

BIODEGRADACIÓN DE NITRILOS POR CEPAS DE *RHODOCOCOCCUS*

Autora Sofía Guzmán García
Titulación Grado en Biotecnología, curso 2019/2020
Tutores José Joaquín Moreno Casco
Macarena del Mar Jurado Rodríguez





Departamento Biología y Geología

Área Microbiología

Facultad de Ciencias Experimentales

Universidad de Almería

Trabajo Fin de Grado

AGRADECIMIENTOS

Aún recuerdo perfectamente mi primer contacto con la Biotecnología. Estaba en 1º de Bachillerato, solo me quedaba un año para decidir qué carrera estudiar y no tenía ni la más remota idea. Estaba perdida. Tenía muy claro lo que no quería estudiar, pero no me decidía en lo que sí. Entonces, un día cualquiera, vino a clase a dar una charla un científico almeriense, concretamente, un biotecnólogo que estaba trabajando ni más ni menos que en Singapur. Yo no sabía lo que era la Biotecnología y, mucho menos, que existía una carrera llamada así pero quedé totalmente fascinada con su trabajo. Hoy puedo afirmar que esa charla sigue siendo una de las más increíbles que he recibido nunca y, definitivamente, me ayudó muchísimo a tomar una de las mejores decisiones de mi vida.

En estos 4 años de carrera y, sobre todo, durante la realización de este TFG, he aprendido que, a veces, las cosas se complican y nos vemos obligados a tomar caminos inesperados pero eso nos permite conocer partes del camino que no hubiéramos podido ver nunca. Como bien escribió Antoine de Saint-Exupéry en El Principito: “Caminando en línea recta no puede uno llegar muy lejos”. Por suerte, durante mi camino, he tenido la oportunidad de conocer a personas maravillosas, tanto compañeros de clase como profesores, que me han ayudado y aconsejado siempre que lo he necesitado y a los que me gustaría darles las gracias.

Para empezar, quisiera expresarle mi agradecimiento a mi director Joaquín. Gracias por haberme dado la oportunidad de trabajar en tu laboratorio durante todos estos meses, por la confianza puesta en mí, por empujarme a superarme a mí misma, por estar siempre ahí para resolver mis preocupaciones académicas y por tus fantásticas lecciones de microbiología, gracias a las cuales sé hacia donde quiero enfocar mi carrera como biotecnóloga. Sé que muchas veces no hemos sido los mejores alumnos y no te hemos puesto fácil querernos, así que gracias por tu infinita paciencia y comprensión.

También me gustaría darle las gracias a mi codirectora Macarena, por todas las horas que has invertido en mí y en el resto de compañeros, que no han sido pocas; por tu energía, alegría y positivismo, tan necesarios cuando el trabajo en el laboratorio parecía interminable o las cosas no salían como queríamos; por tus consejos y por enseñarme tanto, siempre paciente y amable conmigo. Eres de esas profesoras que dejan huella. Gracias, de corazón.

No me gustaría olvidarme, por supuesto, de dar las gracias a Juan y Paqui, por todo lo que nos han enseñado a lo largo de estos años en innumerables asignaturas; y al resto de compañeros del laboratorio, por dejarnos invadir su espacio y ser tan cercanos con nosotros.

Por último, no habría podido llegar hasta aquí sin el apoyo incondicional de mi familia. Quiero agradecer a mis padres que me han apoyado en todas mis decisiones y han procurado que nunca me faltase de nada y que la única preocupación que tuviese fuera estudiar y aprobar. Siempre están ahí para levantarme cuando me caigo y calmarme durante mis más que constantes agobios. También, gracias a mi hermano por su apoyo, a pesar de encontrarse a más de 400 km de distancia; y a mi novio, por recordarme siempre que me venía abajo que yo puedo con todo y más.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1. Efectos adversos debidos a la contaminación por compuestos orgánicos.....	2
1.2. Acetonitrilo: Compuesto Orgánico Volátil altamente tóxico.....	3
1.3. Métodos físico-químicos y biológicos para la descontaminación de compuestos orgánicos persistentes.....	5
1.4. Objetivos.....	10
2. MATERIAL Y MÉTODOS	11
2.1. Diseño experimental	11
2.2. Colección de cepas del género <i>Rhodococcus</i>	12
2.3. Ensayos de toxicidad sobre cepas de <i>Rhodococcus</i>	13
2.3.1. Toxicidad en medio nutritivo con acetonitrilo.....	13
2.3.2. Toxicidad en medio selectivo con acetonitrilo	14
2.3.3. Toxicidad en ambiente contaminado por acetonitrilo volátil.....	15
2.4. Estudio de metabolismo y cometabolismo	16
2.5. Comprobación <i>in vitro</i> de la capacidad protectora de <i>Rhodococcus</i> : bioensayo de fitotoxicidad.....	18
2.6. Búsqueda molecular de genes asociados a la degradación de nitrilos.....	21
2.7. Análisis estadístico	22
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
3.1. Efecto tóxico del acetonitrilo sobre cepas pertenecientes al género <i>Rhodococcus</i>	22
3.2. Utilización de acetonitrilo como fuente de carbono y energía.....	27
3.3. Efecto de <i>Rhodococcus</i> como agente bioprotector <i>in vitro</i>	34
3.4. Presencia genes asociados a la degradación de nitrilos.....	37
4. CONCLUSIONES.....	38
5. BIBLIOGRAFÍA	39

RESUMEN

La mala gestión de los residuos por parte de determinados sectores productivos, como el industrial o el agrícola, ha propiciado un incremento de la acumulación de compuestos orgánicos persistentes (COPs) de origen sintético en la naturaleza a lo largo del último siglo, poniendo en peligro la seguridad humana y de los ecosistemas debido a su carácter altamente tóxico y contaminante. Dentro de este amplio grupo de compuestos cabe destacar, por su facilidad para evaporarse a temperatura ambiente, los conocidos como Compuestos Orgánicos Volátiles (COVs), entre los que se halla el acetonitrilo, un disolvente muy empleado a nivel industrial y a escala de laboratorio, que puede producir graves efectos medioambientales. En consecuencia, urge el desarrollo de técnicas sostenibles para su tratamiento, entre las cuales destaca la biorremediación por su demostrada fiabilidad y rendimiento económico.

Con el fin de encontrar microorganismos con alto potencial para ser empleados en tareas de biorremediación de contaminantes orgánicos, concretamente, de acetonitrilos, se evaluó la capacidad degradadora de una colección de 16 cepas del género *Rhodococcus*. Para ello, en primer lugar, se probó su tolerancia al potencial tóxico del acetonitrilo y, seguidamente, su capacidad para crecer utilizando el acetonitrilo en procesos de cometabolismo o como única fuente de carbono y nitrógeno. Tras seleccionar las mejores cepas, se cuantificó la capacidad de éstas para metabolizar el acetonitrilo. Por último, se comprobó *in vitro* la capacidad protectora de las cepas mediante un bioensayo de fitotoxicidad sobre semillas y, tras seleccionar finalmente la cepa más prometedora de la colección, se llevó a cabo la búsqueda molecular de genes asociados a la degradación de nitrilos.

De las 16 cepas de *Rhodococcus* que constituyeron la colección de estudio del presente TFG, fue la cepa 487, identificada como *Rhodococcus rhodochrous*, la que mostró los mejores resultados para el conjunto de ensayos, convirtiéndola en la mejor candidata para tareas de biorremediación de nitrilos.

Palabras clave: COPs, COVs, acetonitrilo, biorremediación, *Rhodococcus rhodochrous*.

ABSTRACT

The inadequate waste management carried out by certain productive sectors, such as the industrial or agricultural, has caused an increase in the accumulation of synthetic persistent organic pollutant (POP) compounds in nature over the last century, jeopardizing human and ecosystems security due to its highly toxic and polluting character. Within this wide group of compounds, it is worth noting those known as Volatile Organic Compounds (VOCs) due to its ease of evaporating at room temperature, among which is acetonitrile, a solvent widely used in industry and laboratories, that can produce serious environmental effects. In consequence, it is urgent to develop new strategies for its sustainable treatment, such as bioremediation, which has proven to be highly reliable and cost-effective.

With the aim to find microorganisms with high potential in the bioremediation of organic pollutants, specifically acetonitriles, the degrading capabilities of 16 strains of the *Rhodococcus* genus were evaluated. To that end, firstly, its tolerance to the toxic potential of acetonitrile was tested, and then, their capacity to grow using acetonitrile in co-metabolic processes or as the single carbon and nitrogen sources available. After selecting the best strains, their potential to degrade acetonitrile was measured. Finally, the protective capacity of the strains was verified *in vitro* through a phytotoxicity bioassay on seeds and, after selecting the most promising strain in the collection, the molecular search for genes associated with nitrile degradation was carried out.

Of the 16 *Rhodococcus* strains that comprise the collection shown in this Bachelor Thesis, it was strain number 487, identified as *Rhodococcus rhodochrous*, the one that showed the best results for the set of tests, turning it to be the best candidate for nitrile bioremediation tasks.

Keywords: POPs, VOCs, acetonitrile, bioremediation, *Rhodococcus rhodochrous*.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Efectos adversos debidos a la contaminación por compuestos orgánicos

La producción de compuestos orgánicos sintéticos, incluyendo disolventes, pesticidas, detergentes o colorantes, entre otros, se ha incrementado notablemente a lo largo del último siglo como consecuencia del gran crecimiento del sector industrial, así como debido a determinadas prácticas agrícolas, pesqueras o comerciales, entre otras posibles fuentes de origen (Galán-Huertos *et al.*, 2003). La liberación de este tipo de sustancias a la atmósfera, la hidrosfera, los suelos y los sedimentos implica una gran amenaza debido a su carácter contaminante y a su alta toxicidad. Asimismo, la dificultad de eliminación o limpieza de muchos de ellos supone un problema añadido (Håkansson y Mattiasson, 2002). Este es el caso de los Compuestos Orgánicos Volátiles (COVs), que se caracterizan por su facilidad para evaporarse a temperatura ambiente, provocando un impacto negativo en la calidad del aire y el agua, y afectando a las personas, animales y plantas que los inhalan o absorben (Resines-Urien *et al.*, 2019). De ahí la importancia de tomar medidas de control a la hora de producir y manejar estos compuestos, cuyas emisiones son cada vez mayores.

Algunos COVs poseen una reactividad baja y, por lo tanto, su permanencia en la atmósfera suele ser muy alta, por lo que pueden ser clasificados, además, como Contaminantes Orgánicos Persistentes (COPs) (Devotta y Rao, 2008). Los COPs, más conocidos internacionalmente por su acrónimo en inglés POPs (*Persistent Organic Pollutants*), son compuestos orgánicos que, en mayor o menor medida, resisten la degradación fotolítica, biológica y química (Ritter *et al.*, 1995). Estos compuestos están entre los contaminantes más peligrosos liberados al medio ambiente, donde son capaces de persistir durante largos periodos de tiempo (Deribe *et al.*, 2011). Cabe destacar dos importantes propiedades en estos contaminantes: su semi-volatilidad, que les permite ser transportados largas distancias a través de la atmósfera, permitiendo su acumulación en zonas alejadas del lugar donde se usaron o emitieron; y su lipofilia, tendencia a disolverse preferentemente en grasas y lípidos, en lugar de en agua, lo que les permite atravesar membranas biológicas y acumularse en los organismos (Ritter *et al.*, 1995; Jones y De Voogt, 1999). Por lo tanto, teniendo en cuenta estas características, los efectos negativos que pueden generar estos compuestos sobre la salud humana, animal y el medio ambiente, si se emplean de forma inadecuada, pueden llegar a ser de gran significancia.

Las personas pueden estar expuestas a la contaminación por compuestos orgánicos a través de la inhalación y la absorción dérmica, especialmente en lo que se refiere a los COVs, así como a través de la ingesta de alimentos contaminados o la transferencia prenatal de la madre al feto (Guo *et al.*, 2004; Lau *et al.*, 2012). Algunos de los riesgos más importantes para la salud pública incluyen problemas endocrinos, reproductivos e inmunológicos, enfermedades cardiovasculares, trastornos neurológicos y cáncer. Estudios recientes también han determinado cierta relación entre la exposición a los COPs y una reducción de la inmunidad en bebés y niños, acompañado de un aumento de determinadas infecciones y otras enfermedades (Guo *et al.*, 2019).

Por otro lado, como se ha mencionado previamente, estas sustancias suponen también un grave problema medioambiental, ya que pueden afectar negativamente al crecimiento de las plantas y a la salud de los animales, destruir el ozono estratosférico o contribuir a la generación de ozono fotoquímico a nivel del suelo, en definitiva, contribuir al cambio climático global (Khan y Ghoshal, 2000; Iluțiu-Varvara *et al.*, 2016).

