbiana	Benceno, etilbenceno, naftaleno, tolueno, xileno y fenantreno.
3. Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP)		
Otros componentes		
1. Asfaltenos	·Solubles en aromáticos y no solubles en alcanos ligeros. ·Contienen entre 18 y 65 átomos de carbono	Fenoles, ácidos grasos, cetonas, ésteres, sulfonatos, quinolinas, piridinas, porfirinas, cardasoles.
2. Ceras y alquitrán		
3. Resinas		
4. Compuestos no hidrocarbonados		

De la enorme cantidad de hidrocarburos encontrados, no sólo en el petróleo sino también en productos derivados del mismo con carácter contaminante, sólo una pequeña parte de éstos están bien caracterizados respecto a su efecto toxicológico (ATSDR, 1999). Por ejemplo, los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) de bajo peso molecular, es decir, los compuestos por menos de 4 anillos bencénicos, son sumamente tóxicos. Por su parte, los hidrocarburos aromáticos policíclicos de alto peso molecular, es decir, los compuestos por 4 o más anillos bencénicos, tienen carácter cancerígeno y mutagénico. Asimismo, a consecuencia de su naturaleza hidrofóbica, los hidrocarburos aromáticos policíclicos, en general, tienden a unirse a partículas que sedimentan en el suelo y que finalmente pueden llegar a incorporarse a la cadena trófica (Morehead et al., 1986).

Los HAPs se consideran contaminantes orgánicos ubicuos, debido a que representan un grupo químico muy estable. Están conformados por 2 o más anillos de benceno, los cuales están fusionados ya sea de manera radial, lineal o en forma de racimo (Wilson y Jones, 1993). Precisamente, el benceno, junto al tolueno e isómeros del xileno, también conocidos conjuntamente como BTX, son hidrocarburos aromáticos que constituyen alrededor de un 30% de la composición de la gasolina, uno de los subproductos contaminantes obtenidos a partir de

destilaciones fraccionadas del petróleo. El 70% restante de la composición de la gasolina corresponde a compuestos alifáticos saturados (Hartley y Englande, 1992; Phelps y Young, 2001; Coates et al., 2002).

Existe un gran número de hidrocarburos aromáticos policíclicos, algunos de los más comunes se pueden observar en la Figura 1.

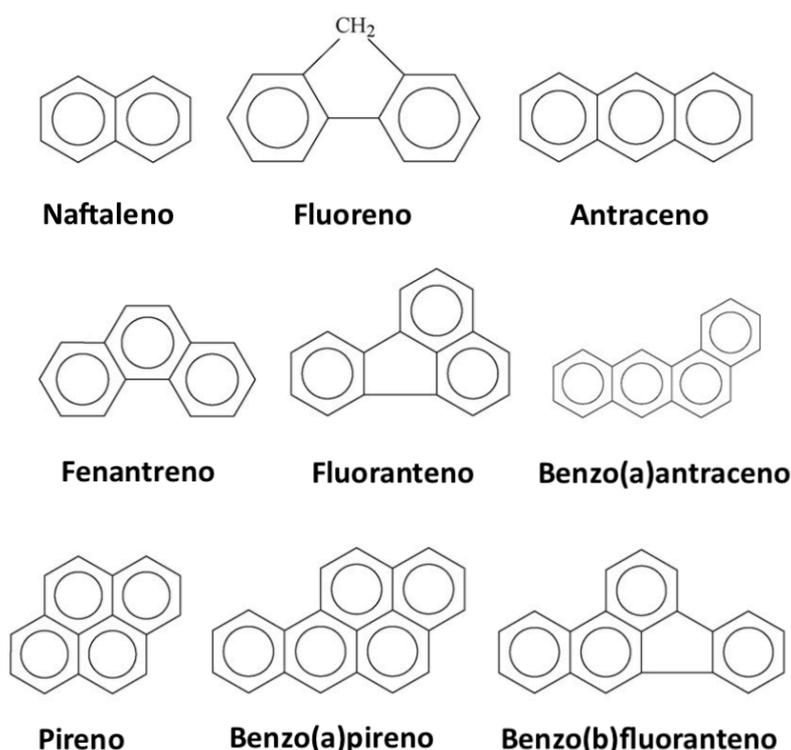


Figura 1. Estructura química de algunos de los HAPs más comúnmente estudiados (modificado de Haritash y Kaushik, 2009).

Los HAPs pueden aparecer en el ambiente bien de manera natural o bien por acción antropogénica. Naturalmente se forman durante la descomposición térmica de moléculas orgánicas y su posterior recombinación; por la combustión incompleta a altas temperaturas, entre 500 y 800 °C; o al someter el material orgánico a temperaturas entre 100 y 300 °C durante largos periodos de tiempo (Haritash y Kaushik, 2009). Mientras que, por acción del ser humano, que es como aparecen la gran mayoría, se forman debido principalmente a la combustión incompleta de biomasa y de combustibles fósiles (Tobiszewski y Namieśnik, 2012; Tsibart y Gennadiev, 2013). Según un estudio realizado en la provincia de Caserta (Italia) por Qi et al. (2020), las fuentes de emisión con mayor contribución respecto a la formación de hidrocarburos aromáticos policíclicos, son las combustiones incompletas de materia orgánica como pueden ser, por ejemplo, las emisiones procedentes de vehículos o de industrias, respecto a las fuentes de contaminación procedentes directamente del petróleo. Es por esto, que las emisiones

procedentes tanto de la actividad industrial como de los vehículos con motor de combustión deberían ser correctamente controladas (Qi et al., 2020).

El crecimiento de la población mundial y, por tanto, de las consiguientes actividades industriales, ha incrementado la incidencia de dichas fuentes de hidrocarburos. De hecho, ha provocado un mayor uso de los recursos del planeta, en general, trayendo a su vez como consecuencia el incremento de la contaminación del suelo, siendo responsable de dicha contaminación, en gran medida, la explotación, refinación, almacenamiento y distribución del petróleo crudo y sus derivados (Ferrera-Cerrato et al., 2006), especialmente en países con actividad petrolífera, tales como México, donde han sido registrados casos de contaminación en suelo y agua ocasionados por derrames, fugas, infiltraciones y recortes de perforación (Maldonado et al., 2010). La presencia de hidrocarburos contaminantes provenientes del petróleo, tanto en agua como en suelo, tiene un gran impacto medioambiental y, además, la vida en ambientes contaminados con hidrocarburos plantea un peligro sustancial tanto para los seres humanos como para otros organismos (Ossai et al., 2020). Por ejemplo, se ha constatado en distintas investigaciones que existe un claro efecto inhibitorio, tras la contaminación con hidrocarburos, sobre la germinación de diferentes tipos de plantas, observándose un acentuado retraso en el crecimiento de todas las especies evaluadas (Benavides et al., 2006).

La presencia de hidrocarburos en el suelo impide el intercambio gaseoso que se produce con la atmósfera y, por tanto, da lugar a una sucesión de procesos fisicoquímicos que, dependiendo de determinados factores como pueden ser el tipo de hidrocarburo, la humedad, la temperatura, el tipo de suelo o la cantidad de hidrocarburo derramada, pueden ser procesos más o menos lentos lo cual puede llegar a ocasionar toxicidad a largo plazo. Además, al tener los suelos un cierto grado de salinidad, adquieren una alta complejidad que dificulta su tratamiento. Con estos altos gradientes de salinidad son capaces de desnaturalizar enzimas, destruir la estructura terciaria proteínica y deshidratar células, lo cual puede resultar letal para muchos de los microorganismos que se usan frente a aguas y suelos contaminados con hidrocarburos (Schroeder et al., 1999; Siva et al., 2004; Miranda y Restrepo, 2005). Además, debido a la relativamente alta solubilidad de los llamados BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno y xileno), éstos son capaces de mezclarse en el subsuelo y contaminar el agua subterránea de los acuíferos (Margesin y Schinner, 2001).

A causa de la gran cantidad existente de hidrocarburos aromáticos policíclicos, estamos expuestos, por diferentes vías, a una mezcla de HAPs y no sólo a nivel individual. Las principales fuentes de exposición a estos compuestos son la inhalación, el contacto directo con la piel o la ingesta, especialmente mediante la toma de agua, alimentos, e incluso tierra o partículas de polvo contaminadas (ATSDR, 1999). Precisamente, Yang et al. (2014) observaron que ésta última era la principal vía de contacto con los HAPs por parte de las personas.

La Agencia de Protección del Medio Ambiente de los Estados Unidos (USEPA) ha descrito la capacidad mutagénica, cancerígena y teratogénica de los hidrocarburos aromáticos policíclicos y ha catalogado a 16 de estos compuestos como contaminantes prioritarios, siendo siete de

ellos, entre los que destaca el benzo(α)antraceno, calificados como cancerígenos por el Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (Yang et al., 2014). La presencia de hidrocarburos en humanos conlleva un amplio abanico de efectos problemáticos para la salud, entre los que se encuentran la hemotoxicidad, carcinogenicidad, neurotoxicidad, genotoxicidad, citotoxicidad, cardiotoxicidad o inmunotoxicidad (Ossai et al., 2020). En concreto, uno de ellos, el naftaleno, que se encuentra como microcontaminante en el agua potable de manera habitual, es capaz de ocasionar cataratas. Una intoxicación aguda por este hidrocarburo puede acarrear una anemia hemolítica y nefrotoxicidad (Mastrangelo et al., 1996; Goldman et al., 2001). Además, este compuesto es capaz de inhibir la respiración mitocondrial (Falahahtpisheh et al., 2001).

Teniendo en cuenta la peligrosidad de estos subproductos del petróleo, es imprescindible controlar y eliminar adecuadamente los residuos derivados de ellos a través de la aplicación de las diversas técnicas y métodos de descontaminación existentes.

1.2 Métodos para la descontaminación de suelos: técnicas biológicas.

Los procesos necesarios para la degradación de los hidrocarburos que conforman el petróleo consisten en transformaciones bioquímicas, tanto de carácter abiótico como de carácter biótico, es decir, con implicación de microorganismos; y mineralización (Joutey et al., 2013; Aeppli et al., 2014). La susceptibilidad de los hidrocarburos con respecto a su uso por parte del metabolismo de los microorganismos difiere en función del tipo. Normalmente dicha susceptibilidad tiende a aumentar en el siguiente orden: hidrocarburos aromáticos policíclicos < ciclo alcanos < pequeños aromáticos (mono aromáticos y aromáticos de pequeño peso molecular) < alquenos ramificados < alcanos lineales (Perry, 1984; Ulrici, 2000; Tyagi et al., 2011). Algunos compuestos, cuyo peso molecular es muy alto, como algunos hidrocarburos aromáticos, pueden no ser degradados de manera completa (Atlas y Bragg, 2009).

Además de esta susceptibilidad, otros factores influyen sobre los microorganismos que actúan en estos ambientes y, por tanto, en la tasa de transformación de dichos contaminantes, como son: la temperatura, debido a que la mayoría de las bacterias crecen en condiciones mesófilas, (entre 15 y 45 °C), y que a partir de los 40 °C, se produce la desnaturalización de las enzimas, bajando la tasa de degradación; la necesidad de nutrientes; el pH del suelo, debido a que el crecimiento microbiano está limitado en su mayoría por el intervalo de pH que va desde 6 a 8; y, por último, la humedad, ya que los microorganismos necesitan un porcentaje de humedad mínimo para poder crecer, pero, por otra parte, un exceso de la misma provoca una inhibición del crecimiento microbiano, ya que se reduce la concentración de oxígeno en el suelo (Maroto y Rogel, 2002).

Los microorganismos de mayor interés en tareas de descontaminación son aquellos que obtienen energía mediante la biodegradación de los contaminantes, ya que los utilizan para su

metabolismo, obteniendo así carbono, que es el componente fundamental de las estructuras celulares, convirtiéndose la biodegradación de los hidrocarburos del petróleo en una actividad energéticamente favorable para ellos (Abbasian et al., 2015). La biodegradación puede ocurrir tanto en condiciones aerobias (Figura 2) como anaerobias (Figura 3). Si ocurre de manera aerobia, esto es, en presencia de oxígeno (O_2), la degradación puede ser activada por oxigenasas y oxidada completamente a dióxido de carbono (CO_2) y agua (H_2O) (Ossai et al., 2020). En caso de condiciones anaerobias, el aceptor de electrones utilizado puede ser el hierro (III) (Fe^{3+}), los nitratos, los sulfatos o el dióxido de carbono (CO_2), por lo que se produce en condiciones reductoras (Maroto y Rogel, 2002).

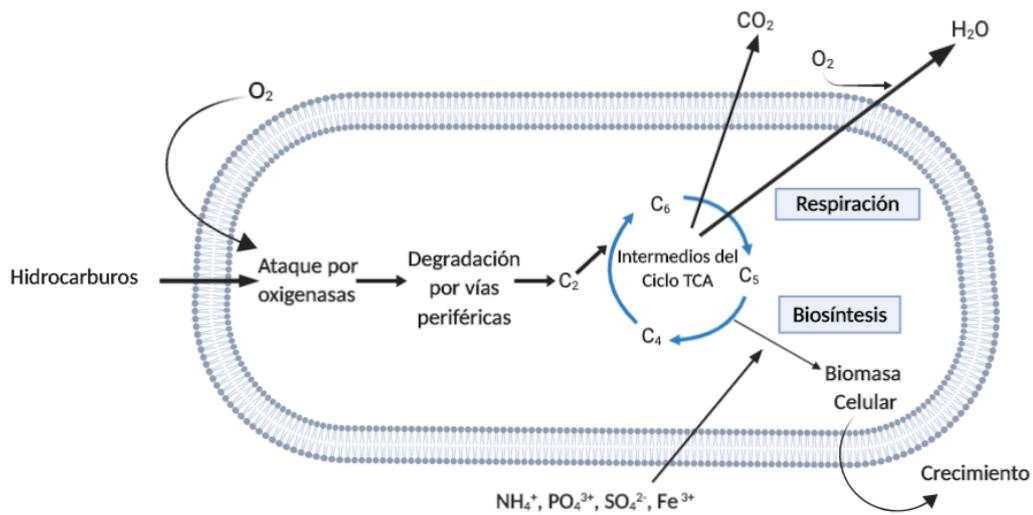


Figura 2. Principio general de la degradación aeróbica de hidrocarburos del petróleo (modificado de Das y Chandran, 2011).

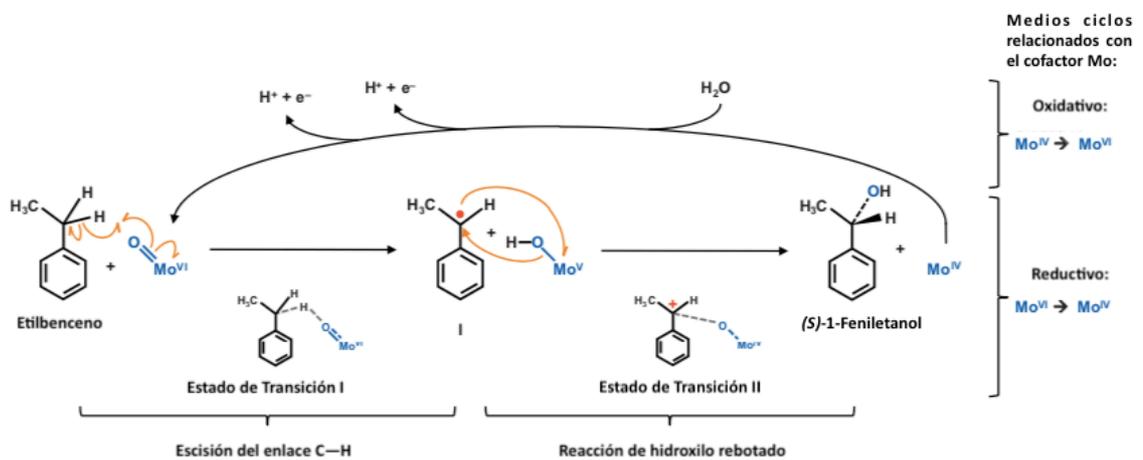


Figura 3. Hidroxilación anaeróbica de hidrocarburos mediada por la enzima etilbenceno deshidrogenasa que contiene el cofactor Mo (modificado de Rabus et al., 2016).

La recuperación de un suelo contaminado puede llevarse a cabo, por tanto, mediante diferentes tácticas (Rao et al., 1996). Dichos métodos pueden ser aplicados en el lugar donde se encuentra presente la contaminación, éstos son los llamados tratamientos *in situ* (Martín et al., 2004), o bien como tratamientos *ex situ*, cuya metodología consiste en tratar un suelo o material contaminado en un sistema controlado previa extracción de éste (Benavides et al., 2006).

Aunque existen métodos de distinta naturaleza, física, química o biológica, éstos últimos destacan porque han demostrado una alta capacidad de remediación tanto *in situ* como *ex situ*, siendo capaces de degradar tanto los hidrocarburos presentes en el petróleo como otros contaminantes orgánicos, dando lugar a compuestos más simplificados y sin efectos tóxicos para el medio ambiente (Lim et al., 2016). Sin embargo, algunos de estos métodos necesitan un largo periodo de tiempo de varios años para disponer de una degradación satisfactoria de los compuestos sometidos a transformación. Además, una elevada concentración del contaminante es capaz de inhibir en un alto porcentaje la actividad microbiana, lo cual hace que la eficiencia de la degradación sea, en ocasiones, muy baja (Margesin et al., 2003). Es por esto, que los tratamientos de carácter biológico dependen estrechamente de los factores limitantes citados anteriormente. No obstante, un estudio más profundo de los mismos permitirá alcanzar una mayor eficiencia y optimización de dichos tratamientos.

Los métodos biológicos de remediación más utilizados son:

- **Biorremediación.** Es una técnica sencilla, sostenible, ecológica y de bajo coste para la restauración del suelo afectado. Se basa en la degradación natural de los hidrocarburos por parte de distintos grupos microbianos como levaduras, hongos o bacterias (Ossai et al., 2020). Después de la guerra del Golfo en 1991, la biorremediación fue popularizada como una buena opción para tratar los residuos del petróleo (Margesin y Schinner, 2001), aunque dicha técnica fue utilizada por primera vez ya en 1940 (Hoff, 1993). Esta técnica puede utilizarse tanto *in situ* como *ex situ*, pero hay que destacar que las técnicas de biorremediación *in situ* tienen un menor coste y, además, producen una reducción con respecto a la generación de residuos superficiales a eliminar (Daane et al., 2001). En comparación con los métodos fisicoquímicos, la biorremediación ofrece ciertas ventajas debido principalmente a que la gran mayoría de las moléculas que componen el petróleo son de naturaleza orgánica y, como consecuencia, son susceptibles de ser biodegradadas por microorganismos que, además, son ubicuos y pueden encontrarse de forma natural sobre la zona contaminada (Van Hamme et al., 2003). Las comunidades microbianas que se encuentran expuestas a hidrocarburos presentan una alta capacidad de adaptación, produciéndose en ellas cambios genéticos que les permiten obtener energía de dichos compuestos, incluso algunas son capaces de responder a la presencia de hidrocarburos en apenas unas horas (Atlas y Bartha, 1998). Las especies bacterianas más utilizadas y mejor caracterizadas para la degradación de hidrocarburos pertenecen

en su mayoría al género *Pseudomonas*, y se les atribuye una alta eficiencia (Wang et al., 2011a).

