

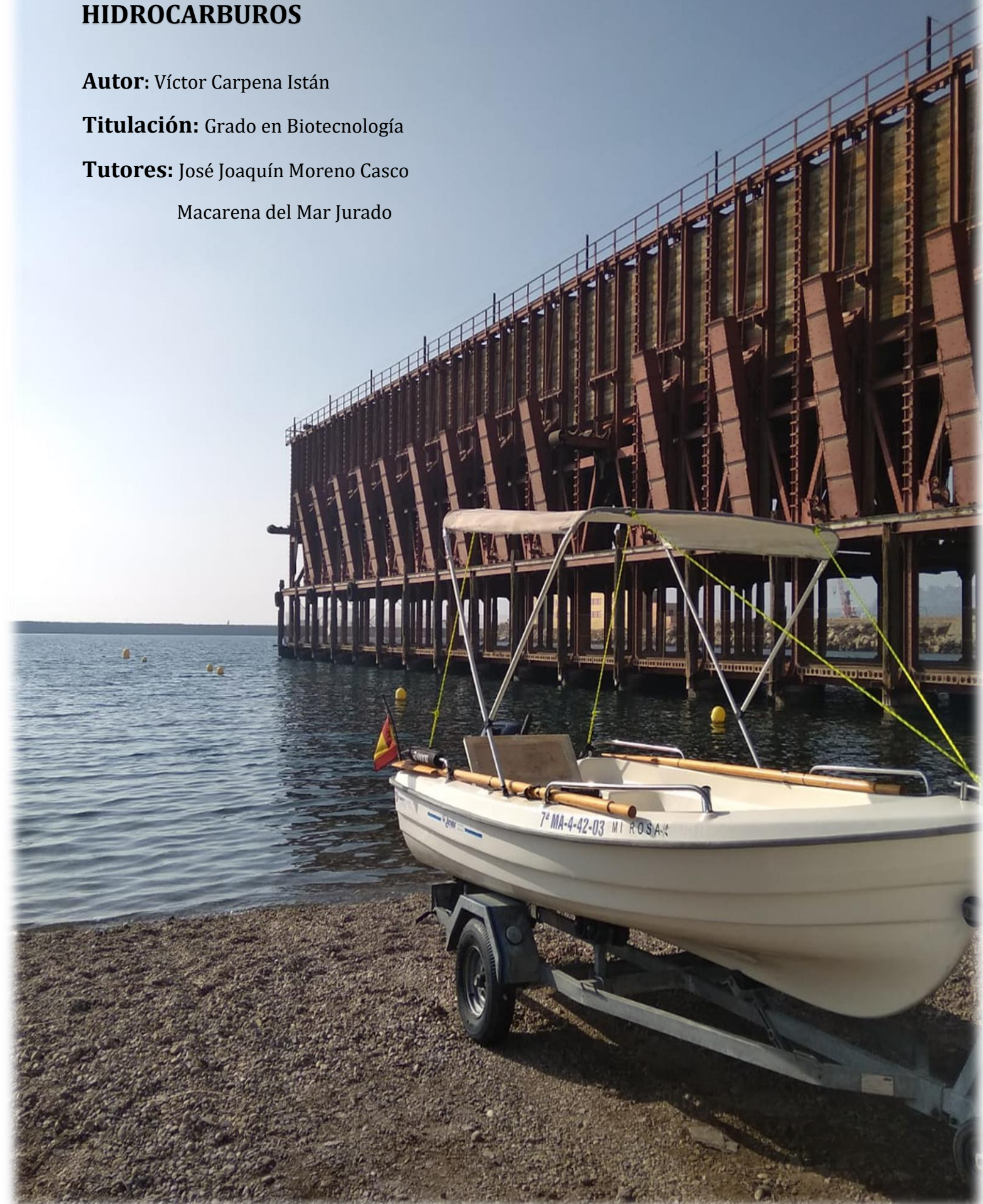
BÚSQUEDA DE MICROORGANISMOS CON CAPACIDAD BIORREMEDIADORA AISLADOS DE HÁBITATS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS

Autor: Víctor Carpena Istán

Titulación: Grado en Biotecnología

Tutores: José Joaquín Moreno Casco

Macarena del Mar Jurado





Departamento Biología y Geología

Área Microbiología

Universidad de Almería

Trabajo Fin de Grado

Almería, Julio 2019

AGRADECIMIENTOS

“She thought that trying to live life according to any plan you actually work out is like trying to buy ingredients for a recipe from the supermarket. You get one of those trolleys which simply will not go the direction you push it and end up just having to buy completely different stuff. What do you do with the recipe? She didn't know.”

“Ella pensaba que tratar de vivir la vida de acuerdo con cualquier plan que realmente trabajes es como tratar de comprar ingredientes para una receta del supermercado. Coges uno de esos carritos que nunca van en la dirección en la que lo empujas y acabas teniendo que comprar cosas totalmente distintas. ¿Qué haces con la receta? No lo sabía.

- “Mostly Harmless” (fundamentalmente inofensiva), Douglas Adams (1992).

Recuerdo llamar a mi madre desbordado de ilusión el día que me enseñaron cuál sería la línea de investigación para mi trabajo de fin de grado y su diseño experimental: “Mamá, este trabajo reúne todo lo que más me gusta; conocimientos en microbiología y biología molecular, habilidades de laboratorio de microbiología, ¡y el objetivo final que no es ni más ni menos que descontaminar el mar! Mi madre no sabía exactamente de lo que hablaba, pero la alegría en mi voz era lo único que le bastaba. Los siguientes meses transcurrieron, en algunas ocasiones, como una densa neblina de incertidumbre, y a veces me llegué a sentir como Tricia McMillan en el libro de Douglas Adams” fundamentalmente inofensiva”: no importaba el plan que trazase, los resultados de los experimentos te obligaban a cambiar de dirección, de receta, todo para obtener resultados aproximados a los que esperabas. De esta manera, viví mi primer contacto con la investigación científica, acompañado por mi codirectora Macarena que, de forma inexplicable, siempre estuvo disponible para calmar mis más asfixiantes preocupaciones tanto académicas como personales, así como para ayudarme en los días de siembras infinitas. Todas las decisiones tomadas no hubieran sido acertadas sin el conocimiento y la experiencia ejecutados de forma implacable por mi director Joaquín Moreno Casco, cuyos consejos y enseñanzas pasionales me descubrieron una vocación. La fase final de identificación molecular no hubiera sido posible sin la ayuda y paciencia de Ana Toribio, quien estuvo hasta el final procurando que todo fuese bien en esta etapa. Me gustaría agradecer a todas las personas del laboratorio por el buen ambiente que saben crear, sin él, no hubiera trabajado tan cómodo y la realización de este trabajo de fin de grado hubiera sido un camino más tortuoso.

Por último, gracias a mi familia, amigos y novia por todo el apoyo emocional y por siempre escucharme, ahora ellos son también un poco más científicos.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	1
1.INTRODUCCIÓN.....	2
1.1. Impacto ambiental en sistemas acuáticos debido a la presencia de hidrocarburos	2
1.2. Técnicas físicas, químicas y biológicas para el tratamiento de hidrocarburos	4
1.3. Microorganismos degradadores de hidrocarburos	7
1.4. Objetivos	9
2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	10
2.1. Muestreo y adecuación de las muestras.....	10
2.2. Aislamiento de microorganismos de muestras de agua contaminadas con hidrocarburos	12
2.3. Estudio del metabolismo y cometabolismo	14
2.4. Identificación molecular de las cepas seleccionadas.....	16
2.5. Análisis estadístico	18
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	18
3.1. Colección de microorganismos de muestras de agua contaminadas.....	18
3.2. Selección de microorganismos en base a su capacidad para utilizar hidrocarburos.....	22
3.3. Identificación de las cepas con mayor potencial biodegradador	33
4. CONCLUSIONES	35
BIBLIOGRAFÍA.....	36

RESUMEN

La mala gestión de los residuos por parte de las industrias, en general, ha propiciado un incremento exacerbado de hidrocarburos en los medios acuáticos en las últimas décadas, poniendo en peligro la seguridad de este servicio ecosistémico tanpreciado, así como de todos los seres vivos que lo habitan.

El objetivo de este trabajo consiste en la búsqueda e identificación de microorganismos que posean capacidad degradadora de Benceno, Tolueno y Xileno (BTX), principales componentes del petróleo y que puedan ser empleados en estrategias de biorremediación. Para ello, se tomaron muestras de cuatro puntos contaminados de la costa de Almería y mediante procedimientos de enriquecimiento y siembra en medios selectivos constituidos por BTX, se consiguió obtener un cepario. A continuación, se sometió a este conjunto de bacterias a ensayos de metabolismo y cometabolismo para determinar cuáles de ellas poseían mayor capacidad de degradación de BTX. Finalmente, se seleccionaron las mejores bacterias para llevar a cabo esta labor, y se procedió a su identificación mediante técnicas moleculares.

De las muestras de agua potencialmente contaminadas por hidrocarburos, se aislaron 11 cepas que constituyeron la colección de estudio del presente TFG. Las cepas 1, 6 y 7 mostraron la capacidad no sólo de tolerar la presencia de BTX, sino de utilizar dichos hidrocarburos aromáticos sencillos. Estas tres bacterias, fueron identificadas como *Streptomyces flavoviridis*, *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter xiangfangensis*.

Palabras clave: BTX, hidrocarburos, biorremediación, *Streptomyces flavoviridis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter xiangfangensis*.

ABSTRACT

The inadequate waste management carried out by the petrochemical industry has caused a huge hydrocarbon increases in the aquatic systems during the last few decades, jeopardizing this precious ecosystem service security as well as every being that inhabits it.

In order to find microorganisms able to degrade Benzene, Toluene and Xylene (BTX) that could be used in bioremediation strategies, a screening and identification of microorganisms was conducted. To do so, samples were taken from four different places along the coast of Almería and by means of enrichment procedures and seeding in selective media constituted by BTX, a set of bacteria was obtained. Then, this set of bacteria was subjected to a metabolism and co-metabolism test to determine which one of them had the best degradation capabilities. Finally, the best strains to carry out this labor were selected and identified by molecular techniques.

11 strains were isolated from the sampling points suspected to be polluted, comprising the collection shown in this Bachelor Thesis. Strains number 1, 6 and 7 showed not only hydrocarbon tolerance when they were on their presence, but they could also utilize BTX as a sole carbon source. These three bacteria were identified as *Streptomyces flavoviridis*, *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter xiangfangensis*.

Keywords: BTX, hydrocarbons, bioremediation, *Streptomyces flavoviridis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter xiangfangensis*.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Impacto ambiental en sistemas acuáticos debido a la presencia de hidrocarburos

Los sistemas acuáticos se consideran un patrimonio muy vulnerable a la actividad humana (Cairns y Buikema, 1984) y, por lo tanto, su protección y conservación son un objetivo prioritario de las políticas de la Unión Europea (UE), especialmente desde el lanzamiento de la Directiva Marco del Agua (DMA) en el año 2000 (Directiva 2000/60/CE).

Una de las razones principales para esta fragilidad es la presencia de hidrocarburos, con gran incidencia en las grandes masas de agua. Las formas más comunes de contaminación en este tipo de entornos son debidas a los combustibles procedentes del tráfico marino o al vertido incontrolado de subproductos de la industria petrolífera (extracción de pozos, refinado, transporte y almacenamiento), más concretamente, por medio de derrames que puedan ocurrir por la rotura accidental de los tanques de contención o del sistema de tuberías que los transporta (Beller *et al.*, 1996) (Figura 1). No obstante, los vertidos también pueden ser ocasionados de forma deliberada a través de descargas por camiones cisterna o como consecuencia de la manipulación del crudo en tierra (Tabla 1).



Figura 1. Vertido de petróleo en el Golfo de México debido a una rotura en una tubería de un pozo ubicado en aguas profundas (Schmidt, 2013).

Tabla 1. Fuentes de contaminación por petróleo y cantidad estimada de producto liberado al medioambiente marino (Baker, 1983).

Fuentes	Cantidades (Miles de toneladas)
Accidentes de transporte	390
Operaciones con tanques (lavado)	710
Combustión atmosférica	300
Escorrentías superficiales	1.400
Filtraciones naturales/erosión	300

En cualquier caso, el petróleo termina por filtrarse a los lechos rocosos y arcillas impermeables acabando finalmente en algún cuerpo receptor de agua (océanos, mares, ríos, aguas superficiales de los acuíferos...), dando lugar, en última instancia, a la migración de estos hidrocarburos a regiones lejanas respecto del punto donde se produjo el vertido (Onwurah *et al.*, 2007).

Este tipo de residuos consta fundamentalmente de los siguientes constituyentes: en el caso del petróleo crudo, se trata de una mezcla compleja de compuestos aromáticos policíclicos (PAHs) y otros hidrocarburos (Domask, 1984), incluyendo algunos contaminantes prioritarios como benceno, heptanos, hexanos, isobutanos e isopentanos. Mientras que, en el caso de los combustibles diésel, principalmente empleados por las grandes embarcaciones, la mayoría de los hidrocarburos encontrados son, por una parte, los alcanos (Mackay *et al.*, 1985) que son rápidamente degradados, los isoprenoides que presentan una alta resistencia a la biodegradación, los aromáticos que son moderadamente solubles y, finalmente, los polares que contienen principalmente grupos sulfuro, oxígenos y/o nitrógenos (Onwurah *et al.*, 2007).

La propia naturaleza de los hidrocarburos les confiere un carácter carcinogénico, mutagénico y neurotóxico para los organismos vivos, incluyendo plantas y animales (Das y Chandran, 2011), siendo el plancton el primer grupo de seres vivos afectados. Por ello, las repercusiones de la presencia de este tipo de contaminantes en los sistemas acuáticos suponen tanto un impacto negativo global para el ambiente en su conjunto como para la salud de los animales. De hecho, el petróleo puede afectar a los organismos marinos bien porque directamente les resulte tóxico o bien por ahogamiento físico (Perry, 1980). Por ejemplo, en peces puede causar linfocitosis, hiperplasia epidérmica, septicemia hemorrágica (Beeby, 1993) y en mamíferos actúa como un potencial anticoagulante (Onwurah, 2002).

Asimismo, estos residuos forman una especie de agregados en las superficies marinas que se observan como enormes manchas superficiales que flotan debido a la diferencia de gradientes de densidad (Figura 2).

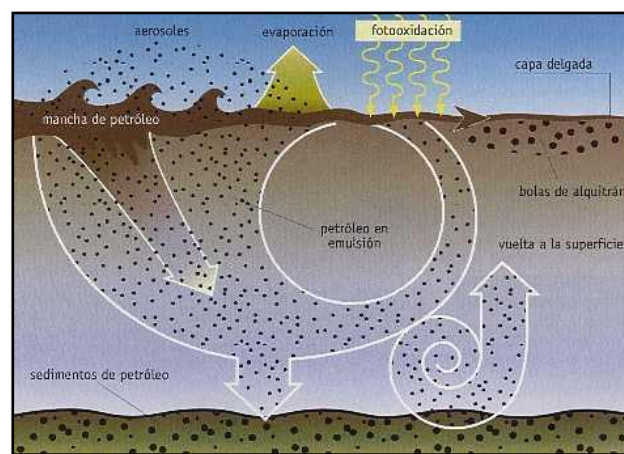


Figura 2. Evolución y comportamiento de las manchas de petróleo en agua (Alfonso *et al.*, 2006).

Estas manchas impiden la adecuada entrada de luz y el intercambio gaseoso con el medio, ocasionando el agotamiento del oxígeno disuelto debido a la transformación de los compuestos orgánicos en compuestos inorgánicos. Dichos agregados cada vez se vuelven más viscosos, formando emulsiones en el agua. Algunos pueden persistir durante un largo periodo de tiempo antes de ser finalmente degradados por microorganismos acuáticos. En definitiva, el petróleo en el agua provoca pérdida de biodiversidad y eutrofización (Onwurah et al., 2007).