1.2. Acetonitrilo: Compuesto Orgánico Volátil altamente tóxico

La elevada volatilidad de los COVs los convierte en uno de los mayores contaminantes atmosféricos actuales. Los efectos que se les atribuyen dependen principalmente de su naturaleza, concentración y fuente de emisión, la cual puede ser muy variada, ya que estos compuestos pueden provenir tanto de grandes industrias como de productos cotidianos en el hogar (Kamal *et al.*, 2016). Dentro de este amplio grupo de contaminantes orgánicos se encuentra el acetonitrilo, un disolvente altamente polar, volátil y tóxico, generado principalmente como subproducto de la fabricación del acrilonitrilo. El acetonitrilo se suele emplear en industrias químicas y laboratorios para preparar una gran variedad de compuestos como algunos productos farmacéuticos o cosméticos. Además, una de las aplicaciones por las que más se conoce a este compuesto es su uso como fase móvil en la técnica de cromatografía líquida de alta presión o *High Pressure Liquid Chromatography* (HPLC) (Håkansson y Mattiasson, 2002).

Aunque las posibilidades son muy amplias, la forma más común de exposición de las personas a este contaminante es mediante la inhalación de aire contaminado con acetonitrilo (Chaban y Prezhdo, 2011), pudiendo causar una intoxicación aguda, e incluso efectos fatales, observándose los síntomas en cuestión de horas. Estudios de intoxicación accidental en trabajadores expuestos han identificado algunos de los síntomas y signos de intoxicación aguda por acetonitrilo más típicos, por ejemplo, dolor y opresión en el pecho, náuseas, emesis, taquicardia, hipotensión, respiración corta y superficial, dolor de cabeza, inquietud y convulsiones (WHO, 1993).

Sus efectos nocivos se pueden deber a su capacidad de formación de compuestos altamente tóxicos como el cianógeno (Chaban y Prezhdo, 2011), pero principalmente, están asociados a la liberación metabólica de cianuro (Hashimoto, 1991; WHO, 1993), siendo este compuesto un potente inhibidor del crecimiento celular, ya que afecta a importantes procesos como la respiración, el metabolismo del nitrógeno y del fósforo, además de tener la capacidad de inhibir la actividad de algunas metaloproteínas (Castillo, 2005). La liberación de cianuro a partir de acetonitrilo ocurre, por lo tanto, cuando este compuesto es lentamente metabolizado a cianhidrina por el complejo enzimático citocromo P-450 monooxigenasa, especialmente la P-450 IIE1 dependiente de NADPH. A continuación, la cianhidrina se descompone por acción de la catalasa para formar cianuro y formaldehído (Figura 1a). El cianuro podría ser posteriormente transformado por la enzima rodanasa, mediante conjugación con tiosulfato, a tiocianato, un compuesto menos tóxico que puede ser eliminado a través de la orina (Figura 1b) (Feierman y Cederbaum, 1989; De Paepe *et al.*, 2016).

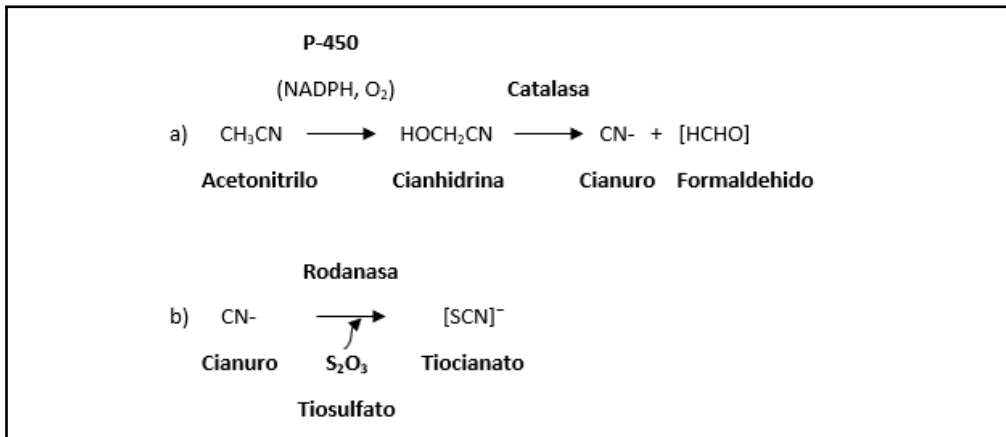


Figura 1. Reacciones de: a) oxidación del acetonitrilo a cianuro, y b) conjugación con tiosulfato para formar tiocianato (modificado de WHO, 1993).

Conociendo las propiedades negativas del acetonitrilo y los efectos que puede tener en las personas y el medio ambiente, ya indicados con anterioridad, su uso y posterior liberación en forma de desechos industriales y de laboratorio supone un serio problema, que se agrava al tener en cuenta la frecuencia y cantidad con la que se emplea este compuesto anualmente. De acuerdo con los datos recogidos en la edición 2020 del Inventario Nacional de Contaminantes Atmosféricos de España (MITECO, 2020), en el que se recogen los datos de emisiones de los principales contaminantes a la atmósfera hasta 2018 (Tabla 1), se estima que las emisiones de compuestos orgánicos volátiles no metánicos (COVNM) en ese último año fueron de 624 kilotoneladas. Las emisiones de estos compuestos aumentaron un 1% a nivel nacional con respecto al año anterior y fueron dominadas, principalmente, por el uso de disolventes (45% del total de emisiones), entre los que se incluye el acetonitrilo. A pesar de que las emisiones se redujeron un 38,7% desde 1990 como consecuencia de las mejoras tecnológicas en vehículos y la reducción del contenido de COVNM en pinturas y recubrimientos, éstas comenzaron a aumentar ligeramente de nuevo a partir del año 2014 (MITECO, 2020).

Tabla 1. Emisiones totales (kilotoneladas) en España (excluyendo Islas Canarias), en los años indicados (1990, 2005, 2017 y 2018), de óxidos de nitrógeno (NOx); compuestos orgánicos volátiles no metánicos (COVNM); óxidos de azufre (SOx); amoníaco (NH₃); y material particulado (PM_{2.5}) (MITECO, 2020).

	1990	2005	2017	2018
NOx	1.348	1.358	740	698
COVNM	1.018	803	618	624
SOx	2.039	1.206	219	197
NH₃	463	476	479	470
PM_{2.5}	0	146	126	125

A pesar de que la mayoría de los países han impuesto condiciones estrictas para limitar las emisiones de COVs, los datos de contaminación registrados anualmente continúan siendo muy elevados. En respuesta a la creciente conciencia mundial sobre la contaminación, la sobreexplotación de los recursos naturales y los efectos adversos derivados de determinados procesos en el medio ambiente y la salud humana, han surgido múltiples iniciativas de investigación en todo el mundo para el desarrollo de tecnologías eficientes con las que cumplir las cada vez más estrictas regulaciones ambientales. Se buscan técnicas de remediación que, no sólo sean capaces de eliminar contaminantes de la manera más eficiente y segura posible sin incrementar el impacto en el ambiente durante el proceso, sino que sean asimismo sostenibles económicamente, de manera que todos los países puedan acceder a ellas sin importar su nivel de riqueza y recursos.

1.3. Métodos físico-químicos y biológicos para la descontaminación de compuestos orgánicos persistentes

En general, los vertidos y emisiones de los residuos reconocidos como COPs suponen un grave problema global debido a su resistencia a la degradación, la cual se atribuye a su estructura química estable, a su carácter xenobiótico y a su reducida biodisponibilidad, dada su baja solubilidad en agua y fuerte adsorción al suelo (Arbeli, 2009). A esta característica hay que sumarle su persistencia, capacidad de bioacumularse y transportarse a través de largas distancias, así como su alta toxicidad incluso a pequeñas concentraciones (Pariatamby y Kee, 2016). Una de las principales fuentes de estos contaminantes es la agricultura, a través del empleo de pesticidas y fertilizantes químicos que alcanzan cada año valores de cientos de miles de toneladas sólo en Europa (Kumari *et al.*, 2020). Es por ello, que, en 2001, en respuesta a esta problemática, se firmó el Convenio de Estocolmo, un tratado global con el objetivo de proteger a las personas y al medio ambiente de estos compuestos orgánicos persistentes mediante su regulación y prohibición (Pariatamby y Kee, 2016; Arslan *et al.*, 2017).

Sin embargo, a pesar de que la mayoría de estos contaminantes están siendo prohibidos en muchos países, todavía existen lugares con áreas impactadas por estas sustancias, en los que es necesario llevar a cabo técnicas de remediación si se desea regresar a su condición original y natural. Los tratamientos que se manejan se pueden clasificar en físico-químicos y biológicos, principalmente:

- **Métodos físico-químicos:** este tipo de tratamientos implican la aplicación de procesos físicos (mecánicos, térmicos) y/o químicos para la remediación (Sillanpaa, 2020). Algunos de los métodos más destacados son:
 - **Vertederos sellados o *landfill capping*.** Se trata de una tecnología de contención, que consiste en que los materiales de desecho sean enterrados y cubiertos con el fin de formar una barrera que evite el contacto con el medio ambiente y, con ello, una posible migración de los contaminantes, que proteja de sus efectos nocivos. Sin embargo, con este método la toxicidad no se reduce y los contaminantes no son

degradados, además, existe el riesgo de que se produzcan fugas de compuestos peligrosos (Lodolo *et al.*, 2001).

- **Sistemas de membranas.** Permiten separar y retener contaminantes según el tamaño de partícula o carga. Las membranas con mejores resultados son las de ósmosis inversa, con una eficiencia de eliminación superior al 92%, y las de nanofiltración, que restringen entre un 30-82% el paso de los COPs (Kumari *et al.*, 2020). Esta tecnología también se puede aplicar a los COVs, siendo las membranas de caucho de silicio las más utilizadas en ese caso (Kamal *et al.*, 2016). Una de las principales limitaciones que presenta es el coste asociado por trabajar a altas presiones hidráulicas (Kumari *et al.*, 2020).
- **Extracción de vapor de suelos.** Técnica bien establecida, económica y eficiente para la eliminación de COVs y algunos compuestos orgánicos halogenados, que consiste en recuperar los contaminantes del suelo mediante pozos de extracción (Sillanpaa, 2020). Sin embargo, pueden producirse emisiones de compuestos peligrosos durante la excavación (Lodolo *et al.*, 2001).
- **Coagulación y floculación.** Este proceso se usa ampliamente para el tratamiento de aguas residuales, ya que es muy efectivo para eliminar altas concentraciones de contaminantes orgánicos (Pariatamby y Kee, 2016). La coagulación consiste en agregar un coagulante químico con cargas opuestas a la del contaminante en suspensión para su neutralización. A continuación, durante el proceso de floculación, las partículas comienzan a unirse entre sí formando microfloculos que irán cambiando a macrofloculos visibles. Una vez que los floculos tienen el tamaño y la resistencia óptima, se produce su sedimentación (Kumari *et al.*, 2020). El coagulante más empleado debido a su bajo coste y alta disponibilidad es el sulfato de aluminio. Sin embargo, este compuesto suele producir una gran cantidad de lodo y puede ser tóxico (Pariatamby y Kee, 2016).
- **Extracción química.** Consiste en el empleo de solventes o surfactantes para aumentar la solubilidad de contaminantes orgánicos hidrófobos (Sillanpaa, 2020). La principal limitación es que los contaminantes transferidos al disolvente deben destruirse mediante un método secundario (Lodolo *et al.*, 2001).
- **Procesos de oxidación avanzada.** Son tecnologías ecológicamente limpias que dependen de la formación de radicales hidroxilo (-OH), uno de los agentes oxidantes más reactivos, capaces de reaccionar con prácticamente todos los compuestos orgánicos, degradándolos en productos no tóxicos (Venny *et al.*, 2012; Kumari *et al.*, 2020). Cabe destacar la oxidación de Fenton como técnica de remediación de suelos contaminados por COPs (Venny *et al.*, 2012).
- **Incineración.** Consiste en un tratamiento destructivo mediante el empleo de altas temperaturas (870-1200 °C). El material que se pretende descontaminar se introduce

en un incinerador bajo condiciones controladas donde es degradado hasta sustancias volátiles inocuas. Esta técnica se caracteriza por tener una alta eficiencia, pero, en algunos casos, puede provocar una liberación de COPs no destruidos y recién formados, como las dioxinas y furanos, contaminando el medio ambiente (Lodolo *et al.*, 2001). Además, en sí misma esta técnica contribuye a incrementar la contaminación del ambiente debido a la emisión de CO₂ asociada a ella.