- **Bioatenuación.** Es una técnica aplicable tanto de forma *in situ* como *ex situ*. Puede definirse como la utilización de procesos físicos y bioquímicos para transformar, neutralizar, eliminar y reducir la cantidad, concentración y la toxicidad del contaminante (Ossai et al., 2020). Esta técnica se aplica principalmente para lugares en los cuales existe una baja concentración de contaminantes, pero otros métodos de remediación no pueden ser utilizados (Vásquez-Murrieta et al., 2016).
- **Bioestimulación.** Dicha técnica puede aplicarse tanto *in situ* como *ex situ*. Consiste en la adición de nutrientes, factores de crecimiento, biopolímeros y demás compuestos, para aumentar y soportar el crecimiento de los microorganismos autóctonos en suelos con capacidad biorremediadora (Lim et al., 2016). En este sentido, los biosurfactantes tienen un futuro prometedor, ya que estos aumentan la superficie de contacto con el contaminante y, con ello, la cantidad de petróleo disponible para ser atacada por los microorganismos (Nikolopoulou y Kalogerakis, 2009). Varios investigadores han descrito que la bioestimulación es una técnica muy apropiada para la eliminación de contaminantes derivados del petróleo en suelos, pero que, para llevarla a cabo, es necesario un estudio de la capacidad degradadora de la microbiota autóctona, así como de los parámetros ambientales del lugar afectado por el derrame petrolífero (Adams et al., 2015). Para alcanzar el mayor grado de bioestimulación, el factor diferencial es la concentración ideal de nutrientes para los microorganismos, de manera que estos obtengan un crecimiento óptimo, además de mantener dicha concentración el mayor tiempo que sea posible (Lee et al., 2007). Se debe tener en cuenta que la adición de nutrientes puede provocar el crecimiento de microorganismos heterotróficos que no tengan capacidad biodegradadora, lo cual es capaz de crear una competición entre la microbiota existente (Adams et al., 2014). Es una de las técnicas consideradas más eficiente si se compara con otras técnicas de remediación *in situ* (Simpanen et al., 2016). La adición de compost, el producto final tras un proceso de compostaje, a un material contaminado, se considera también bioestimulación (Semple et al., 2001).
- **Bioaumentación.** Se puede aplicar tanto de manera *in situ* como *ex situ*. Esta técnica conlleva la introducción de cultivos microbianos exógenos, comunidades microbianas autóctonas previamente aisladas y caracterizadas o bien microorganismos modificados genéticamente cuya actividad metabólica haya sido adaptada para la degradación de hidrocarburos con el objetivo de mejorar o aumentar la tasa de biodegradación de éstos (Kästner y Miltner, 2016; Poi et al., 2017). Determinar el éxito potencial de esta técnica requiere conocer varios factores como son la biodisponibilidad de los hidrocarburos o del contaminante que se quiere eliminar, la capacidad de supervivencia del o de los microorganismos que se pretenden añadir, sus actividades metabólicas o bien sus

genomas, y una idea general de las condiciones medioambientales que controlan la ratio de biodegradación del suelo (Vogel, 1996). Aunque realmente la parte fundamental de la que depende esta técnica es la identificación y el aislamiento de cepas microbianas apropiadas (Thompson et al., 2005). Una de las opciones que se emplean actualmente consiste en la realización de técnicas moleculares como la Real-Time PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real), con la que se monitorean las poblaciones objetivo y los genes catabólicos involucrados en la degradación de contaminantes (Baek et al., 2009). A través de varios estudios, se ha observado que el uso de un consorcio microbiano para la biodegradación de los contaminantes otorga más ventajas que un único cultivo puro, debido a que se proporciona la diversidad metabólica necesaria para su aplicación en el campo y asegura su supervivencia en la gran mayoría de los casos (Nyer et al., 2002; Rahman et al., 2002; Martínez-Gallardo et al., 2020).

- Compostaje. Esta técnica puede aplicarse tanto *in situ* como *ex situ*. Consiste en la degradación bioquímica, realizada por microorganismos aerobios, de residuos y contaminantes orgánicos y su posterior transformación en materia orgánica humificada y estabilizada que puede ser utilizada como fertilizante con aplicación agrícola, así como para restaurar suelos agotados o contaminados con compuestos orgánicos (Cai et al., 2017; Ren et al., 2018;). El proceso de compostaje, para llevarse a cabo en condiciones óptimas, requiere de algunos ajustes iniciales, por ejemplo, la mezcla con estiércol animal y restos vegetales que mejora sustancialmente la biodegradación de los hidrocarburos (Antizar-Ladislao et al., 2005; Liu et al., 2010b). Esto a su vez permite alcanzar una adecuada humedad y relación Carbono/Nitrógeno en la mezcla de partida, esenciales para el desarrollo de la actividad microbiana. Además, se debe controlar durante el proceso la realización de volteos periódicos o el mantenimiento de una aireación suficiente, así como el hecho de que se alcancen condiciones termófilas (> 50 °C), para poder higienizar y transformar de una manera correcta un material tan peligroso como son los hidrocarburos de petróleo. El aumento de temperatura es consecuencia del calor generado por la actividad microbiana durante la descomposición de los materiales orgánicos en el compost (Ossai et al., 2020).
- Ficorremediación. Es una técnica con mucho potencial que actualmente se sigue desarrollando. Puede aplicarse *in situ* o *ex situ*. Dicha técnica consiste en el uso de especies de algas, tanto macroalgas como microalgas, para retener, biotransformar, degradar o metabolizar contaminantes presentes concretamente en agua (Phang et al., 2015). Las algas tienen capacidad para acumular y degradar compuestos tales como pesticidas, hidrocarburos del petróleo o fenoles (Kumar et al., 2008). Rao et al. (2011), señalaron entre las posibles ventajas destacables observadas tras usar la ficorremediación como método de remediación de zonas contaminadas, la oxigenación del ambiente, los beneficios comerciales derivados de la producción de biomasa y sus

bioproductos derivados, el bajo coste y el secuestro de dióxido de carbono (CO₂), lo cual ayuda a reducir la huella del cambio climático.

- **Fitorremediación.** Es una técnica aplicable tanto *in situ* como *ex situ*. Se basa en el uso de plantas con capacidad para descontaminar suelos y acuíferos mediante la extracción de contaminantes por el sistema radicular (Adam, 2001). Muchos investigadores han realizado estudios de fitorremediación utilizando diferentes tipos de plantas para remediar suelos contaminados con contaminantes de diferente naturaleza como metales pesados o hidrocarburos del petróleo. La fitorremediación usa la sinergia que ofrece la interacción entre las plantas y los microorganismos que las rodean y que habitan el suelo y sus raíces, para degradar un amplio rango de contaminantes (Ossai et al., 2020).

Como se ha podido comprobar, en las diferentes técnicas de descontaminación biológica están involucrados distintos tipos de microorganismos, en mayor o menor medida.

1.3 Microorganismos degradadores de hidrocarburos.

Las bacterias son los microorganismos más activos en la degradación de petróleo y sus derivados, y, además, son consideradas como degradadoras primarias en ambientes contaminados (Brooijmans et al., 2009), incluso, se conocen bacterias cuya única fuente de carbono se basa en hidrocarburos (Yakimov et al, 2007), dichas bacterias son pertenecientes a los géneros *Oleispira*, *Oleiphilus*, *Thalassolituus*, *Alcanivorax* y *Cycloasticus* (Brooijmans et al., 2009). Actualmente, el uso de consorcios microbianos está tomando más peso en la biodegradación de petróleo crudo y sus derivados, que el uso de cepas únicas. Uno de los consorcios más comunes está formado por bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Brucella* y *Rhodococcus* (Zhao et al., 2011). En la Tabla 2 se muestran algunas de las principales bacterias degradadoras de compuestos aromáticos.

Tabla 2. Principales bacterias con capacidad degradadora de distintos compuestos aromáticos (modificado de Seo et al., 2009).

Especies bacterianas	Cepas	Compuestos aromáticos
<i>Achromobacter</i> sp.	NCW	Carbazol
<i>Bacillus cereus</i>	P21	Pireno
<i>Burkholderia cepacia</i>	BU-3	Fenantreno, naftaleno, pireno
<i>Mycobacterium</i> sp.	JS14	Fluoranteno
<i>Mycobacterium</i> sp.	PYR-1, LB501T	Antraceno, fenantreno, fluoranteno, pireno

<i>Pseudomonas</i> sp.	NCIB 9816-4	Dibenzotiofeno, dibenzofurano, fluoreno
<i>Pseudomonas putida</i>	CSV86	1- Metilnaftaleno
<i>Rhodococcus erythropolis</i> .	D-1	Dibenzotiofeno
<i>Staphylococcus</i> sp.	PN/Y	Fenantreno

Las bacterias del género *Pseudomonas* son bacterias Gram negativas, ubicuas y que presentan una gran diversidad metabólica, lo que les permite, por tanto, usar diversos sustratos para obtener energía, entre los que se encuentran los hidrocarburos presentes en el petróleo (Benavides et al., 2006). De hecho, para ello, algunas especies dentro de este género, como *P. aeruginosa*, *P. putida* y *P. chlororaphis*, son capaces de producir biosurfactantes de naturaleza glucolipídica que favorecen la utilización de hidrocarburos (Das y Chandran, 2011). Cameotra y Makkar (1998) demostraron que el biosurfactante producido por *P. aeruginosa* era capaz de recuperar un 56% de petróleo que permanecía absorbido por arena almacenada en una columna vertical. *P. fluorescens* es degradadora de naftaleno y fenantreno, lo cual le da una ventaja frente a otras especies de *Pseudomonas*, que únicamente son capaces de metabolizar naftaleno y asfaltenos (Rockne et al., 2000). Zhang et al. (2011) aislaron de un campo petrolero en Daqing (China) una cepa de *P. aeruginosa*, denominada DQ8. Dicha cepa era capaz de crecer con diésel y petróleo crudo como única fuente de carbono y energía, además de degradar de manera eficiente los dos principales compuestos del petróleo crudo, alcanos lineales e hidrocarburos aromáticos policíclicos. Por tanto, dicha cepa demostró tener un gran potencial en la biorremediación de suelos contaminados.

Las bacterias del género *Rhodococcus* son organismos aerobios, Gram positivos, sin opción de movimiento y en algunos casos pueden presentarse como pequeños filamentos. Poseen una alta diversidad de vías metabólicas para la modificación y eliminación de compuestos aromáticos, entre las que se incluyen principalmente las actividades dioxigenasa y monooxigenasa sobre los anillos aromáticos, además de la actividad de rotura de catecol (Benavides et al., 2006) (Figura 4). Binazadeh et al. (2020) han descrito recientemente la gran capacidad que posee una cepa de *Rhodococcus* sp. (Moj-3349) como microorganismo degradador de hidrocarburos, debido a que fue capaz de descomponer de una manera eficiente largas cadenas de hidrocarburos lineales en altas concentraciones.

Bacterias del género *Mycobacterium* son utilizadas habitualmente en lugares que llevan bastante tiempo contaminados. Se conoce que las micobacterias poseen superficies lipofílicas, que las convierten en microorganismos capaces de extraer contaminantes de las partículas del suelo. También, es conocida su alta eficiencia para biodegradar hidrocarburos aromáticos policíclicos compuestos hasta por 5 anillos bencénicos (Khan et al., 2002; Bogan et al., 2003; Lu et al., 2011). Además, junto a *Mycobacterium*, los géneros *Alcaligenes* y *Bacteroides*, han sido descritos como importantes degradadores de hidrocarburos, lo que los sitúa como serios aspirantes a agentes biorremediadores para el tratamiento de suelos contaminados con todo

tipo de hidrocarburos, aunque cuentan con la desventaja de no ser muy abundantes en los ambientes de interés (Nannipieri et al., 2003).

Wang et al. (2011b) aislaron una cepa del género *Dietzia* (DQ12-45-1b), con capacidad para crecer sobre alcanos compuestos desde 6 hasta 40 carbonos y compuestos aromáticos, siendo éstos su única fuente de carbono. También se ha descrito en otra publicación, la enorme capacidad potencial de *Escherichia fergusonii* como degradadora de hidrocarburos presentes en el petróleo (Pasumarthi et al., 2013). Stach y Burns (2002) descubrieron la capacidad de la cepa *Comamonas testosteroni* GZ39 para utilizar fenantreno como única fuente de carbono y energía.

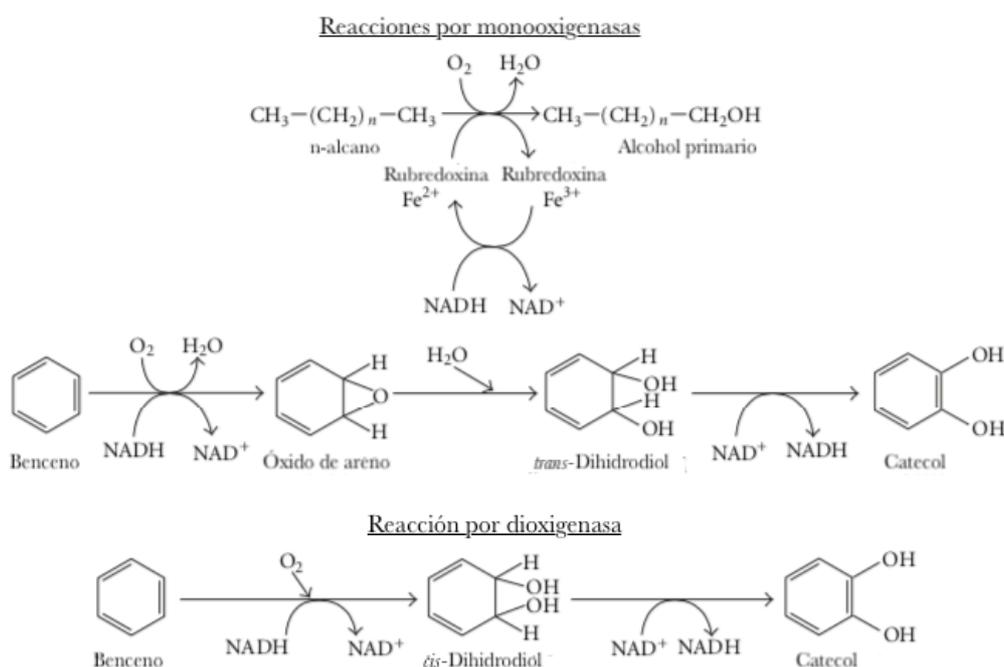


Figura 4. Reacciones enzimáticas intracelulares involucradas en el proceso de degradación de hidrocarburos (modificado de Das y Chandran, 2011).

Bacosa et al. (2012) observaron los distintos roles existentes entre las bacterias que conformaban un consorcio microbiano de 5 cepas distintas, capaces de degradar hidrocarburos presentes en el petróleo. En dicho estudio se determinó que *Burkholderia* sp. era la principal degradadora de hidrocarburos aromáticos, además de tener un crecimiento notablemente rápido al ser cultivada en queroseno. Por otro lado, *Cupriavidus* sp. destacó respecto a la utilización de compuestos alifáticos para obtener energía. Mientras que el crecimiento de *Achromobacter* sp., *Alcaligenes* sp. y *Rhodanobacter* sp. se vio inhibido por los compuestos aromáticos, no teniendo estos microorganismos capacidad para degradar hidrocarburos. Sin embargo, una vez que dichos compuestos fueron degradados por otras cepas, formando metabolitos intermedarios, éstas si fueron capaces de crecer, precisamente utilizando dichos metabolitos.

Respecto al crecimiento anaeróbico sobre naftaleno como único medio de carbono y energía, se ha observado cuando éste es combinado con la reducción disimilativa del nitrato. *Pseudomonas* sp. con capacidad desnitrificante, y *Vibrio* sp., reductora de nitrato a nitrito, se han descrito como cepas capaces de utilizar el naftaleno de manera anaerobia (Rockne et al., 2000). La degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos de manera anaerobia no está restringida a hidrocarburos aromáticos de 2 anillos bencénicos, ya que existen investigaciones que han demostrado que cepas con capacidad desnitrificante han mostrado una completa mineralización del fenantreno (Rockne y Strand, 2001).

Aparte de los microorganismos como tales, existen grupos de enzimas con capacidad degradadora. Las más conocidas son las enzimas alcano hidroxilasas del citocromo P450. En su conjunto, constituyen una superfamilia ubicua de monooxigenasas que desempeñan un papel fundamental en la degradación de hidrocarburos del petróleo, compuestos clorados y aditivos que forman parte de combustibles (Van Beilen y Funhoff, 2007). Los eucariotas superiores generalmente tienen diferentes familias P450, las cuales consisten en formas individuales que colaboran como un conjunto de isoformas a la conversión metabólica del sustrato suministrado. En el caso de microorganismos eucariotas dicha multiplicidad de P450 sólo se encuentra en unas pocas especies de levaduras (Zimmer et al., 1996), como son *Candida maltosa*, *C. tropicalis* y *C. apicola* (Scheuer et al., 1998).

Además de bacterias, algunos hongos filamentosos, correspondientes a los géneros *Penicillium*, *Trichoderma* o *Aspergillus*, se han descrito como degradadores de hidrocarburos del petróleo, entre ellos el benzo(α)pireno, tanto en condiciones *in vitro* como en la rizosfera de plantas crecidas en suelos contaminados (Ferrera-Cerrato y Alarcón, 2004). La degradación microbiana realizada por hongos ligninolíticos ha sido estudiada de una manera exhaustiva durante años (Cajthaml et al., 2001). Estos hongos producen enzimas extracelulares con muy poca especificidad hacia el sustrato, por lo que éstas son capaces de degradar varios tipos de compuestos. Diferentes investigaciones con enzimas ligninolíticas purificadas han demostrado su capacidad para degradar HAPs (Hofrichter et al., 1998).

Diferentes especies de algas pertenecientes a los géneros *Chlamydomonas*, *Chlorella*, *Botryococcus* y *Phormidium* también han demostrado eficacia como biodegradadores de hidrocarburos (Ossai et al., 2020). En una investigación realizada por Xaaldi-Kalhor et al. (2017), se expuso a la microalga *Chlorella vulgaris* a agua contaminada con distintas concentraciones de petróleo durante 14 días, para posteriormente calcular su porcentaje de efectividad en tareas de fitorremediación. Los resultados obtenidos fueron bastante positivos, debido a que la eficiencia de eliminación de benceno, naftaleno y nonadecano, en una concentración de 10 g/L, fue casi del 90% y en el caso de una concentración mayor, de 20 g/L, fue del 76,5%, confirmando, por tanto, que *C. vulgaris* es capaz de eliminar hidrocarburos de bajo peso molecular.