1.2. Técnicas físicas, químicas y biológicas para el tratamiento de hidrocarburos

La remediación química, que supone el uso de compuestos químicos con capacidad de cambiar las propiedades físicas y químicas del contaminante (Vergetis, 2002), es una de las alternativas que se han utilizado en labores de remediación de hidrocarburos. Algunas de las ventajas que presenta esta estrategia son la rapidez y el amplio espectro de actuación en cualquier condición climática. Los productos químicos empleados se agrupan en 3 categorías: dispersantes, solidificantes y oxidantes químicos (Akpor *et al.*, 2014):

- **Dispersantes** (mayoritariamente surfactantes): los dispersantes químicos rompen la masa de crudo y ralentizan la formación de emulsiones aceitosas en el agua; esto permite que disminuya la tendencia del mismo a adherirse a superficies y facilita la formación de gotas de aceite de mayor superficie, incrementando con ello la tasa de biodegradación por la microbiota indígena (Nomack y Cleveland, 2010). De este modo, se consiguen transformar los vertidos de petróleo en residuos menos dañinos para la vida acuática.
- **Solidificantes**: se trata de materiales granulares que reaccionan con el petróleo y cambian su estado líquido a sólido, similar a la goma, que puede ser retirado mecánicamente. Pueden ser aplicados de diversas formas, incluyendo partículas secas, materiales semisólidos como bolas, esponjas, etc. Son aplicables en mares moderadamente movidos que proporcionan la energía de mezclado necesaria para mejorar la solidificación. Uno de los inconvenientes que presentan es que son difíciles de recuperar una vez solidificados. También necesitan usarse en mayor cantidad debido a su menor eficiencia de limpieza (Fingas *et al.*, 1995; Nomack y Cleveland, 2010).
- **Oxidantes químicos**: La oxidación química es una técnica que usa agentes químicos capaces de oxidar contaminantes orgánicos (Watts *et al.*, 1990). La oxidación se consigue introduciendo agentes oxidantes al agua contaminada (también puede aplicarse a ambientes terrestres) usando aparatos de inyección o mezclado. La efectividad del proceso depende de la cantidad de oxidante que se use, las condiciones geológicas, el tiempo de residencia del oxidante en el medio y el contacto efectivo entre el oxidante y el contaminante (Karpenko *et al.*, 2008).

Sin embargo, dentro del contexto de Economía Circular que se persigue con las actuales políticas de la UE respecto a la emisión de residuos cero, la biorremediación se postula como un

conjunto de estrategias de enorme interés. Éstas, consisten en el uso de microorganismos para la corrección de un entorno contaminado (Sharma, 2012). Habitualmente se usan microorganismos naturalmente presentes en el entorno para la degradación y metabolización de sustancias peligrosas en sustancias menos o nada tóxicas, permitiendo la restauración de la calidad del ambiente afectado (Mbhele, 2007; Dave y Ghaly, 2011). El objetivo de la biorremediación, en el caso particular de los hidrocarburos, es acelerar el proceso de atenuación natural a través del cual los microorganismos asimilan las moléculas orgánicas generando productos secundarios como dióxido de carbono, agua y calor (Atlas y Cerniglia, 1995).

Algunos de los géneros microbianos mayoritariamente implicados en la degradación de hidrocarburos aparecen representados en la Tabla 2.

Tabla 2. Microorganismos degradadores de hidrocarburos (Zhu *et al.*, 2001; Webb, 2005; Kamath *et al.*, 2004).

Bacterias y actinobacterias	Hongos y levaduras
<i>Achromobacter</i>	<i>Aspergillus</i>
<i>Acinetobacter</i>	<i>Candida</i>
<i>Alcaligena</i>	<i>Clodosporium</i>
<i>Arthrobacter</i>	<i>Penicillum</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Rhodotorula</i>
<i>Brevibacterium</i>	<i>Sporobolomyces</i>
<i>Corynebacterium</i>	<i>Trichoderma</i>
<i>Flavobacterium</i>	<i>Fusarium</i>
<i>Nocardia</i>	
<i>Pseudomonas</i>	

De esta manera, la actividad biológica natural de los microorganismos o sus enzimas transforman los componentes tóxicos del petróleo en metabolitos menos tóxicos o dañinos (Abha y Singh, 2012). La biorremediación, por tanto, es la alternativa preferida en la restauración a largo plazo de sistemas contaminados con hidrocarburos del petróleo. Además, es una técnica de bajo coste, alta eficiencia y respetuosa con el medio ambiente (Okoh y Trejo-Hernandez, 2006). La biorremediación se puede aplicar desde dos puntos de vista:

- **Bioestimulación:** consiste en la adición de nutrientes requeridos por la microbiota indígena (con capacidad degradadora) para alcanzar la máxima degradación de los compuestos tóxicos presentes (Sharma, 2012). Cuando ocurre un derrame de petróleo, el incremento de carbono en el medio estimula el crecimiento de los microorganismos degradadores ya presentes. La adición de micronutrientes como el fósforo o el nitrógeno en las concentraciones adecuadas permite a los microorganismos alcanzar una mayor tasa de crecimiento y con ello, una mayor tasa de degradación (Boufadel *et al.*, 2006; Zahed *et al.*, 2010). Para alcanzar la máxima bioestimulación, el factor más importante es la concentración ideal de nutrientes que los microorganismos necesitan para lograr un

crecimiento óptimo, así como mantener dicha concentración el mayor tiempo posible (Lee *et al.*, 2007).

- **Bioaugmentación:** consiste en la adición de microorganismos que poseen la habilidad de degradar los hidrocarburos, consiguiendo así reducir la cantidad de contaminantes (Sharma, 2012). Esto puede suponer a veces la adición de microorganismos modificados genéticamente, diseñados para la degradación de los hidrocarburos contaminantes (Gentry *et al.*, 2004). Se debe tener en cuenta que, puesto que los entornos ambientales contienen naturalmente microorganismos con capacidad degradadora, el hecho de emplear la inoculación con microorganismos alóctonos mediante la bioaugmentación, por ejemplo, en aguas contaminadas con petróleo, podría dar lugar al establecimiento de relaciones de competencia con la microbiota indígena beneficiosa. Por esta razón, la elección de los microorganismos en base a su adaptación al entorno es de especial importancia. De todos modos, un microorganismo habitualmente sólo puede descomponer un rango limitado de hidrocarburos. Por ello, en ambientes naturales los procesos de degradación de estos compuestos se llevan a cabo con la participación de diferentes especies microbianas (Hassanshahian *et al.*, 2014). Esto da idea de que una implementación de esta estrategia pasaría por el estudio de la aplicación de consorcios microbianos.

Dentro de las estrategias potencialmente utilizables para la biorremediación de ambientes contaminados con hidrocarburos se encuadran diversas técnicas de interés, especialmente aquellas con aplicación *ex situ*:

- **Fitorremediación:** uso de plantas, así como de los microorganismos asociados a ellas, para la degradación, extracción, reducción, contención o inmovilización de contaminantes en los suelos, lodos, aguas subterráneas y superficiales y aguas de deshecho. El proceso usa la habilidad de las plantas para incorporar, acumular y degradar constituyentes que están presentes en entornos contaminados (Mbhele, 2007; FRTR, 2012).

- **Compostaje:** consiste en la transformación aerobia de residuos o contaminantes debido a la acción de los microorganismos. En el caso particular de los hidrocarburos, algunos autores han señalado que, mediante la adición de paja, compost, excrementos, etc., se puede mejorar la degradación de PAHs. Esto se debe a que dichos materiales estimulan el crecimiento de los microorganismos, proveyendo a las distintas poblaciones de la energía necesaria para llevar a cabo distintas tareas que permiten, por ejemplo, mejorar la textura del suelo o la transferencia del oxígeno (Haritash y Kaushik, 2009). Wischmann y Steinhart (1997) indicaron que en suelos a los que no se les había añadido alguna enmienda, sólo se degradaron compuestos aromáticos con un máximo de 3 anillos fusionados, mientras que en suelos suplementados con compost se observó la degradación de todos los compuestos monitorizados. Wong *et al.*, (2002) comprobaron que la adición de una dosis del 25% de excremento de cerdo como enmienda puede mejorar la cantidad de carbono orgánico soluble, de nitrógeno y de fósforo incrementando el número de

bacterias termófilas y mesófilas degradadoras de PAHs en un estadio temprano del compostaje, aumentando la degradación total hasta un 90%. De esta manera, los PAHs de 3 anillos pueden ser degradados en las 3 primeras semanas de compostaje mientras que los PAHs de 4 anillos o más, precisan de un tiempo superior a 5 semanas; esto puede ser debido al coeficiente de partición del carbono orgánico, así como a su alto peso molecular.

Las grandes ventajas de la biorremediación por encima de otras técnicas de remediación son:

- Bajo coste
- Ahorro de tiempo requerido por los operarios para limpiar el sitio contaminado.
- Técnica respetuosa con el medio ambiente debido a que no se usan compuestos que no se encuentran ya naturalmente presentes, evitando la disrupción del hábitat (Dave y Ghaly, 2011). Los microorganismos degradan los hidrocarburos generando productos que no son dañinos para el entorno. También, la eliminación *in situ* del contaminante, evita que éste tenga que ser transportado a otro lugar impidiendo la ocurrencia de un nuevo derrame.

A pesar de las ventajas expuestas, uno de los inconvenientes que posee este conjunto de técnicas es que se trata de procesos lentos y, dependiendo de donde ocurra el vertido, será más o menos complicado inocular con microorganismos foráneos o proporcionar a la microbiota indígena los nutrientes necesarios para la adecuada degradación (Dave y Ghaly, 2011).

Precisamente, el estudio pormenorizado de los agentes con potencial biotecnológico es la base para la optimización de estas estrategias económica y ambientalmente sostenibles.

1.3. Microorganismos degradadores de hidrocarburos:

Las actinobacterias realizan un papel fundamental en ambientes que han sido contaminados por petróleo, puesto que son capaces de mineralizar hidrocarburos aromáticos policíclicos (Adegboye y Babalola, 2012). Precisamente, uno de los géneros bacterianos más explotados en bioprocesos no convencionales es *Rhodococcus*, un grupo único consistente en microorganismos que presentan una gran diversidad metabólica, capaz de transformar, biodegradar y utilizar como única fuente de carbono compuestos hidrófobos. Se trata de actinobacterias cuyas cepas están caracterizadas bioquímicamente como productoras de poli-3-hidroxiacanoatos, capaces de acumular metales pesados y enzimas útiles como la fenilalanina deshidrogenasa y endoglucosidasas. En general, las especies del género *Rhododoccus* poseen una gran variedad de vías metabólicas para la degradación y modificación de compuestos aromáticos, incluyendo las actividades di-oxigenasa y mono-oxigenasa sobre anillos, así como la actividad de rotura del catecol. Algunas cepas presentan también la vía del 3-oxoadipato. Lo anterior sumado a su capacidad de crecimiento en medios con escasos nutrientes, la carencia de un sistema de represión catabólica y su persistencia ambiental, las convierten en excelentes candidatos para los tratamientos de biorremediación (Flavio *et al.*, 1999).

Una característica muy importante de *Rhodococcus* spp. en el contexto de este trabajo es su capacidad para utilizar el dibenzotiofeno (DBT) como única fuente de azufre, siendo el DBT y sus derivados, los compuestos órganoazufrados más abundantes en el diesel primario. De hecho, cepas de este género microbiano han sido aisladas en zonas contaminadas con petróleo, observándose la capacidad de desulfurar muestras de diésel. Otros microorganismos referenciados por su capacidad de utilizar el DBT como fuente de azufre pertenecen a los géneros *Gordona* y *Nocardia* (López de Mesa *et al.*, 2006).

Otro grupo microbiano muy asociado a la degradación de hidrocarburos son las bacterias del género *Pseudomonas*, ya que poseen la habilidad de utilizar diversos sustratos, incluyendo aquellos tan tóxicos y recalcitrantes como los presentes en el petróleo. Estas bacterias Gram negativas y que pertenecen a la subclase gamma de las *Proteobacterias*, poseen la habilidad de producir biosurfactantes como los ramnolípidos involucrados en procesos de eliminación de aceites y productos relacionados. A Bushnell y Hass (1941) se les atribuye una de las primeras descripciones de bacterias productoras de biosurfactantes, entre las que se encuentran diferentes cepas de *Pseudomonas* (Flavio *et al.*, 1999; Nelson *et al.*, 2002) o, por ejemplo, la especie *Corynebacterium simplex*. Algunos microorganismos productores de biosurfactantes extracelulares que solubilizan y facilitan la penetración de los hidrocarburos a través de la pared celular hidrofílica, contienen además enzimas degradadoras de hidrocarburos en la membrana citoplasmática. *Pseudomonas aeruginosa* es otro de los microorganismos más usado y estudiado en biorremediación y presenta una serie de actividades naturales que le permiten actuar sobre xenobióticos. Lamentablemente, también es conocida por ser un patógeno oportunista en humanos y causante de complicaciones graves en personas inmunodeprimidas, con quemaduras severas o con fibrosis quística. Por estas razones existe mucho interés en el estudio de las relaciones filogenéticas entre serotipos clínicos y ambientales (Rockne *et al.*, 2000). Otra especie del mismo género, *Pseudomonas putida*, un saprofito del suelo, metabólicamente versátil por poseer una dioxigenasa inicial, una tolueno-dioxigenasa, aunque no presenta la dioxigenasa específica para los PAHs, es considerada una buena candidata para diversas aplicaciones biotecnológicas, desde agricultura, biocatálisis, producción de bioplásticos hasta diversas estrategias de biorremediación (Daane *et al.*, 2001). La degradación de los alcanos por *Pseudomonas putida* se ha estudiado por secuenciación del plásmido OCT que codifica una enzima dioxigenasa que convierte alcanos a aldehídos a través de la hidroperoxidación del grupo n-alquilo sin un intermediario del alcohol, conocido como la vía de Finnerty. Un proceso similar lo presentan los géneros *Acinetobacter* y *Nocardiodetes*, aunque estos últimos no poseen este plásmido. Siguiendo con el género *Pseudomonas*, *P. fluorescens* es degradadora de naftaleno y fenantreno, lo cual le confiere una ventaja frente a otras cepas del mismo género que sólo metabolizan naftaleno y asfaltenos (Rockne *et al.*, 2000). Estudios realizados demuestran que *Flavobacterium* y *Pseudomonas* son los microorganismos más aislados en la fase de degradación de los Hidrocarburos Policíclicos Totales (HPT). Siguiendo en esta línea, otra especie de *Pseudomonas* considerada de interés es *P. stutzeri*, una degradadora de PHAs (Kästner *et al.*, 1998). Además, diferentes subclases de las *Proteobacterias*, además de *Pseudomonas* spp., como *Sphingomonas* spp., *Acidovorax* spp. y *Comamonas* spp., son consideradas capaces de

metabolizar naftaleno y fenantreno como única fuente de carbono y, por ello, potenciales agentes para estrategias de biorremediación.

Otros géneros bacterianos destacados en tareas de biorremediación incluyen, por ejemplo, a *Burkholderia*, concretamente por su capacidad para degradar herbicidas y pesticidas recalcitrantes. Además, algunas cepas de la especie *Burkholderia cepacia* se han descrito como excelentes degradadoras de hidrocarburos aromáticos (Svenja *et al.*, 1999). A ésta se añaden otros microorganismos como *Acinetobacter baumani*, considerada eficiente en la degradación de fracciones de alcanos (Díaz *et al.*, 2002); *Mycobacterium austroafricanum*, aislada de acuíferos contaminados con gasolina, con capacidad degradadora de benceno, tolueno, etilbenceno y n-alcenos, este microorganismo también es capaz de usar el isoctano (2,2,4-trimetilpentano) como única fuente de carbono y energía; *Azoarcus* spp., se ha descrito como un microorganismo degradador de benceno, tolueno, etilbenceno y xileno (Hideki *et al.*, 2000; Carla *et al.*, 2004). Finalmente, otros microorganismos como *Comamonas acidovorans*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Achromobacter* sp., *Flavobacterium devorans*, *Bacillus lentus*, *Bacillus mascerans* y *Bacillus thuringensis* han sido aplicados con buenos resultados en la biodegradación del bifenil policlorinado PCBs y otros hidrocarburos (Jizhong *et al.*, 2001; De Boer *et al.*, 2003).

En definitiva, entre las alternativas para el tratamiento de zonas contaminadas con hidrocarburos, se encuentra la aplicación de técnicas de biorremediación que consisten en aprovechar la capacidad metabólica de diversos microorganismos (levaduras, bacterias, hongos, microalgas), para degradar y biotransformar estos contaminantes (Hassanshahian *et al.*, 2012). El aislamiento y selección de microorganismos de zonas contaminadas con hidrocarburos constituye un paso muy importante para el estudio, desarrollo e implementación de los métodos de biorremediación, debido a que la selección natural, producto de la dinámica metabólica de cada microorganismo, hace que en estas zonas predominen los que tienen mayor capacidad para tolerar y degradar estas sustancias (Gentili *et al.*, 2006).