- **Desorción térmica.** Proceso para eliminar contaminantes volátiles y semivolátiles, especialmente aquellos que quedan absorbidos en los materiales residuales, calentando a temperaturas lo suficientemente altas (170-550 °C) como para evaporarlos. Sin embargo, no es una tecnología independiente, y el gas de escape debe ser tratado posteriormente (Lodolo *et al.*, 2001).
- **Métodos biológicos y/o biotecnológicos:** consisten en el empleo de organismos vivos o productos de éstos, principalmente plantas y microorganismos, para eliminar sustancias contaminantes de un ambiente. Incluyen diversas técnicas entre las que se encuadran las siguientes estrategias de interés:
- **Fitorremediación.** Uso de plantas y, en consecuencia, de los microorganismos asociados a ellas para la absorción, acumulación y metabolización de contaminantes del suelo. Dependiendo de sus propiedades, los contaminantes orgánicos pueden degradarse en la zona de la raíz o bien ser incorporados a la planta, seguido de su degradación, secuestro o volatilización (Morillo y Villaverde, 2017). En las asociaciones entre plantas y bacterias, los COPs pueden ser degradados por las bacterias, principalmente rizobacterias, que poseen los genes catabólicos necesarios, mientras la planta les proporciona las condiciones óptimas para su proliferación (Arslan *et al.*, 2017).
 - **Laboreo o *landfarming*, compostaje y bioventeo.** Mientras el laboreo implica esparcir una delgada capa de suelo contaminado excavado en el terreno, el compostaje consiste en apilar suelo contaminado en montones, y en ambos casos, se estimula la actividad microbiana aeróbica mediante aireación o adición de nutrientes (Sillanpaa, 2020). Por otro lado, el bioventeo, es un proceso de aireación del suelo o agua para estimular la biodegradación de los contaminantes orgánicos (Gaur *et al.*, 2018). Estas estrategias destacan por su bajo coste, su sencillez, al no requerir una infraestructura compleja, y su probada efectividad en la detoxificación de residuos.
 - **Biorremediación microbiana.** Consiste en emplear microorganismos directamente en el foco de la contaminación, de manera que la descontaminación se produce debido a la capacidad natural que tienen para transformar moléculas orgánicas en sustancias más pequeñas y menos tóxicas. Se suelen emplear los microorganismos debido a su naturaleza ubicua, su capacidad para trabajar en condiciones extremas, su mecanismo

catalítico efectivo y su gran diversidad (Pariatamby y Kee, 2016). Además, es una técnica de bajo coste, muy sencilla y efectiva, con una alta aceptación social y respetuosa con el medio ambiente (Morillo y Villaverde, 2017). La biorremediación se puede aplicar desde dos puntos de vista: bioestimulación, que consiste en ajustar las condiciones ambientales y adicionar nutrientes y aceptores de electrones al suelo contaminado, con el fin de fomentar el crecimiento de poblaciones microbianas degradadoras y, por lo tanto, para disminuir la concentración de contaminantes del suelo; y, bioaumentación, que consiste en inocular microorganismos con capacidad de degradar contaminantes en el suelo cuando las poblaciones microbianas nativas no son capaces de metabolizar el contaminante o cuando la cantidad de microorganismos no es lo suficientemente grande para ser efectiva (Alkorta *et al.*, 2017).

Algunos de los microorganismos más empleados en la biorremediación de ambientes contaminados por COPs aparecen representados en la Tabla 2.

Tabla 2. Microorganismos degradadores de COPs (Gadd, 2001; Singh *et al.*, 2017; Gaur *et al.*, 2018).

Bacterias y actinobacterias	Hongos y levaduras
<i>Achromobacter</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<i>Acinetobacter</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>
<i>Alcaligenes</i>	<i>Lentinula edodes</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Penicillium</i>
<i>Corynebacterium</i>	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>
<i>Enterobacter</i>	<i>Pleurotus ostreatus</i>
<i>Escherichia</i>	<i>Trametes versicolor</i>
<i>Klebsiella</i>	<i>Trichoderma harzianum</i>
<i>Microbacterium</i>	<i>Trichoderma viride</i>
<i>Pseudomonas</i>	
<i>Rhodococcus</i>	

Diversos estudios han determinado la eliminación exitosa de COPs mediante la adición de muchas de las bacterias y actinobacterias recopiladas en la Tabla 2. Por ejemplo, se conoce la capacidad degradadora de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) por cepas de bacterias como *Microbacterium*, *Alcaligenes* y *Achromobacter*, así como se han realizado ensayos sobre degradación de pesticidas por parte de consorcios bacterianos formados por *Acinetobacter*, *Pseudomonas* (como *Pseudomonas putida* o *Pseudomonas aeruginosa*), *Bacillus* o *Klebsiella* (Gaur *et al.*, 2018). Además, cabe destacar la gran diversidad de rutas catabólicas que presentan los microorganismos del género *Rhodococcus* (Figura 2) que, junto con otras

características, como su capacidad para absorber y metabolizar compuestos hidrófobos, formar biopelículas o persistir en condiciones adversas, convierten a estas actinobacterias en uno de los grupos microbianos más prometedores y adecuados para la biodegradación de compuestos que otros organismos no pueden transformar fácilmente.

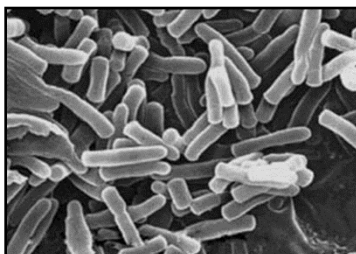


Figura 2. *Rhodococcus* sp. (Ponce-Granillo *et al.*, 2016)

Los compuestos xenobióticos metabolizados por *Rhodococcus* cubren una amplia gama de grupos estructurales, que incluyen hidrocarburos alifáticos y aromáticos, compuestos nitroaromáticos y halogenados como los policlorobifenilos (PCB), diversos herbicidas y, sobre todo, nitrilos (Martínková *et al.*, 2009). Por lo tanto, el acetonitrilo, a pesar de su carácter tóxico en la naturaleza, puede llegar a ser degradado por microorganismos como *Rhodococcus* (Santoshkumar *et al.*, 2010). Esto se consigue a partir de enzimas hidrolizadoras de nitrilos como la nitrilo hidratasa, la amidasa y/o la nitrilasa (Sulistinah y Riffiani, 2018). Para ello, se diferencian dos rutas degradativas claras: por un lado, la degradación puede ocurrir en dos pasos, mediante la participación de las enzimas nitrilo hidratasa y amidasa, de manera que, en primer lugar, el nitrilo es transformado en amida mediante la enzima nitrilo hidratasa (Figura 3a), y posteriormente, este compuesto es degradado por la amidasa hasta ácido carboxílico y amoníaco (Figura 3b) (Nawaz *et al.*, 1989).

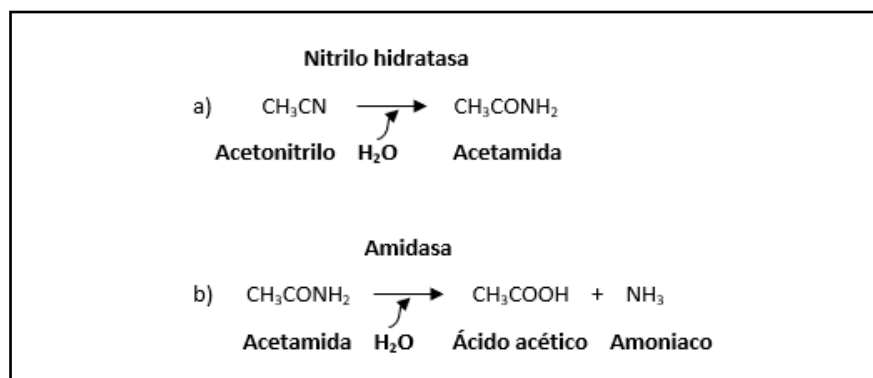


Figura 3. Reacciones de: a) transformación del nitrilo en amida y, b) degradación de la amida formada en ácido carboxílico y amoníaco (modificado de Håkansson y Mattiasson, 2002).

Y, por otro lado, mediante la enzima nitrilasa, se puede transformar directamente el nitrilo, en un único paso, en el ácido carboxílico correspondiente y amoníaco (Figura 4) (Nawaz *et al.*, 1989).

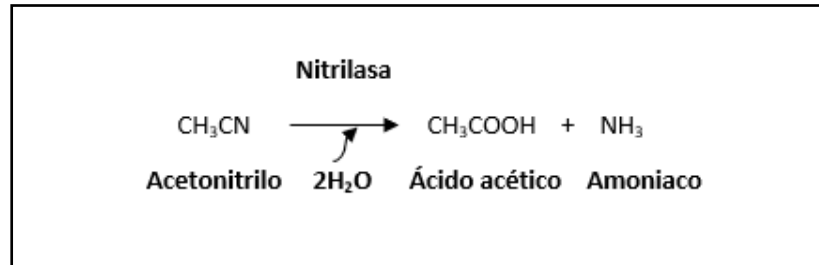


Figura 4. Reacción directa de transformación del nitrilo en ácido carboxílico y amoníaco (modificado de Sulistinah y Riffiani, 2018).

Por último, aunque las aplicaciones biorremediadoras de los hongos sobre este tipo de compuestos no son tan numerosas en comparación con las derivadas del uso de bacterias, los microorganismos eucariotas también tienen un papel fundamental a través de la descomposición y transformación de materiales orgánicos. Entre las especies más empleadas en investigación destacan, por su gran versatilidad, los hongos de la podredumbre blanca, sobre todo *Phanerochaete chrysosporium*, que posee un gran potencial para la biorremediación de pesticidas, HAP, PCB y muchos otros contaminantes (Novotný *et al.*, 2004).

A pesar de que tradicionalmente se han empleado los métodos físico-químicos para la remediación de suelos contaminados, estas estrategias suelen ser caras y pueden afectar negativamente a la integridad de los ecosistemas (Alkorta *et al.*, 2017). Los métodos biológicos, sobre todo la biorremediación microbiana, son preferibles y presentan grandes ventajas respecto a otras técnicas de descontaminación o eliminación de residuos contaminantes. Destacan su bajo coste, alta efectividad, así como el hecho de que no requieren de grandes ni complejas instalaciones. Se trata de métodos respetuosos con el medio ambiente que permiten lograr una degradación completa de los contaminantes orgánicos sin consecuencias colaterales, como la destrucción de los materiales colindantes o del área impactada, además, actuando desde el respeto de la fauna y flora autóctonas (Ang *et al.*, 2005; Gaur *et al.*, 2018).

1.4. Objetivos

El rápido incremento de la contaminación ambiental como consecuencia de las actividades antropogénicas plantea serias preocupaciones sobre la salud de los organismos y de los ecosistemas, de cuyas funciones dependen considerablemente las actividades socioeconómicas y culturales de la sociedad actual y de futuras generaciones. Por ello, surge la necesidad de tomar medidas para proteger

el medio ambiente, tanto en términos cualitativos como cuantitativos, garantizando así su sostenibilidad. En este contexto, se plantea el objetivo principal de este TFG, como la caracterización de cepas del género *Rhodococcus*, aisladas previamente de un proceso de compostaje de restos lignocelulósicos, para comprobar su potencial biotecnológico en tareas de biorremediación de compuestos orgánicos contaminantes, concretamente de acetonitrilos.

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

1. Comprobar la toxicidad del acetonitrilo sobre las cepas a ensayar.
2. Analizar cualitativa y cuantitativamente la capacidad de degradación de la colección de cepas.
3. Comprobar la efectividad de los microorganismos más prometedores *in vitro*.
4. Caracterizar el potencial enzimático de los microorganismos en base a su identidad molecular.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Diseño experimental

Para cumplimentar los objetivos planteados, se desarrollaron una serie de experimentos que se ejecutaron de acuerdo con el esquema indicado en la Figura 5.

El objetivo principal de estos ensayos fue caracterizar, en base a la capacidad de utilizar el acetonitrilo, una colección de cepas del género *Rhodococcus* previamente aislada de muestras de compostaje de restos lignocelulósicos, y, seleccionar aquellas con un mayor potencial como agentes degradadores de dicho contaminante orgánico.

En primer lugar, se estudió la posible toxicidad del acetonitrilo sobre las cepas en cultivo puro (Objetivo 1).

Los microorganismos de la colección se sometieron a dos ensayos: un ensayo cualitativo para la caracterización de su espectro de actuación sobre varios medios adicionados con el compuesto a ensayar, a partir de cuyos resultados se seleccionaron las cepas con mayor potencial biodegradador de acetonitrilos; y un ensayo cuantitativo, basado en el crecimiento microbiano, la variación del pH y la producción de amonio a partir de una muestra líquida, con el que se cuantificó la capacidad de las cepas anteriormente seleccionadas para crecer empleando el acetonitrilo (Objetivo 2).

Tras comprobar cómo afectaban estas actinobacterias por sí solas al desarrollo de semillas de referencia (berro), se analizó si la presencia de dichas cepas sería capaz de remitir el daño que implica un contaminante orgánico volátil como el acetonitrilo en el ambiente (Objetivo 3).

Por último, y de forma paralela, se caracterizaron molecularmente las cepas más prometedoras, evaluando su capacidad para producir enzimas relacionadas con la degradación de nitrilos mediante extracción de ADN y amplificación por PCR, empleando cebadores específicos para dichas enzimas (Objetivo 4).

A continuación, se describen detalladamente cada uno de los experimentos indicados (Figura 5).



Figura 5. Esquema del diseño experimental realizado.