Asimismo, para caracterizar los microorganismos con mayor potencial biorremediador, es importante conocer los genes implicados en la degradación de hidrocarburos, principalmente para la introducción de éstos en organismos genéticamente modificados (OGMs), mediante

ingeniería genética. Se ha estudiado que la degradación de los alcanos por medio de *Pseudomonas putida* está determinada por el plásmido OCT. Dicho plásmido codifica una enzima dioxigenasa que transforma alcanos en aldehídos. *Acinetobacter* sp. y *Nocardiodes* sp. presentan un proceso similar, aunque ellos no disponen de este plásmido (Benavides et al., 2006). Por ejemplo, Ramos et al. (1987) realizaron modificaciones en la ruta metabólica de *P. putida*, permitiendo que dicho microorganismo fuera capaz de degradar 4-etilbenzoato. Los organismos genéticamente modificados han mostrado una gran capacidad degradativa, sin embargo, hay debates de tintes éticos y medioambientales, como el desplazamiento de la microbiota autóctona, que unidos a la restrictiva legislación actual, condicionan mucho su utilización, aun así, deben ser tenidos en cuenta como herramientas potenciales de futuro (Das y Chandran, 2011).

En cualquier caso, la caracterización y posterior aplicación de microorganismos autóctonos, adaptados a las condiciones de las zonas contaminadas, constituyen la opción más segura y confiable y, por ello, merece seguir siendo estudiada con detalle, ya que, además de sostenible ambiental y económicamente, plantea una fuente numerosa de individuos objeto de estudio.

1.4 Objetivos

La ya de por sí alta explotación actual del suelo, unida a las actividades derivadas de la industria petrolífera y similares, así como las emisiones procedentes de vehículos con motor de combustión, suponen un conjunto de actuaciones que perjudican gravemente la calidad y la viabilidad del suelo. Además, por desgracia son bastante conocidos diversos casos en los que se han producido derrames de petróleo afectando enormemente a la fauna, flora y microbiota del hábitat en cuestión. Por eso, es necesario encontrar soluciones con las que se pueda hacer frente de una manera rápida, eficaz, sin mucho coste económico y reduciendo al máximo todos los problemas derivados. Utilizando esta premisa, se plantea el objetivo principal de este trabajo fin de grado como el estudio, selección y caracterización de microorganismos aislados de suelos contaminados con derivados de petróleo en función a su potencial biodegradador de hidrocarburos aromáticos como benceno, tolueno y xileno, con objeto de desentrañar la capacidad de dichos microorganismos para ser usados en futuras tareas de biorremediación.

Para cumplir con el objetivo principal, fue necesario plantear diversos objetivos específicos:

1. Aislar microorganismos de muestras contaminadas con hidrocarburos.
2. Seleccionar los microorganismos que muestren tolerancia a los compuestos BTX.
3. Evaluar el crecimiento de los microorganismos seleccionados anteriormente, en base a su capacidad para crecer utilizando los compuestos BTX.

4. Seleccionar las mejores cepas en base a los resultados recopilados e identificar a nivel molecular.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Diseño experimental

El objetivo general de los distintos experimentos fue aislar, caracterizar y seleccionar microorganismos a partir de suelos contaminados con derivados de petróleo, en base a su potencial como agentes degradadores de hidrocarburos aromáticos como son el benceno, el tolueno y el xileno. Para llevarlo a cabo se procedió como sigue:

En primera instancia se aislaron todos los microorganismos con diferentes fenotipos encontrados en las muestras de suelos contaminados con diésel y gasolina, para así poder obtener una colección de cepas de trabajo (Objetivo 1).

Posteriormente, los microorganismos fueron expuestos a benceno, tolueno y xileno, en un ensayo cualitativo en placa basado en el empleo de un medio general adicionado con los distintos compuestos aromáticos. Comprobándose, por tanto, la capacidad de los microorganismos para crecer en estos medios selectivos, indicativo de la posible toxicidad de dichos elementos sobre la colección de microorganismos aislados en la fase anterior (Objetivo 2).

Las cepas más prometedoras fueron inoculadas en un medio líquido cuya única fuente de carbono eran los hidrocarburos anteriormente descritos y, mediante una evaluación del crecimiento microbiano, se pudo estudiar tanto la capacidad para soportar la presencia de dichos hidrocarburos como la capacidad de las cepas para utilizarlos en su metabolismo (Objetivo 3).

Por último, las cepas que mostraron un mayor carácter degradador fueron seleccionadas para su identificación molecular a través de los siguientes pasos: extracción de ADN, amplificación, secuenciación y comparación en bases de datos del NCBI mediante la herramienta bioinformática BLAST (Objetivo 4).

A continuación, se describen de una manera más detallada cada uno de los experimentos anteriormente citados.

2.2 Muestreo y adecuación de las muestras

Se utilizaron 3 puntos de muestreo distintos, todos ellos localizados en gasolineras del término municipal de Quesada (Jaén). En cada uno, se tomaron 3 repeticiones a partir de las cuales se llevaron a cabo los recuentos y aislamientos de los distintos morfotipos microbianos.

- Punto de muestreo número 1: “SCA La Bética Aceitera”. Gasolinera ubicada en la carretera autonómica A-315 (37°52'05.1"N 3°05'17.7" W, número 1 en la Figura 5).
- Punto de muestreo número 2: “Estación de servicio Esfer-Oil”. Gasolinera ubicada en el polígono industrial de Quesada (37°51'38.8"N 3°05'08.2" W, número 2 en la Figura 5).
- Punto de muestreo número 3: “Estación de servicio Hermanos Moreno Padilla”. Gasolinera ubicada a las afueras de Quesada. 37°50'44.3"N 3°04'15.5" W, número 3 en la Figura 5).

Para la toma de muestras se utilizaron hisopos estériles, previamente humedecidos con solución salina estéril (NaCl al 0,9% p/v). Una vez recopiladas todas las muestras, se trasladaron al laboratorio del Área de Microbiología de la Universidad de Almería y en condiciones de asepsia, cada uno de los algodones de los hisopos fueron introducidos en frascos ISO de 100 mL que contenían solución salina estéril (NaCl al 0,9% p/v). Un total de 9 frascos ISO, cada uno correctamente señalado con el lugar de procedencia de cada muestra (3 muestras x 3 repeticiones). Posteriormente los frascos fueron incubados durante 1 hora, en agitación, a 30 °C de temperatura.

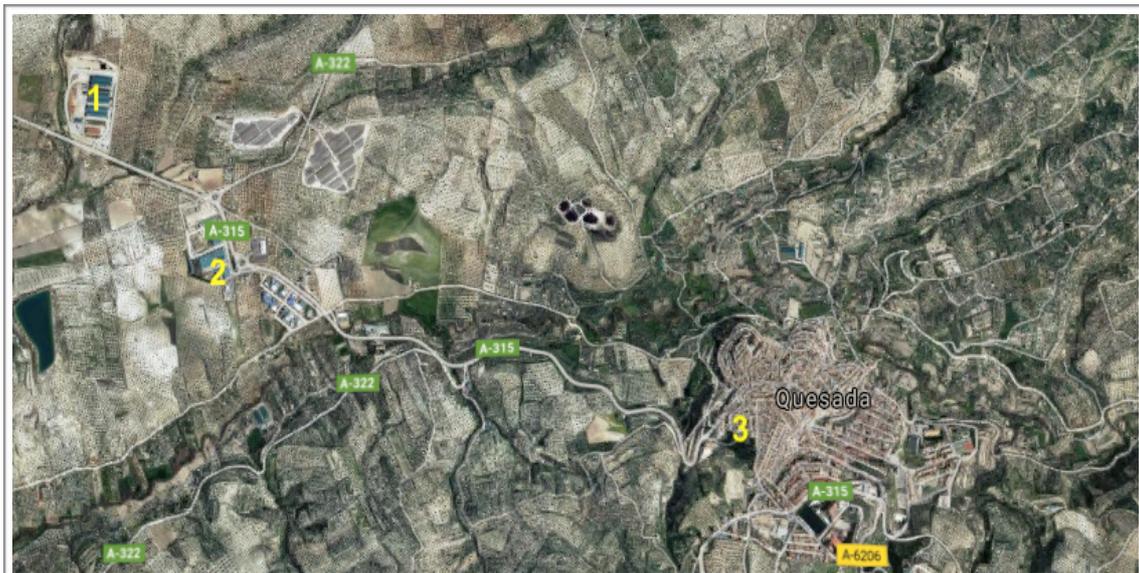


Figura 5. Mapa a vista aérea de los puntos de muestreo (Google Maps).

2.3 Aislamiento de microorganismos de muestras de suelo contaminadas con hidrocarburos

En la Figura 6 se muestran las etapas llevadas a cabo para la obtención de la colección de microorganismos.

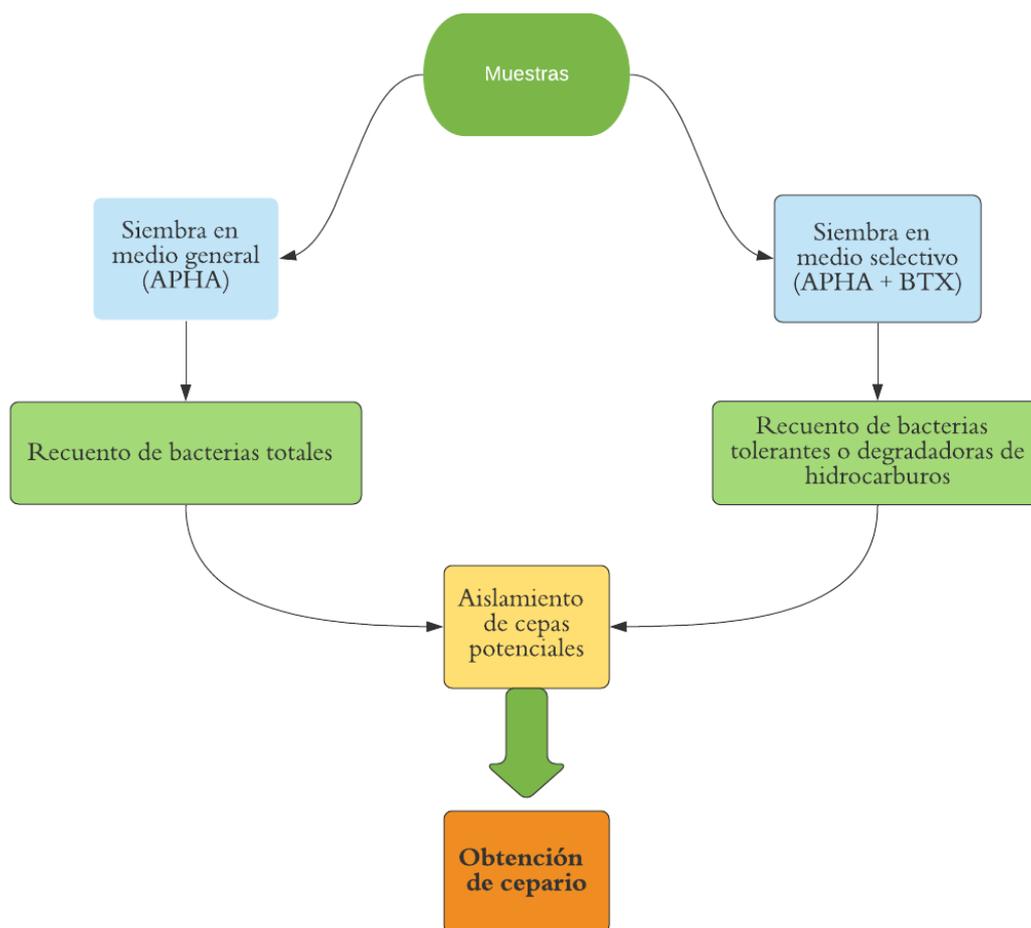


Figura 6. Esquema del diseño experimental realizado para la obtención del cepario.

Tras el periodo de incubación (ver apartado 2.2.), se llevaron a cabo diluciones decimales seriadas a partir de cada uno de los 9 frascos ISO, desde 10^{-1} hasta 10^{-7} . Para realizar las diluciones se utilizaron eppendorfs con 900 μL de solución salina estéril (SS) (NaCl al 0,9% p/v), comenzando con un aporte de 100 μL de la muestra contenida en el frasco ISO, en uno de los eppendorf, para obtener la dilución 10^{-1} , a partir del cual se llevaron a cabo el resto de las diluciones decimal seriadas, igualmente utilizando eppendorfs con 900 μL de SS, inoculados con una alícuota de 100 μL del contenido del eppendorf de la dilución anterior, así hasta llegar a la dilución 10^{-7} .

Después, para la siembra en placas de Petri se utilizaron medios selectivos compuestos por un medio nutritivo comercial adecuado para el crecimiento general de microorganismos, APHA (PanReac AppliChem), adicionado con 5 mL de "TWEEN 80" (PanReac AppliChem), empleado como dispersante para favorecer la mezcla homogénea de los hidrocarburos, los cuales se adicionaron a razón de 5 mL por cada uno de los estudios, Benceno, Tolueno y Xileno (MERCK), previamente esterilizados mediante filtración con filtro estéril para materiales orgánicos de nitrato de celulosa de 0,22 μm de poro (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Alemania)

y que fueron añadidos al medio general tras ser éste autoclavado, en condiciones de 121 °C y 1 atm, durante 20 minutos, como se puede observar en la Figura 7. Paralelamente, se emplearon como control, placas con medio general APHA, sin aditivos.

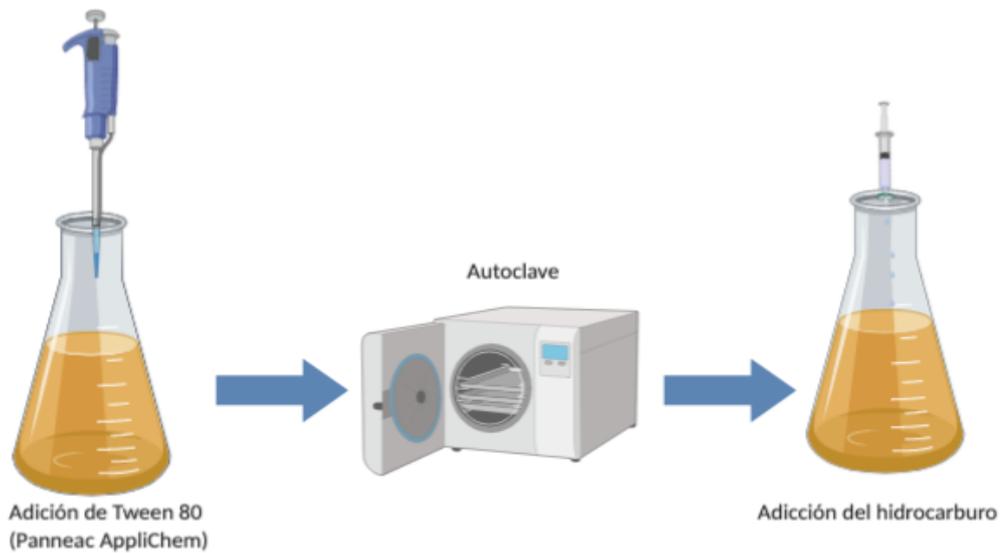


Figura 7. Preparación de los medios de cultivos selectivos adicionados con hidrocarburos.

Se realizaron siembras en superficie, sobre los distintos medios empleados, consistentes en la inoculación de 100 μ L de la dilución decimal correspondiente y la posterior dispersión homogénea del volumen con ayuda de bolitas de vidrio estériles, como se puede observar en la Figura 8.

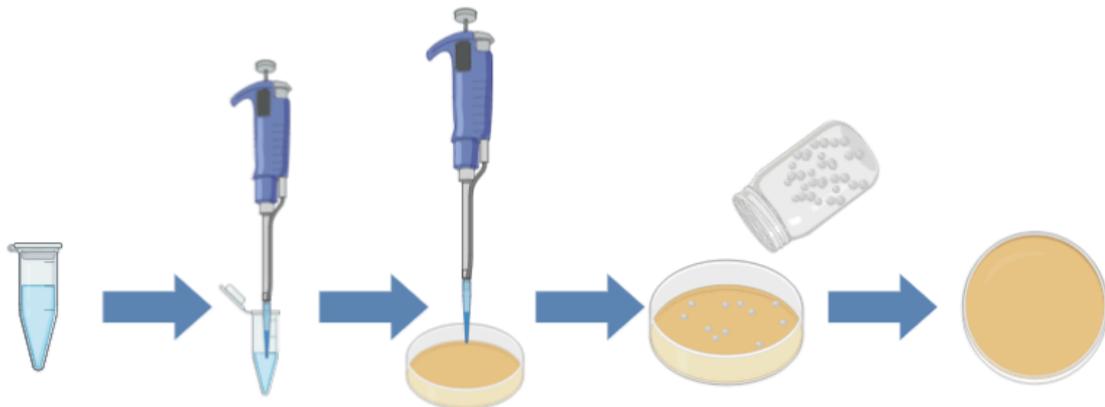


Figura 8. Siembra en superficie mediante la ayuda de bolitas de vidrio estériles.

Tras realizar las siembras, tanto en los tres medios selectivos como en el medio general, las placas de Petri se incubaron durante 48 horas a 30 °C. Tras esto, se realizaron recuentos de los distintos morfotipos coloniales, para obtener resultados de la carga microbiana inicial de cada muestra, expresados en unidades formadoras de colonias (UFC) por unidad de volumen (mL).

$$\frac{UFC}{mL} = \frac{n^{\circ} \text{ de colonias} \times \text{inverso de la dilución sembrada}}{\text{Volumen sembrado}}$$

Tanto del medio general como de los específicos, se seleccionaron aquellos morfotipos distintos, que fueron resembrados con la técnica de aislamiento en placas de Petri con medio general (APHA) para conseguir cultivos puros. Dichas placas fueron incubadas 48 h a una temperatura de 30 °C.

Las cepas aisladas de la colección, ya como cultivos puros, se sometieron de nuevo a medios sólidos con benceno, tolueno y xileno para comprobar la potencial toxicidad de estos compuestos sobre dichos microorganismos, con el objetivo de comprobar si alguna de las cepas seleccionadas podía seguir creciendo y soportando el potencial contaminante de los compuestos ensayados sin el consorcio microbiano natural de la muestra de procedencia. Las siembras se llevaron a cabo con asa de platino por cuadrantes. Las placas se incubaron durante 48 h a 30 °C.

2.4 Estudio del metabolismo y cometabolismo

Posteriormente, se llevó a cabo un estudio del crecimiento de las cepas en 2 condiciones diferentes, en medio líquido: la primera condición, empleando un Medio Mínimo de Sales de Janshekar (MMJ), adicionado con el hidrocarburo de interés, siendo éste la única fuente de carbono y de energía; y, la segunda condición, en un MMJ con el hidrocarburo, como en el caso anterior, pero esta vez suplementado con glucosa (C₆H₁₂O₆) (Sigma Aldrich). La composición de dichos medios puede verse en la Tabla 3.