1.4. Objetivos

Los sistemas acuáticos están sometidos a la creciente presión que supone el continuo incremento de su demanda, de buena calidad y en cantidades suficientes para todos los usos. Por ello, surge la necesidad de tomar medidas para proteger las aguas, tanto en términos cualitativos como cuantitativos, y garantizar así su sostenibilidad. En este contexto, se plantea el objetivo principal de este TFG, como el estudio y la selección de aquellos microorganismos que, presentes en el mismo foco de contaminación, exhiban un perfil degradador de hidrocarburos que los convierta en potenciales herramientas biotecnológicas en tareas de biorremediación, de un modo sostenible con el medioambiente y seguro para la biodiversidad de dichos hábitats.

Para la consecución de dicho objetivo principal, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Aislar microorganismos de muestras contaminadas con hidrocarburos.
2. Seleccionar las mejores cepas para su empleo en estrategias de biorremediación, en base a su capacidad para tolerar la presencia de hidrocarburos.
3. Demostrar la capacidad de los microorganismos seleccionados para crecer empleando los hidrocarburos ensayados como únicas fuentes de carbono y energía.
4. Identificar molecularmente los potenciales agentes con interés biotecnológico.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

El objeto principal de estos ensayos fue caracterizar y seleccionar microorganismos presentes en muestras de agua afectadas por la presencia de derivados del petróleo, que presenten potencial como agentes degradadores de hidrocarburos aromáticos: tolueno, benceno y xileno.

En primer lugar, se aislaron microorganismos de las muestras de agua contaminadas para constituir una colección de trabajo (Objetivo 1).

Los microorganismos de la colección se sometieron a un ensayo cualitativo para la caracterización de su espectro de actuación sobre placas de medio general adicionadas con los compuestos a ensayar (tolueno, benceno y xileno) para comprobar la posible toxicidad de estos sobre los microorganismos. A partir de los resultados de este ensayo, se seleccionaron las cepas con potencial biodegradador (Objetivo 2).

Mediante la evaluación del crecimiento microbiano, se determinó la capacidad de las cepas no sólo para soportar la presencia, sino para degradar los tres hidrocarburos aromáticos utilizados como única fuente de carbono y energía (Objetivo 3).

Por último, las cepas que presentaron el mayor potencial se identificaron mediante extracción de ADN, amplificación, secuenciación y comparación en bases de datos del NCBI mediante la herramienta bioinformática BLAST (Objetivo 4).

A continuación, se describen detalladamente cada uno de los experimentos indicados.

2.1. Muestreo y adecuación de las muestras

Para el recuento y aislamiento de los microorganismos se recogieron muestras de 4 puntos susceptibles de estar contaminados con hidrocarburos en la costa de Almería (Figura 3):

1ª Muestra: gasolinera para barcos situada en el lateral del cargadero de mineral (36°49'53.7"N 2°27'48.3"W, cruz verde en el mapa) en el puerto de Almería

2ª Muestra: zona próxima al faro de Almería (36°49'32.4"N 2°27'49.9"W, cruz roja en el mapa)

3ª Muestra: zona cercana a la piscifactoría de Aguadulce (36°48'57.0"N 2°31'17.1"W).

4ª Muestra: tomada en el espacio adyacente a dos barcos mercantes (36°49'39.6"N 2°28'40.7"W, cruz amarilla en el mapa).



Figura 3. Imagen del Puerto de Almería donde aparecen representados los tres puntos de toma de muestras correspondientes a esa zona (Google Maps).

Para constituir la colección de cepas objeto de estudio se siguieron diferentes estrategias. De esta manera, para el primer punto de muestreo (gasolinera para barcos), aparentemente susceptible de alta contaminación, se tomaron 3 repeticiones, mientras que, para el segundo, tercero y cuarto punto, sólo se tomó una repetición obteniendo un total de 6 frascos de muestras.

En todos los casos, el muestreo se llevó a cabo como sigue: se sumergió un frasco de 1 Litro de capacidad previamente esterilizado, para evitar la presencia de una alta carga microbiana ajena a la propia del lugar de muestro, bajo la superficie de aguas que presentaban una apariencia sospechosa de estar contaminada, por ejemplo, grandes manchas de aspecto aceitoso. Los frascos con el agua de muestra se mantuvieron a temperaturas de refrigeración para su conservación y posterior procesamiento. A continuación, se filtraron para conseguir una concentración de la posible biomasa retenida en los filtros. Para ello se empleó un sistema de filtración clásico compuesto por una bomba de vacío conectada a un Matraz Kitasato y un filtro esterilizante de 0,45 μm (Figura 4). La biomasa retenida en el filtro se resuspendió en un frasco ISO (debidamente etiquetado con la posición del punto de muestra) en un volumen de 100 mL de H₂O destilada estéril (Figura 4).



Figura 4. Concentración de la biomasa microbiana procedente de 1L de muestra de agua de mar en 100 mL de agua estéril.

2.2. Aislamiento de microorganismos de muestras de agua contaminadas con hidrocarburos

En el siguiente esquema se detallan los experimentos llevados a cabo para el establecimiento de la colección de microorganismos (Figura 5). A continuación, se describen detalladamente cada uno de los experimentos indicados.

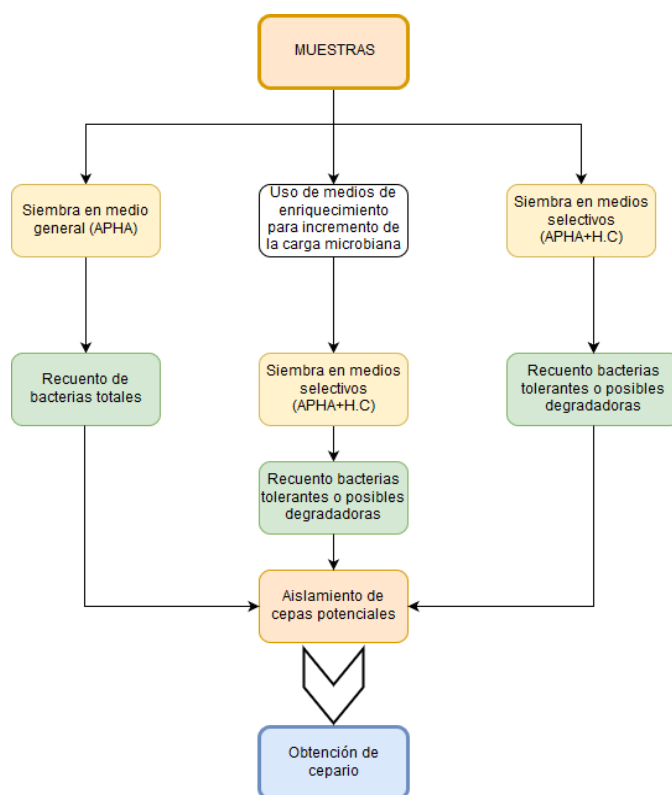


Figura 5. Esquema del diseño experimental seguido para la obtención del cepario.

Con objeto de llevar a cabo un recuento de microbiota viable (rama izquierda del esquema, en Figura 5), se llevó a cabo una siembra en superficie empleando como volumen de inoculación 100 μL de muestra obtenidos directamente del bote ISO (biomasa resuspendida del filtro), así como a partir de esta misma muestra sometida a diluciones decimales seriadas empleando eppendorfs con 900 μL de solución salina estéril (NaCl al 0,9% p/v) con objeto de reducir la posible carga microbiana, en concreto, llegando hasta la dilución 10^{-2} . La siembra se hizo mediante la extensión de un volumen (0,1 mL de muestra) en la superficie de placas Petri con un medio sólido ordinario APHA (Panreac). Tras 24 horas de incubación a 30 $^{\circ}\text{C}$, se llevó a cabo el recuento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC).

Una vez hecho el recuento general, se procedió al aislamiento de los morfotipos interesantes en medios selectivos. Para ello, en primer lugar, a partir exclusivamente de la Muestra 1 se hicieron siembras en superficie (siguiendo los pasos del caso anterior) en medios selectivos (rama derecha del esquema, en Figura 5) elaborados mediante la adición a un medio general (APHA) de 5 mL de TWEEN 80, un emulsionante necesario para una buena homogenización del hidrocarburo en el medio, y 5 mL de benceno, xileno (RPL-UCB,Bélgica) o tolueno (Merck), según cada caso, incorporados al matraz, tras ser autoclavado el medio general (120 $^{\circ}\text{C}$ durante 20 minutos), usando una jeringuilla con un filtro estéril para materiales orgánicos de nitrato de celulosa de 0,8 μm de poro (Sartorius Stedim Biotech GmbH,Goettingen, Alemania) en condiciones de asepsia (Figura 6). Tras 24 horas de incubación a 30 $^{\circ}\text{C}$, se llevó a cabo el recuento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC).

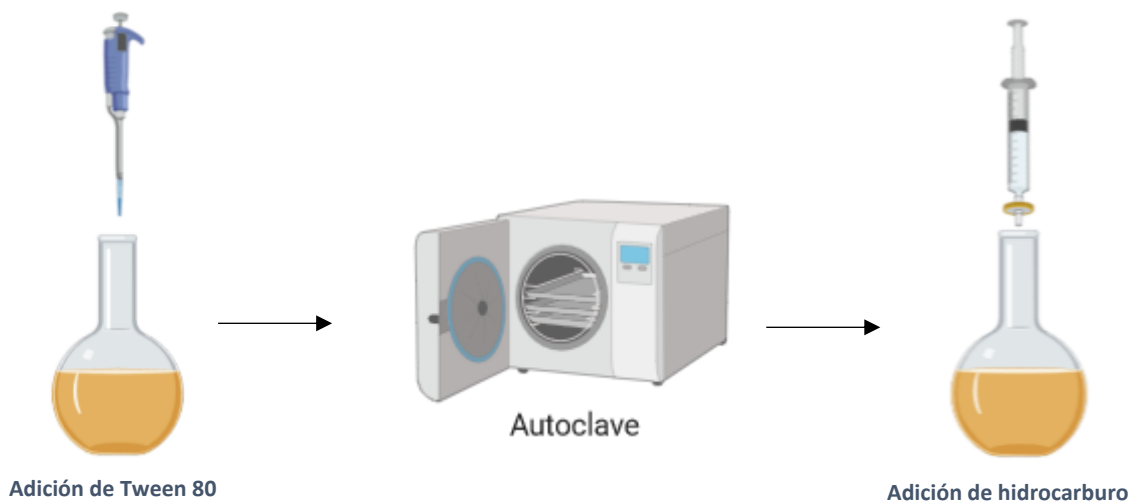


Figura 6. Preparación de medios de cultivo selectivos adicionados con los hidrocarburos ensayados.

Además, los morfotipos interesantes procedentes de las siembras en superficie en medio general, se tomaron con un asa de siembra y se realizó una siembra en aislamientos en los medios selectivos previamente preparados, por agotamiento en estrías. También se llevó a cabo

(tal y como muestra la rama derecha del esquema de diseño experimental, en Figura 5), la siembra directa desde los frascos ISO de las muestras del punto de Muestra 1 en medios selectivos con objeto de probar la tolerancia de las cepas a la toxicidad de los hidrocarburos. Todas las placas se incubaron durante 24 horas a 30 °C.

Debido a la baja carga microbiana encontrada con este método, para el resto de las muestras (2, 3 y 4) se probó otra estrategia que permitiera estimular el crecimiento de los microorganismos, presentes en ellas (rama central del esquema, en Figura 5). Para ello, se emplearon medios líquidos de enriquecimiento, para incrementar la carga bacteriana, y posterior siembra en medios selectivos. Los cultivos de enriquecimiento se prepararon suspendiendo 5 mL de cada muestra objeto de estudio en frascos ISO de 1 litro de capacidad que contenían 45 mL de un medio líquido compuesto de (L⁻¹): 10 g de glucosa, 2 g de extracto de levadura, 300 mL de Medio Mínimo de Sales (MMS) y 700 mL de agua destilada. Tras 21 días de incubación, se llevaron a cabo diluciones decimales seriadas (hasta 10⁻⁶) de cada uno de los frascos de enriquecimiento. A continuación, se sembraron las diluciones 10⁻⁴, 10⁻⁵ y 10⁻⁶ en medios sólidos selectivos, preparados como se ha mencionado anteriormente: APHA + Tolueno, APHA + Benceno y APHA + Xileno, a partir de cada uno de los frascos ISO conteniendo medios de enriquecimiento con Muestras 2, 3 y 4. Tras 24 horas de incubación a 30 °C, se llevó a cabo el recuento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC).

Los resultados de todos los recuentos fueron expresados en UFC/mL, de acuerdo con la siguiente fórmula:

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

Paralelamente, se llevó a cabo una caracterización preliminar de las cepas por medio de una observación a microscopio óptico (Leica DMP4) de la forma celular de cada bacteria constituyente del cepario, así como de su clasificación mediante la tinción diferencial de Gram. Todas las cepas fueron sometidas a la siguiente fase experimental: estudio del metabolismo y cometabolismo de las bacterias candidatas.

2.3. Estudio del metabolismo y cometabolismo

En esta fase se llevó a cabo un estudio del crecimiento diferencial que mostraban las bacterias en MMS con glucosa e hidrocarburo y en MMS sólo con hidrocarburo como fuente de carbono y energía.

Para ello, se prepararon 6 frascos ISO de 200 mL, 3 de ellos con la composición especificada en la Tabla 3 (con glucosa y tolueno, glucosa y benceno y glucosa más xileno) y otros 3 frascos ISO, con la composición mostrada en la tabla 3, pero sin glucosa y sólo con hidrocarburos como

única fuente de carbono (Paso 1 del esquema, en Figura 7). Se autoclavaron a 121 °C durante 20 minutos y se añadió el hidrocarburo ensayado a cada frasco usando un filtro esterilizante de 0,45 µm de tamaño de poro para compuestos orgánicos acoplado a una jeringuilla.

Tabla 3. Preparación de medios de cultivo para estudio del metabolismo y cometabolismo de las bacterias aisladas en el Objetivo 1.

Componentes	Cantidad
H₂O destilada	105 mL
Glucosa	1,5 g
Sales de Janshekar A, B y C	15 mL sal A, 15 mL sal B, 15 mL sal C
Hidrocarburo (Tolueno, Benceno o Xileno)	75 µL del Hidrocarburo correspondiente
TWEEN 80	75 µL

De esta manera, se ensayó a lo largo de 3 semanas, un solo compuesto por semana, en las dos condiciones antes descritas (por una parte, glucosa e hidrocarburo y, por otra parte, sólo hidrocarburo). Al inicio de cada semana, se prepararon tantos tubos falcon como cepas preparados con el hidrocarburo a ensayar y glucosa, e igual número sólo conteniendo el hidrocarburo objeto de ensayo. A continuación, a partir de cada tubo falcon inoculado (Paso 2 del esquema, en Figura 7), se llevaron a cabo diluciones decimales seriadas (hasta 10⁻⁶) en tubos eppendorfs de 1,5 mL con 900 µL de solución salina estéril (NaCl 0,9%, p/v) y se efectuó una siembra en superficie con bolitas de vidrio estériles directamente de los falcon y de cada uno de los eppendorfs de diluciones en placas de Petri con medio de cultivo sólido general APHA (Paso 3 del esquema, en Figura 7).

Los falcons inoculados, así como las placas sembradas, se devolvían tras cada sesión de trabajo a la cámara de incubación (30 °C) para que continuara el proceso de crecimiento de los microorganismos (Paso 4 del esquema, en Figura 7).

De esta manera, cada día se llevaba a cabo el recuento de UFC/mL de las placas sembradas el día anterior, y se realizaban las siembras correspondientes a ese día empleando los tubos falcon inoculados que se habían dejado en incubación.

Al final de cada semana, se obtuvieron datos de recuentos correspondientes a 5 días de ensayo con cada uno de los hidrocarburos probados, en las dos condiciones especificadas (Hidrocarburo + Glucosa y Sólo hidrocarburo).