2.2. Colección de cepas del género *Rhodococcus*

La colección de cepas del género *Rhodococcus* empleada en los experimentos correspondientes al presente TFG (Tabla 3), pertenece a una colección de microorganismos del grupo de investigación BIO-175 de la Universidad de Almería, previamente aislados a lo largo de diferentes etapas de un proceso de compostaje de restos lignocelulósicos.

Tabla 3. Cepas de *Rhodococcus* de la colección de trabajo.

Código	Identidad	% Identidad (Blast)	Número Acceso (Blast)
410	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	99	AB562467.1
487	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	99	JQ040005.1
494	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	99	AB562467.1
517	<i>Rhodococcus phenolicus</i>	99	AB562489.1
578	<i>Rhodococcus pyridinivorans</i>	98	JQ229777.1
656	<i>Rhodococcus ruber</i>	99	JX979148.1
661	<i>Rhodococcus phenolicus</i>	99	AB562489.1
671	<i>Rhodococcus coprophilus</i>	98	KF410348.1
702	<i>Rhodococcus indicum</i>	99	JQ889713.1
722	<i>Rhodococcus indicum</i>	99	JQ889713.1
801	<i>Rhodococcus indicum</i>	99	JQ889713.1
1031	<i>Rhodococcus phenolicus</i>	98	AB562489.1
2535	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	98	AB562467.1
2576	<i>Rhodococcus pyridinivorans</i>	99	KF953541.1
2724	<i>Rhodococcus pyridinivorans</i>	99	KF975435.1
2794	<i>Rhodococcus gordoniae</i>	98	EU741104.1

Para el mantenimiento de la colección, se llevaron a cabo resiembras periódicas mediante siembra en aislamiento con estrías sobre placas de Petri con medio APHA, para comprobar la ausencia de posibles morfotipos coloniales contaminantes interfiriendo con el crecimiento de los microorganismos objeto de estudio en cultivo axénico, así como siembra en “slant”, es decir, en tubos de agar inclinado de medio APHA, para su conservación a medio-largo plazo en cámara fría (4 °C). Las condiciones de incubación en ambos casos fueron de 72 horas, al tratarse de actinobacterias, y 30 °C, pues todas las cepas presentaron su óptimo de crecimiento en el rango mesófilo de temperatura.

2.3. Ensayos de toxicidad sobre cepas de *Rhodococcus*

En esta primera fase se probó la capacidad de las cepas de la colección (Tabla 3) para crecer en presencia de acetonitrilo, es decir, se estudió la posible toxicidad de este compuesto sobre las actinobacterias.

Para ello, se llevaron a cabo tres estrategias que consistieron en sembrar las cepas en un medio nutritivo y en un medio selectivo, ambos medios sólidos y con acetonitrilo; y comparar el crecimiento de las cepas en un medio genérico sólido en presencia de acetonitrilo volatilizado y en el mismo medio en ausencia total de acetonitrilo.

2.3.1. Toxicidad en medio nutritivo con acetonitrilo

En el primer caso (Figura 6), se recogió biomasa de colonias aisladas de cada una de las cepas de la colección en cultivo puro y se sembraron en tubos de 5 mL de un medio líquido, caldo nutritivo (CN) (Panreac), con el objetivo de obtener preinóculos que permitieran activar el metabolismo de los

microorganismos como paso previo a su exposición al acetonitrilo. Las actinobacterias se incubaron durante 72 horas, a 30 °C y en agitación para evitar condiciones de anaerobiosis. Pasado el periodo de incubación, las cepas se sembraron de forma masiva sobre la superficie de un medio sólido selectivo elaborado mediante la adición a un medio general APHA (Panreac) de 5 mL de acetonitrilo (0,5% v/v), incorporado al matraz tras ser autoclavado dicho medio (121 °C durante 20 minutos), usando una jeringuilla con un filtro estéril para materiales orgánicos de nitrato de celulosa de 0,22 µm de poro (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Goettingen, Alemania) en condiciones de asepsia (el acetonitrilo se incorporó siempre de esta manera en los ensayos subsiguientes). Se realizaron dos réplicas de la siembra para garantizar la repetitividad de los resultados. En este caso, el periodo de incubación fue de 120 horas con objeto de no perder resultados positivos debidos al lento crecimiento de las cepas en este medio. Pasado este tiempo, la lectura de los resultados se basó en la asignación de tres posibles valores en función del crecimiento y otras características observadas en las cepas: 0 para ausencia de crecimiento, 1 para poco crecimiento y pérdida de color y 2 para crecimiento igual o mayor que en placas control (sin acetonitrilo) y sin pérdida de color.

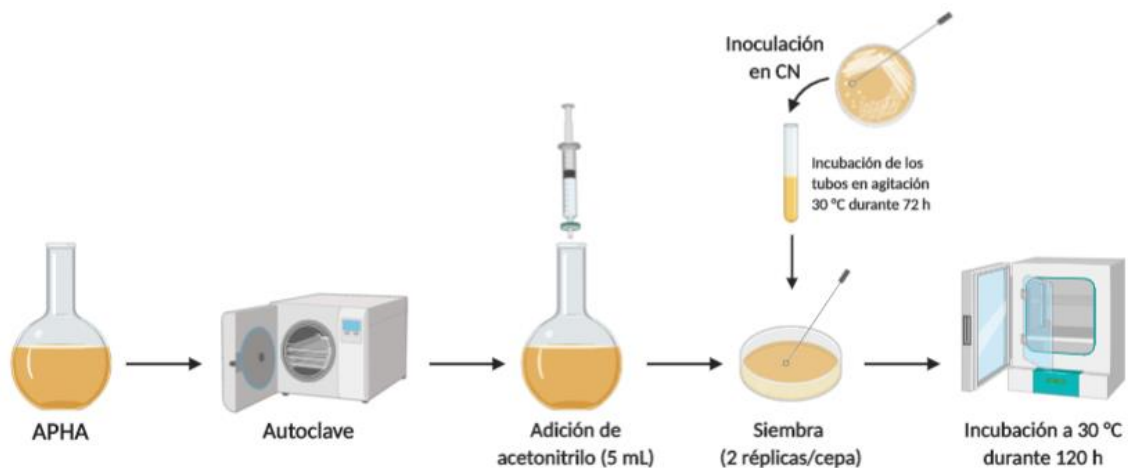


Figura 6. Esquema del estudio de toxicidad en medio nutritivo sólido con acetonitrilo.

2.3.2. Toxicidad en medio selectivo con acetonitrilo

En el segundo caso, se preparó un medio de sales minerales (MSM) más restrictivo, cuya composición se especifica en la Tabla 4, de acuerdo con el protocolo presente en Santoshkumar *et al.* (2010). Una vez incorporados todos los elementos, el pH del medio se ajustó a 7, mediante adición de NaOH o HCl, según el valor de partida fuera ácido o básico, respectivamente. A continuación, se añadieron al matraz 10 g/L de glucosa como fuente de carbono suplementaria, rojo fenol al 0,02% (p/v) y agar bacteriológico (Liofilchem) al 2%, y éste se autoclavó durante 20 minutos a 121 °C. En condiciones asépticas, se incorporó posteriormente acetonitrilo al 0,1% v/v.

Tabla 4. Composición mineral del medio selectivo para el estudio de toxicidad por acetonitrilo.

Componentes	Cantidad (g·L ⁻¹)
K ₂ HPO ₄	6,8
KH ₂ PO ₄	1,2
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1
MnSO ₄ ·4H ₂ O	0,1
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,1
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,1
Na ₂ MoO ₇ ·2H ₂ O	0,006

Una vez preparado el medio, se resuspendió biomasa de colonias aisladas a partir de cada una de las cepas en eppendorfs con 900 µL de solución salina estéril (NaCl 0,9% p/v) y se inocularon sobre la superficie mediante gotas de 20 µL de estas suspensiones, colocando tres réplicas por cepa (Figura 7). Pasado el periodo de incubación (120 horas a 30 °C), la lectura de los resultados se basó en el crecimiento de las cepas y, principalmente, en el viraje de color del medio debido al indicador de pH rojo fenol, de manera que: si la cepa es capaz de degradar el acetonitrilo y utilizarlo como fuente de carbono y nitrógeno, liberará amonio, lo que producirá un aumento del pH y un cambio de color del medio de rojo a rosa; mientras que, si la cepa no es capaz de emplear el acetonitrilo, el color permanecerá igual o virará a amarillo, en el caso de que se reduzca el pH como consecuencia de otras actividades metabólicas de la cepa. Los resultados, de nuevo, se expresaron como tres posibles valores en base a los criterios mencionados: 0 para ausencia de crecimiento, 1 para crecimiento y viraje del color a amarillo/naranja y 2 para crecimiento y viraje del color a rosa.



Figura 7. Esquema del estudio de toxicidad en medio selectivo con acetonitrilo.

2.3.3. Toxicidad en ambiente contaminado por acetonitrilo volátil

En el tercer caso (Figura 8), a partir de cada una de las cepas de la colección se llevó a cabo una siembra por estrías en medio general APHA (Panreac). Se realizaron cuatro réplicas de la siembra de cada cepa en este medio: dos de las réplicas se incubaron en ausencia total de acetonitrilo y se usaron como control de un adecuado crecimiento de cada actinobacteria, y las otras dos réplicas se

incubaron en el interior de un recipiente herméticamente cerrado junto a un vaso de precipitado que contenía 10 mL de acetonitrilo. Tras 120 horas a 30 °C, el acetonitrilo se evaporó por completo, entrando en contacto con las cepas cultivadas que se encontraban dentro del recipiente. La lectura de estas placas se basó, al igual que el primer ensayo de toxicidad (Apartado 2.3.1), en la asignación de tres posibles valores en función del crecimiento y otras características observadas en las cepas: 0 para ausencia de crecimiento, 1 para crecimiento menor que en las placas control y pérdida de color y 2 para crecimiento igual o mayor que en las placas control y sin pérdida de color.

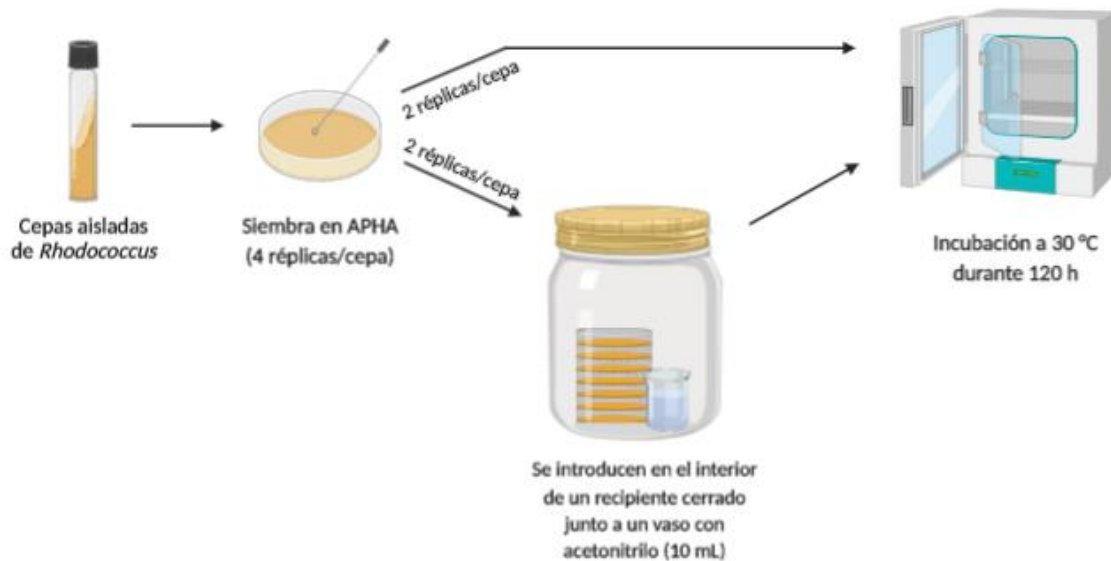


Figura 8. Esquema del estudio de toxicidad por compuestos volátiles.

2.4. Estudio de metabolismo y cometabolismo

En esta fase se llevó a cabo un estudio del crecimiento diferencial que mostraban las cepas de la colección en condiciones más restrictivas, es decir, en MSM exclusivamente con acetonitrilo como fuente de carbono, nitrógeno y energía; en comparación con MSM con glucosa y acetonitrilo.

En primer lugar, se realizó un ensayo cualitativo que sirvió de cribado de las cepas más prometedoras, sobre medios sólidos. Siguiendo el mismo procedimiento explicado en el Apartado 2.3.2, se preparó de nuevo el MSM, con rojo fenol al 0,02% (p/v) y agar bacteriológico (Liofilchem) al 2%, incluido. Se obtuvieron dos medios sólidos selectivos diferentes según la fuente de carbono y nitrógeno empleada: MSM con acetonitrilo al 0,1% v/v adicionado con 10 g/L glucosa (Medio Glucosa + 0,1%) y MSM con acetonitrilo al 0,1% v/v como única fuente de carbono y nitrógeno (Medio 0,1%). Además, para obtener una caracterización cualitativa completa de las cepas, se volvió a preparar el medio nutritivo APHA (Panreac) inoculado con acetonitrilo al 0,5% v/v (APHA + 0,5%) del Apartado 2.3.1.