Tabla 3. Preparación de medios de cultivo para el estudio del metabolismo y el cometabolismo de la colección de cepas. A) Medio base; B) Composición de las sales de Janshekar (Janshekar et al., 1982).

A)

Componentes	Cantidad
H ₂ O destilada	965 mL
Glucosa (Si procede)	10 g
Sales de Janshekar A, B y C *	100 mL sal A, 100 mL sal B, 100 mL sal C
Hidrocarburo (Benceno, Tolueno, Xileno)	5 mL
TWEEN 80	5 mL

B)

Solución A:		Solución B:		Solución C:	
K_2HPO_4	16 g	NaCl	2,5 g	$(NH_4)SO_4$	12,5 g
KH_2PO_4	5 g	$MgSO_4 \cdot 7 \cdot H_2O$	5,8 g	$(NH_4)NO_3$	10 g
H_2O	1000 mL	$CaCl_2 \cdot 2 \cdot H_2O$	0,13 g	$FeCl_3 \cdot 6 \cdot H_2O$	0,025 g
		H_2O	1000 mL	H_2O	1000 mL

Cada cepa se sembró en ambas condiciones (con glucosa y sin glucosa) para cada uno de los compuestos ensayados (benceno, tolueno y xileno) (Pasos 1 y 2, Figura 9). A partir de cada frasco ISO inoculado, se llevaron a cabo diluciones decimales seriadas (desde 10^{-1} hasta 10^{-6}) en tubos eppendorfs de 1,5 mL con 900 μ L de SS (NaCl 0,9%, p/v) y se realizaron siembras en superficie utilizando bolitas de vidrio estériles para dispersar el volumen inoculado en placa de APHA proveniente de cada dilución (Paso 3 en la Figura 9). Este procedimiento se realizó cada 24 h, durante 5 días. Tanto los frascos como las placas sembradas se incubaron a 30 °C (Paso 4 en la Figura 9).

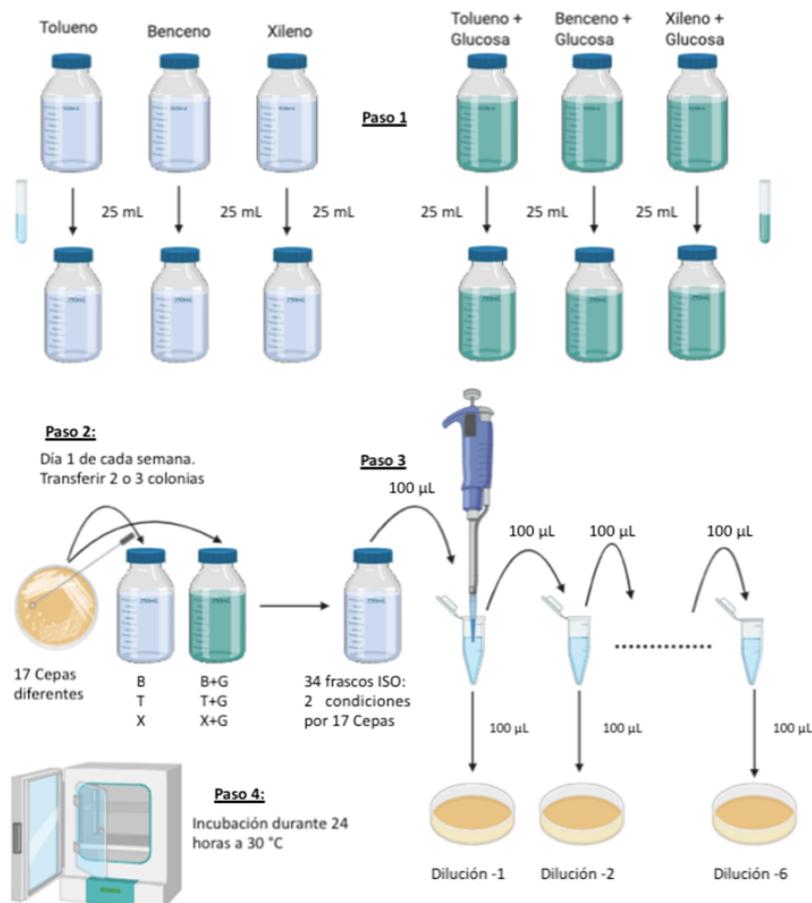


Figura 9. Esquema del diseño experimental de los ensayos de metabolismo y cometabolismo.

Después de realizar este estudio, se realizó un experimento similar pero esta vez modificando la composición del medio utilizado, que puede observarse en la Tabla 4, eliminando la principal fuente de nitrógeno, siendo ésta las sales de Janshekar. Por lo tanto, se estudió la capacidad de las cepas para crecer en 2 condiciones distintas, éstas fueron, un medio compuesto únicamente por un hidrocarburo, en este caso tolueno, y un medio compuesto por el hidrocarburo y glucosa, ambas sin fuente directa de nitrógeno. Para la realización de este nuevo experimento se siguieron los mismos pasos que en el experimento anterior (Figura 9).

Tabla 4. Preparación medio de cultivo para el estudio del metabolismo y cometabolismo sin fuente directa de nitrógeno.

Componentes	Cantidad
H ₂ O destilada	500 mL
Hidrocarburo (Tolueno)	2,5 mL
TWEEN 80	2,5 mL
Glucosa (Si procede)	5 g

2.5 Identificación molecular de las cepas seleccionadas.

Las cepas seleccionadas en base a los experimentos anteriores fueron sometidas a identificación molecular, con el objetivo de conocer su identidad.

La identificación se llevó a cabo mediante la amplificación y secuenciación del ADN perteneciente a la subunidad 16S ribosomal. El ADN fue extraído mediante choque térmico. Para ello se dispuso biomasa de cada cepa en un eppendorf con 500 µL de H₂O destilada estéril y éste se sometió a 100 °C en bloque térmico durante 5 minutos y a 0 °C, sumergidos en hielo, durante otros 5 minutos. Una vez extraído el ADN de cada una de las cepas, se procedió a amplificar los fragmentos utilizando un termociclador MyCycler (Biorad, California, EEUU) mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa), con las condiciones que se pueden ver en la Figura 10 y empleando los cebadores recogidos en la Tabla 5.

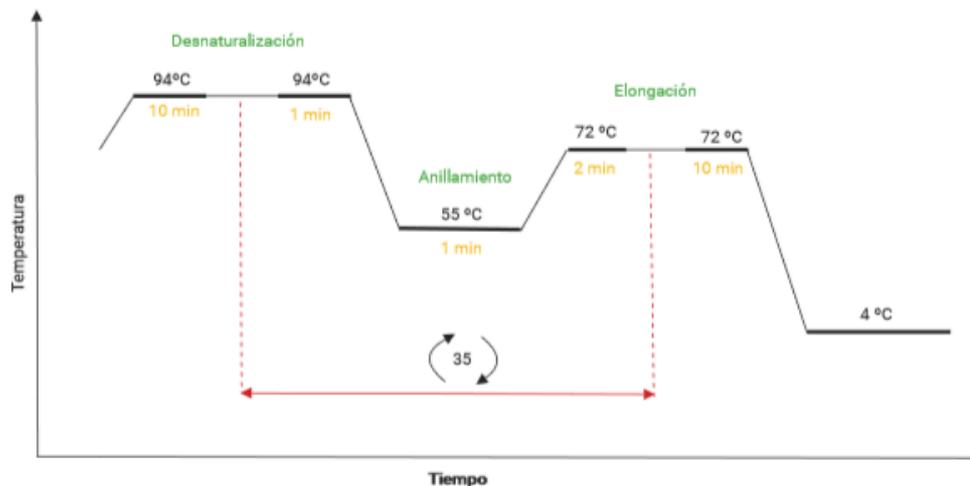


Figura 10. Perfil térmico para la amplificación del gen 16s ARN ribosomal.

Tabla 5. Cebadores utilizados para la amplificación.

Cebadores para la amplificación del gen 16S ARN ribosomal	
27F	5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG -3'
1492R	5'- ACGGCTACCTGTTACGACTT -3'

La mezcla para la amplificación estuvo compuesta por 10 μL de mix de PCR "Taq Kit" (QUIAGEN), 0,4 μL del cebador Forward y otros 0,4 μL del cebador Reverse y 9,2 μL de la muestra problema de ADN.

La longitud de los fragmentos se verificó empleando electroforesis en gel de agarosa al 1,8% con tampón TAE al 1X y suplementado con 0,002% de GelRed TM (Biotium, Hayward, EEUU). Las bandas obtenidas se compararon con el marcador de ADN Ladder (50-10000 Pb DirectLoad TM Wide Range DNA marker, Sigma-Aldrich, EEUU). Las bandas fueron visualizadas con luz UV en un transiluminador. Tras comprobar que la amplificación había ocurrido correctamente, los productos de PCR se purificaron empleando el kit de limpieza mi-PCR Purification Lit (Metabion). Estos fragmentos de ADN puros se enviaron al servicio de secuenciación de los Servicios Centrales de Investigación de la Universidad de Almería. Las secuencias obtenidas fueron analizadas por una serie de programas bioinformáticos: Sequence Scanner v1.0 (disponible en www.appliedbiosystems.com) para visualizar y copiar las secuencias Forward y Reverse; Reverse complement (disponible en www.bioinformatics.org) para obtener el reverso complementario del fragmento antisentido; Clustal v2.0.11 (disponible en www.clustal.org/) para alinear la secuencia Forward y el reverso complementario; Mega 5.05 (www.megasoftware.net/) para editar las secuencias alineadas y construir el fragmento completo y la base de datos online del

National Center for Biotechnology Information (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast.ncbi.nlm.nih.gov/) para comparar los fragmentos con secuencias en esta base de datos.

2.6 Análisis estadístico

Todos los resultados fueron analizados y procesados mediante el programa Microsoft Office Excel 2019 para Mac. Además, se realizó un Análisis Factorial de Varianza (ANOVA) con los datos y se compararon las diferencias significativas entre las medias mediante el Test de Mínima Diferencia de Fisher (LSD), utilizando un intervalo de confianza del 95% ($p < 0,05$). Para estos análisis se utilizó el programa Statgraphics Centurion XVIII.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Colección de microorganismos de muestras de suelo contaminadas

A partir de las muestras recogidas en las tres gasolineras, se llevaron a cabo siembras en 4 medios distintos, un medio general (APHA) y 3 medios selectivos (APHA + Benceno, APHA + Tolueno, APHA + Xileno), con el objetivo de aislar los microorganismos presentes en dicho material. Pasado el tiempo de incubación pertinente (24 h), los resultados obtenidos representaron a la microbiota de cada zona de muestreo, desglosada en función de cada una de las condiciones probadas. De este modo se pudo comprobar la naturaleza de la composición microbiana de cada una de las zonas estudiadas, gasolinera 1 (Figura 11), gasolinera 2 (Figura 12) y gasolinera 3 (Figura 13).

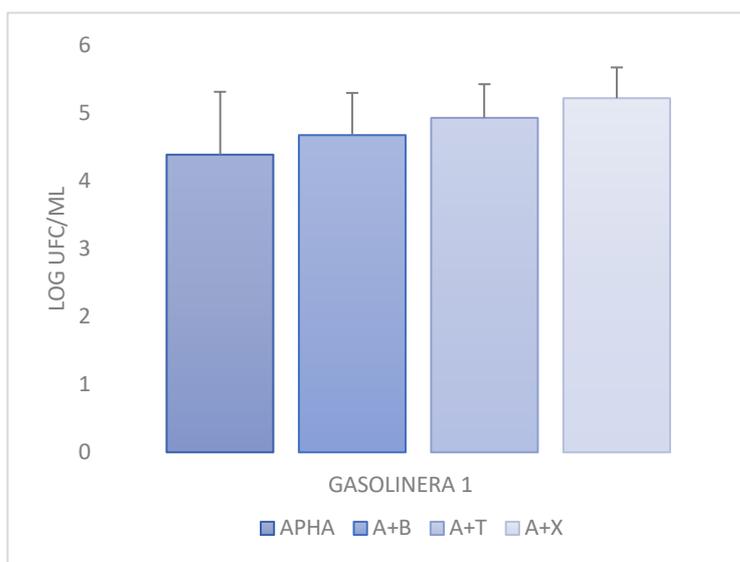


Figura 11. Recuento de la microbiota procedente de la Gasolinera 1 (LOG UFC/mL).

En la primera zona muestreada, la gasolinera 1, se detectó una mayor presencia de colonias bacterianas en los medios selectivos, especialmente en presencia de xileno, respecto al medio general sin aditivos tóxicos, lo cual es indicativo de una microbiota bien adaptada a la zona, es decir, a los restos de diésel y gasolina muy presentes en el lugar concreto de muestreo (Figura 14).

Los microorganismos que fueron encontrados en esta gasolinera (Figura 11) probablemente se hayan adaptado hasta el punto de basar su metabolismo únicamente en el uso de hidrocarburos, ya sea de manera individual o bien en consorcios por medio de interacciones de simbiosis o comensalismo (Santisi et al., 2015). La microbiota que habita este tipo de suelos con una alta concentración de hidrocarburos (tanto lineales como aromáticos), adapta de manera eficiente su crecimiento en base al uso de dichos compuestos. Algunas especies bacterianas, denominadas hidrocarbonoclasticas, han sido descritas como especialistas en la degradación de hidrocarburos, desempeñando un papel fundamental en la eliminación de éstos en los ambientes contaminados. Algunos representantes destacados son: *Arthrobacter* sp., *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas* sp., *Rhodococcus* sp., *Streptomyces* sp., o *Bacillus* sp. (Yakimov et al., 2007).

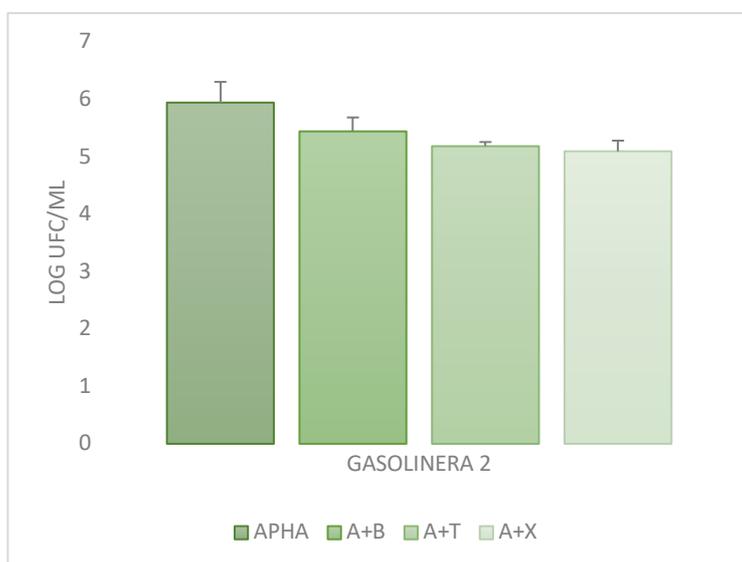


Figura 12. Recuento de la microbiota procedente de la Gasolinera 2 (LOG UFC/mL).

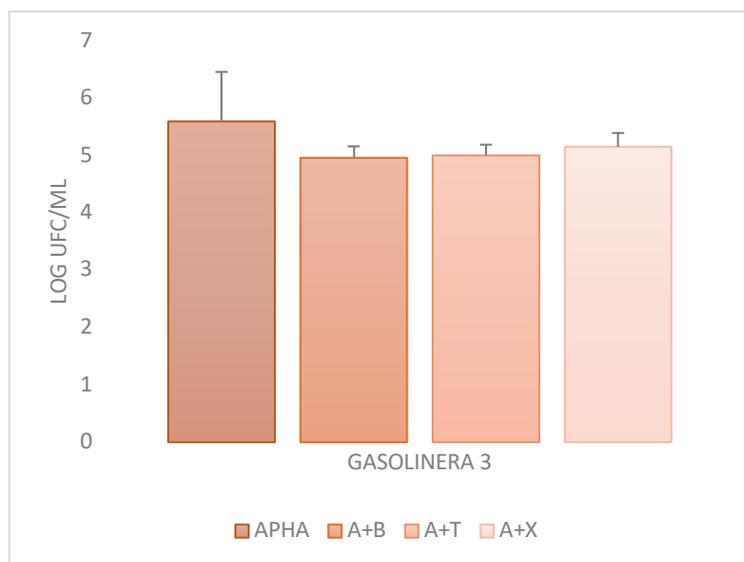


Figura 13. Recuento de la microbiota procedente de la Gasolinera 3 (LOG UFC/mL).

Por el contrario, en las gasolineras 2 y 3 (Figuras 12 y 13, respectivamente), la carga microbiana encontrada en el medio APHA, favorable para el crecimiento general de los microorganismos, fue relativamente mayor que en los medios selectivos. De todos modos, los representantes con capacidad de tolerar los compuestos BTX fueron suficientemente representativos. Esto podría deberse a la presencia de consorcios colaborativos con roles perfectamente marcados (Bacosa et al., 2012). De hecho, teniendo en cuenta los valores observados, en general, la mayoría de las colonias bacterianas encontradas en las placas de APHA, es asumible que correspondan a las mismas encontradas en los medios selectivos (A+B, A+T y A+X) para cada caso, presentando, a su vez, diferente diversidad entre las distintas zonas muestreadas como se observa en el ejemplo recogido en la Figura 15.



Figura 14. Zonas de muestreo de las distintas gasolineras.

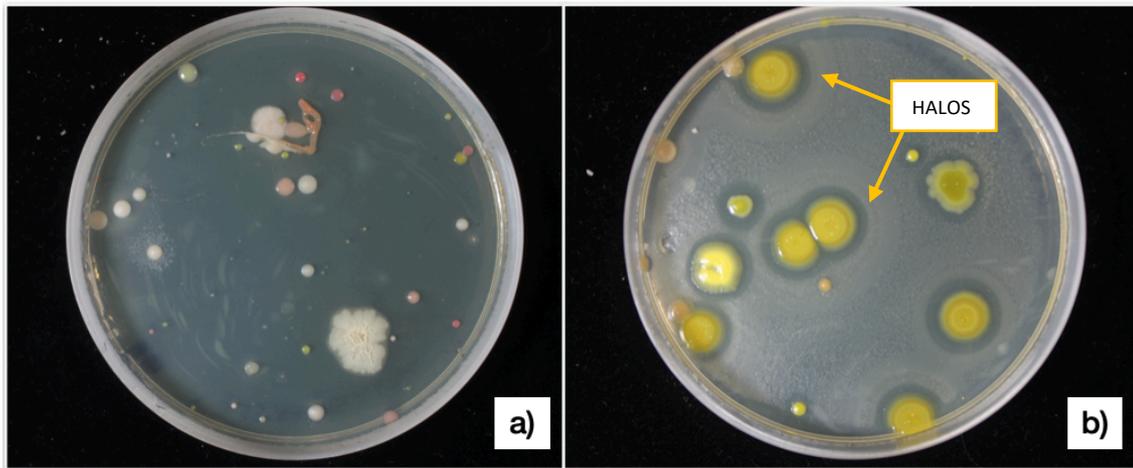


Figura 15. Fotografías de diferentes morfotipos coloniales encontrados en: a) Gasolinera 3, placa con medio A+X; b) Gasolinera 1, placa con medio A+T, cabe destacar los halos de aclaramiento formados por las colonias presentes en esta placa, consecuencia de la degradación de los componentes aromáticos.