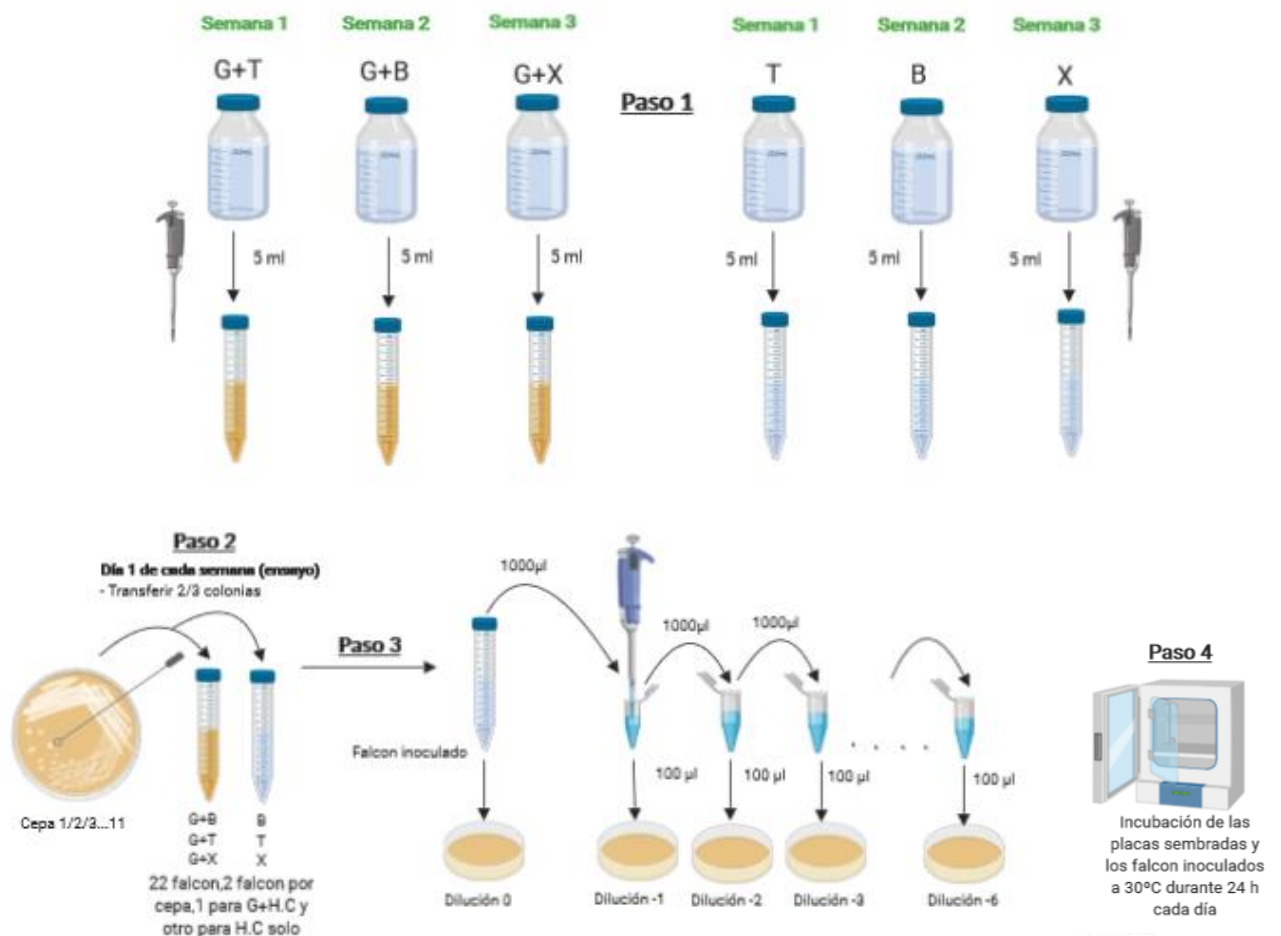


Figura 7. Esquema del diseño experimental de los ensayos de metabolismo y cometabolismo.

2.4. Identificación molecular de las cepas seleccionadas

A partir de los resultados obtenidos en los ensayos de metabolismo y cometabolismo, se seleccionaron aquellas cepas que poseían mayor capacidad para la degradación de los hidrocarburos y se procedió a su identificación molecular.

La identificación se llevó a cabo mediante la amplificación y secuenciación de la secuencia de ADN correspondiente a la subunidad 16S ribosomal. El ADN bacteriano se extrajo tras someter a cada cepa a un choque térmico convencional (5 minutos a 100 °C y 5 minutos a 0 °C). Para ello, la biomasa de las cepas seleccionadas se resuspendió en eppendorfs con 500 µL de H₂O destilada estéril, a continuación, se posicionaron los eppendorfs en un bloque térmico a 100 °C durante 5 minutos. Tras esos 5 minutos, se colocaron los eppendorfs en un recipiente de aislamiento térmico con hielo durante otros 5 minutos. Una vez conseguido el extracto de ADN de cada una de las bacterias, se procedió a amplificar los fragmentos utilizando un termociclador MyCycler (Biorad, California, EEUU) mediante PCR empleando los cebadores especificados en la Tabla 4 y con las condiciones de amplificación mostradas en la Figura 8.

Tabla 4. Cebadores empleados.

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

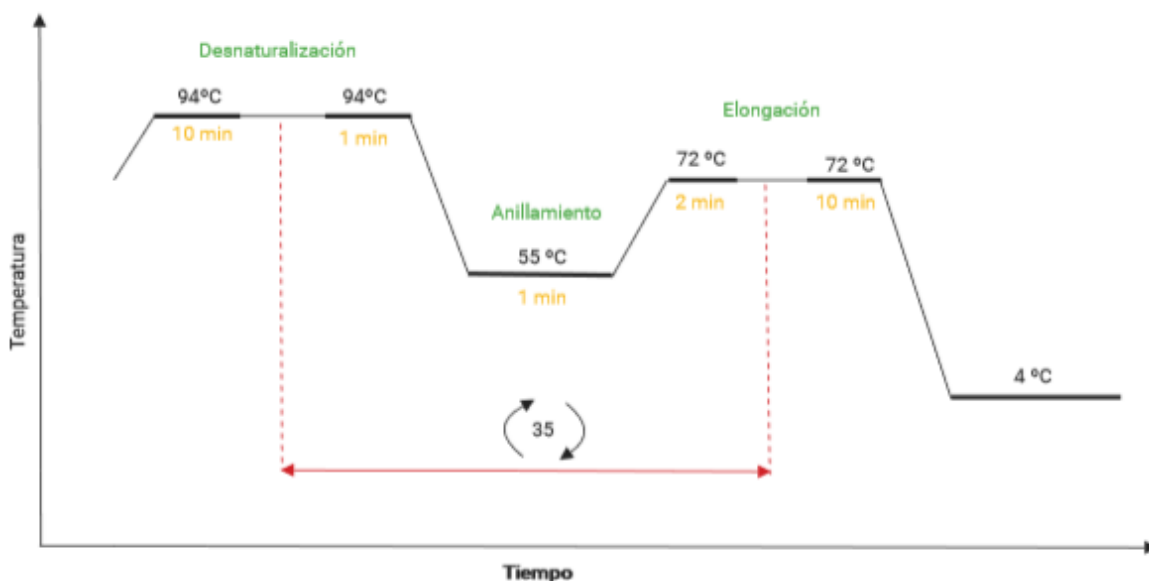


Figura 8. Perfil térmico para la amplificación del gen 16S ARN ribosomal.

La mezcla para la amplificación estuvo constituida por 5 μ L de ADN de la muestra problema, 0,4 μ L del cebador *Forward* y otros 0,4 μ L del cebador *Reverse*, 10 μ L de mix de PCR 2x Biomix Red (Bioline) y 4,2 μ L de agua destilada para alcanzar los 20 μ L de volumen total.

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.

Para el diseño de las figuras número 4,6,7 y 8 se empleó el software Biorender (<https://app.biorender.com/signin>)

2.5. Análisis estadístico

Todos los resultados fueron procesados mediante el programa Microsoft Office Excel 2010 para Windows, así como sus gráficas correspondientes. 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

En consonancia con los objetivos planteados en este TFG seguidamente se exponen los resultados obtenidos en las distintos ensayos llevados a cabo durante la parte experimental del trabajo, incluyendo la determinación de la carga microbiana en las muestras de agua contaminada, la carga microbiana total a partir del uso de medios de enriquecimiento seguido de siembra en medios selectivos, la confección del cepario con la información obtenida en los recuentos (Figura 5), el estudio del metabolismo y cometabolismo del cepario (Figura 7) así como los resultados de la identificación molecular de las cepas finalmente seleccionadas (Apartado 3.3).

3.1. Colección de microorganismos de muestras de agua contaminadas

Para la determinación de la carga microbiana total, las muestras procedentes de los distintos puntos de la costa de Almería se sembraron directamente en medios generales sólidos (APHA) y se efectuaron recuentos de UFC/mL en placa tras 24 horas de incubación. Estos resultados se muestran en la Figura 9.

Como se observa en la Figura 9, la muestra que mayor carga microbiana presentó es la correspondiente al punto de muestreo del agua presente entre los dos barcos mercantes (Punto 4) (233,33 UFC/mL), mientras que el punto donde menor recuento microbiano se obtuvo fue en el faro (Punto 2) (sólo 10 UFC/mL). La reducida carga microbiana que se obtuvo en el faro pudo ser debida a que esta zona se encuentra menos resguardada de corrientes marinas debido a la ausencia de un espigón rocoso (no como en las muestras de la gasolinera (Punto 1) o los barcos mercantes), impidiendo el asentamiento de los microorganismos; de la misma manera ocurre con las muestras de la piscifactoría (Punto 3), las cuales presentaron una carga microbiana

similar a las del faro (16,66 UFC/mL). Por su parte, la mayor carga microbiana obtenida entre los barcos mercantes pudo ser debida a que esta zona presentaba aguas más tranquilas, favoreciendo el asentamiento de los microorganismos. Esto coincide con lo observado respecto a la carga microbiana presente en las aguas superficiales de la gasolinera de barcos (82,2 UFC/mL), relativamente similar a la de los barcos mercantes. De hecho, en las aguas de los Puntos 1 y 4 se podía observar aparentemente más contaminación orgánica, lo cual implicaría que esa mayor presencia de carga microbiana, estaría constituida por microbiota indígena adaptada a tales circunstancias y, por tanto, capaz de tolerar o, en el mejor de los casos, degradar los hidrocarburos presentes.

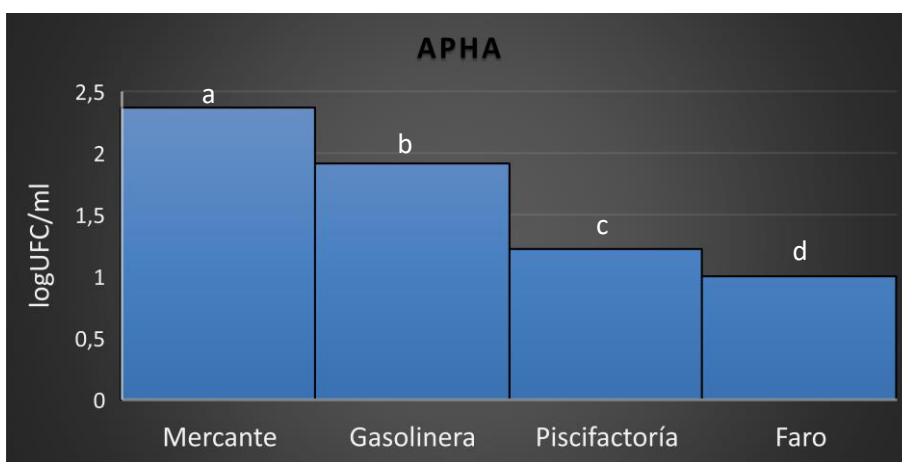


Figura 9. Carga bacteriana total de las muestras en los distintos puntos de muestreo tomados en la Costa de Almería, tras efectuar la siembra en medios generales (APHA). Valores expresados en Logaritmo de Unidades Formadoras de Colonias por mL (log UFC/mL). Los valores con diferentes letras son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Como se explicó anteriormente (ver apartado 2.1.), se siguieron dos estrategias distintas con objeto de aislar un número suficiente de microorganismos aislados de las aguas contaminadas, que pudieran formar parte de la colección de cepas estudiadas. En la Figura 10 se muestran los resultados procedentes de la primera de ellas, correspondiente a la muestra de la gasolinera de barcos (Punto 1). En la siguiente gráfica (Figura 10) se muestra la carga microbiana total obtenida tras efectuar las siembras en medios selectivos (APHA+Hidrocarburo), en comparación con la carga microbiana obtenida tras la siembra en medio general (APHA). Como se observa, la carga microbiana total se ve reducida cuando los microorganismos están en presencia de los hidrocarburos, generando un recuento de 48,889 UFC/mL en las placas de APHA + Tolueno; 47,7778 UFC/mL en las placas de APHA + Benceno; y 46,6667 UFC/mL en las de APHA + Xileno. A pesar de la reducción de carga al sembrar las muestras en medios selectivos (de unas 34 UFC/mL de media con respecto a la siembra en medio general APHA), los microorganismos podían continuar creciendo, poniendo de manifiesto que, *a priori*, presentaban tolerancia a la toxicidad por parte de estos compuestos. Algunos de ellos ya mostraban indicios de degradación

pudiendo observarse halos de aclaramiento, debidos a la modificación de la estructura del medio por parte de la bacteria, en torno a las colonias crecidas en los medios sólidos con los compuestos ensayados (Figura 11).

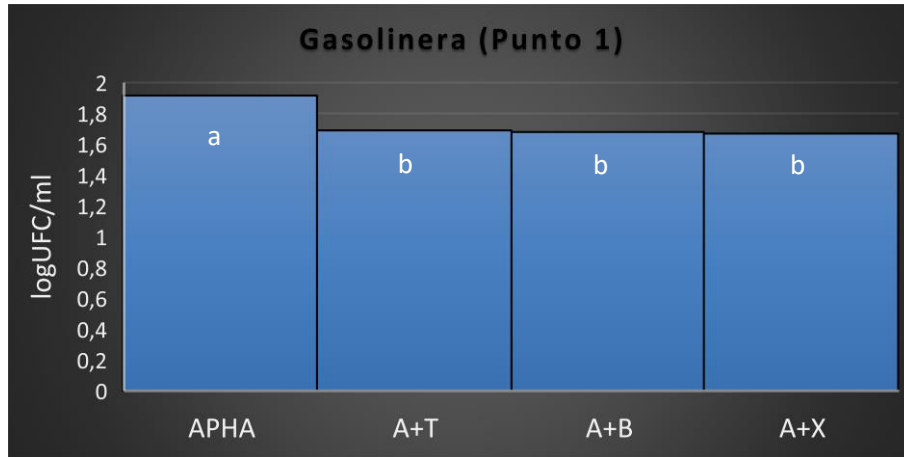


Figura 10. Carga bacteriana total de la muestra correspondiente al primer punto de muestreo tomado en la gasolinera para barcos deportivos del puerto de Almería, tras efectuar la siembra en medios generales y selectivos (APHA y APHA + Hidrocarburos, respectivamente). A+T: APHA + Tolueno; A+B: APHA + Benceno; A+X: APHA + Xileno. Valores expresados en Logaritmo de Unidades Formadoras de Colonias por mL (log UFC/mL). Los valores con diferentes letras son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

La diversidad microbiana presente en las aguas del punto de muestreo 1, tras la siembra directa de las muestras en medio selectivo de APHA + Xileno, se observa en las fotografías que aparecen en la Figura 11. Además, se muestra el morfotipo correspondiente a la Cepa 4 aislado en el medio selectivo de APHA + Tolueno, donde se aprecian los halos de aclaramiento debidos a la transformación y modificación de los componentes del medio.

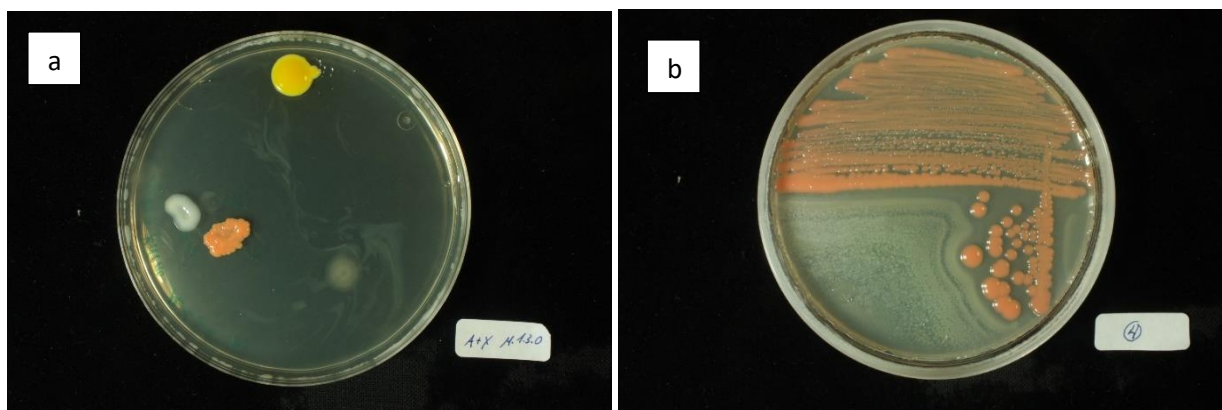


Figura 11. Fotografías de diferentes bacterias aisladas de la muestra de agua recogida en la gasolinera para barcos (Punto 1): a) Diversos morfotipos coloniales aislados tras la siembra en superficie en placa de Petri con medio APHA + Xileno; b) Halos de aclaramiento por parte de la Cepa 4 observados en la placa con medio de APHA + Tolueno.