Se resuspendió biomasa de colonias aisladas a partir de cada una de las cepas en eppendorfs con 900 µL de solución salina estéril (NaCl 0,9% p/v) y se inocularon sobre la superficie de estos medios

mediante gotas de 80 μL y dos repeticiones (Figura 9). Las placas fueron incubadas durante 120 horas a 30 $^{\circ}\text{C}$. La lectura de resultados se basó en el espectro de crecimiento de las cepas en los 3 medios en los que se sembraron, teniendo en cuenta tanto si pudieron crecer, o no, como el viraje de color, en base a la variación del pH, en los MSM.

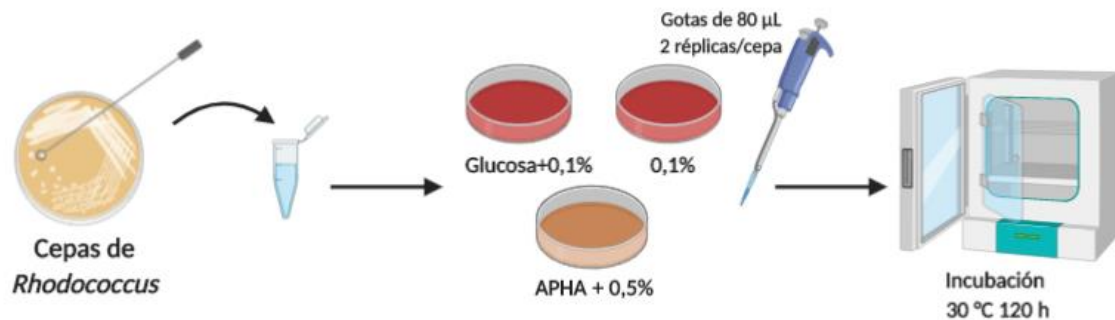


Figura 9. Esquema del ensayo cualitativo de degradación de acetonitrilo.

Una vez finalizado el análisis cualitativo de la capacidad de degradación de la colección, para estimar el potencial biorremediador de las cepas, se cuantificó la capacidad de éstas para metabolizar el acetonitrilo. Para ello, los microorganismos se incubaron en los mismos medios selectivos del ensayo previo, pero en su versión líquida, es decir, sin adición de agar bacteriológico: medio líquido con el acetonitrilo como única fuente de carbono y nitrógeno, 500 mL de MSM y acetonitrilo al 0,1% v/v; y medio líquido con el acetonitrilo adicionado con glucosa, 500 mL de MSM, acetonitrilo al 0,1% v/v y 10 g/L de glucosa. Ambos MSM fueron preparados sin añadir rojo fenol ni agar bacteriológico. Las cepas fueron inoculadas en botes de 100 mL que contenían 50 mL de cada uno de los medios selectivos.

Tras la inoculación y cada 72 horas, se realizaron recuentos de unidades formadoras de colonias por mL (UFC/mL) para el seguimiento de la viabilidad y el crecimiento del cultivo (Paso 1 del esquema, en Figura 10). Para ello, se realizaron diluciones decimales seriadas en eppendorf con 900 μL de solución salina estéril (NaCl 0,9% p/v) a partir del bote inoculado. La primera dilución (10^{-1}) contenía 100 μL del cultivo y 900 μL de solución salina. A partir de esta, se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-6} , de las cuales se realizaron siembras desde 10^{-3} hasta 10^{-6} , utilizando bolitas de vidrio estériles para la dispersión homogénea del volumen inoculado en la superficie (0,1 mL de cada dilución) de placas de APHA (Panreac). Los botes inoculados, así como las placas sembradas, se devolvían tras cada sesión de trabajo a la cámara de incubación (30 $^{\circ}\text{C}$) para que continuara el proceso de crecimiento de los microorganismos. Pasado el periodo de incubación, se realizaron recuentos de colonias para el cálculo de UFC/mL, que posteriormente permitieron el seguimiento de la evolución de las cepas a lo largo del tiempo.

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

Además de los recuentos de colonias, cada 72 horas se realizaron también, directamente de los botes inoculados, medidas de pH, empleando un peachimetro (Crison) y se determinó la concentración de amonio liberado mediante el empleo del reactivo de Nessler (Paso 2 del esquema, en Figura 10), el cual está formado por 2 reactivos: reactivo A, compuesto por (L^{-1}) 50 g de HgI_2 , 36,5 g de KI y 1 L de H_2O destilada; y reactivo B, compuesto por (L^{-1}) 150 g de KOH puro y 1 L de H_2O destilada. Mezclado con el cultivo líquido, forma un precipitado de color naranja si detecta grandes concentraciones de amonio. Ambos parámetros, pH y amonio, están altamente relacionados y permitieron cuantificar de manera indirecta el nivel de degradación del acetonitrilo por las cepas seleccionadas.

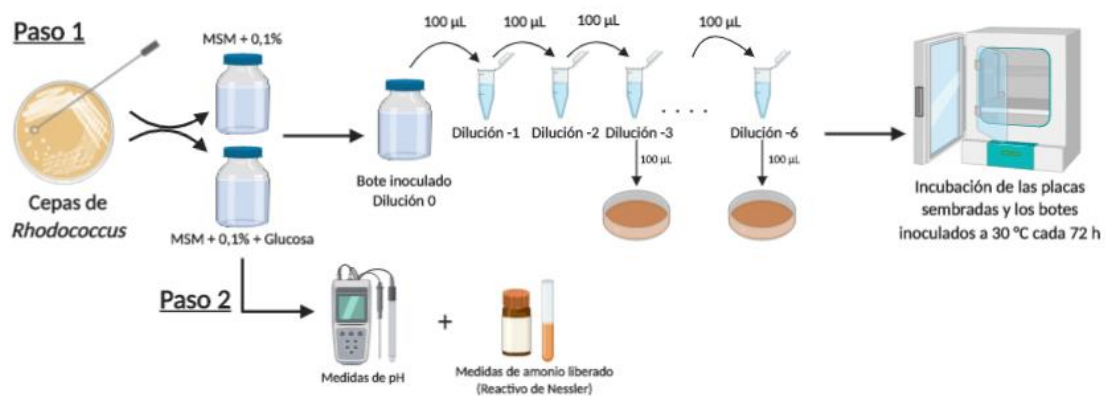


Figura 10. Esquema del ensayo cuantitativo de degradación de acetonitrilo.

2.5. Comprobación *in vitro* de la capacidad protectora de *Rhodococcus*: bioensayo de fitotoxicidad

Con objeto de comprobar la efectividad de las cepas de la colección y demostrar su capacidad para retener los posibles daños que pueden provocar contaminantes como el acetonitrilo sobre el ambiente, se planteó llevar a cabo un ensayo conformado por dos partes.

La primera parte (Figura 11) consistió en comprobar cómo afectan estas cepas por sí solas al desarrollo de semillas de referencia, es decir, determinar si estas actinobacterias producen fitotoxicidad o no. Para ello, se sembraron semillas de berro en presencia de una concentración microbiana determinada. Dicha concentración fue de 10^5 y se alcanzó realizando diluciones decimales en H_2O destilada estéril a partir de CN (Panreac) previamente inoculado e incubado durante 72 horas. El número de diluciones dependió de la carga microbiana de partida, estimada a partir del cálculo de las UFC/mL en placas de APHA (Panreac) sembradas a partir de diluciones decimales seriadas (desde 10^{-3} hasta 10^{-6}) del CN inoculado con las cepas. Una vez conocida la concentración microbiana de partida, las primeras diluciones decimales que se realizaron hasta alcanzar una concentración de 10^6 se llevaron a cabo mediante transferencias de 100 µL a eppendorfs que contenían 900 µL de H_2O destilada estéril. En este punto no se usó solución salina para no afectar al crecimiento de las semillas. Para alcanzar la concentración de 10^5 se realizó la última dilución transfiriendo todo el contenido de la dilución 10^6 (1 mL) a un tubo que contenía 9 mL de H_2O destilada estéril, de esta manera se pudo

disponer del volumen necesario para humectar los papeles de filtro estériles incorporados a las placas sobre los que se dispusieron las semillas de berro (*Lepidium sativum*) indicadoras.

A continuación, se prepararon las placas para el bioensayo de fitotoxicidad: 4 placas para control de agua y 4 placas por cepa, todas con un filtro de papel estéril en su interior. Mientras en las placas control se repartieron 2 mL de H₂O destilada estéril por placa sobre el papel de filtro y se colocaron 25 semillas de berro, en las placas preparadas para las cepas se repartieron 2 mL de la dilución 10⁵ de cada microorganismo y se colocaron 25 semillas de berro por placa. En total, se llevó a cabo el ensayo respecto a 100 semillas en cada caso. Todas las placas fueron incubadas a 25 °C y en oscuridad, durante 72 horas.

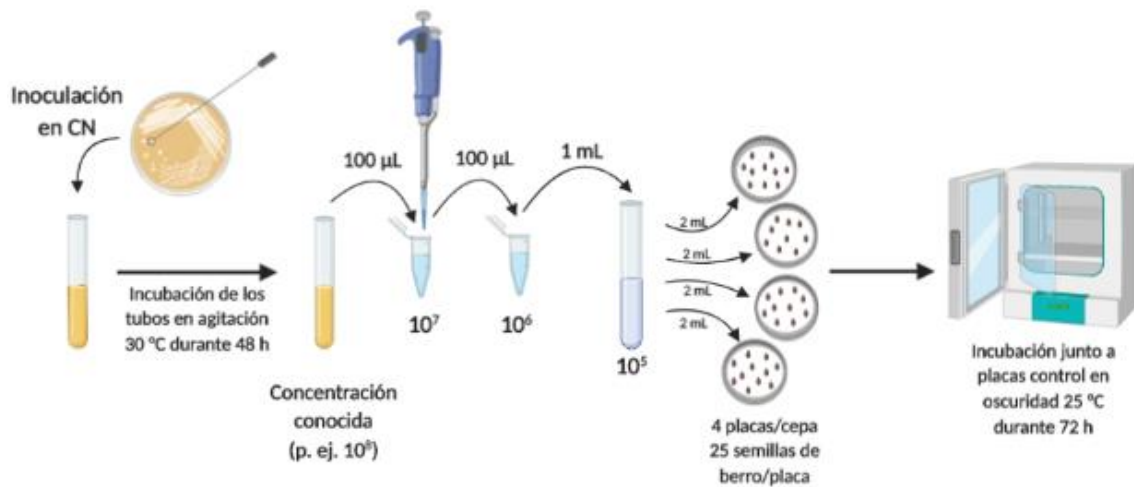


Figura 11. Esquema del estudio de fitotoxicidad in vitro por las cepas seleccionadas.

Pasado el periodo de incubación, se comparó el desarrollo de las semillas en presencia de estas cepas con el control de agua mediante la medición de la longitud de las radículas. A partir de estos datos, se calculó el valor promedio de la longitud de las radículas del control de agua (L_c) y de las inoculadas con cepas (L), así como el porcentaje de germinación de las semillas del control de agua (%G_c) y las inoculadas con cepas (%G).

$$\%G = \frac{n^{\circ} \text{ de semillas que han germinado}}{n^{\circ} \text{ de semillas sembradas}} \times 100$$

Conociendo estos valores se pudo estimar el porcentaje de índice de germinación de cada una de las 4 placas por cepa (%IG) y, por lo tanto, el porcentaje de índice de germinación promedio de la cepa (%IG promedio).

$$\%IG = \frac{\%G \times L}{\%G_c \times L_c} \times 100$$

La segunda parte de este ensayo fue dependiente de los resultados obtenidos en la primera parte, ya que, si estos indicaban que las cepas con las que se trabajó eran agentes fitotóxicos y, por lo tanto, las semillas no conseguían desarrollarse adecuadamente en su presencia, no sería necesario continuar con el experimento y comprobar si remiten, o no, los daños que provoca el acetonitrilo. En el caso de obtener resultados positivos, esta segunda parte, que no se pudo realizar dadas las circunstancias de restricción de movimiento por el Estado de Alarma activado tras conocerse el estallido de la Pandemia por Coronavirus, hubiera consistido en sembrar de nuevo las mismas semillas (berro) inoculadas con la misma concentración microbiana (10^5) pero sobre un sustrato orgánico estéril (mezcla de turba y vermiculita en relación 3:1) y en presencia de acetonitrilo volatilizado.