En la Figura 16 se muestra una comparativa de la carga total encontrada en cada zona muestreada.

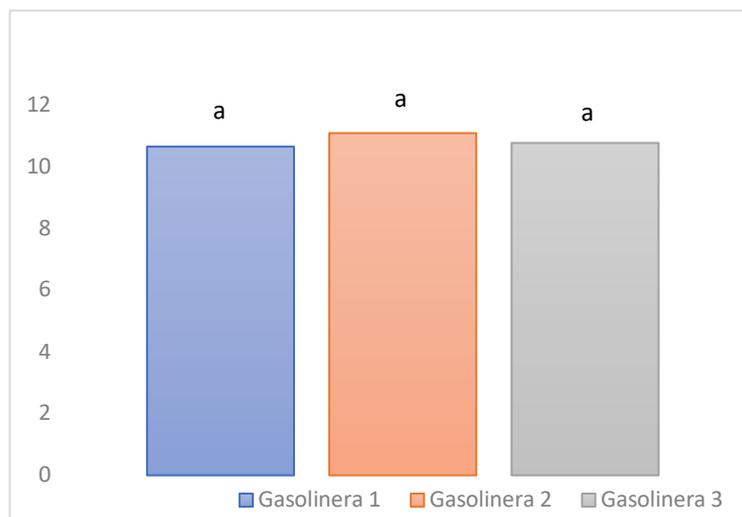


Figura 16. Carga microbiana total (teniendo en cuenta valores de APHA, A+B, A+T y A+X) en las tres gasolineras muestreadas. Las letras señalan la homogeneidad entre muestras ($P < 0,05$).

Como se observa en la Figura 16, a pesar de la diferente distribución de los microorganismos en cada medio de cultivo, mostrada anteriormente para cada una de las muestras analizadas, la

carga microbiana total fue similar en las 3 instalaciones, ya que no existen diferencias significativas entre sus valores medios.

3.2 Selección de microorganismos en base a su capacidad para utilizar hidrocarburos

A partir del experimento anterior, se aislaron un total de 40 cepas, correspondientes a morfotipos distintos, que constituyeron la colección de cultivos puros sometida a la siguiente fase de experimentos. Con objeto de corroborar la capacidad de dichas cepas para crecer en presencia de Benceno, Tolueno y Xileno, sin los posibles beneficios de toda la comunidad presente en las muestras originales, se resembraron nuevamente las cepas en los medios selectivos. Tras 24 horas en incubación, se comprobó que sólo 17 cepas (Tabla 6), del total de 40 inicialmente seleccionadas, fueron capaces de crecer en los medios adicionados con cada uno de los tres componentes ensayados. Algunas de estas cepas tenían la capacidad de producir halos de aclaramiento en el medio adicionado con hidrocarburos (Figura 17), como ya se pudo observar en la Figura 15, a partir de la siembra procedente de la muestra. La observación de dichos halos podría verse favorecida debido a la secreción de biosurfactantes (Mahjoubi et al., 2019) que permiten cambiar la tensión interfacial del compuesto, mejorando la transferencia de sustratos hidrofóbicos y aumentando su biodisponibilidad para el uso metabólico por parte del microorganismo (Boulton y Ratledge, 1984).

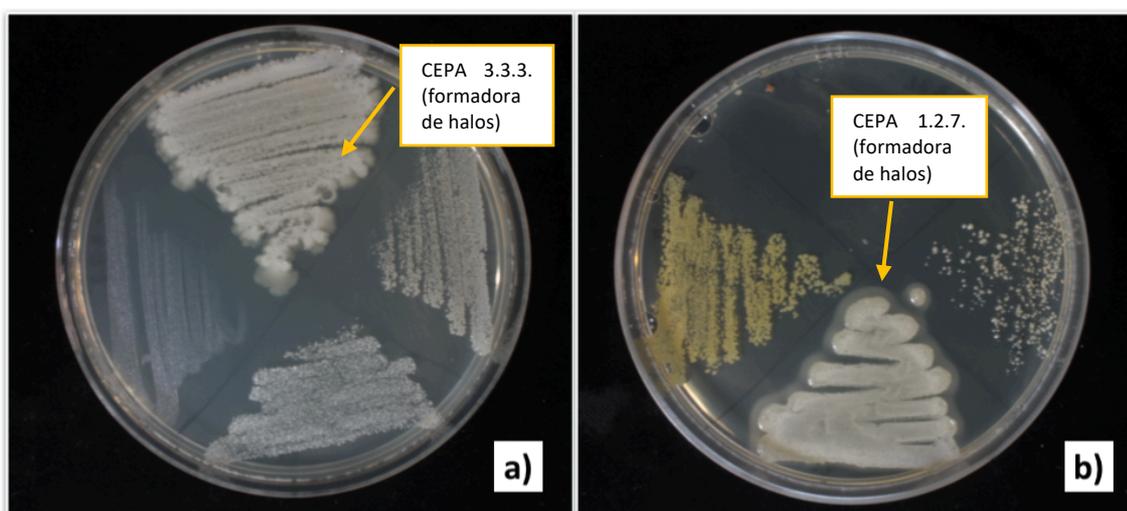


Figura 17. Cultivos puros sembrados en estría en: a) Placa con medio A+B; b) Placa con medio A+T Diversas cepas sembradas en superficie, en placa de Petri con medio APHA + tolueno.

De las 17 cepas seleccionadas en base al criterio anterior, 9 eran procedentes de la gasolinera número 1, lo cual corrobora el potencial de esa muestra como portadora de una mayor cantidad de microorganismos capaces de usar los hidrocarburos como fuente de carbono; sólo 1 cepa

pertenecía a la gasolinera número 2, lo cual podría explicarse debido a las tareas de limpieza a las que es sometida esta instalación en concreto; y, por último, 7 procedían de la gasolinera número 3. Por lo tanto, finalmente se obtuvo un cepario con una gran diversidad de morfotipos y procedencias. A continuación, se muestra información relativa a cada una de estas cepas, respecto a su identificación durante el muestreo y su descripción morfológica (Tabla 6).

Tabla 6. Número de identificación de cada cepa aislada de las muestras de suelos contaminados de cada gasolinera con su respectiva descripción morfológica y el resultado de la tinción de Gram. Descripción de los códigos identificativos de las cepas: el primer número representa la gasolinera; el segundo número, la repetición; y el tercero indica el número de cepa.

Número de identificación de cepa	Características morfológicas y de tinción
1.1.1	Cocos Gram +
1.1.2	Cocobacilos Gram -
1.1.6	Coco Gram +
1.2.2	Bacilos Gram +
1.2.7	Bacilos Gram +
1.3.1	Bacilos Gram -
1.3.2	Cocos Gram -
1.3.7	Cocos Gram -
1.3.10	Cocobacilos Gram +
2.1.2	Bacilos, Diplobacilos alargados Gram -
3.1.2	Cocobacilo Gram -
3.1.3	Cocos Gram +
3.1.4	Cocos Gram -
3.1.6	Cocos Gram +
3.2.2	Bacilos Gram -
3.2.4	Cocobacilos Gram+

3.3.3**Agrupación de bacilos Gram +**

Además, en la Figura 18 se incluyen fotografías de algunos ejemplos de aislamientos en placa y tinciones de Gram.

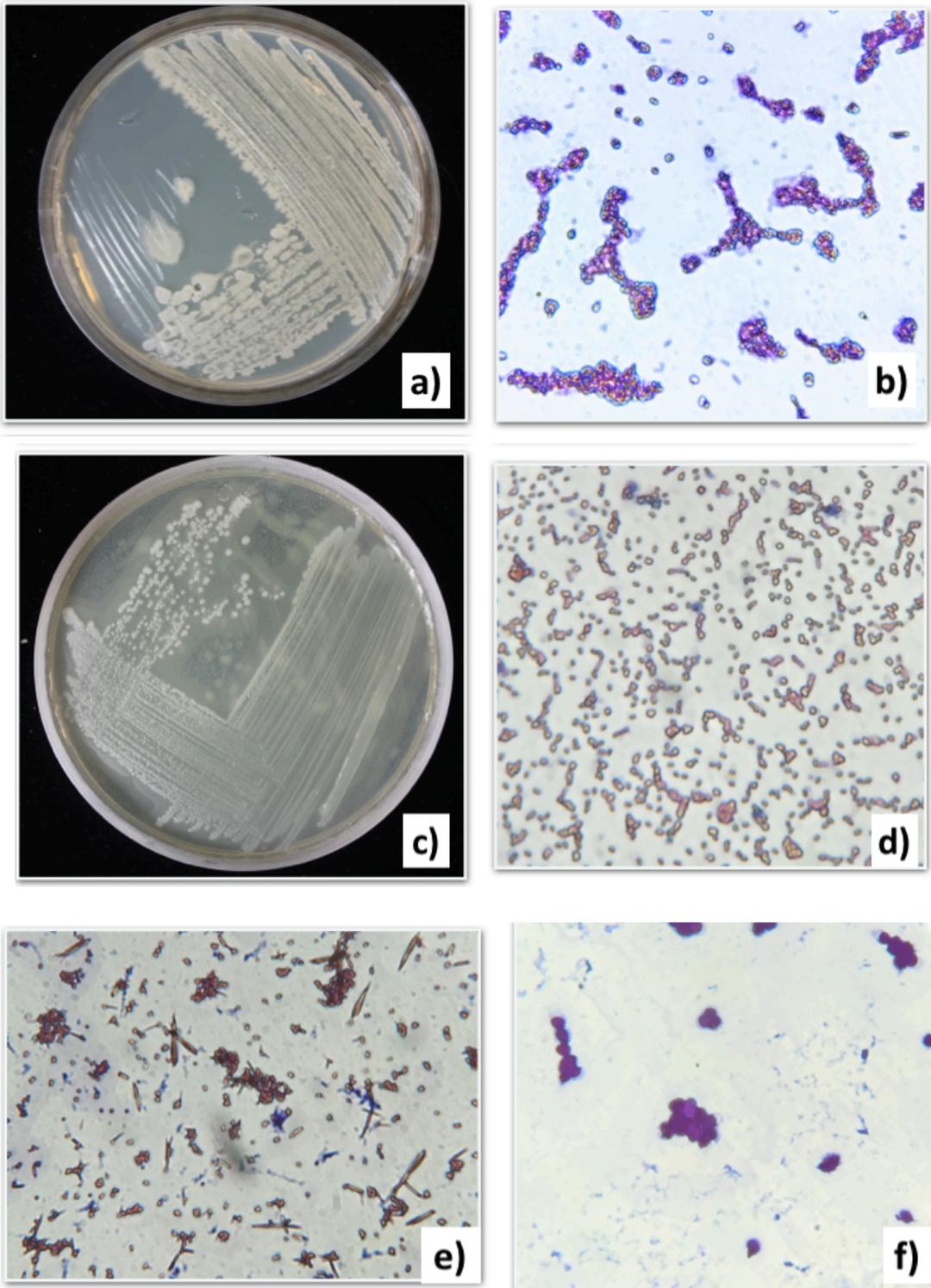
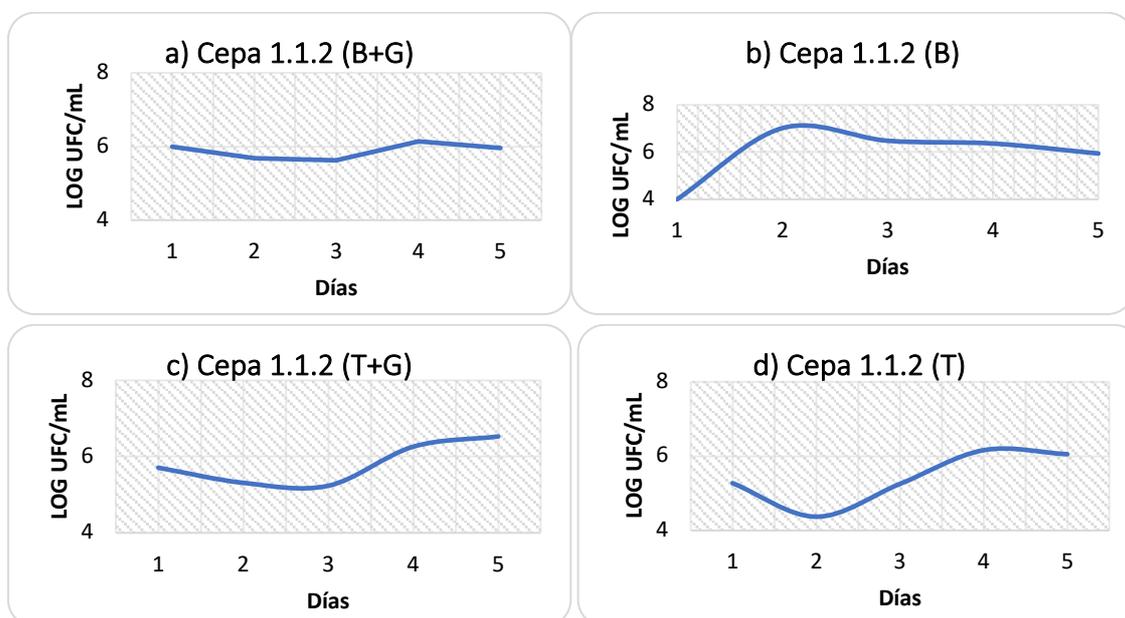


Figura 18. Fotografías de las cepas: a) 3.3.3 a nivel macroscópico, aislamiento APHA; b) 3.3.3 a nivel microscópico, grampositiva; c) 1.1.1 a nivel macroscópico, aislamiento APHA; d) 1.3.1 a nivel microscópico, gramnegativa; e) 2.1.2 a nivel microscópico, gramnegativa; f) 3.2.4 a nivel microscópico, grampositiva.

Con los 17 microorganismos que constituyeron el cepario final, se llevó a cabo el estudio de metabolismo y cometabolismo en medio líquido. Para ello, como se explica en el apartado 2.4, se prepararon 2 frascos ISO por cada una de las cepas. Uno de ellos compuesto por el medio mínimo de sales (con adición de glucosa) y el hidrocarburo específico a ensayar; y el otro compuesto por el medio mínimo de sales (sin adición de glucosa) y el hidrocarburo específico a ensayar.

A continuación, se muestran los resultados del estudio de metabolismo y cometabolismo de las cepas más interesantes, es decir, aquellas que consiguieron crecimiento en medio líquido con los 3 hidrocarburos estudiados, estas fueron: 1.1.2 (Figura 19), 1.2.7 (Figura 20), 1.3.1 (Figura 21), 3.1.2 (Figura 22) y 3.3.3 (Figura 23). No obstante, algunas cepas, como 1.2.2 y 1.3.2, fueron capaces de crecer en los medios adicionados con benceno, pero no así con tolueno y xileno (resultados no mostrados). Por lo que dichas bacterias, a pesar del limitado espectro de actuación, podrían considerarse como buenas candidatas exclusivamente para la biorremediación específica de benceno.



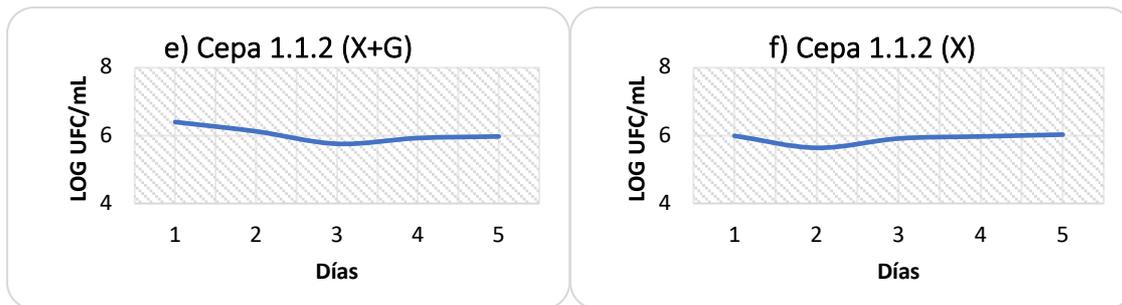


Figura 19. Curva de crecimiento de la Ceba 1.1.2 sometida a medio mínimo de sales con: (a) Benceno + Glucosa (B+G); b) Benceno (B); c) Tolueno + Glucosa (T+G); d) Tolueno; e) Xileno + Glucosa (X+G); y f) Xileno (X), como únicas fuentes de carbono y energía. Valores en Logaritmo de Unidades Formadoras de Colonias por mL (LOG UFC/mL).

En la Figura 19, se observa que la cepa 1.1.2 fue capaz de crecer con los tres hidrocarburos, sin destacar respecto a la concentración bacteriana presentada, pero si en cuanto a la capacidad de utilizar el benceno en su condición sin fuente de carbono adicional fácilmente asimilable.