Debido a que la carga microbiana de partida presente en las muestras del faro, la piscifactoría y los barcos mercantes fue relativamente pobre, se decidió incrementar la concentración de microorganismos empleando medios de enriquecimiento, segunda estrategia descrita en el apartado 2.1., sin efectuar previamente una siembra en medios selectivos. También se usaron medios de enriquecimiento para incrementar la carga de las muestras de la gasolinera de barcos.

En la figura 12 se presentan los resultados correspondientes a la carga microbiana presente en cada punto de muestreo, tras ser sometidos a medios de enriquecimiento y sembrados en medios selectivos (A+T, A+B, A+X), en comparación con la carga obtenida en las siembras de medio general APHA. Como se puede observar, la microbiota de cada punto de muestreo mostró un incremento en su carga similar y proporcional a la carga que presentaron de partida en los medios generales de APHA, excepto dos casos particulares: a pesar de la reducida carga microbiana de partida de las muestras de la piscifactoría (respecto a las muestras de la gasolinera y del barco mercante), las bacterias de dicha muestra consiguieron superar en UFC/mL a la microbiota de las muestras de la gasolinera y del barco mercante cuando fueron aisladas en APHA + tolueno y APHA + benceno.

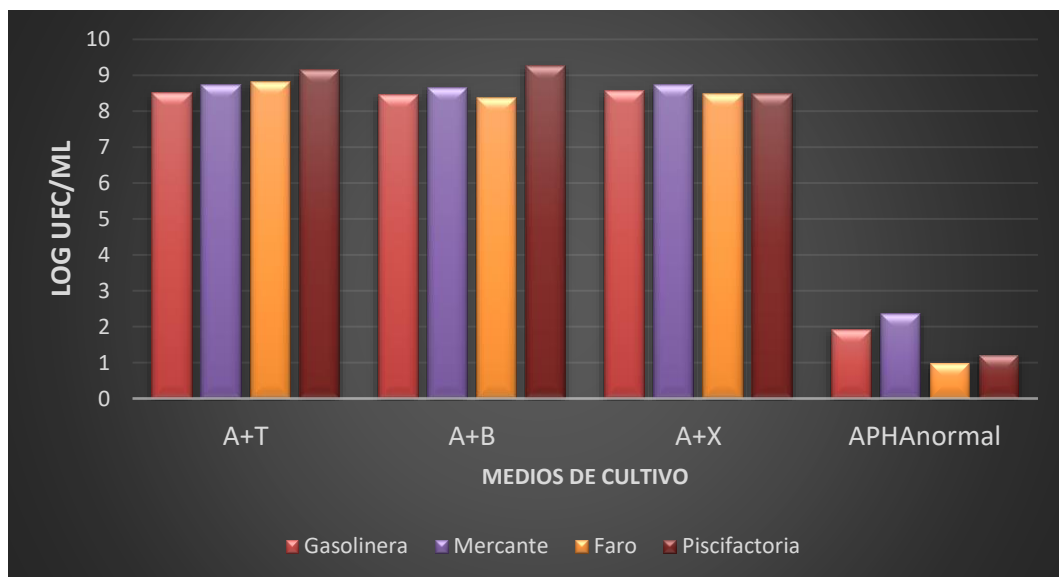


Figura 12. Carga bacteriana de los distintos puntos de muestreo tomados en la Costa de Almería, tras efectuar la siembra en medios generales y selectivos (APHA y APHA + Hidrocarburos, respectivamente), después de someter una alícuota a medios de enriquecimiento. A+T: APHA +

Tolueno; A+B: APHA + Benceno; A+X: APHA + Xileno. Valores expresados en Logaritmo de Unidades Formadoras de Colonias por mL (log UFC/mL).

Estos datos son consistentes con los resultados que se mostrarán a continuación, pues una parte de las bacterias que conforman el cepario que finalmente se constituyó, proceden de las muestras de la piscifactoría, lo que da a entender que es en esta zona donde hay más probabilidad de encontrar una mayor presencia de microorganismos capaces de usar los hidrocarburos como fuente de carbono, proporcionándoles una ventaja selectiva frente a la presencia de otros grupos microbianos.

Otro caso particular es el de la muestra del faro: con tan solo 10 UFC/mL de carga microbiana de partida en su siembra en medios generales de APHA, la microbiota de esta muestra consiguió prácticamente igualar en carga microbiana a las muestras de la gasolinera y el barco mercante.

En la Figura 13 se observa la agrupación de todos en función de las 4 condiciones estudiadas, comprobándose como, en general, la estrategia de enriquecimiento permite un mayor aislamiento de microorganismos a partir de las muestras de interés.

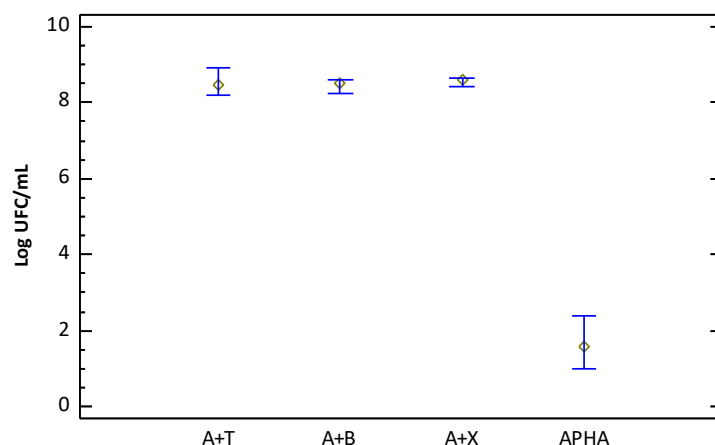


Figura 13. Gráfico de medianas con intervalos del 95% de confianza en función de los datos de recuentos de bacterias de los distintos puntos de muestreo tomados en la Costa de Almería, tras efectuar la siembra en medios generales y selectivos (APHA y APHA + Hidrocarburos, respectivamente), después de someter una alícuota a medios de enriquecimiento. A+T: APHA + Tolueno; A+B: APHA + Benceno; A+X: APHA + Xileno. Valores expresados en Logaritmo de Unidades Formadoras de Colonias por mL (log UFC/mL).

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

Para incrementar las probabilidades de aislar microorganismos con capacidad degradadora de hidrocarburos, se llevaron a cabo las siguientes estrategias: siembra directa en medios selectivos, siembra directa en medios generales y posterior siembra en medios selectivos y de forma paralela, enriquecimiento de las muestras y posterior siembra en medio selectivos.

De este modo, se consiguió una colección de 11 cepas de interés: 6 bacterias Gram positivas, incluyendo una actinobacteria, y 5 Gram negativas. La mayoría de los aislados procedían de las muestras de agua de la gasolinera de barcos, con un total de 7 cepas y de la zona cercana a la piscifactoría, con 4 cepas. Los puntos de muestra del faro y de los barcos mercantes mostraron unos morfotipos similares a aquellos aislados de los otros dos puntos de muestras, por ello, es ésta una de las razones por la que dichos puntos de muestreo no aportaron cepas interesantes. Otra razón por la que no se obtuvo alguna cepa de los puntos de muestreo 2 y 4 es que, los aislados, tras cada siembra, perdían viabilidad poniendo de manifiesto la posibilidad de que estas cepas se encontraban formando consorcios en el medio natural, siendo incapaces de crecer una vez aislados en cultivos puros.

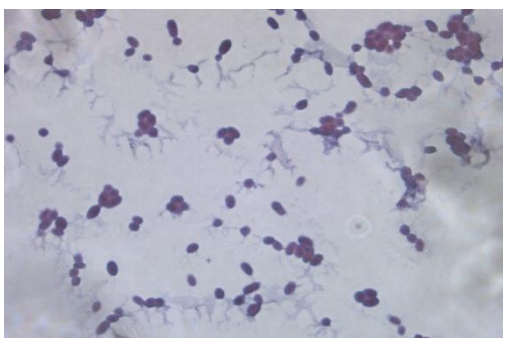
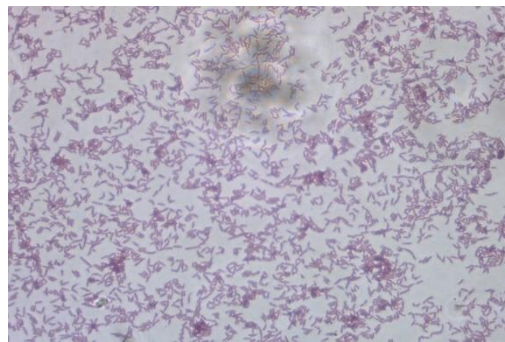
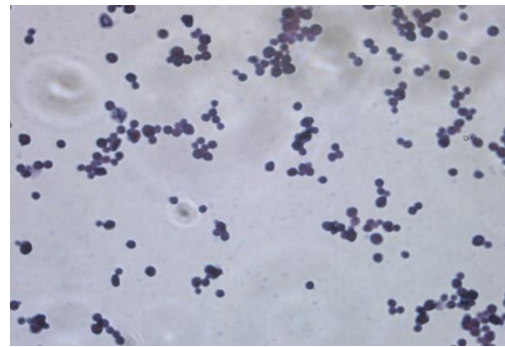
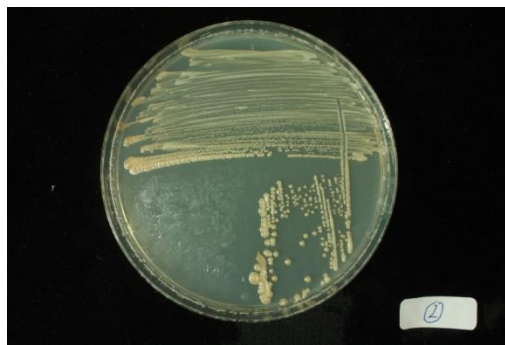
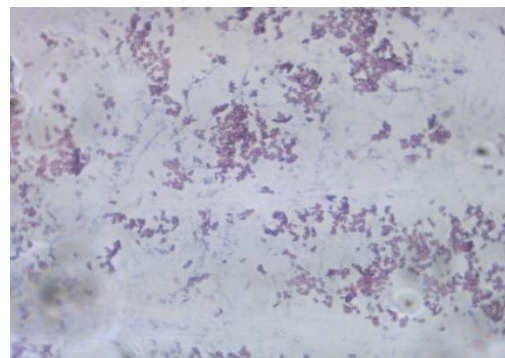
La estrategia empleada que aportó la totalidad de las cepas que conformaron el cepario, fue aquella que implicó una fase de enriquecimiento en medio líquido, seguido de aislamientos en medios selectivos de APHA más el hidrocarburo a ensayar.

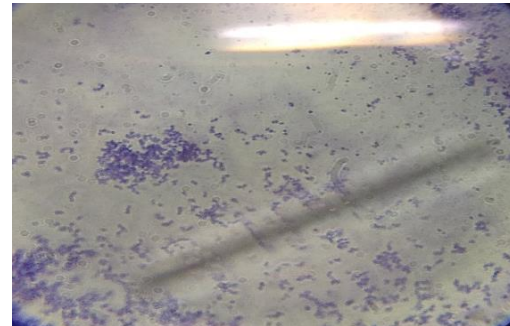
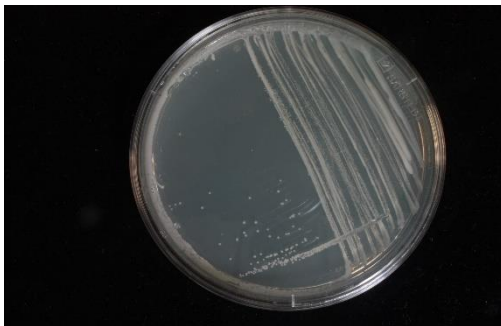
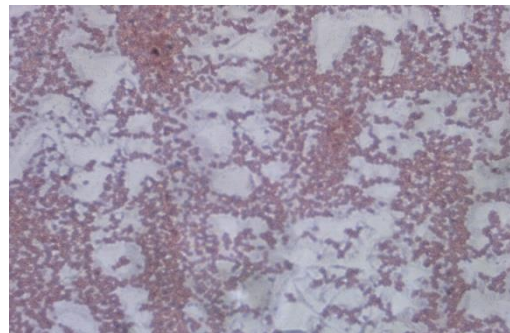
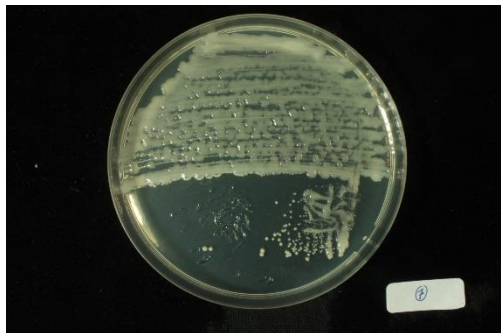
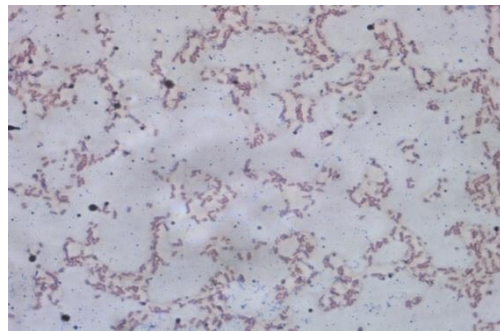
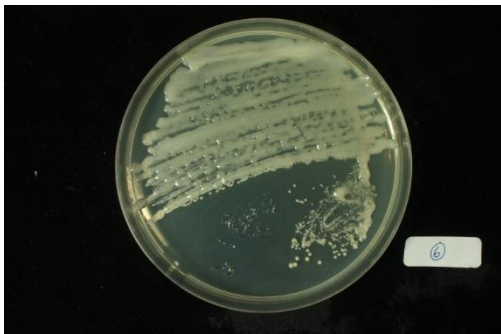
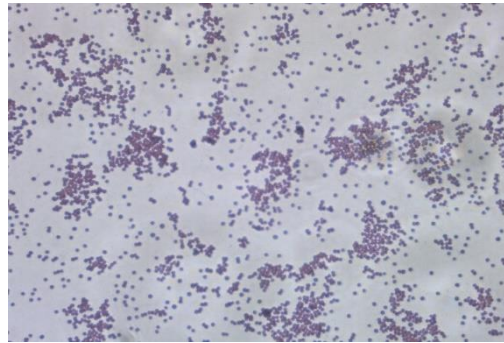
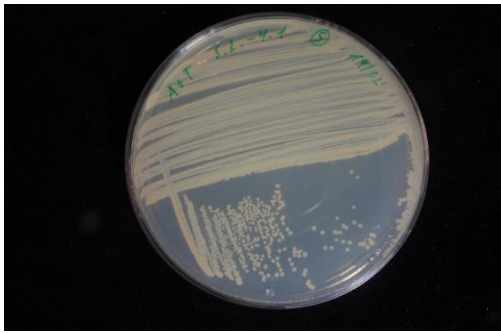
A continuación, se muestra información relativa a cada una de las bacterias que conforman la colección de estudio del presente TFG. Tanto en la Tabla 5, donde aparece el número de identificación de cada cepa con su respectiva descripción morfológica y de tinción, como en la Figura 13, donde se muestran las fotografías de dichos aislados macroscópicamente (aislamiento en placa) y microscópicamente (tinción de Gram), cada aislado aparece en orden desde la cepa 1 a la cepa 11.

Tabla 5. Número de identificación de cada cepa aislada de las muestras de agua contaminada con su respectiva descripción morfológica y el resultado de la tinción de Gram.