Para alcanzar una carga microbiana de 10^5 , se repetiría el mismo procedimiento seguido en la primera parte: diluciones decimales en H_2O destilada estéril a partir de CN (Panreac) previamente inoculado e incubado durante 72 horas, realizando la última dilución por transferencia de la dilución 10^6 completa (1 mL) a un tubo de 9 mL de H_2O destilada estéril. La concentración de partida sería la misma que en la primera parte. A continuación, se sumergirían 30 semillas de berro en esa dilución para cada cepa durante 30 minutos, y, pasado este tiempo, se recuperarían del tubo y se sembrarían en un sustrato estéril previamente preparado, el cual se colocaría en el interior de un recipiente cerrado junto a un vaso de precipitado que contenga 10 mL de acetonitrilo (Figura 12). En el caso del control de agua, que representaría un ambiente sin compuestos contaminantes orgánicos volátiles, el procedimiento sería el mismo, pero sumergiendo las 30 semillas en agua y colocando un vaso de precipitado con 10 mL de agua en el interior del recipiente. La incubación se produciría a 25 °C y en oscuridad durante 120 horas. Pasado dicho periodo, se podría determinar si la presencia de las cepas protege, o no, de los efectos del acetonitrilo mediante medición de la longitud de las radículas y el cálculo de los mismos parámetros que en la primera parte (%G y %IG).



Figura 12. Esquema del estudio de fitotoxicidad *in vitro* por COVs.

2.6 Búsqueda molecular de genes asociados a la degradación de nitrilos

Por último, a partir de los resultados obtenidos en el conjunto de ensayos anteriores, se seleccionaron aquellas cepas que poseían mayor capacidad para la degradación de acetonitrilo y se procedió a la búsqueda de genes asociados a la degradación de nitrilos.

La búsqueda se llevó a cabo mediante la amplificación de la secuencia de ADN correspondiente al gen de la nitrilo hidratasa, enzima degradadora de nitrilos. El ADN de las cepas se extrajo tras someterlas 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 actinobacterias seleccionadas, se procedió a amplificar los fragmentos mediante PCR, utilizando un termociclador MyCycler (Biorad, California, EEUU), empleando cebadores específicos para la enzima nitrilo hidratasa (Tabla 5) y con las condiciones de amplificación especificadas en la metodología de Precigou *et al.* (2001) (Figura 13).

Tabla 5. Cebadores específicos para la amplificación del gen de la enzima nitrilo hidratasa.

RDCo225	5'- CCGGCCGGTACAGCCGACC -3'
DRCo1804	5'- CGGTGAATAACAAGCTCGCC -3'

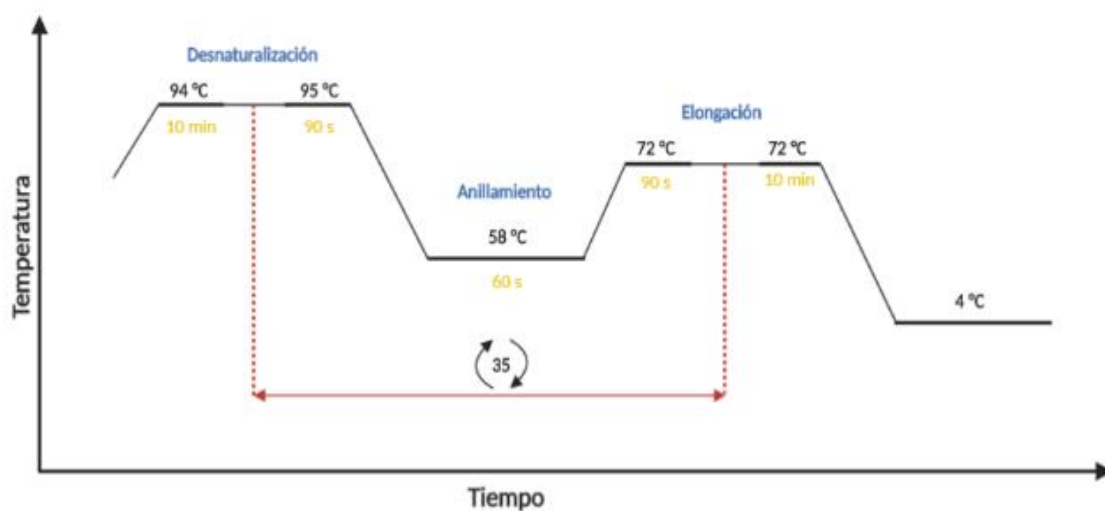


Figura 13. Perfil térmico para la amplificación del gen de la enzima nitrilo hidratasa.

La mezcla para la amplificación estuvo constituida por 2 μL de ADN de la muestra problema, 0,4 μL del cebador *Forward* y otros 0,4 μL del cebador *Reverse*, 10 μL de mix de PCR 2x Biomix Red (Bioline) y 7,2 μL de agua destilada para alcanzar los 20 μL de volumen total.

Y, finalmente, la longitud de los fragmentos se verificó empleando electroforesis en gel de agarosa al 1% con tampón TAE al 1X y suplementado con 0,004% 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), y se visualizaron con luz UV en un transiluminador.

Para el diseño de las figuras número 6 a 13 se empleó el software Biorender (<https://app.biorender.com/signin>).

2.7. 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% ($p < 0,05$), así como análisis de conglomerados y el diagrama de dispersión con el método del Vecino Más Cercano (Vínculo Simple), empleando como métrica de Distancia: Euclideana Cuadrada. 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 los distintos ensayos que se llevaron a cabo durante la parte experimental del trabajo, incluyendo los tres ensayos de toxicidad del acetonitrilo sobre la colección de cepas de *Rhodococcus* (Apartado 2.3), el estudio del metabolismo y cometabolismo de las cepas más prometedoras (Apartado 2.4), la primera parte del ensayo de fitotoxicidad *in vitro* (Apartado 2.5) y la búsqueda molecular de genes asociados a la degradación de nitrilos (Apartado 2.6). Sin embargo, la segunda parte del ensayo de fitotoxicidad (Apartado 2.5) no pudo llegar a realizarse a causa de la pandemia de COVID-19 y el Estado de Alarma decretado en España el 14 de marzo de 2020.

3.1. Efecto tóxico del acetonitrilo sobre cepas pertenecientes al género *Rhodococcus*

Para la comprobación de la toxicidad del acetonitrilo sobre las cepas de la colección de trabajo, se llevaron a cabo 3 pruebas. En las 2 primeras, se estudió la toxicidad del acetonitrilo directamente inoculado en los medios, de manera que se sembraron los microorganismos en un medio sólido APHA que contenía 0,5% v/v de acetonitrilo (condición 1) y en un medio selectivo de sales minerales (MSM) que contenía acetonitrilo al 0,1% v/v y 10 g/L de glucosa (condición 2). En la tercera prueba, las cepas se sembraron en un medio sólido APHA y los efectos de la presencia del acetonitrilo sobre el

crecimiento de las mismas se comprobaron mediante la aplicación de acetonitrilo volatilizado en el ambiente (condición 3).

A cada cepa de la colección se le asignó un valor numérico (0, 1 ó 2) según los resultados observados en cada una de las pruebas, como se recoge en la Tabla 6.

Tabla 6. Interpretación de los resultados cualitativos obtenidos en los ensayos de toxicidad respecto a distintas condiciones. Condición 1) APHA + 0,5% Acetonitrilo; Condición 2) MSM + 0,1% Acetonitrilo + Glucosa; y Condición 3) Acetonitrilo volátil.

Valor	Condiciones 1 y 3	Condición 2
0	Ausencia de crecimiento	Ausencia de crecimiento
1	Poco crecimiento y pérdida de color	Crecimiento y viraje del medio a amarillo/naranja
2	Crecimiento igual o superior que en placas control y sin pérdida de color	Crecimiento y viraje del medio a rosa

Dado el volumen de datos obtenidos en total, se simplificó la lectura de los resultados de los ensayos de toxicidad mediante el cálculo de un promedio de cada cepa considerado como el índice de toxicidad capaz de soportar por cada una de las actinobacterias ensayadas. Teniendo en cuenta este valor calculado, el límite para considerar la selección de cepas con mayor capacidad de resistencia al compuesto tóxico estudiado fue el de aquellos microorganismos con un valor promedio igual o superior al promedio que alcanzaría una cepa que produjera un valor de resistencia a la toxicidad alto en al menos dos de las condiciones estudiadas (valor de 2, ver Tabla 6) y bajo, pero no nulo, en la condición restante (valor de 1, ver Tabla 6), es decir, un valor $\geq 1,7$.

Los resultados de este conjunto de ensayos se muestran en la Tabla 7 y en la Figura 14.

Tabla 7. Medidas de la toxicidad del acetonitrilo sobre las cepas de *Rhodococcus* en tres condiciones diferentes: 1) APHA + 0,5% Acetonitrilo; 2) MSM + 0,1% Acetonitrilo + Glucosa; 3) Acetonitrilo volátil. *Promedio de tolerancia a la toxicidad teniendo en cuenta los valores asignados a las tres condiciones descritas: los valores mayores o iguales de 1,7 implican una mayor resistencia de la cepa a la toxicidad del compuesto ensayado.

CEPAS	APHA + 0,5% Acetonitrilo	MSM + 0,1% Acetonitrilo + Glucosa	Volátiles	Índice de toxicidad soportado*
410	2	0	2	1,3
487	2	2	1	1,7
494	2	0	1	1,0
517	2	2	1	1,7
578	2	2	2	2,0
656	2	0	1	1,0
661	2	0	1	1,0
671	2	2	1	1,7
702	2	1	1	1,3
722	2	1	1	1,3
801	2	2	2	2,0
1031	2	1	1	1,3
2535	2	0	1	1,0
2576	2	2	1	1,7
2724	2	1	1	1,3
2794	2	1	1	1,3

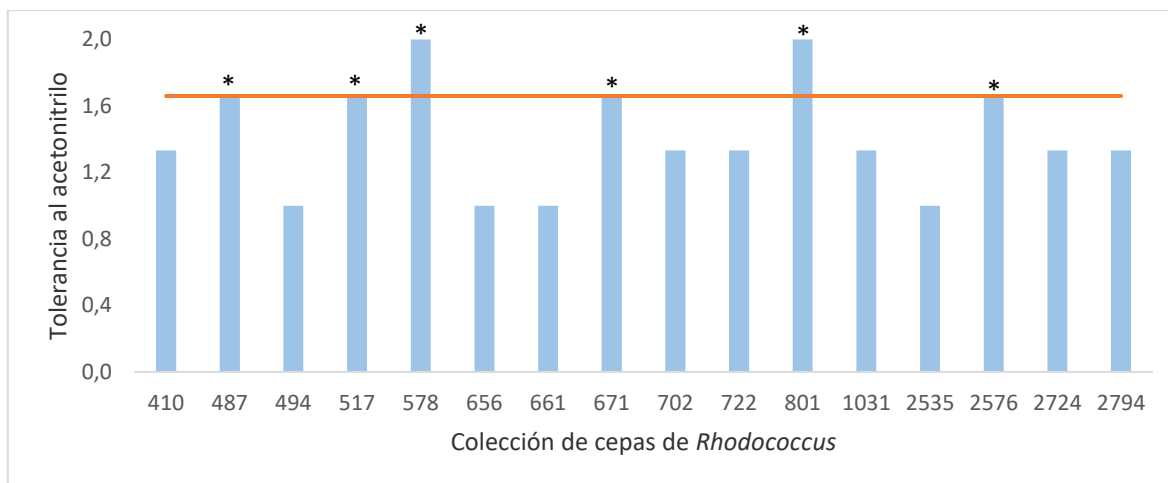


Figura 14. Representación de los valores promedio de tolerancia al acetonitrilo de la colección de cepas de *Rhodococcus*. La línea naranja marca el valor promedio 1,7, a partir del cual se llevó a cabo la preselección de cepas.

Con respecto al ensayo de APHA + 0,5% Acetonitrilo, todas las cepas de *Rhodococcus* de la colección dieron resultados positivos y pudieron desarrollarse completamente en presencia del compuesto a ensayar, por lo que ninguna cepa sufrió toxicidad. Estos resultados fueron los esperados ya que el medio general en el que se sembraron los microorganismos contenía todos los nutrientes necesarios para su crecimiento. El único elemento presente en el medio que podría haber limitado el desarrollo de las cepas era el acetonitrilo, debido a su elevada toxicidad. En el caso de que alguna de las cepas hubiese sido susceptible a este compuesto, no habría podido crecer en su presencia. Sin embargo, es bien conocido el papel de las cepas del género *Rhodococcus* como eficientes degradadoras de una amplia gama de nitrilos, empleándolos como fuente de carbono, nitrógeno y energía (Martínková *et al.*, 2009), lo que lleva implícito su tolerancia al potencial tóxico de este tipo de compuestos, tolerancia que es considerada por Yu *et al.* (2019), en la mayoría de los casos concernientes a cepas de este género, como excelente. Esta actividad catabólica, se ha demostrado en múltiples estudios, que es debida a la presencia en el genoma de estos microorganismos de los genes responsables de dicha degradación, estos son, genes codificantes del sistema enzimático nitrilo hidratasa/amidasa (Figura 3) y/o de la enzima nitrilasa (Figura 4) (Blakey *et al.*, 1995; Okamoto y Eltis, 2007; Egelkamp *et al.*, 2017).