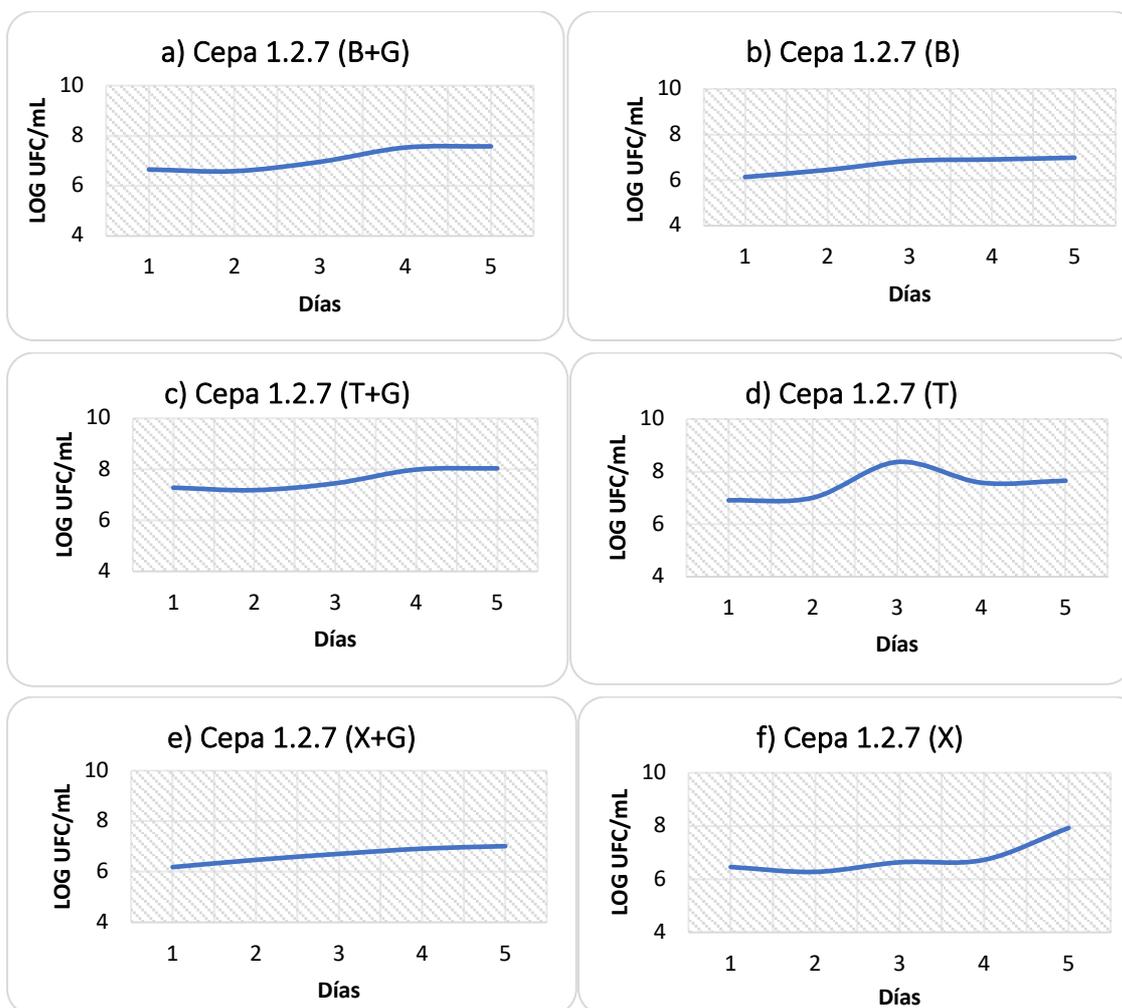


Figura 20. Curva de crecimiento de la Cepa 1.2.7 sometida a medio mínimo de sales con: (a) Benceno + Glucosa (B+G); b) Benceno (B); c) Tolueno + Glucosa (T+G); d) Tolueno; e) Xileno + Glucosa (X+G); y f) Xileno (X), como únicas fuentes de carbono y energía. Valores en Logaritmo de Unidades Formadoras de Colonias por mL (LOG UFC/mL).

Como puede observarse en las diferentes gráficas, la cepa 1.2.7 tiene un crecimiento homogéneo en todos los medios. Destacando su crecimiento mediante el uso del hidrocarburo tolueno, tanto en presencia como en ausencia de glucosa, lo que puede ser consecuencia de que ésta sea poseedora del plásmido TOL, con capacidad para sintetizar una enzima capaz de degradar tolueno (Ramos et al., 1987), lo cual le conferiría a la cepa una ventaja selectiva frente a otros microorganismos. También destaca el crecimiento de ésta en el medio sólo con xileno, donde parece que, tras un periodo de adaptación, es capaz de utilizarlo como única fuente de carbono y energía de una manera muy eficaz.

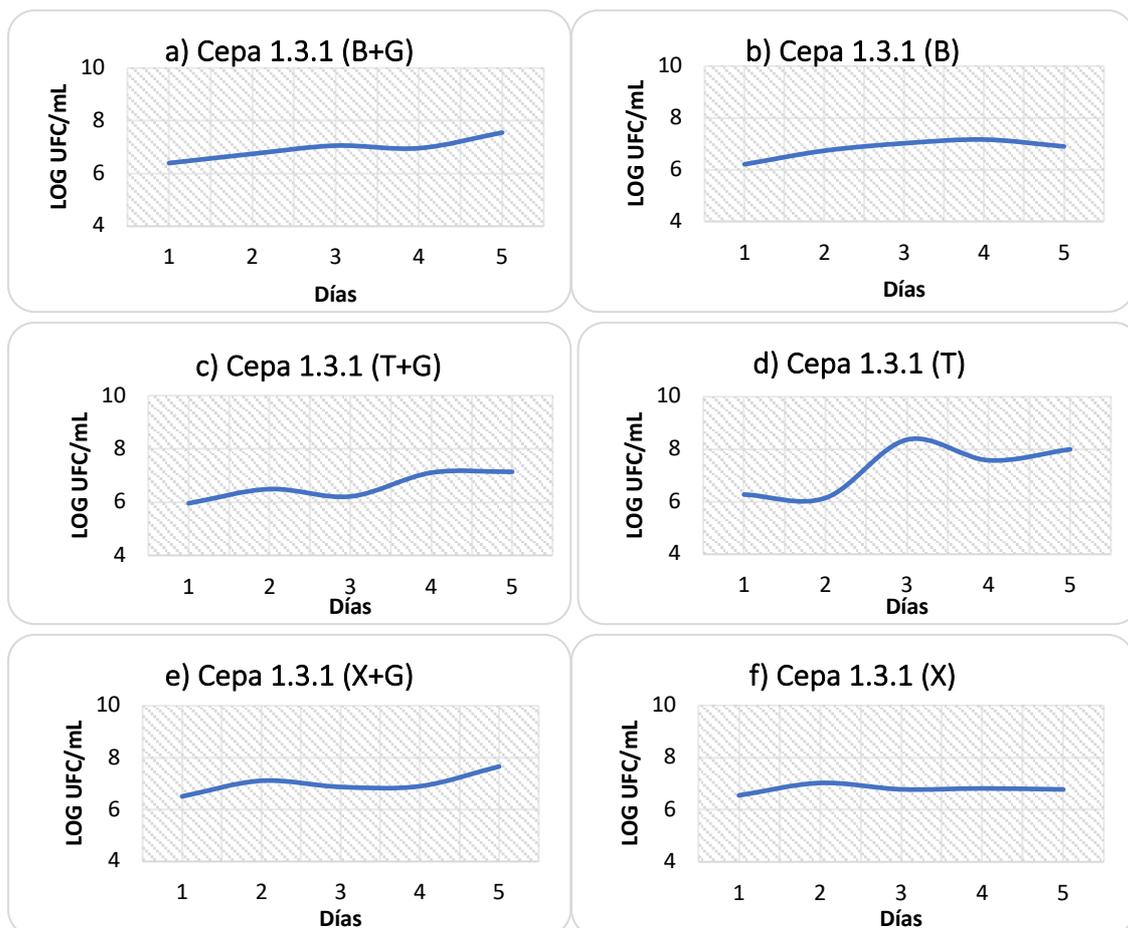


Figura 21. Curva de crecimiento de la Cepa 1.3.1 sometida a medio mínimo de sales con: (a) Benceno + Glucosa (B+G); b) Benceno (B); c) Tolueno + Glucosa (T+G); d) Tolueno; e) Xileno + Glucosa (X+G); y f) Xileno (X), como únicas fuentes de carbono y energía. Valores en Logaritmo de Unidades Formadoras de Colonias por mL (LOG UFC/mL).

Como se observa en la Figura 21, el crecimiento de esta cepa también es bastante abundante en cualquiera de los medios probados, destacando en tolueno. Como se mencionó anteriormente, las cepas procedentes de la gasolinera 1 (cepas 1.2.7 y 1.3.1) parecen tener una especial disposición para degradar el tolueno, sin una clara necesidad de adición de glucosa al medio para ayudar a su crecimiento, por lo que es posible que el plásmido TOL esté presente en una gran cantidad de bacterias de esta gasolinera y que dicho plásmido se haya ido transfiriendo mediante conjugación entre distintas bacterias presentes en el suelo (Castillo, 2005).

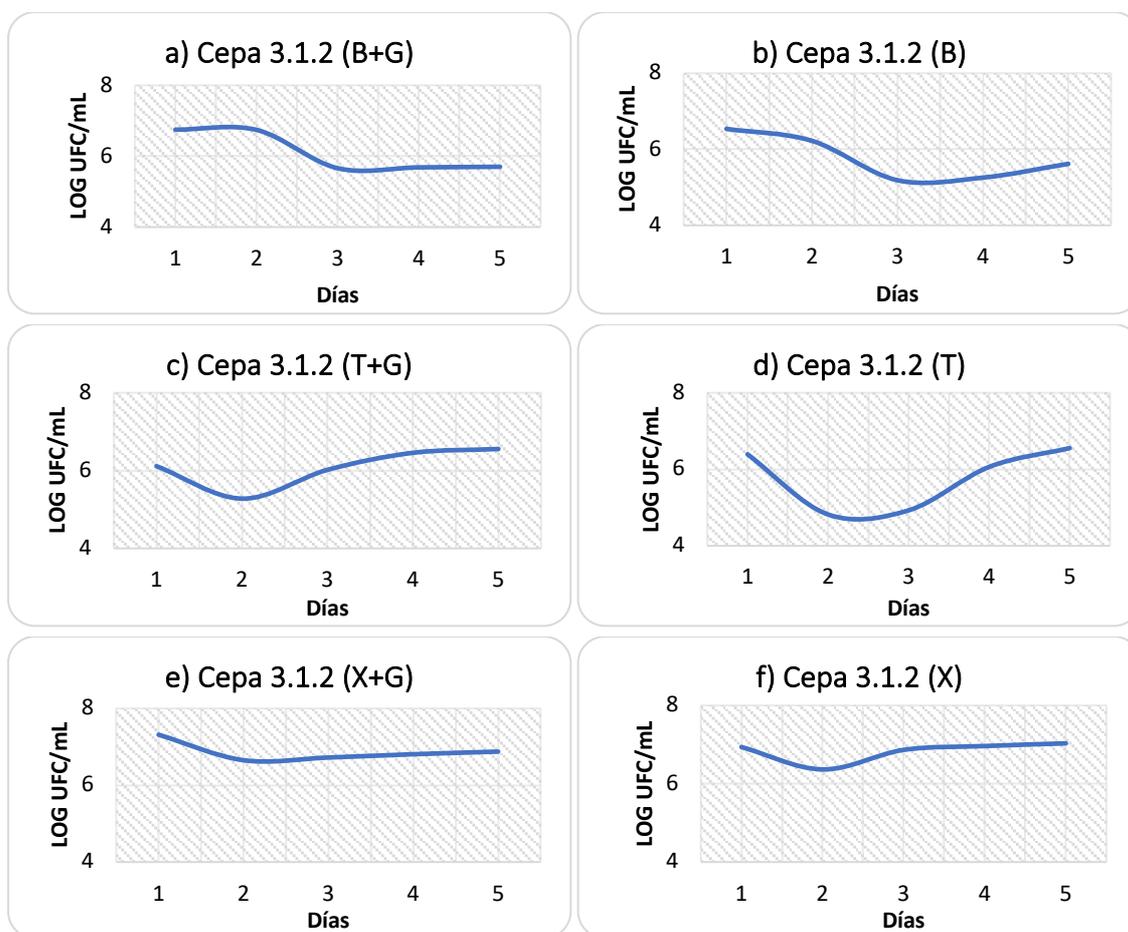


Figura 22. Curva de crecimiento de la Ceba 3.1.2 sometida a medio mínimo de sales con: (a) Benceno + Glucosa (B+G); b) Benceno (B); c) Tolueno + Glucosa (T+G); d) Tolueno; e) Xileno + Glucosa (X+G); y f) Xileno (X), como únicas fuentes de carbono y energía. Valores en Logaritmo de Unidades Formadoras de Colonias por mL (LOG UFC/mL).

En la Figura 22 se observa como la cepa 3.1.2, a pesar de mostrar un crecimiento relativamente constante en todas las condiciones, presentó un mayor potencial, logrando valores de recuento superiores, utilizando el xileno, respecto a los otros hidrocarburos, por lo

que parece que dicha cepa tolera y es capaz de utilizar el xileno de una manera más eficaz que en los casos de benceno y tolueno. En este caso, como para la cepa 1.1.2 (Figura 19), el potencial uso de estas cepas podría verse mejorado al ser empleados consorcios microbianos en lugar de en cultivo axénico. Como se puede advertir de los resultados, ambas cepas requieren de una primera adaptación al medio, que en algunos casos ocurre a los 2 días de experimentación, mientras que en otros casos ocurre al tercer día, posteriormente siendo dichos hidrocarburos presentes en el medio utilizados para su crecimiento.

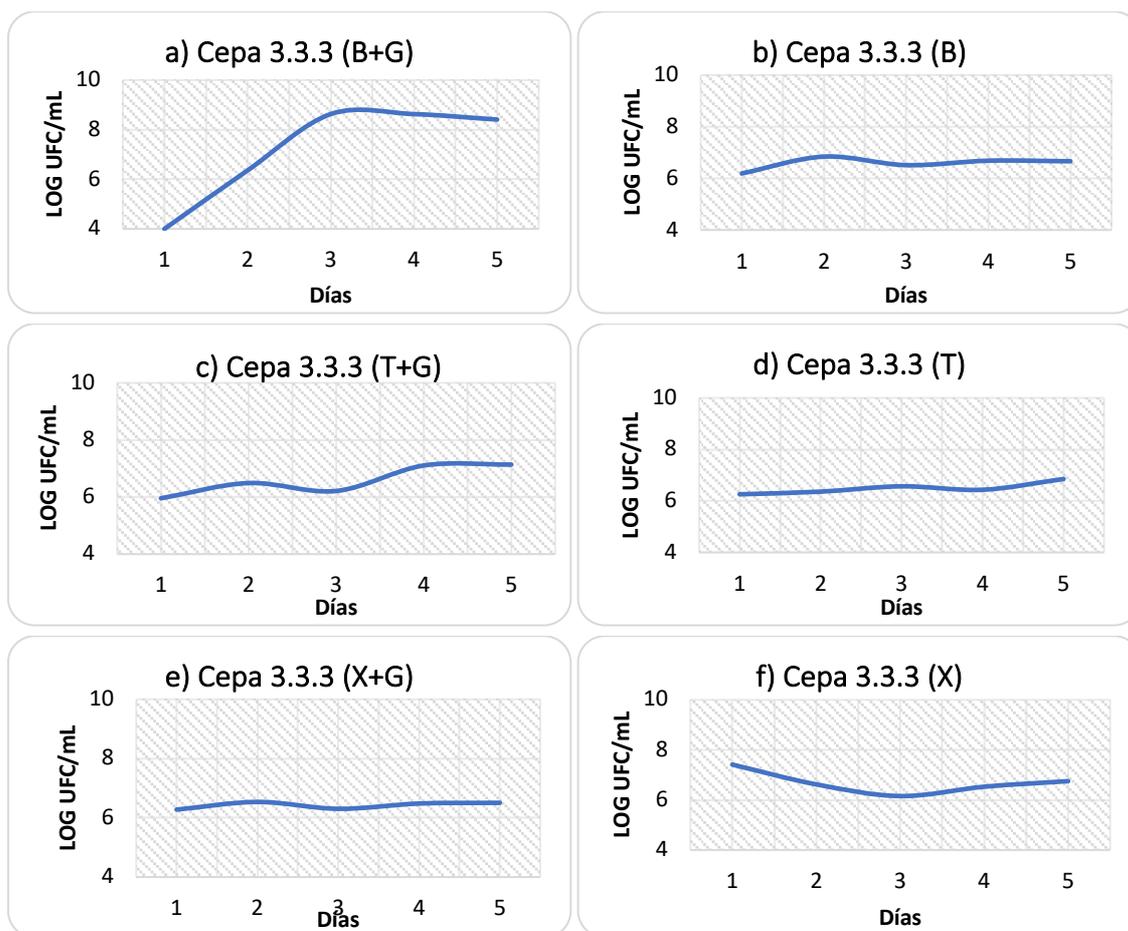


Figura 23. Curva de crecimiento de la Cepa 3.3.3 sometida a medio mínimo de sales con: (a) Benceno + Glucosa (B+G); b) Benceno (B); c) Tolueno + Glucosa (T+G); d) Tolueno; e) Xileno + Glucosa (X+G); y f) Xileno (X), como únicas fuentes de carbono y energía. Valores en Logaritmo de Unidades Formadoras de Colonias por mL (LOG UFC/mL).

Como es observable en la Figura 23, la cepa 3.3.3 presentó también un crecimiento bastante positivo con respecto a las 6 condiciones ensayadas, especialmente en el caso de benceno con glucosa, si bien es cierto que ésta necesitó de un periodo de adaptación mayor para seguir evolucionando en el caso del xileno. En el caso concreto del medio B+G se detectó una rápida evolución exponencial que luego se estabilizó, probablemente debida a la utilización de la

fFuente de azúcar disponible. De hecho, las curvas de crecimiento observadas en las Figuras 19, 20, 21, 22 y 23, respecto a los medios adicionados con glucosa, han repetido esta tendencia. Esto es indicativo de que, al inicio, las bacterias estudiadas utilizan la glucosa como la principal y primera fuente de carbono y energía, ya que ésta es un sustrato más simple y fácil de utilizar que los hidrocarburos, puesto que estos contienen un anillo bencénico en su interior. Cuando se agota este sustrato, sufren un pequeño periodo de adaptación antes de empezar a utilizar el hidrocarburo correspondiente como su nueva fuente de carbono y energía. Esta aclimatación, para algunas cepas conlleva más tiempo que para otras.

En la siguiente imagen (Figura 24), se observa un ejemplo del distinto aspecto adquirido por dos frascos inoculados con dos cepas distintas, a pesar de contener el mismo medio de cultivo. Se trata del caso concreto de las cepas 1.2.2 y 1.2.7 en medio líquido A+T (APHA + Tolueno). La turbidez indicativa del crecimiento bacteriano en el caso de la derecha es evidente.



Figura 24. Fotografía que muestra 2 frascos ISO inoculados: cepa 1.2.2, a la izquierda, no hubo crecimiento bacteriano; y cepa 1.2.7, a la derecha, se observa una importante turbidez a consecuencia del crecimiento bacteriano.

En base a los resultados observados en este primer estudio de metabolismo y cometabolismo, se efectuó uno adicional, tal y como se explica en el apartado 2.4, basado en la eliminación de la principal fuente de nitrógeno, siendo ésta las sales de Janshekar, con objeto de estudiar con más precisión, y de manera concreta, el compuesto Tolueno, hidrocarburo que dio unos resultados interesantes de manera común para las cepas 1.2.7 (Figura 25), 1.3.1 (Figura 26) y 3.3.3 (Figura 27).

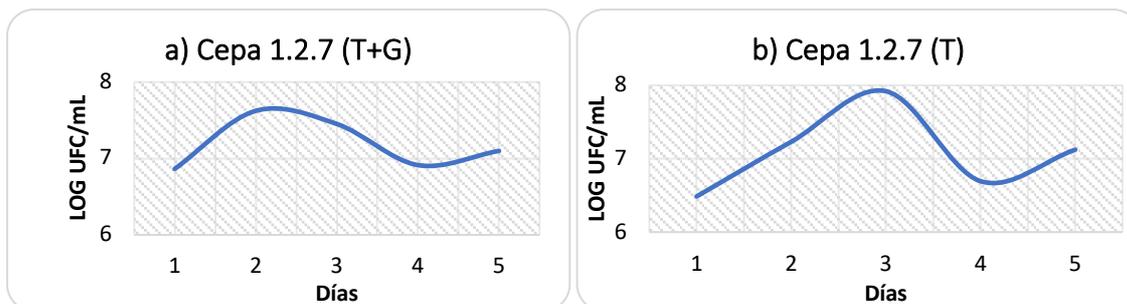


Figura 25. Curva de crecimiento de la Ceba 1.2.7 sometida a: (a) Tolueno + Glucosa (T+G); b) Tolueno, sin sales de Janshekar. Valores en Logaritmo de Unidades Formadoras de Colonias por mL (LOG UFC/mL).