Número de identificación de cepa	Características morfológicas y de tinción
1	Racimos de cocos Gram +
2	Estreptococos, sarcinas, tétradas Gram +
3	Bacilos y estreptobacilos Gram +
4	Bacilos Gram -
5	Cocos, diplococos y estreptococos Gram -
6	Bacilos Gram -
7	Cocos Gram -
8	Cocos Gram +
9	Cocos Gram -
10	Cocos Gram +
11	Cocos Gram +

A continuación, en la Figura 14, se muestran las fotografías de las 11 cepas en orden ascendente. En la columna de la izquierda se muestran los aislamientos y a la derecha la tinción.





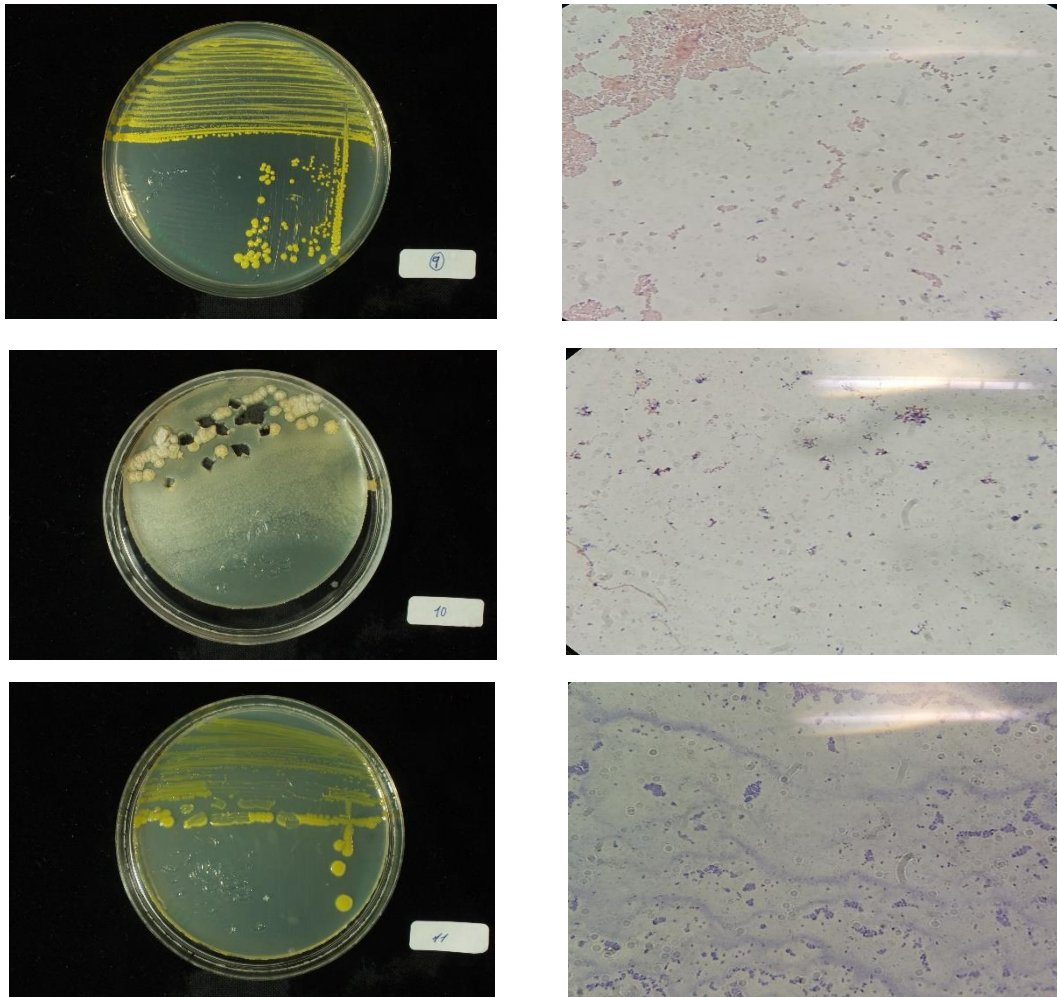


Figura 14. A la izquierda, fotografía de siembra en aislamiento en placa de medio general (APHA). A la derecha, fotografía de tinción de Gram al microscopio óptico. De arriba a abajo, cepas ordenadas desde la 1 a la 11.

Una vez constituido el cepario, las bacterias fueron sometidas a un estudio de metabolismo y cometabolismo. Para ello, en primer lugar, se prepararon semanalmente 22 tubos falcon, con medio mínimo de sales y la condición específica a ensayar (11 tubos con el hidrocarburo determinado y otros 11 tubos con el hidrocarburo y glucosa), así durante 3 semanas: 2 condiciones de ensayo (hidrocarburo con y sin glucosa) por semana, para cada una de las cepas.

A continuación, se muestran los resultados del estudio del metabolismo y el cometabolismo representados en gráficas que muestran el log de UFC/ml en función del tiempo en días de las cepas 1, 6 y 7. No se muestran los resultados de las ocho bacterias restantes de la colección, ya que no pudieron crecer en los medios mínimos de sales con única fuente de carbono el hidrocarburo a ensayar, por lo tanto, no podrían considerarse buenas candidatas en tareas de biorremediación. La conclusión principal de dichos resultados es que esas bacterias toleran la presencia de hidrocarburos, pero no son capaces de utilizarlos como fuente de nutriente y energía.

En las Figuras 15, 16 y 17, se muestran las gráficas correspondientes al crecimiento de las Cepas 1, 6 y 7 en el medio con Tolueno + Glucosa (a) y en el medio sólo con Tolueno (b). En las Figuras 18, 19 y 20, se muestran las gráficas correspondientes al crecimiento de las Cepas 1, 6 y 7 en el medio con Xileno + Glucosa (a) y en el medio sólo con Xileno (b). En las Figuras 21, 22 y 23, se muestran las gráficas correspondientes al crecimiento de las Cepas 1, 6 y 7 en el medio con Benceno + Glucosa (a) y en el medio sólo con Benceno (b).

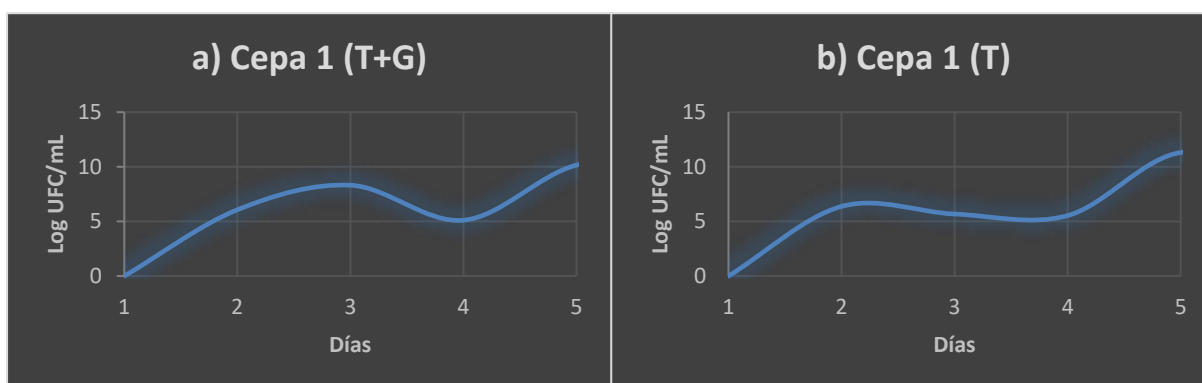


Figura 15. Curva de crecimiento de la Cepa 1 tras ser sometida a Tolueno + Glucosa (a) y a Tolueno (b), como únicas fuentes de carbono, a lo largo de 5 días de incubación. Valores expresados en Logaritmo de Unidades Formadoras de Colonias por mL (log UFC/mL).

La cepa 1 presentó una cinética de crecimiento similar cuando se encontraba en ambas condiciones, pudiendo observarse una fase de adaptación que abarcó desde el día 1 hasta el día 4, donde dio comienzo una fase de crecimiento exponencial. La carga microbiana alcanzada en el día 5 fue mayor en Tolueno que en la condición de tolueno y glucosa, lo que sugiere que esta cepa puede utilizar el tolueno como única fuente de carbono (Figura 15).

La cepa 6 presentó un crecimiento uniforme cuando se encontraba en presencia de tolueno y Glucosa, llegando a alcanzar la máxima carga durante el día 4, mientras que, cuando se encontraba únicamente en presencia de tolueno, no mostró crecimiento hasta el día 4, alcanzando entonces una carga incluso mayor a la observada cuando fue cultivada con tolueno y glucosa (Figura 16b). Atendiendo a estos resultados, esta cepa parece usar el monosacárido prioritariamente como fuente de carbono en una primera etapa del crecimiento, siendo capaz de emplear el tolueno una vez consumida la glucosa.

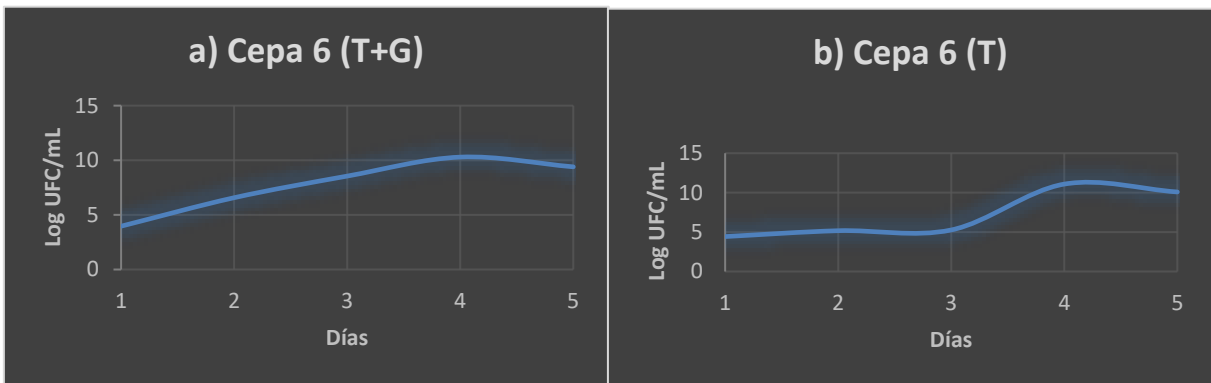


Figura 16. Curva de crecimiento de la Ceba 6 tras ser sometida a Tolueno + Glucosa (a) y a Tolueno (b), como únicas fuentes de carbono, a lo largo de 5 días de incubación. Valores expresados en Logaritmo de Unidades Formadoras de Colonias por mL (log UFC/mL).

En la gráfica siguiente (Figura 17a), se puede observar como la cepa 7 mostró una tendencia de crecimiento similar a la cepa 6 (Figura 16a), es decir, creció progresivamente hasta alcanzar la mayor carga el día 4, cuando su crecimiento se mantuvo estacionario. Por otro lado, la cepa 7 en la gráfica de sólo tolueno (Figura 17b), aparece de nuevo una tendencia similar a la cepa 6 (Figura 16b), es decir, relativo poco crecimiento hasta que en el día 3 comienza una fase de crecimiento exponencial, llegando a la máxima carga microbiana el día 4. Estos resultados dan a entender que, al igual que ocurre con la cepa 6, esta bacteria emplea la glucosa como fuente prioritaria de carbono, pero es capaz también usar el tolueno como única fuente de carbono.

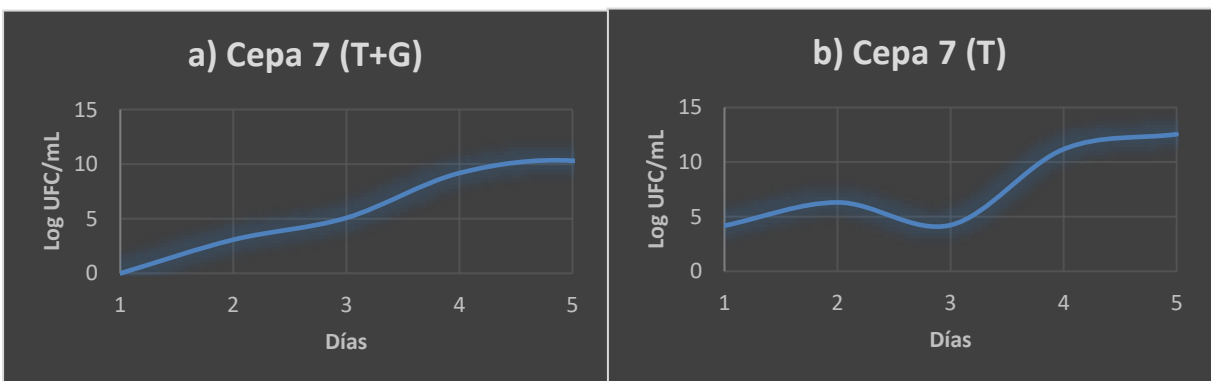


Figura 17. Curva de crecimiento de la Ceba 7 tras ser sometida a Tolueno + Glucosa (a) y a Tolueno (b), como únicas fuentes de carbono, a lo largo de 5 días de incubación. Valores expresados en Logaritmo de Unidades Formadoras de Colonias por mL (log UFC/mL).

En la Figura 18a, se muestra una fase previa de adaptación de la cepa 1 hasta alcanzar en el día 4 la máxima carga. Por otro lado, cuando esta cepa es cultivada en presencia de xileno como única fuente de carbono (Figura 18b), se observa un crecimiento exponencial desde el día 1 hasta alcanzar la máxima carga en el día 2, estabilizándose el resto de los días. Estos resultados

muestran que la cepa 1 tiene una gran capacidad para usar el xileno como única fuente de carbono alcanzando una carga microbiana mayor que cuando se cultivó en el medio de xileno adicionado con glucosa.

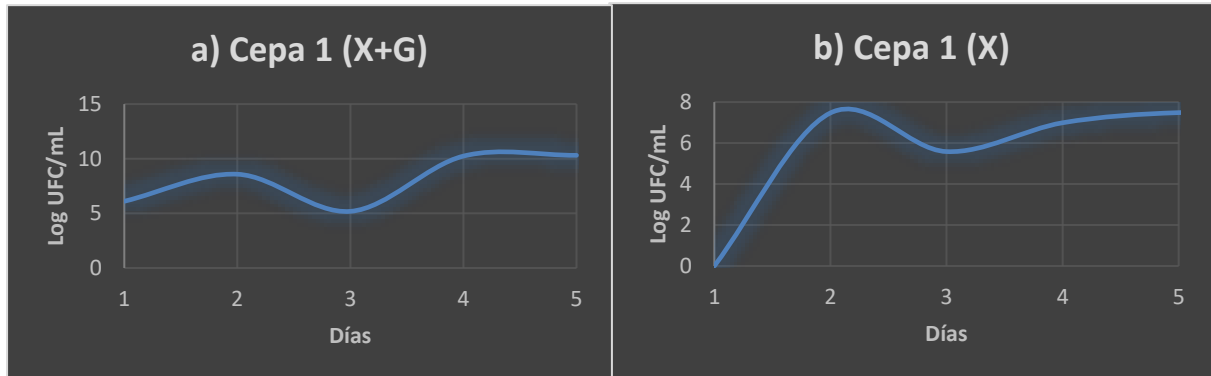


Figura 18. Curva de crecimiento de la Cepa 1 tras ser sometida a Xileno + Glucosa (a) y a Xileno (b), como únicas fuentes de carbono, a lo largo de 5 días de incubación. Valores expresados en Logaritmo de Unidades Formadoras de Colonias por mL (log UFC/mL).

Respecto a la cepa 6, ésta mostró un crecimiento uniforme cuando fue cultivada en xileno y glucosa (Figura 19a) alcanzando la máxima carga entre los días 2 y 3 y estabilizándose los días posteriores. Por otro lado, esta bacteria mostró una fase de adaptación donde el crecimiento fue casi nulo cuando fue cultivada en xileno (Figura 19b). De hecho, la carga microbiana máxima fue alcanzada a los 3 días, y la bacteria pudo seguir creciendo, mostrando el comienzo de una fase exponencial el día 4 y estabilizándose al llegar el día 5. Estos datos revelan que la bacteria es capaz de emplear el xileno como única fuente de carbono y energía, alcanzando incluso una mayor carga que cuando se cultiva en presencia de glucosa y xileno.