Dicha capacidad degradativa pudo ser comprobada mediante la siembra del cepario en el medio MSM + 0,1% Acetonitrilo + Glucosa. Para ello, se empleó rojo fenol como indicador de pH durante la preparación del mismo, de manera que, si las cepas de *Rhodococcus* fueran capaces de emplear el acetonitrilo como fuente de carbono y nitrógeno, se liberaría amonio como producto final de la reacción, lo que causaría un aumento del pH del medio, resultando en un cambio de color de rojo a rosa (alcalinización del medio). Algunas de las cepas (5) no fueron capaces de crecer en este medio más restrictivo con acetonitrilo como única fuente de nitrógeno. La conclusión principal de dichos resultados es que dichas actinobacterias toleraron la presencia del acetonitrilo, pero no fueron capaces

de utilizarlo como fuente de nutriente y energía. El resto de las actinobacterias de la colección, sí presentaron crecimiento en este medio selectivo. Sin embargo, 5 de ellas presentaron un viraje de color de rojo a amarillo/naranja en su medio, posiblemente como consecuencia de la liberación de ácidos debido al empleo principalmente de la glucosa, pero no del acetonitrilo. Una posible explicación para que estas cepas pudieran crecer sin emplear el acetonitrilo, siendo este compuesto la única fuente de nitrógeno del medio, es que estas actinobacterias fueran fijadoras de nitrógeno atmosférico o, como se ha demostrado en estudios previos realizados en especies de *Rhodococcus*, que se trate de microorganismos oligotrofos capaces de emplear cantidades traza de amoníaco atmosférico (Yoshida *et al.*, 2014) ante la imposibilidad de metabolizar el acetonitrilo del medio. Por último, en las 6 cepas restantes, a las que se les asignó un valor de 2, se observó un mayor crecimiento y, además, los bordes de las colonias crecidas a partir del volumen inoculado en el medio (en forma de gota) adoptaron un color rosa llamativo (Figura 15), siendo esto un indicativo del presunto empleo de acetonitrilo como fuente de carbono y nitrógeno, y la liberación final de amonio.

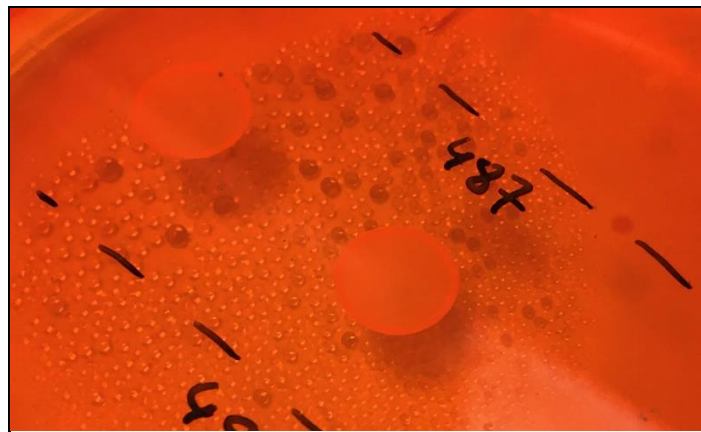


Figura 15. Variación de color de rojo a rosa observada en los bordes de las gotas sembradas en el MSM con acetonitrilo y glucosa.

Teniendo en cuenta la elevada volatilidad del acetonitrilo y los efectos tóxicos y dañinos que puede provocar este compuesto en los organismos y el medio ambiente (Resines-Urien *et al.*, 2019), se pensó que podría ser interesante comprobar cómo afecta la presencia de este compuesto en estado volatilizado (ambiente contaminado) en el desarrollo de las cepas de *Rhodococcus*. Al igual que en el primer ensayo de toxicidad, se demostró que *Rhodococcus* puede crecer, en mayor o menor medida, en presencia de acetonitrilo. Sin embargo, el impacto que tuvo este compuesto en su forma volátil en algunos casos fue mucho mayor que cuando se inoculó directamente en el medio, además de más característico, observándose efectos nocivos sobre la mayoría de las cepas que no se habían producido anteriormente, como la pérdida de coloración. Esta prueba demuestra el gran peligro que puede suponer la liberación de este contaminante volátil a la naturaleza. En esta condición, las cepas que presentaron los mejores resultados fueron la 410, 578 y 801, demostrando ser las cepas de la colección con mayor tolerancia al potencial tóxico del acetonitrilo volátil. Por su parte, las cepas 487 y 671,

crecieron vigorosamente, al igual que las cepas valoradas como “2”, pero recibieron una valoración menor debido a la pérdida de pigmento derivada de las condiciones inhóspitas de crecimiento. En cualquier caso, la presencia del acetonitrilo pudo tener incluso efectos positivos en el crecimiento de las cepas mencionadas, siendo esto un indicativo de las posibles habilidades degradativas de nitrilos de este grupo de actinobacterias. Estos resultados concuerdan con estudios previos de toxicidad por compuestos orgánicos volátiles, como el realizado por Lu *et al.* (2018), en el que se demostró la elevada tolerancia y capacidad degradativa que posee el género *Rhodococcus*, capaz de emplear y eliminar una gran variedad de estos contaminantes.

A pesar de los llamativos resultados de esta última prueba, la preselección se llevó a cabo teniendo en cuenta la actuación de los microorganismos en todas las condiciones estudiadas, ya que el objetivo del trabajo no fue sólo comprobar la tolerancia a la toxicidad del acetonitrilo, obviamente de índole necesaria, sino la capacidad de utilizar este contaminante para poder emplear la cepa o cepas en cuestión como agentes efectivos en tareas de biorremediación. Por ello, en base al comportamiento general de cada cepa para el conjunto de ensayos, se preseleccionaron las 6 más prometedoras, estas fueron las que produjeron un promedio de tolerancia al acetonitrilo igual o superior a 1,7 (Tabla 7, Figura 14): 487, 517, 578, 671, 801 y 2576.

3.2. Utilización de acetonitrilo como fuente de carbono y energía

Para la caracterización cualitativa de los microorganismos degradadores de acetonitrilo, las 6 cepas preseleccionadas a partir de los ensayos de toxicidad se volvieron a sembrar en los medios APHA con acetonitrilo al 0,5% v/v y MSM con acetonitrilo al 0,1% v/v adicionado con 10 g/L glucosa (Apartado 3.1). La repetición de estos ensayos se llevó a cabo para comprobar la susceptibilidad de las cepas preseleccionadas para utilizar el acetonitrilo como fuente de carbono y energía, pero en este caso, se tuvo en cuenta una tercera y nueva condición determinante, que en los ensayos de toxicidad no fue probada: MSM con acetonitrilo al 0,1% v/v como única fuente de carbono y nitrógeno. Esta última condición sirvió para confirmar la capacidad de las cepas para utilizar el acetonitrilo no sólo como fuente de nitrógeno, sino también de carbono, en comparación con las condiciones anteriormente probadas.

Los resultados de las 3 pruebas se muestran en la Tabla 8, expresados como - (ausencia de crecimiento), + (crecimiento sin viraje de color) y ++ (crecimiento con viraje a color rosa).

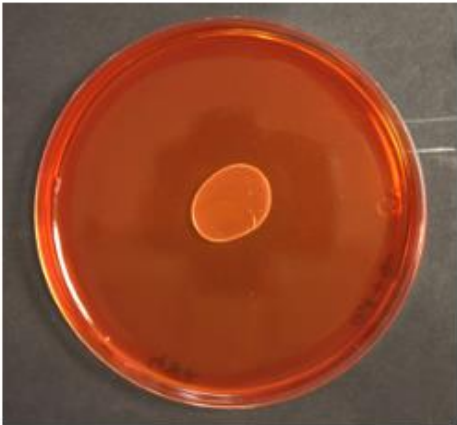
Tabla 8. Caracterización cualitativa de las 6 cepas preseleccionadas respecto a su capacidad para crecer a costa de acetonitrilo como fuente de carbono y energía.

CEPAS	APHA + 0,5% Acetonitrilo	MSM + 0,1% Acetonitrilo + Glucosa	MSM + 0,1% Acetonitrilo
487	++	++	++
517	++	++	+
578	++	++	+
671	++	++	++
801	++	++	+
2576	++	++	-

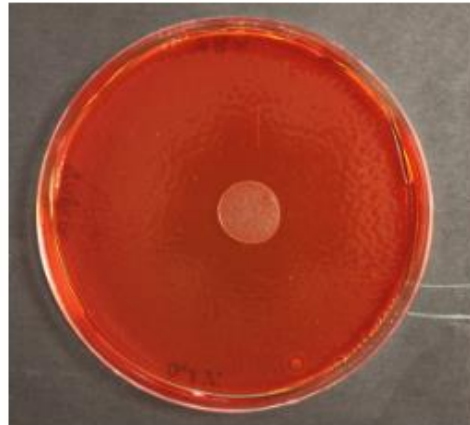
A partir del cribado de cepas derivado de los resultados alcanzados en el apartado 3.1., se llevó a cabo una segunda preselección en función de los resultados obtenidos en las 3 pruebas cualitativas realizadas (Tabla 8) a las 6 cepas. Las cepas escogidas como las mejores candidatas para ser probadas en el posterior ensayo cuantitativo fueron la 487 y la 671, al ser las únicas que obtuvieron ++ en todas las pruebas, por lo que pudieron crecer completamente en todos los medios y emplearon, presuntamente, el acetonitrilo como fuente de nutrientes y energía, al observarse un viraje de color de rojo a rosa en los dos MSM. El resto de las cepas fueron descartadas al presentar una menor versatilidad metabólica. Por ejemplo, la cepa 2576, perteneciente a la especie *Rhodococcus pyridinivorans*, no pudo crecer en el medio que contenía sólo acetonitrilo como fuente de carbono y nitrógeno. Esto puede deberse a que, muchas veces, la eficiencia catalítica de un sistema enzimático, como el sistema nitrilo hidratasa/amidasa, no coincide en un mismo microorganismo y se requiere de la combinación de dos microorganismos diferentes para la completa degradación de un compuesto (Yu *et al.*, 2019). Así lo demostraron Kohyama *et al.* (2006) al emplear *R. pyridinivorans*, con una elevada actividad nitrilo hidratasa, y *Brevundimonas diminuta*, con una elevada actividad amidasa, combinadas para la degradación de acetonitrilo.

En la Figura 16, se muestran las fotografías tomadas de los dos MSM de las 6 cepas preseleccionadas, a excepción del MSM + 0,1% Acetonitrilo de la cepa 2576.