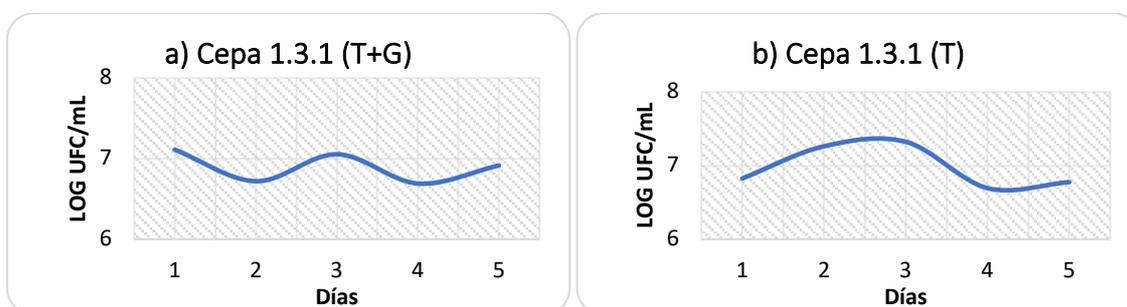


Figura 26. Curva de crecimiento de la Ceba 1.3.1 sometida a: (a) Tolueno + Glucosa (T+G); b) Tolueno, sin sales de Janshekar. Valores en Logaritmo de Unidades Formadoras de Colonias por mL (LOG UFC/mL).

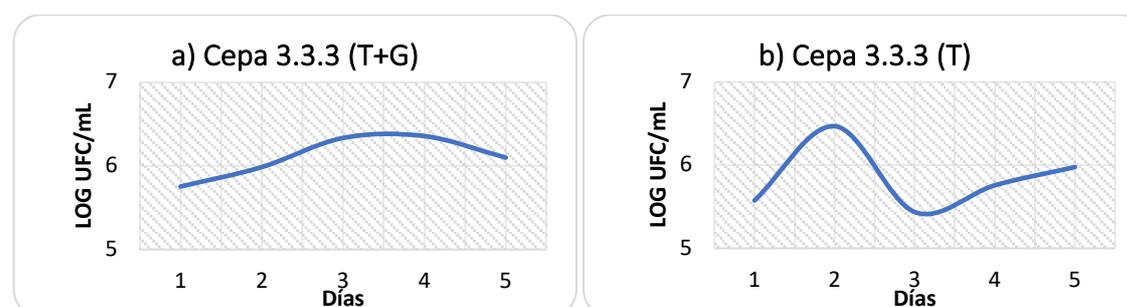


Figura 27. Curva de crecimiento de la Ceba 3.3.3 tras ser sometida a crecimiento en Tolueno + Glucosa (a) y a Tolueno (b) como únicas fuentes de carbono y energía, sin sales de Janshekar. Valores en Logaritmo de Unidades Formadoras de Colonias por mL (LOG UFC/mL).

Como se puede apreciar en las Figuras 25, 26 y 27, las cepas fueron capaces de sobrevivir en estas condiciones inhóspitas, aunque en todos los casos la tendencia no fue uniformemente creciente. Habitualmente, la manera más eficiente para la degradación de hidrocarburos parece ser en presencia de una fuente de nitrógeno directa, sea dicha fuente obtenida por consorcio

con bacterias fijadoras de nitrógeno o bien por adición de compuestos nitrogenados al medio. Teniendo en cuenta los resultados recopilados, es muy posible que las cepas 1.2.7, 1.3.1 y 3.3.3 sean capaces de fijar el nitrógeno.

A continuación, se muestra una gráfica que recopila la actuación de las 3 cepas en estas 4 condiciones, es decir, en medios fabricados en base a la intervención del compuesto tolueno, con y sin glucosa, así como con y sin fuente de nitrógeno (Figura 28), donde se observa como los microorganismos actúan de un modo diferente en presencia y ausencia de glucosa, no siendo determinante la presencia de nitrógeno, de lo que se deduce que pueden emplear igualmente los medios sin dicho nutriente.

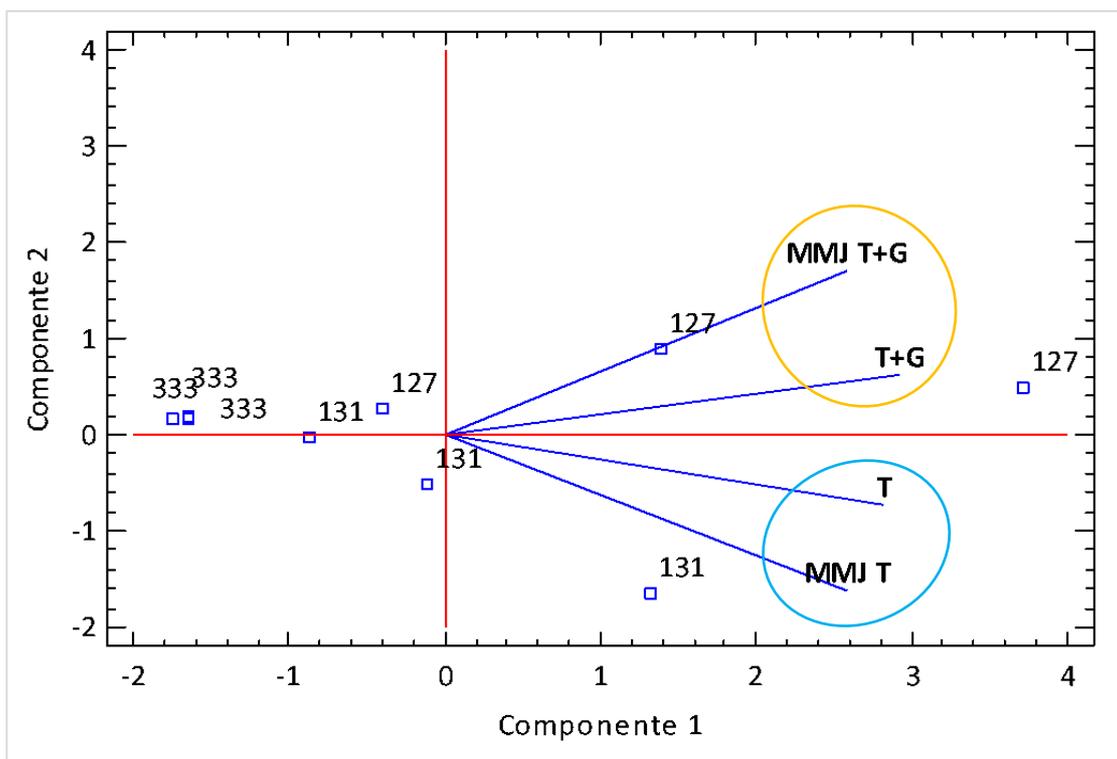


Figura 28. Análisis de componentes principales. Los 4 componentes analizados (MMJ T+G, MMJ T, T y T+G), en conjunto, explican el 100,0% de la variabilidad en los datos originales. MMJ T: Medio mínimo de Janshekar con Tolueno. MMJ T+G: Medio mínimo de Janshekar con Tolueno más Glucosa. T: Medio sin Janshekar con Tolueno. T+G: Medio sin Janshekar con Tolueno más Glucosa.

Las bacterias hidrocarbonoclásticas, en una evolución temprana desarrollaron la capacidad de utilizar hidrocarburos, sustratos pobres en nitrógeno, desarrollando de manera simultánea el potencial de fijación de nitrógeno para poder sintetizar sus materiales celulares nitrogenados tales como proteínas y ácidos nucleicos (Dashti et al., 2015). Esta situación, es decir, la presencia de fijadores de nitrógeno en ambientes contaminados con derivados del petróleo coincide con otras investigaciones previas, por ejemplo, Dashti et al. (2015) aislaron 100 bacterias

hidrocarbonoclasticas en suelos y sistemas acuáticos contaminados por hidrocarburos, de las cuales, 82 eran diazotróficas, es decir, capaces de fijar el nitrógeno, lo que permite que dichas bacterias estén ampliamente repartidas por todo el ambiente. Estas bacterias fueron identificadas pertenecientes a los géneros *Agrobacterium*, *Sphingomonas* o *Pseudomonas*.

3.3 Identificación de las cepas con mayor potencial biorremediador: Resultados esperables

El último paso de este experimento correspondía a la identificación molecular de las cepas más prometedoras como potenciales agentes de biorremediación de hidrocarburos, en base a los resultados anteriores. Sin embargo, debido a la pandemia causada por la Covid-19, no se pudo llevar a cabo el envío de las extracciones de ADN de las cepas seleccionadas a los Servicio de Secuenciación. Por lo tanto, se desconocen las identidades exactas de dichos microorganismos. No obstante, en base a los resultados morfológicos, así como de metabolismo y cometabolismo estudiados, la información recopilada se contrastó con bibliografía basada en aportaciones de otros investigadores respecto a estudios similares, pudiendo hacer una predicción de las posibles identidades de las 3 cepas más prometedoras, 1.2.7, 1.3.1 y 3.3.3.

En una investigación realizada por Adams et al. (2014), basada en el análisis microbiológico de suelos contaminados con petróleo, para la posterior utilización de esos microorganismos en técnicas de biorremediación, encontraron una amplia cantidad de bacterias heterótrofas, predominantemente pertenecientes a *Arthrobacter* sp., *Pseudomonas* sp., *Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp., *Escherichia coli*, *Micrococcus* sp. y *Corynebacterium* sp. Donde destacaron principalmente cepas asociadas a los géneros *Enterobacter* sp, *Arthrobacter* sp y *Pseudomonas* sp.

Otras investigaciones, como la llevada a cabo por Quatrini et al. (2007), dieron como resultado que 5 cepas diferentes de bacterias, todas ellas degradadoras de n-alcanos, provenientes de un suelo contaminado en la costa mediterránea italiana, fueron identificadas como cepas pertenecientes a los géneros *Pseudomonas* sp., *Rhodococcus* sp. y *Gordonia* sp..

Por su parte, Liu et al. (2010a) desarrollaron una investigación a partir de la cual observaron la utilidad mostrada por cepas de *Bacillus* para la degradación de benceno. Dichos investigadores llegaron a la conclusión de que los cultivos mixtos de *Bacillus* spp. presentaban una mayor eficacia durante los ensayos con respecto a la degradación de benceno, que cada aislado individualmente.

Por lo tanto, basado en la morfología y características estudiadas, así como en la información recopilada y citada anteriormente, se puede prever que, posiblemente, las cepas 1.2.7, 1.3.1, y 3.3.3 sean pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Rhodococcus*, respectivamente. Tanto la clasificación a partir de la tinción de Gram, como la forma celular y la

capacidad de utilizar compuestos complejos y fijar nitrógeno coinciden entre los resultados mostrados por estas cepas y las características propias de esos géneros.

4. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos permitieron obtener las siguientes conclusiones:

1. Los suelos contaminados con subproductos derivados del petróleo constituyen un ambiente naturalmente enriquecido con microorganismos con potencial como degradadores de hidrocarburos. Es por esto por lo que es interesante estudiar la microbiota autóctona presente en lugares como gasolineras con el afán de obtener nuevas cepas con capacidad biorremediadora.
2. Las cepas 1.1.2, 1.2.7, 1.3.1, 3.1.2 y 3.3.3 son bacterias presumiblemente hidrocarbonoclásticas, con potencial para ser caracterizadas en base a su capacidad para utilizar hidrocarburos.
3. Las cepas 1.2.7, 1.3.1 y 3.3.3, mostraron unas características particularmente interesantes, en concreto el empleo de tolueno sin fuente directa de nitrógeno, que las convierte en candidatas prometedoras para ser empleadas como agentes con potencial biorremediador en estrategias de biodescontaminación de suelos contaminados con hidrocarburos.
4. Las cepas 1.2.7, 1.3.1 y 3.3.3, pertenecieron (presuntamente) a los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Rhodococcus*, respectivamente.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Abbasian, F., Lockington, R., Mallavarapu, M. & Naidu, R. (2015). A comprehensive review of aliphatic hydrocarbon biodegradation by bacteria. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 176(3), 670-699. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1603-5>.
- Adam, G. (2001). A study into the potential of phytoremediation for diesel fuel contaminated soil. En: Environmental, Agricultural and Analytical Chemistry. (Doctoral Thesis). University of Glasgow. Glasgow, Escocia.
- Adams, G.O., Fufeyin, P.T. & Igelenyah, E. (2014). Bioremediation of spent oil contaminated soils using poultry litter. *Research Journal in Engineering and Applied Sciences*, 3(2), 124- 130.
- Adams, G.O., Fufeyin, P.T., Okoro, S.E. & Ehinomen, I. (2015). Bioremediation, biostimulation and bioaugmentation: a review. *International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation*, 3(1), 28-39.
- Aeppli, C., Nelson, R.K., Radović, J.R., Carmichael, C.A., Valentine, D.L. & Reddy, C.M. (2014). Recalcitrance and degradation of petroleum biomarkers upon abiotic and biotic natural weathering of Deepwater Horizon oil. *Environmental Science & Technology*, 48(12), 6726-6734. <https://doi.org/10.1021/es500825q>.
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). (1999). Toxicological profile for total petroleum hydrocarbons (TPH). Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.
- Antizar-Ladislao, B., Lopez-Real, J. & Beck, A.J. (2005). In-vessel composting–bioremediation of aged coal tar soil: effect of temperature and soil/green waste amendment ratio. *Environment International*, 31(2), 173-178. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2004.09.012>.
- Atlas, R.M. & Bartha, R. (1998). *Microbial ecology: fundamentals and applications*. 4th edn. Addison Wesley Longman, New York, pp 556–588.
- Atlas, R.M. & Bragg, J. (2009). Bioremediation of marine oil spills: when and when not—the Exxon Valdez experience. *Microbial Biotechnology*, 2(2), 213–221.
- Bacosa, H.P., Suto, K. & Inoue, C. (2012). Bacterial community dynamics during the preferential degradation of aromatic hydrocarbons by a microbial consortium. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 74, 109-115. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.04.022>.

- Baek, K.H., Yoon, B.D., Cho, D.H., Kim, B.H., Oh, H.M. & Kim, H.S. (2009). Monitoring bacterial population dynamics using real-time PCR during the bioremediation of crude-oil-contaminated soil. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19, 339-345.
- Benavides, J., Quintero, G., Guevara, A.L., Jaimes Cáceres, D.C., Gutiérrez Riaño, S.M. & Miranda García, J. (2006). Bioremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *Nova*, 4(5), 82. <https://doi.org/10.22490/24629448.351>.
- Binazadeh, M., Li, Z. & Karimi, I. (2020). Optimization of biodegradation of long chain n-alkanes by *Rhodococcus* sp. Moj-3449 using response surface methodology. *Physical Chemistry Research*, 8(1), 45-59. <https://doi: 10.22036/pcr.2019.204077.1682>.
- Bogan, B.W., Lahner, L.M., Sullivan, W.R. & Paterek, J.R. (2003). Degradation of straight-chain aliphatic and high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by a strain of *Mycobacterium austroafricanum*. *Journal of Applied Microbiology*, 94(2), 230-239. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01824.x>.
- Brooijmans, R.J.W., Pastink, M.I. & Siezen, R.J. (2009). Hydrocarbon-degrading bacteria: the oil-spill clean-up crew. *Microbial Biotechnology*, 2(6), 587-594. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2009.00151.x>.
- Boulton, C.A. & Ratledge, C. (1984). The physiology of hydrocarbon utilizing microorganisms. En: Wieseman, A. (Ed.), *Topics in Fermentation and Enzyme Technology*, vol 9, pp. 11–77. Ellis Horwood, Chichester, Inglaterra.
- Cai, D., Yang, X., Wang, S., Chao, Y., Morel, J.L. & Qiu, R. (2017). Effects of dissolved organic matter derived from forest leaf litter on biodegradation of phenanthrene in aqueous phase. *Journal of Hazardous Materials*, 324, 516-525. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.11.020>.
- Cajthaml, T., Pacakova, V. & Sasek, V. (2001). Microbial degradation of polycyclicaromatic hydrocarbons, *Chemické Listy*, 95(7), 404-410.
- Cameotra, S.S. & Makkar, R.S. (1998.) Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50, 520-529.
- Castillo, F. (2005). Biodegradación de compuestos naturales III. En: Castillo, F (Ed.), *Bioteología Ambiental*, pp. 450-466. Tébar, Madrid, España.
- Coates, J.D., Chakraborty, R. & McInerney, M.J. (2002). Anaerobic benzene biodegradation—a new era. *Research in Microbiology*, 153(10), 621-628. [https://doi.org/10.1016/s0923-2508\(02\)01378-5](https://doi.org/10.1016/s0923-2508(02)01378-5).

- Daane, L.L., Harjono, I., Zylstra, G.J. & Häggblom, M.M. (2001). Isolation and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria associated with the rhizosphere of salt marsh plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(6), 2683-2691. <https://doi.org/10.1128/aem.67.6.2683-2691.2001>.
- Das, N. & Chandran, P. (2011). Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *Biotechnology Research International*, 2011, 1-13. <https://doi.org/10.4061/2011/941810>.
- Dashti, N., Ali, N., Eliyas, M., Khanafer, M., Sorkhoh, N.A. & Radwan, S.S. (2015). Most hydrocarbonoclastic bacteria in the total environment are diazotrophic, which highlights their value in the bioremediation of hydrocarbon contaminants. *Microbes and Environments*, 30(1), 70-75. <https://doi.org/10.1264/jsme2.me14090>.
- Falahatpisheh, M.H., Donnelly, K.C. & Ramos, K.S. (2001). Antagonistic interactions among nephrotoxic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 62(7), 543-560. <https://doi.org/10.1080/152873901300007833>.
- Ferrera-Cerrato, R. & Alarcón, A. (2004). Papel de los microorganismos rizosféricos en la fitorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. En: Tundo, P. & Hoyos de Rossi, R. (Eds.), *Química verde en Latinoamérica*, pp. 89-109. IUAPAC- INCA, Argentina.
- Ferrera-Cerrato, R., Rojas-Avelizapa, N., Poggi-Varaldo H., Alarcón, A. & Cañizares-Villanueva, R. (2006). Procesos de biorremediación de suelo y agua contaminados por hidrocarburos del petróleo y otros compuestos. *Revista latinoamericana de Microbiología*, 48(2), 179-187.
- Goldman, R., Enewold, L., Pellizzari, E., Beach, J.B., Bowman, E.D., Krishnan, S.S. & Shields, P.G. (2001). Smoking increases carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in human lung tissue. *Cancer research*, 61(17), 6367-6371.
- Haritash, A. & Kaushik, C. (2009). Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Journal of Hazardous Materials*, 169(1-3), 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.03.137>.
- Hartley, W.R. & Englande, A.J., Jr. (1992). Health risk assessment of the migration of unleaded gasoline – a model for petroleum products. *Water Science and Technology*, 25(3), 65-72. <https://doi.org/10.2166/wst.1992.0078>.
- Hoff, R.Z. (1993). Bioremediation: an overview of its development and use for oil spill cleanup. *Marine Pollution Bulletin*, 26(9), 476-481. [https://doi.org/10.1016/0025-326X\(93\)90463-T](https://doi.org/10.1016/0025-326X(93)90463-T).