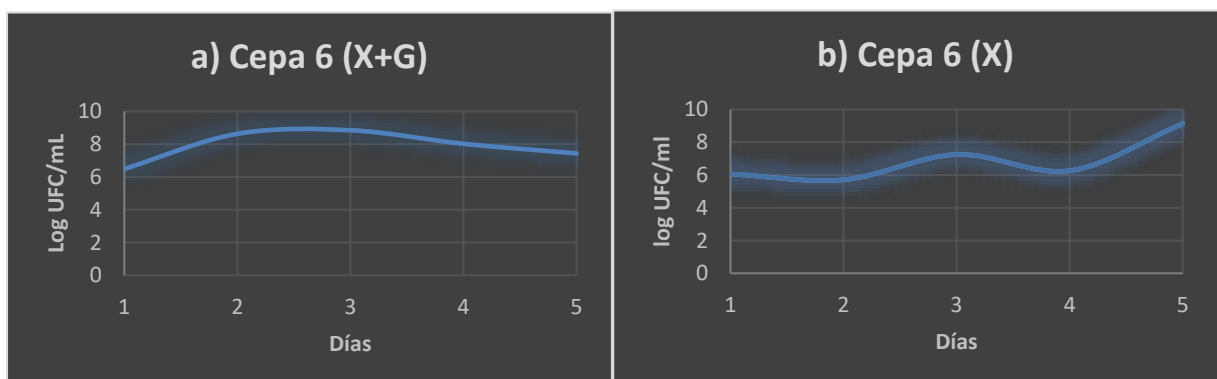


Figura 19. Curva de crecimiento de la Cepa 6 tras ser sometida a Xileno + Glucosa (a) y a Xileno (b), como únicas fuentes de carbono, a lo largo de 5 días de incubación. Valores expresados en Logaritmo de Unidades Formadoras de Colonias por mL (log UFC/mL).

La cepa 7 mostró un comportamiento muy similar cuando fue cultivada en xileno y glucosa y cuando fue cultivada solo en xileno (Figura 20). En ambas gráficas se puede observar cómo desde el día 1 la cepa muestra un crecimiento exponencial alcanzando la máxima carga al segundo día, y estabilizándose en los siguientes. Es probable que en condiciones de crecimiento de xileno y glucosa se alcance una mayor carga microbiana debido a que, el tubo falcon empleado para el medio de glucosa y xileno, a partir del que se efectuaron las siembras diarias, fue inoculado con una mayor carga que el falcon de xileno. A pesar de esto, se confirma que la cepa 7 tiene una gran capacidad de metabolizar el xileno sin la necesidad de la presencia de un sustrato carbonado primario.

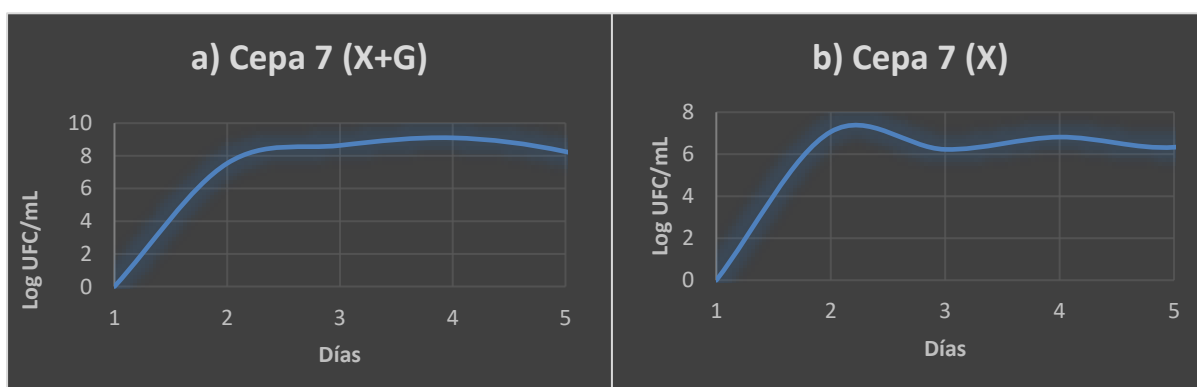


Figura 20. Curva de crecimiento de la Cepa 7 tras ser sometida a Xileno + Glucosa (a) y a Xileno (b), como únicas fuentes de carbono, a lo largo de 5 días de incubación. Valores expresados en Logaritmo de Unidades Formadoras de Colonias por mL (log UFC/mL).

Por último, los resultados relativos a la degradación de benceno mostraron que, en primer lugar, la cepa 1 presentó un crecimiento uniforme en los primeros 3 días de incubación (Figura 21a), probablemente debido al metabolismo prioritario de la glucosa; el día 3 su crecimiento se estabilizó hasta el día 4, donde mostró de nuevo un incremento de la carga microbiana, seguramente debido al inicio de la degradación del benceno. Por otro lado, cuando se cultivó la cepa 1 en presencia únicamente de benceno (Figura 21b), se puede apreciar un descenso de la carga microbiana durante el primer día, pero al segundo día comenzó a incrementar la carga uniformemente, seguramente a causa del metabolismo del benceno, lo que pone de manifiesto que esta cepa es capaz de usar este compuesto como única fuente de carbono.

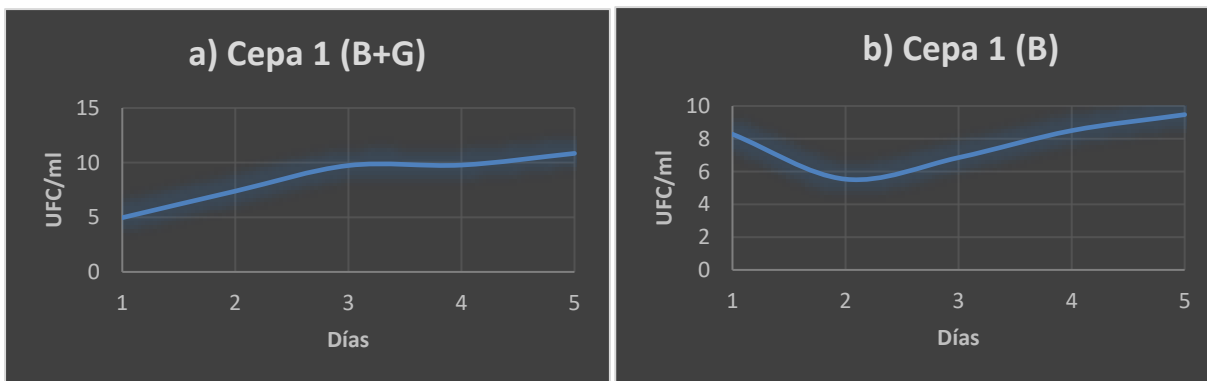


Figura 21. Curva de crecimiento de la Ceba 1 tras ser sometida a Benceno + Glucosa (a) y a Benceno (b), como únicas fuentes de carbono, a lo largo de 5 días de incubación. Valores expresados en Logaritmo de Unidades Formadoras de Colonias por mL (log UFC/mL).

La cepa 6 (Figura 22) mostró una fase de adaptación entre los días 1 y 2, donde creció exponencialmente hasta alcanzar una fase estacionaria que abarcó desde el día 3 al 4 (Figura 22a). Por otro lado, cuando esta cepa fue cultivada en presencia exclusivamente de benceno, no presentó un gran crecimiento previo a alcanzar el día 4, cuando experimentó un crecimiento exponencial (Figura 22b). Aparentemente, la presencia de benceno pareció resultar tóxica para esta cepa debido al decrecimiento observado en los primeros días, cuando se cultivó en glucosa y benceno (Figura 22a), pero se puede comprobar en la gráfica que claramente fue capaz de crecer empleando benceno como única fuente de carbono (Figura 22b).

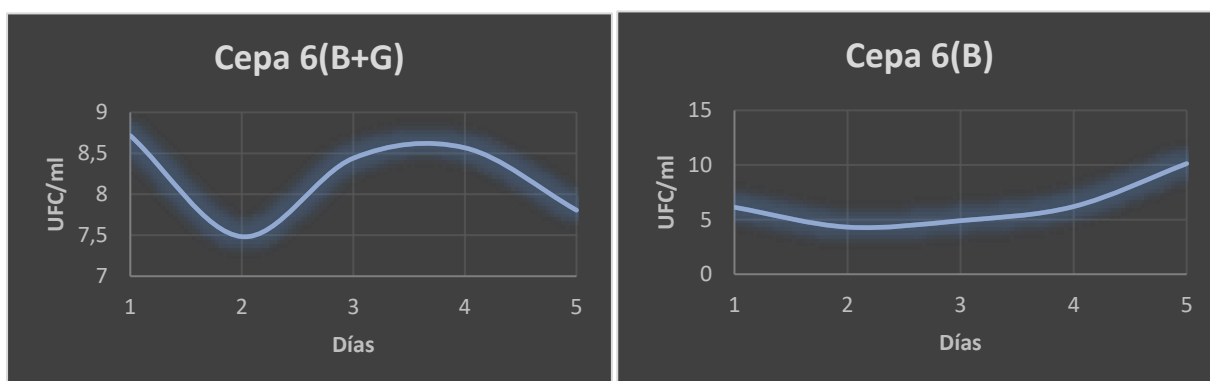


Figura 22. Curva de crecimiento de la Ceba 6 tras ser sometida a Benceno + Glucosa (a) y a Benceno (b), como únicas fuentes de carbono, a lo largo de 5 días de incubación. Valores expresados en Logaritmo de Unidades Formadoras de Colonias por mL (log UFC/mL).

Por su parte, la cepa 7 alcanzó la máxima carga microbiana al tercer día cuando fue cultivada en benceno y glucosa (Figura 23a). Por otro lado, se observó un crecimiento casi nulo cuando se

cultivó esta cepa en presencia solamente de benceno (Figura 23b), comenzando una fase de crecimiento más acelerado a partir del cuarto día.

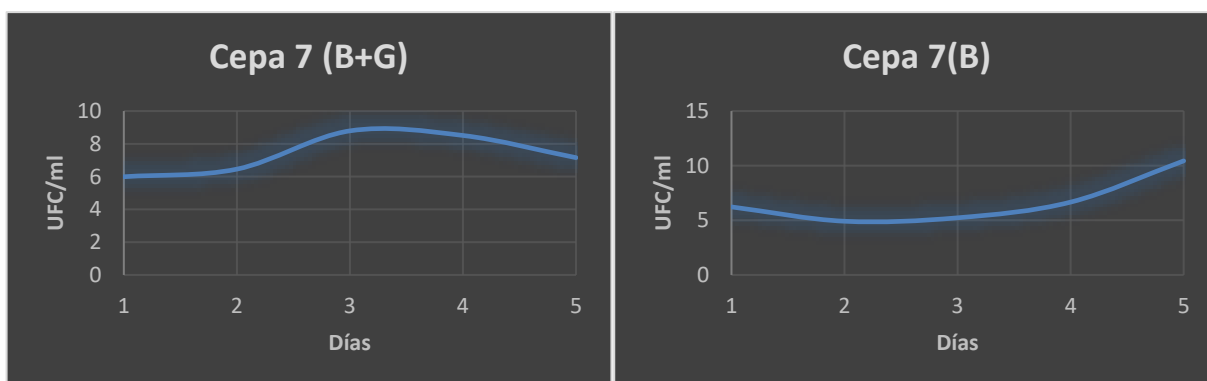


Figura 23. Curva de crecimiento de la Ceba 7 tras ser sometida a Benceno + Glucosa (a) y a Benceno (b), como únicas fuentes de carbono, a lo largo de 5 días de incubación. Valores expresados en Logaritmo de Unidades Formadoras de Colonias por mL (log UFC/mL).

Teniendo en cuenta que sólo se pudieron obtener curvas de crecimiento de las bacterias identificadas internamente en el trabajo como cepa 1, 6 y 7, y puesto que presentaron un crecimiento que deriva de la utilización directa de los tres compuestos ensayados como fuentes de carbono, éstos fueron los microorganismos considerados con el mayor potencial, del total de la colección de 11 aislados. Por tanto, estas cepas se seleccionaron para ser identificadas molecularmente y así indagar más en sus potenciales capacidades

Como se puede observar en la Figura 24, las cepas 6 y 7 mostraron una coloración amarilla con el paso de los días cuando fueron incubadas en presencia de tolueno adicionado con glucosa, mientras que, cuando se encontraban en presencia solamente de tolueno, seguían mostrando un aspecto blanquecino, casi incoloro.

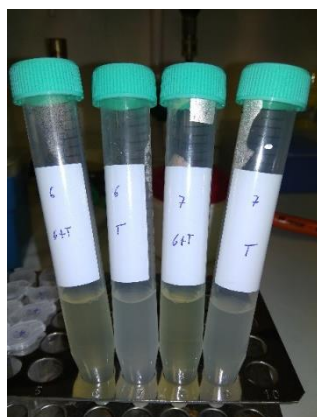


Figura 24. Coloración diferencial de los cultivos.

3.3. Identificación de las cepas con mayor potencial biodegradador.

A la luz de los resultados obtenidos en los ensayos de metabolismo y cometabolismo, se procedió a llevar a cabo la identificación molecular de las cepas candidatas.

En primer lugar, se extrajo el ADN de las cepas mediante un choque térmico convencional, luego se llevó a cabo la amplificación del gen del ARN 16S ribosomal empleando cebadores específicos y, a continuación, se cargaron las muestras con los fragmentos de amplificación en un gel de electroforesis, para comprobar que eran de la longitud buscada.

Finalmente, se purificaron los fragmentos de ADN y se enviaron al servicio de secuenciación en el edificio de Servicios Técnicos de la Universidad de Almería (UAL).

Las secuencias fueron sometidas a un procesamiento bioinformático, obteniendo como identidad final de las cepas la que se especifica en la Tabla 6:

Tabla 6. Identidad de los aislados seleccionados.

Cepa	Identidad	Número de acceso	% de identidad
1	<i>Streptomyces flavoviridis</i>	LC425069.1	100,00%
6	<i>Enterobacter xianfangensis</i>	MH084792.1	100,00%
7	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	MH266250.1	99,76%

En la Figura 25 se observan las fotografías tomadas a los resultados de amplificación obtenidos en el gel de electroforesis. La banda 1 (Figura 25a) representa la amplificación exitosa del gen 16S Ribosomal de la cepa 6 con una longitud de fragmento de 1500 pares de bases; por el otro lado, la banda 2 (Figura 25a) muestra la amplificación del gen 16S Ribosomal de la cepa 7 con longitud de fragmento igual al fragmento 1. Como se puede observar, no pudo obtenerse la amplificación del gen 16S Ribosomal de la cepa 1, por ello se emplearon una combinación de distintas condiciones de amplificación para incrementar el éxito en la amplificación del fragmento. Así, lo que en la Figura 24b se muestra es la amplificación (empleando distintas condiciones para la misma) del gen 16S ribosomal de la cepa 1. La longitud de fragmento fue la esperada (1500 pb).

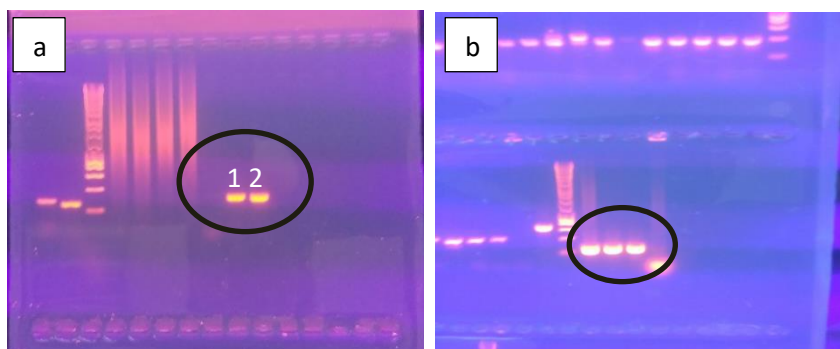


Figura 25. Amplificación de los fragmentos de ADN de las cepas seleccionadas, revelados en geles de electroforesis y comparados con un marcador molecular.