- Hofrichter, M., Scheibner, K., Schneegaß, I. & Fritsche, W. (1998). Enzymatic combustion of aromatic and aliphatic compounds by manganese peroxidase from *Nematoloma frowardii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(2), 399-404. <https://doi.org/10.1128/aem.64.2.399-404.1998>.
- Janshekar, H., Haltmeier, T. & Brown, C. (1982). Fungal degradation of pine and straw alkali lignins. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 14(3), 174-181. <https://doi.org/10.1007/BF00497896>.
- Joutey, N.T., Bahafid, W., Sayel, H. & El Ghachtouli, N. (2013). Biodegradation: involved microorganisms and genetically engineered microorganisms. En: Chamy R (Ed.), *Biodegradation-life of science*. p 289. InTech, Cambridge, Reino Unido. <https://dx.doi.org/10.5772/56194>.
- Kästner, M. & Miltner, A. (2016). Application of compost for effective bioremediation of organic contaminants and pollutants in soil. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(8), 3433-3449. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7378-y>.
- Khan, A.A., Kim, S.J., Paine, D.D. & Cerniglia, C.E. (2002). Classification of a polycyclic aromatic hydrocarbon-metabolizing bacterium, *Mycobacterium* sp. strain PYR-1, as *Mycobacterium vanbaalenii* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(6), 1997-2002. <https://doi.org/10.1099/00207713-52-6-1997>.
- Kumar, M., Lakshmi, C.V. & Khanna, S. (2008). Microbial biodiversity and in situ bioremediation of endosulfan contaminated soil. *Indian Journal of Microbiology*, 48(1), 128-133. <https://doi.org/10.1007/s12088-008-0012-7>.
- Lee, S.H., Lee, S., Kim, D.Y. & Kim, J.G. (2007). Degradation characteristics of waste lubricants under different nutrient conditions. *Journal of Hazardous Materials*, 143, 65-72.
- Lim, M.W., Lau, E.V. & Poh, P.E. (2016). A comprehensive guide of remediation technologies for oil contaminated soil — Present works and future directions. *Marine Pollution Bulletin*, 109(1), 14-45. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.04.023>.
- Liu, J.H., Maity, J.P., Jean, J.S., Chen, C.Y., Chen, C.C. & Ho, S.Y. (2010a). Biodegradation of benzene by pure and mixed cultures of *Bacillus* spp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(9), 1557-1567. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0331-9>.
- Liu, W., Luo, Y., Teng, Y., Li, Z. & Ma, L.Q. (2010b). Bioremediation of oily sludge-contaminated soil by stimulating indigenous microbes. *Environmental Geochemistry and Health*, 32(1), 23-29. <https://doi.org/10.1007/s10653-009-9262-5>.

- Lu, X.Y., Zhang, T. & Fang, H.H.P. (2011). Bacteria-mediated PAH degradation in soil and sediment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(5), 1357-1371. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-3072-7>.
- Mahjoubi, M., Aliyu, H., Cappello, S., Naifer, M., Souissi, Y., Cowan, D.A. & Cherif, A. (2019) The genome of *Alcaligenes aquatilis* strain BU33N: insights into hydrocarbon degradation capacity. *PLoS ONE*, 14(9): e0221574. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221574>.
- Maldonado, E., Chávez-Rivera, M.C., Izquierdo, F. & Palma, D.J. (2010). Efectos de rizosfera, microorganismos y fertilización en la biorremediación de suelos con petróleos crudo nuevo e intemperizado. *Universidad y Ciencia Trópico Húmedo*, 26(2), 121-136.
- Margesin, R. & Schinner, F. (2001). Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56(5-6), 650-663. <https://doi.org/10.1007/s002530100701>.
- Margesin, R., Labbé, D., Schinner, F., Greer, C.W. & Whyte, L.G. (2003). Characterization of hydrocarbon-degrading microbial populations in contaminated and pristine alpine soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(6), 3085-3092. <https://doi.org/10.1128/aem.69.6.3085-3092.2003>.
- Maroto, M.E. & Rogel, J.M. (2002). Aplicación de sistemas de biorremediación de suelos y Aguas contaminadas por hidrocarburos. *MMWR*. URL disponible en: https://www.igme.es/actividadesIGME/lineas/HidroyCA/publica/libros4_CCA/lib15/pdf/lib15/028.pdf.
- Martín, C., González, A. & Blanco, M. (2004). Tratamientos biológicos de suelos contaminados: contaminación por hidrocarburos. Aplicaciones de hongos en tratamientos de biorrecuperación. *Revista Iberoamericana Microbiología*, 21, 103-120.
- Martínez-Gallardo, M.R., López, M.J., Jurado, M.M., Suárez-Estrella, F., López-González, J.A., Sáez, J.A., Moral, R. & Moreno, J. (2020). Bioremediation of olive mill wastewater sediments in evaporation ponds through *in situ* composting assisted by bioaugmentation. *Science of the Total Environment*, 703, 135537.
- Mastrangelo, G., Fadda, E. & Marzia, V. (1996). Polycyclic aromatic hydrocarbons and cancer in man. *Environmental Health Perspectives*, 104(11), 1166-1170. <https://doi.org/10.1289/ehp.961041166>.
- Meléndez, F. (1982). El origen del petróleo. COL-PA. Publicaciones de departamento de paleontología, N° 37, pág. 61-65.

- Miranda, D. & Restrepo, R. (2005). Los derrames de petróleo en ecosistemas tropicales- impactos, consecuencias y prevención. La experiencia de Colombia. *International Oil Spill Conference Proceedings*, 1, 571-575.
- Morehead, N.R., Eadie, B.J., Lake, B., Landrum, P.F. & Berner, D. (1986). The sorption of PAH onto dissolved organic matter in Lake Michigan waters. *Chemosphere*, 15(4), 403-412. [https://doi.org/10.1016/0045-6535\(86\)90534-5](https://doi.org/10.1016/0045-6535(86)90534-5).
- Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M.T., Landi, L., Pietramellara, G. & Renella, G. (2003). Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science*, 54(4), 655-670. <https://doi.org/10.1046/j.1351-0754.2003.0556.x>.
- Nikolopoulou, M. & Kalogerakis, N. (2009). Biostimulation strategies for fresh and chronically polluted marine environments with petroleum hydrocarbons. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 84(6), 802-807. <https://doi.org/10.1002/jctb.2182>.
- Nyer, E.K., Payne, F. & Suthersan, S. (2002). Environment vs. bacteria or let's play 'name that bacteria'. *Ground Water Monitoring and Remediation*, 23, 36-45.
- Olguín, E.J., Hernández, M.E. & Sánchez-Galván, G. (2007). Hydrocarbon mangroves pollution and bioremediation, phytoremediation and restoration strategies. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 23(3), 139-154.
- Ossai, I.C., Ahmed, A., Hassan, A. & Hamid, F.S. (2020). Remediation of soil and water contaminated with petroleum hydrocarbon: a review. *Environmental Technology & Innovation*, 17, 100526. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2019.100526>.
- Pasumarthi, R., Chandrasekaran, S. & Mutnuri, S. (2013). Biodegradation of crude oil by *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia fergusonii* isolated from the Goan coast. *Marine Pollution Bulletin*, 76(1-2), 276-282. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.08.026>.
- Perry, J.J. (1984). Microbial metabolism of cyclic alkanes. En: Atlas, R.M. (Eds.), *Petroleum Microbiology*, pp. 61-98. Macmillan, Nueva York, Estados Unidos.
- Phang, S.M., Chu, W.L. & Rabiei, R. (2015). Phycoremediation. En: Sahoo, D., Seckbach, J. (Eds.), *The Algae World. En: Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology*, vol. 26, Springer, Dordrecht, Países Bajos.
- Phelps, C.D. & Young, L.Y. (2001). Biodegradation of BTEX under anaerobic conditions: a review. *Advanced in Agronomy*, 70, 329-357.
- Poi, G., Aburto-Medina, A., Mok, P.C., Ball, A.S. & Shahsavari, E. (2017). Large scale bioaugmentation of soil contaminated with petroleum hydrocarbons using a mixed

- microbial consortium. *Ecological Engineering*, 102, 64-71. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2017.01.048>.
- Qi, P., Qu, C., Albanese, S., Lima, A., Cicchella, D., Hope, D., Cerino, P., Zheng, H., Li, J. & De Vivo, B. (2020). Investigation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils from Caserta provincial territory, southern Italy: spatial distribution, source apportionment, and risk assessment. *Journal of Hazardous Materials*, 383, 121-158. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121158>.
- Quatrini, P., Scaglione, G., De Pasquale, C., Riela, S. & Puglia, A.M. (2007). Isolation of Gram-positive n-alkane degraders from a hydrocarbon-contaminated Mediterranean shoreline. *Journal of Applied Microbiology*, 104(1), 251-259. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03544.x>.
- Rabus, R., Boll, M., Heider, J., Meckenstock, R.U., Buckel, W., Einsle, O., Ermler, U., Golding, B.T., Gunsalus, R.P., Kroneck, P.M.H., Krüger, M., Lueders, T., Martins, B.M., Musat, F., Richnow, H.H., Schink, B., Seifert, J., Szalaniec, M., Treude, T., Ullmann, G.M., Vogt, C., von Bergen, M. & Wilkes, H. (2016). Anaerobic microbial degradation of hydrocarbons: from enzymatic reactions to the environment. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 26, 5-28.
- Rahman, K.S.M., Thahira-Rahman, J., Lakshmanaperumalsamy, P. & Banat, I.M. (2002). Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium. *Bioresource Technology*, 85(3), 257-261. [https://doi.org/10.1016/s0960-8524\(02\)00119-0](https://doi.org/10.1016/s0960-8524(02)00119-0).
- Ramos, J., Wasserfallen, A., Rose, K. & Timmis, K. (1987). Redesigning metabolic routes: manipulation of TOL plasmid pathway for catabolism of alkylbenzoates. *Science*, 235(4788), 593-596. <https://doi.org/10.1126/science.3468623>.
- Rao, P.H., Kumar, R.R., Raghavan, B.G., Subramanian, V.V. & Sivasubramanian, V. (2011). Is phycovolatilization of heavy metals a probable (or possible) physiological phenomenon? An *in situ* pilot-scale study at a leather-processing chemical industry. *Water Environment Research*, 83(4), 291-297. <https://doi.org/10.2175/106143010x12780288628057>.
- Rao, P.S.C., Davis, G.B. & Johnston, C.D. (1996). Technologies for enhanced remediation of contaminated soils and aquifers: overview, analysis, and case studies. *Contaminants and the Soil Environment in the Australasia-Pacific Region*, 361-410. https://doi.org/10.1007/978-94-009-1626-5_12.
- Ren, X., Zeng, G., Tang, L., Wang, J., Wan, J., Wang, J., Deng, Y., Liu, Y. & Peng, B. (2018). The potential impact on the biodegradation of organic pollutants from composting technology for soil remediation. *Waste Management*, 72, 138-149. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.11.032>.

- Rockne, K., Chee-Sanford, J., Sanford, R., Brian, P., James, T. & Staleyand, S. (2000). Anaerobic naphthalene degradation by microbial pure cultures under nitrate-reducing conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(4), 1595-1601.
- Rockne, K.J. & Strand, S.E. (2001). Anaerobic biodegradation of naphthalene, phenanthrene, and biphenyl by a denitrifying enrichment culture. *Water Research*, 35(1), 291-299. [https://doi.org/10.1016/s0043-1354\(00\)00246-3](https://doi.org/10.1016/s0043-1354(00)00246-3).
- Santisi, S., Cappello, S., Catalfamo, M., Mancini, G., Hassanshahian, M., Genovese, L., Giuliano, L. & Yakimov, M.M. (2015). Biodegradation of crude oil by individual bacterial strains and a mixed bacterial consortium. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(2), 377-387.
- Scheuer, U., Zimmer, T., Becher, D., Schauer, F. & Schunck, W.H. (1998). Oxygenation cascade in conversion of n-alkanes to α,ω -dioic acids catalyzed by cytochrome P450 52A3. *Journal of Biological Chemistry*, 273(49), 32528-32534. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.49.32528>.
- Schroeder, R.H.A., Hernández, L. & Rodríguez, V. (1999). Potencial de la biorremediación de suelo y agua impactados por petróleo en el trópico mexicano. *Terra Latinoamericana*, 17, 159-174.
- Semple, K.T., Reid, B.J. & Fermor, T.R. (2001). Impact of composting strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants. *Environmental Pollution*, 112(2), 269-283. [https://doi.org/10.1016/s0269-7491\(00\)00099-3](https://doi.org/10.1016/s0269-7491(00)00099-3).
- Seo, J.S., Keum, Y.S. & Li, Q. (2009). Bacterial degradation of aromatic compounds. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 6(1), 278-309. <https://doi.org/10.3390/ijerph6010278>.
- Simpanen, S., Dahl, M., Gerlach, M., Mikkonen, A., Malk, V., Mikola, J. & Romantschuk, M. (2016). Biostimulation proved to be the most efficient method in the comparison of in situ soil remediation treatments after a simulated oil spill accident. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(24), 25024-25038. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7606-0>.
- Siva, S., Brett, R., Tessa, M., Vogeler, I., Clothier, B., Northcott, G.L. & McNaughton, D. (2004). Bioremediation of soils contaminated with organic compounds. En: SuperSoil 2004. 3rd Australian New Zealand Soils Conference, 5 —9 December 2004, University of Sydney. Sydney, Australia. (http://www.regional.org.au/au/asssi/supersoil2004/pdf/1455_sivakumarans.pdf).
- Stach, J.E.M. & Burns, R.G. (2002). Enrichment versus biofilm culture: a functional and phylogenetic comparison of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading microbial

- communities. *Environmental Microbiology*, 4(3), 169-182.
<https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2002.00283.x>.
- Thompson, I.P., van der Gast, C.J., Ciric, L. & Singer, A.C. (2005). Bioaugmentation for bioremediation: the challenge of strain selection. *Environmental Microbiology*, 7(7), 909-915. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00804.x>.
- Tobiszewski, M. & Namieśnik, J. (2012). PAH diagnostic ratios for the identification of pollution emission sources. *Environmental Pollution*, 162, 110-119.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.10.025>.
- Tsibart, A.S. & Gennadiev, A.N. (2013). Polycyclic aromatic hydrocarbons in soils: sources, behavior, and indication significance (a review). *Eurasian Soil Science*, 46(7), 728-741.
<https://doi.org/10.1134/s1064229313070090>.
- Tyagi, M., da Fonseca, M.M.R. & de Carvalho, C.C.C.R. (2011). Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. *Biodegradation*, 22(2), 231-241. <https://doi.org/10.1007/s10532-010-9394-4>.
- Ulrici, W. (2000). Contaminant soil areas, different countries and contaminant monitoring of contaminants. En: Rehm, H.J & Reed, G. (Eds.), *Environmental Process II. Soil Decontamination Biotechnology.*, vol. 11, pp. 5–42. Wiley-VCH, Weinheim, Alemania.
- Van Beilen, J.B. & Funhoff, E.G. (2007). Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(1), 13-21.
<https://doi.org/10.1007/s00253-006-0748-0>.
- Van Hamme, J.D., Singh, A. & Ward, O.P. (2003). Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4), 503-549.
<https://doi.org/10.1128/mmbr.67.4.503-549.2003>.
- Vásquez-Murrieta, M.S., Hernández-Hernández, O.J., Cruz-Maya, J.A., Cancino-Díaz, J.C. & Jan-Roblero, J. (2016). Approaches for removal of PAHs in soils: bioaugmentation, biostimulation and bioattenuation. *Soil Contamination - Current Consequences and Further Solutions*, 329-314. <https://doi.org/10.5772/64682>.
- Vogel, T.M. (1996). Bioaugmentation as a soil bioremediation approach. *Current Opinion in Biotechnology*, 7(3), 311-316. [https://doi.org/10.1016/s0958-1669\(96\)80036-x](https://doi.org/10.1016/s0958-1669(96)80036-x).
- Wang, Z., Xu, Y., Zhao, J., Li, F., Gao, D. & Xing, B. (2011a). Remediation of petroleum contaminated soils through composting and rhizosphere degradation. *Journal of Hazardous Materials*, 190(1-3), 677-685.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.03.103>.

- Wang, X.B., Chi, C.Q., Nie, Y., Tang, Y.Q., Tan, Y., Wu, G. & Wu, X.L. (2011b). Degradation of petroleum hydrocarbons (C6–C40) and crude oil by a novel *Dietzia* strain. *Bioresource Technology*, 102(17), 7755-7761. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.06.009>.
- Wilson, S.C. & Jones, K.C. (1993). Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Environmental Pollution*, 81(3), 229-249. [https://doi.org/10.1016/0269-7491\(93\)90206-4](https://doi.org/10.1016/0269-7491(93)90206-4).
- Xaaldi-Kalhor, A., Movafeghi, A., Mohammadi-Nassab, A.D., Abedi, E. & Bahrami, A. (2017). Potential of the green alga *Chlorella vulgaris* for biodegradation of crude oil hydrocarbons. *Marine Pollution Bulletin*, 123(1-2), 286-290. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.08.045>.
- Yakimov, M.M., Timmis K.N. & Golyshin, P.N. (2007). Obligate oil-degrading marine bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(3), 257–266.
- Yang, W., Lang, Y. & Li, G. (2014). Cancer risk of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the soils from Jiaozhou Bay wetland. *Chemosphere*, 112, 289-295. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.04.074>.
- Zhang, Z., Hou, Z., Yang, C., Ma, C., Tao, F. & Xu, P. (2011). Degradation of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons in petroleum by a newly isolated *Pseudomonas aeruginosa* DQ8. *Bioresource Technology*, 102(5), 4111-4116. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.12.064>.
- Zhao, D., Liu, C., Liu, L., Zhang, Y., Liu, Q. & Wu, W.M. (2011). Selection of functional consortium for crude oil-contaminated soil remediation. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 65, 1244-1248.
- Zimmer, T., Ohkuma, M., Ohta, A., Takagi, M. & Schunck, W.H. (1996). The CYP52 multigene family of *Candida maltose* encodes functionally diversen-alkane-inducible cytochromes P450. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 224(3), 784-789.