Respecto a la cepa 1, identificada como *Streptomyces flavoviridis*, investigadores de la Universidad de Saud, en Arabia Saudí, consiguieron aislar de suelos contaminados con petróleo en Chennai (India), una cepa de *Streptomyces* sp. a la que denominaron ERI-CPDA-1. Esta cepa demostró ser capaz de degradar naftaleno, fenantreno y diésel y de crecer en presencia de petróleo, keroseno, benceno, piridina, metanol, etanol, ciclohexano, tween 80, xileno y tolueno usándolos como única fuente de carbono (Balachandran *et al.*, 2012). Otros investigadores consiguieron aislar tres cepas de *Streptomyces* spp. de los suelos superficiales de las planicies de Mitidja (Norte de Argelia). Este grupo de investigadores comprobó la eficiencia que estas cepas poseían para la degradación de naftaleno tras 12 días de incubación mediante HPLC, observando hasta un 80% de eliminación de estos hidrocarburos (Ferradji *et al.*, 2014). En base a lo expuesto, se podría concluir que el género *Streptomyces* posee la capacidad de degradar PAHs, aunque, por otro lado, no se ha encontrado registro de que la especie *Streptomyces flavoviridis* ostente esa habilidad, ya que no se han hallado referencias del aislamiento de esta especie en un ambiente similar al estudiado y en relación particularmente a los compuestos estudiados (BTX). Atendiendo a los resultados mostrados, se puede afirmar que *S. flavoviridis* posee la capacidad de usar BTX como única fuente de carbono, constituyendo este TFG uno de los primeros, sino el primero de los registros que habla de esta capacidad en esta especie.

La especie *Klebsiella pneumoniae*, que coincide con la identidad de la cepa 7, posee la capacidad de degradar endosulfano sin formar el metabolito tóxico de sulfato de endosulfano durante el proceso. Este compuesto es un insecticida y acaricida organoclorado y también un disruptor endocrino altamente tóxico en forma aguda (Kwon *et al.*, 2002). Un equipo de investigadores consiguió aislar seis consorcios microbianos de tres suelos contaminados con hidrocarburos aromáticos sencillos, empleando una serie de medios de cultivos selectivos. De entre todas las bacterias involucradas en los consorcios, pudo identificarse una de las cepas como *K. pneumoniae* (Wu *et al.*, 2013). Por tanto, si esta bacteria es capaz de degradar PHAs, por extensión se puede asumir que también es capaz de degradar el conjunto de compuestos conocido como BTX (Benceno, Tolueno y Xileno), respaldando los resultados conseguidos en el presente TFG. Otro equipo de investigadores consiguió aislar de suelos contaminados con

petróleo crudo un consorcio microbiano con alta tolerancia y capacidad de degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos de tres, cuatro y cinco anillos. De entre todos los microorganismos constituyentes del consorcio, se aisló e identificó *K. pneumoniae* (Zafra *et al.*, 2014). Teniendo en cuenta todo lo expuesto, se podría afirmar que *K. pneumoniae* posee capacidad de degradación de hidrocarburos, habilidad que se ve incrementada cuando forma parte de un consorcio microbiano, haciéndola apta para ser usada en tareas de biorremediación. Por otro lado, *K. pneumoniae* también constituye un patógeno humano importante causando frecuentemente infecciones nosocomiales típicamente adquiridas en hospitales (Podschun y Ullmann, 1998). Es por esto por lo que la naturaleza infecciosa de *Klebsiella pneumoniae* puede constituir una desventaja a la hora de ser usada en estrategias de biorremediación, ya que su origen causa rechazo.

Existe una gran cantidad de estudios que han reportado la capacidad de degradación y uso como fuente de carbono y energía de hidrocarburos por parte de muchos géneros de bacterias, pero son muy pocos los estudios que han observado esta habilidad en bacterias entéricas, especialmente aquellas de los géneros *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Escherichia* y *Hafnia* (Wu *et al.*, 2013). Debido a lo antes expuesto, en ningún estudio se ha descrito que *Enterobacter xianfangensis* posea capacidad de degradación de BTX, probablemente siendo este TFG el primer registro de que esta especie ostente dicha habilidad.

4. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos permitieron obtener las siguientes conclusiones:

1. Las aguas de la costa de Almería constituyen un ambiente naturalmente enriquecido con microorganismos con potencial como degradadores de hidrocarburos.
2. Las zonas con un tránsito constante de barcos, así como aquellas que por su localización se encuentran alejadas de corrientes y flujos turbulentos, permaneciendo habitualmente calmas, son más propicias a presentar un mayor número de microorganismos degradadores de hidrocarburos
3. La estrategia que mejores resultados ofreció para el aislamiento de microorganismos degradadores fue el uso de medios de enriquecimiento y posterior siembra en medios selectivos.
4. Las cepas 1, 6 y 7 identificadas como *Streptomyces flavoviridis*, *Enterobacter xianfangensis* y *Klebsiella pneumoniae* son candidatas prometedoras para ser empleadas como agentes con potencial biorremediador en estrategias de biodescontaminación de ambientes contaminados con hidrocarburos.
5. La principal aplicación biotecnológica que deriva del presente trabajo está relacionada con el aislamiento de cepas pertenecientes a especies cuya capacidad biorremediadora de hidrocarburos no ha sido descrita previamente.

BIBLIOGRAFÍA

- Abha, S., Singh, C.S. (2012). Hydrocarbon Pollution: Effects on Living Organisms, Remediation of Contaminated Environments and Effects of Heavy Metals Co-contamination on Bioremediation. En: Romero-Zeron, L. (ed.). Introduction to Enhanced Oil on Recovery (EOR) Processes and Bioremediation of Oil Contaminated Sites, pp. 186-206 InTech Publisher, China, ISBN: 978-953-51-0629-6.
- Adegboye, M., Babalola, O.O. (2012). Taxonomy and ecology of antibiotic producing actinomycetes. African Journal of Agricultural Research 7 (15), 2255-2261.
- Akpor, O.B., Okolomike, U.F., Olaolu, T.D., Aderiye, B.I. (2014). Remediation of polluted Wastewater Effluents: Hydrocarbons Removal. Trends in Applied Sciences Research, 9: 160-173.
- Alfonso, F., Basco, R., Calleja, A., Martín, S., Mora, A., Ramos, J., Rivero, J.M., Trinidad, A.M. (2006). Ciencias de la Tierra y el Medioambientes. Oxford Educación. Madrid, España.
- Atlas, R.M., Cerniglia, C.E. (1995). Bioremediation of Petroleum Pollutants. BioScience 45, 332-338.
- Baker, J. M. (1983). Impact of oil pollution on living resources: commission on ecology papers No. 4. International Union for Conservation of Nature and Natural Resources, Gland, Switzerland.
- Balachandran, C., Duraipandiyar, V., Balakrishna, K., Ignacimuthu, S. (2012). Petroleum and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) degradation and naphthalene metabolism in *Streptomyces* sp. (ERI-CPDA-1) isolated from oil contaminated soil. Bioresource Technology 112, 83–90.
- Beeby, A. (1993). Measuring the effect of pollution. Applying Ecology. Chapman and Hall, London, New York.
- Beller, M., Schoenmaker, H., Huuskonen, E. (1996). Pipeline inspection environmental protection through on-line inspection, Proceeding of the NNPC Seminar: Oil industry and the Nigerian Environment, pp. 233-241. Port Harcourt, Nigeria..
- Boufadel, M.C., N.T. Suidan and A.D Venosa. (2006). Tracer studies in laboratory beach simulating tidal influences. Journal of Environmental Engineering 132, 616-623.
- Bushnell, L.D., Haas, H.F. (1941). The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. Journal of Bacteriology 41, 653-673.
- Cairns, J., Buikema, A.L. (1984). Restoration of habitats impacted by oil spills. Butterworth, Boston (Mass.), U.S.A.

- Carla, A., Nicholson, M., Fathepure, B. (2004). Biodegradation of benzene by halophilic and halotolerant bacteria under aerobic conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 70 (2), 1222-1225.
- 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.
- Das, N., Chandran, P. (2011). Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *Biotechnology Research International*, Article ID 941810, 13 pp
- Dave, D., Ghaly, A.E. (2011). Remediation technologies for marine oil spills: A critical review and comparative analysis. *American Journal of Environmental Science* 7, 423-440.
- De Boer, W., Verheggen, P., Gunnewick, K., Kowalchuk, G., Veen, J. (2003). Microbial Community Composition Affects Soil Fungistasis. *Applied and Environmental Microbiology* 9 (2), 835-844.
- Díaz, M., Grigson, S., Burgess, J. (2002) Uso de un consorcio bacteriano extremo-halotolerante para la biodegradación de crudo en ambientes salinos. *Revista Colombiana de Biotecnología* 4 (1), 36-42.
- Domask, W.G. (1984). Introduction to petroleum hydrocarbons. Chemistry and composition in relation to petroleum derived fuels and solvents. *Renel Effects of petroleum hydrocarbons. Advances in Modern Environmental Toxicology* 8, 1-26.
- Ferradji, F.Z., Mnif, S., Badis, A., Rebbani, S., Fodil, D., Eddouaouda, K., Sayadi, S. (2014). Naphthalene and crude oil degradation by biosurfactant producing *Streptomyces* spp. isolated from Mitidja plain soil (North of Algeria). *International Biodeterioration and Biodegradation* 86, 300–308.
- Fingas, M., Kyle, D.A., Laroche, N., Fieldhouse, B., Segy, G., Stoodley, G. (1995). Effectiveness testing of oil spill-treating agents. En: P. Lane (ed.). *The use of chemicals in oil spill response*, pp286-298. , ASTM International, USA.
- Flavio, B., Leonardo, F., Zachia, M. (1999). Production of biosurfactant by hydrocarbon degrading *Rhodococcus ruber* and *Rhodococcus erythropolis*. *Revista de Microbiología* 30(3), 231-236.
- FRTR. (2012). Remediation technologies screening matrix and reference guide, Version 4.0. Phytoremediation (In situ Soil Remediation Technology). <http://www.frtrgov/matrix2/section4/4-3.html> (enlace activo el 9 de julio de 2019).
- Gentili A.R., Cubitto M.A., Ferrero M., Rodríguez, M.S. (2006). Bioremediation of crude oil polluted seawater by a hydrocarbondegrading bacterial strain immobilized on chitin and chitosan flakes. *International Biodeterioration & Biodegradation* 57, 222–228.

- Gehnry, T., Rensing, C., Pepper, I.L. (2004). New approaches for bioaugmentation as a remediation technology. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 34 (5), 447-494.
- Haritash, A.K., Kaushik, C. P. (2009). Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Journal of Hazardous Materials* 169 (1-3), 1-15.
- Hassanshahian, M., Emtiazi, G., Cappello, S. (2012). Isolation and characterization of crude-oil-degrading bacteria from the Persian Gulf and the Caspian Sea. *Marine Pollution Bulletin* 64 (1), 7-12.
- Hassanshahian, M. (2014). Isolation and characterization of biosurfactant producing bacteria from Persian Gulf (Bushehr provenance). *Marine Pollution Bulletin* 86 (1-2), 361-366.
- Hideki, K., Katsuyuki, U., Hisako, V., Horikoshi, K. (2000). Novel toluene elimination system in a toluene-tolerant microorganism. *Journal of Bacteriology* 182, 6451-6455.
- Jizhong, Z., Beicheng, X., David, T., Wu, L., Terry, M., Neill, A.R., James, M. (2001). Spatial and resource Factors Influencing High Microbial Diversity in soil. Environmental Sciences Division. Center for Microbial Ecology, Michigan State University, Michigan.
- Kamath, R., Rentz, J.A., Schnoor, J.L., Alvarez, P.J.J. (2004). Phytoremediation of hydrocarbon-contaminated soils: Principles and applications. *Studies in Surface Science and Catalysis* 151, 447-478.
- Karpenko, O., Lubenets, V., Karpenko, E., Novikov, V. (2008). Chemical oxidants for remediation of contaminated soil and water. A review. *Chemistry and Chemical Technology* 3, 41-45.
- Kästner, M., Breuer, M., Mahro, B. (1998). Impact of inoculation protocols, salinity, and pH on the degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) and survival of PAHdegrading Bacteria introduced into soil. *Applied and Environmental Microbiology* 64 (1), 359-362.
- Kwon, G.S., Kim, J.E., Kim, T.K., Sohn, H.Y., Koh, S.C., Shin, K.S., Kim, D.G. (2002). *Klebsiella pneumoniae* KE-1 degrades endosulfan without formation of the toxic metabolite, endosulfan sulfate. *FEMS Microbiology Letters* 215 (2), 255–259.
- 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.
- López de Mesa, B., Quintero, M.S., Guevara Vizcaíno, A., Jaimes Cáceres, D., Gutiérrez Riaño, S., Miranda García, J. (2006). Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *Nova* 4 (5), 82-90.
- Mackay, D., Shiu, W.Y., Chais, A., Southwood, J., Johnson, C.I. (1985). Environmental fate of diesel fuel spills on land. Report of Department of Chemical Engineering and Applied Chemistry of University of Toronto for Association of American Railroads, Washington, DC.

- Mbhele, P.P. (2007). Remediation of soil and water contaminated by heavy metals and hydrocarbons using silica encapsulation (Trabajo Fin de Máster). University of Witwatersrand, Johannesburg.
- Nelson, K., Weinel, C., Paulsen, I., Dodson, R., Hilbert, H., Martins dos Santos, V., Fouts, D., Gill, S., Pop, M., Holmes, M. (2002). Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental Microbiology* 4, 799-813.
- Nomack, M., Cleveland, C.J. (2010). Oil spill control technologies. *The Encyclopedia of Earth*, September 8, <http://www.eoearth.org/view/article/158385/> (enlace activo el 9 de julio de 2019).
- Okoh, A., Trejo-Hernandez, M.R. (2006). Remediation of petroleum hydrocarbon polluted systems: Exploiting the bioremediation strategies. *African Journal of Biotechnology* 5, 2520-2525.
- Onwurah, I.N.E. (2002). Anticoagulant potency of water-soluble fractions of Bonny light oil and enzyme induction in rats. *Biomedical Research* 13 (1), 33-37.
- Onwurah, I.N.E., Ogugua, V.N., Onyike, N.B., Ochonogor, A.E., Otitoju, O.F. (2007). Crude Oil Spills in the Environment: Effects and Some Innovative Clean-up Biotechnologies. *International Journal of Environmental Research* 4, 307-320.
- Perry, J.J. (1980). Oil in the biosphere. *Introduction to Environmental Toxicology*. Elsevier, New York, pp. 198-209.
- Podschun, R., Ullmann, U. (1998). *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clinical Microbiology Reviews* 11 (4), 589-603.
- Rockne, K., Chee-Sanford, J., Sanford, R., Brian, P., James, T., Staleyand. (2000). Anaerobic naphthalene degradation by microbial pure cultures under nitrate-reducing conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 66 (4), 1595-1601.
- Schmidt, F. (2013). Golfo de México: ¿dónde quedó el petróleo? (<https://p.dw.com/p/17lch>) (enlace activo el 9 de julio de 2019).
- Sharma, S. (2012). Bioremediation: Features, strategies and applications. *Asian Journal of Pharmacy and Life Science* 2, 202-213.
- Vergetis, E. (2002). Oil pollution in Greek seas and spill confrontation means methods. National Technical University of Athens, Greece.
- Watts, R., Udell, M., Rauch, P., Leung, S. (1990). Treatment of pentachlorophenol-contaminated soils using Fenton's reagent. *Journal of Hazardous Materials* 7, 335-345.

- Webb, C.C. (2005). Bioremediation of marine oil spill. <http://home.eng.iastate.edu/~tge/ce421-521/CaseyWebb.pdf> (enlace activo el 9 de julio de 2019).
- Wischmann, H., & Steinhart, H. (1997). The formation of PAH oxidation products in soils and soil/compost mixtures. *Chemosphere* 35(8), 1681-1698.
- Wong, J.W.C., Wan, C.K., Fang, M. (2002). Pig manure as a co-composting material for biodegradation of PAH-contaminated soil. *Environmental Technology* 23, 15-26.
- Wu, M., Chen, L., Tian, Y., Ding, Y., Dick, W.A. (2013). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by microbial consortia enriched from three soils using two different culture media. *Environmental Pollution* 178, 152–158.
- Zafra, G., Absalón, A.E., Cuevas, M.D.C., Cortés-Espinosa, D.V. (2014). Isolation and selection of a highly tolerant microbial consortium with potential for PAH biodegradation from heavy crude oil-contaminated soils. *Water, Air, and Soil Pollution* 225 (2), 1826.
- Zahed, M.A., H.A. Aziz, H.M. Isa, L., Mohajeri. (2010). Effect of initial oil concentration and dispersant on crude oil biodegradation in contaminated seawater 84, 438-442.
- Zhu, X., Venosa, A.D., Suidan, M.T., Lee, K. (2001). Guidelines for the bioremediation of marine shorelines and freshwater wetlands, U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, (OH), U.S.A.