CEPA 487

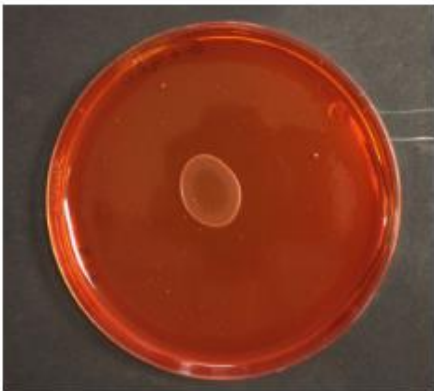


MSM + 0,1% Acetonitrilo + Glucosa

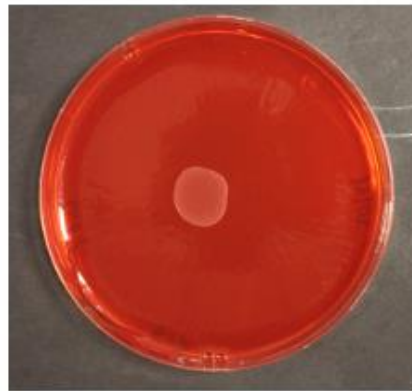


MSM + 0,1% Acetonitrilo

CEPA 517

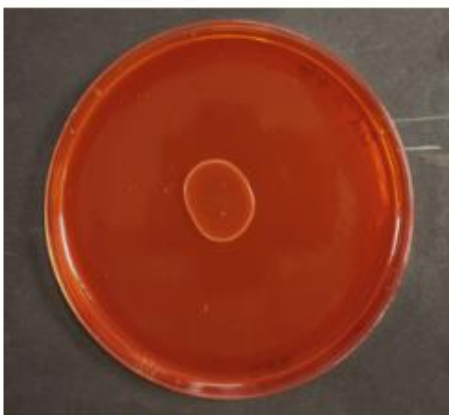


MSM + 0,1% Acetonitrilo + Glucosa

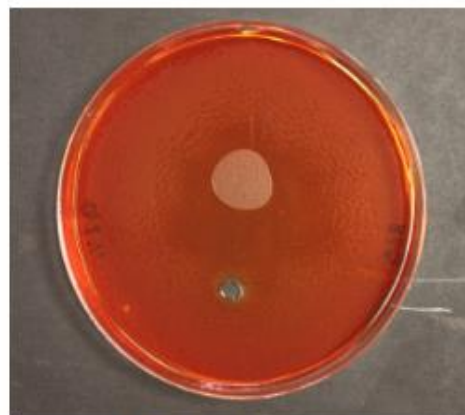


MSM + 0,1% Acetonitrilo

CEPA 578



MSM + 0,1% Acetonitrilo + Glucosa



MSM + 0,1% Acetonitrilo

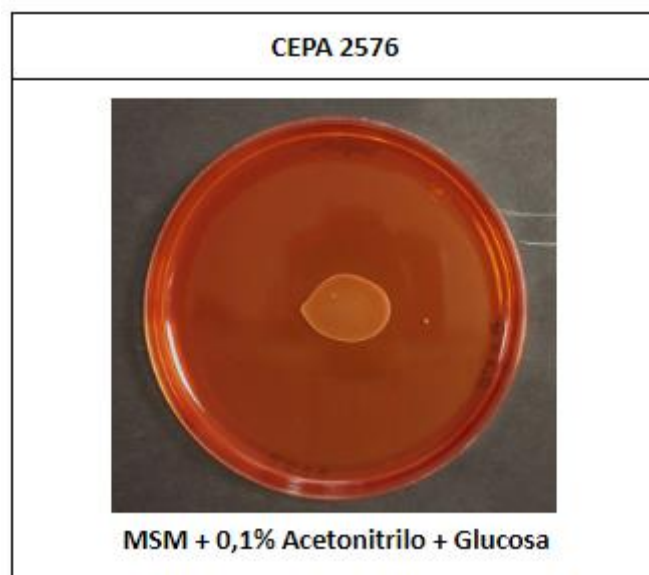
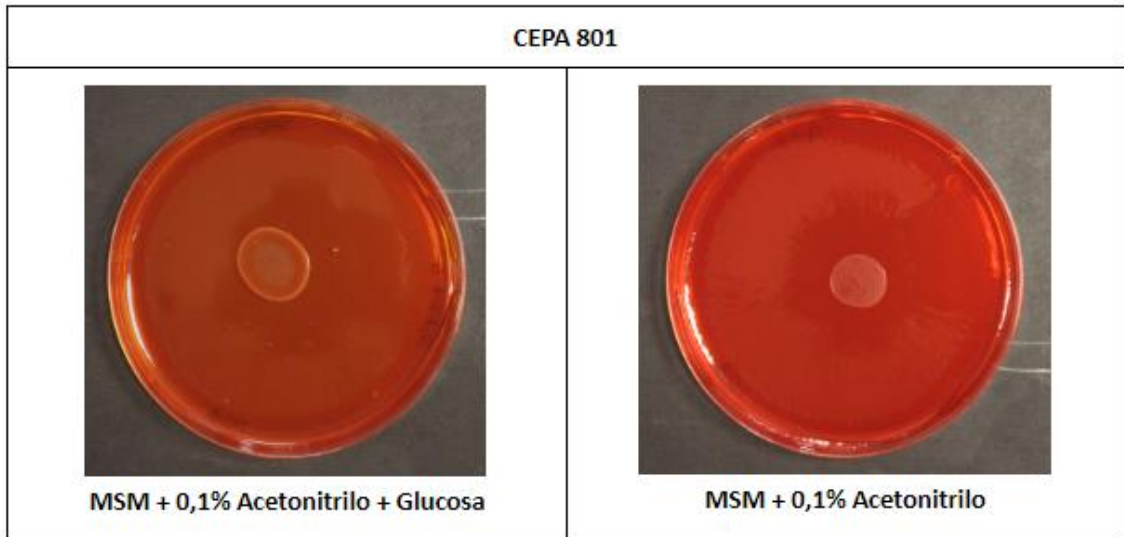
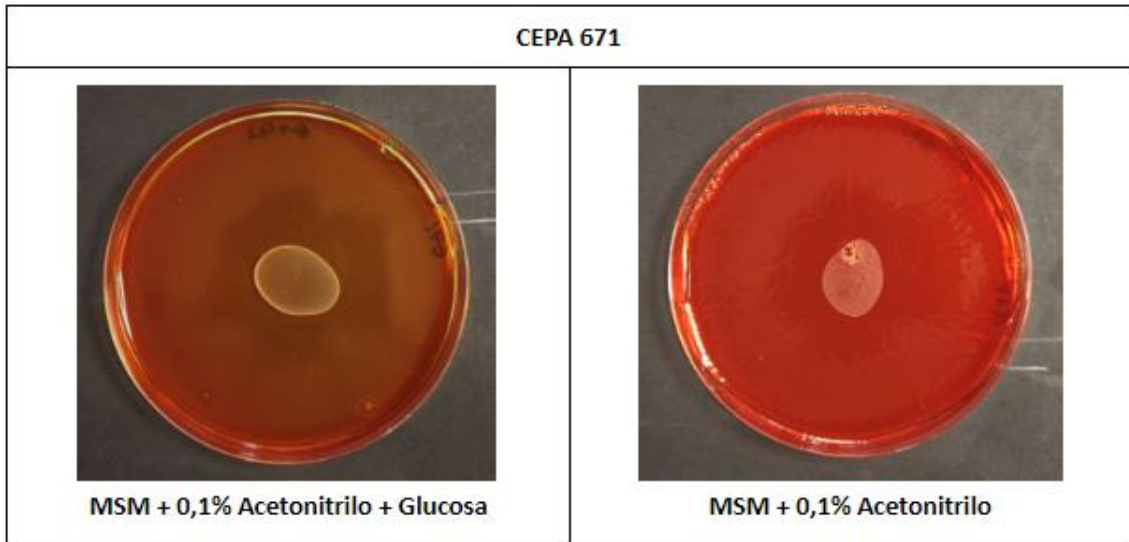


Figura 16. Fotografías de siembra por gotas de las 6 cepas preseleccionadas. A la derecha, MSM con acetonitrilo y glucosa. A la izquierda, MSM sólo con acetonitrilo.

Además, para corroborar la correcta selección de las cepas para ser probadas en la siguiente fase experimental, se compararon todos los resultados disponibles entre las 6 cepas más prometedoras. La distribución de las cepas mostrada en el dendograma observado en la Figura 17, sitúa a las cepas 487 y 671 en el mismo clúster, derivado de un comportamiento similar.

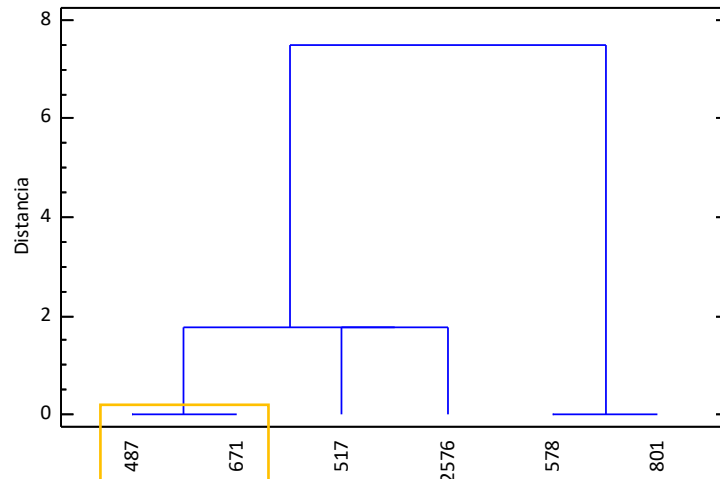


Figura 17. Dendograma elaborado en base a los resultados obtenidos por las 6 cepas preseleccionadas en los distintos medios estudiados.

Para estimar el potencial biorremediador de las cepas que presentaron la mayor eficiencia en el uso del acetonitrilo cualitativamente, las cepas 487 y 671, se cuantificó la capacidad de éstas para metabolizar el acetonitrilo. Para ello, estas actinobacterias se incubaron en los mismos medios MSM del ensayo cualitativo, pero preparados como medios líquidos: medio líquido con el acetonitrilo adicionado con glucosa, 500 mL de MSM, acetonitrilo al 0,1% v/v y 10 g/L de glucosa (Medio Con Glucosa) y medio líquido con el acetonitrilo como única fuente de carbono y nitrógeno, 500 mL de MSM y acetonitrilo al 0,1% v/v (Medio Sin Glucosa).

Se llevó a cabo un seguimiento de la evolución a lo largo del tiempo de la carga microbiana de las 2 cepas seleccionadas en cada uno de los medios líquidos selectivos (con y sin Glucosa), mediante recuentos de unidades formadoras de colonias por mL (UFC/mL). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 18.

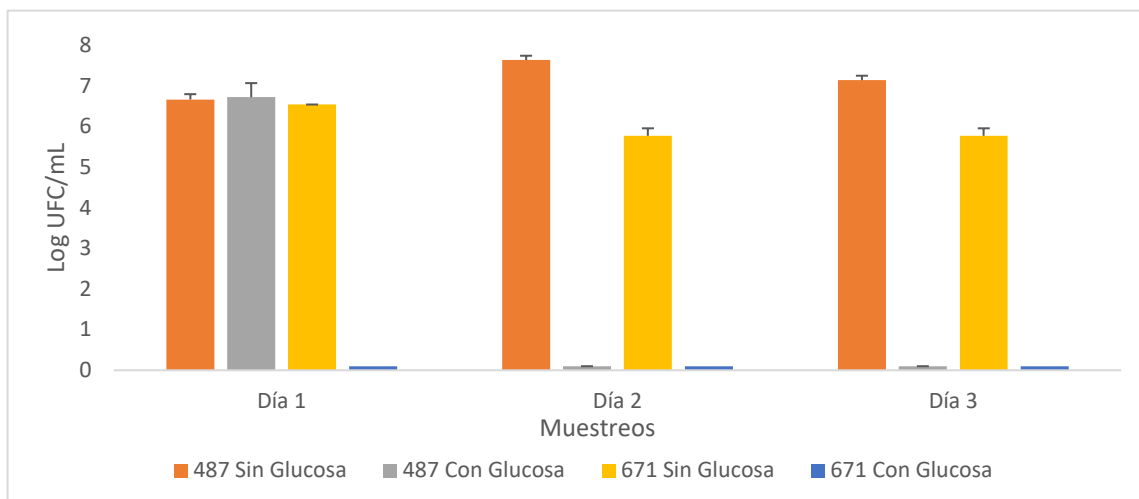


Figura 18. Evolución de la carga microbiana de las cepas 487 y 671 presente en el Medio Sin Glucosa y en el Medio Con Glucosa. Valores expresados en Logaritmo de Unidades Formadoras de Colonias por mL (log UFC/mL).

También se realizaron medidas de pH (mediante peachímetro) directamente de los 2 medios líquidos (con y sin Glucosa) inoculados con las cepas seleccionadas y, se determinó la concentración de amonio liberado mediante empleo del reactivo de Nessler. Los datos de pH recopilados se muestran en la Figura 19, mientras que los de producción de amonio se encuentran representados tanto en la Tabla 10, donde aparecen expresados como – (sin producción de amonio), + (producción baja de amonio, se forma un leve precipitado), ++ (producción moderada de amonio, el precipitado formado es mayor) y +++ (producción alta de amonio, gran precipitado); como en la Figura 20, donde se muestran las fotografías tomadas de los tubos, una vez mezclado el medio líquido inoculado con el reactivo de Nessler.

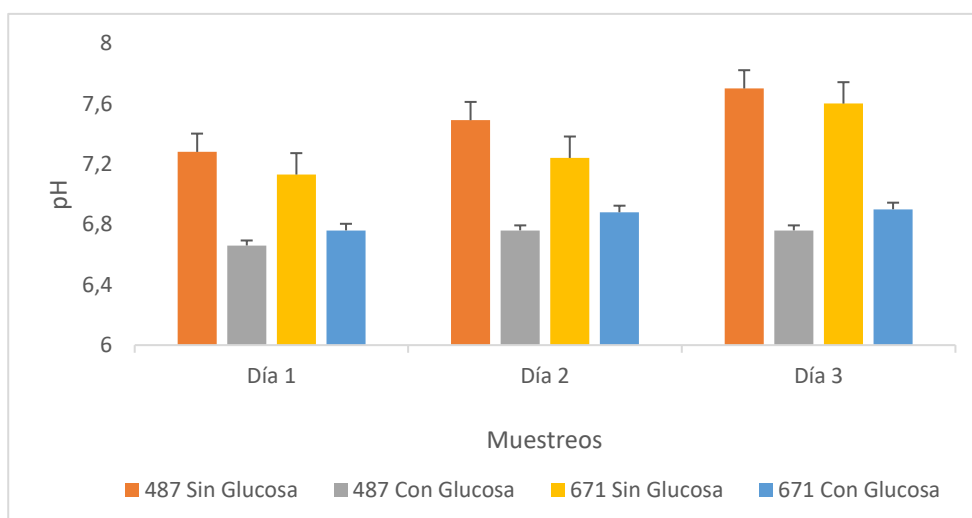


Figura 19. Variación del pH de los medios líquidos, con y sin Glucosa, inoculados con las cepas 487 y 671.

Tabla 10. Resultados de la producción de amonio de los medios líquidos, con y sin Glucosa, inoculados con las cepas 487 y 671.

	CEPA 487		CEPA 671	
	Sin Glucosa	Con Glucosa	Sin Glucosa	Con Glucosa
DÍA 1	++	+	-	+
DÍA 2	+++	+	+	+
DÍA 3	+++	+	+++	+

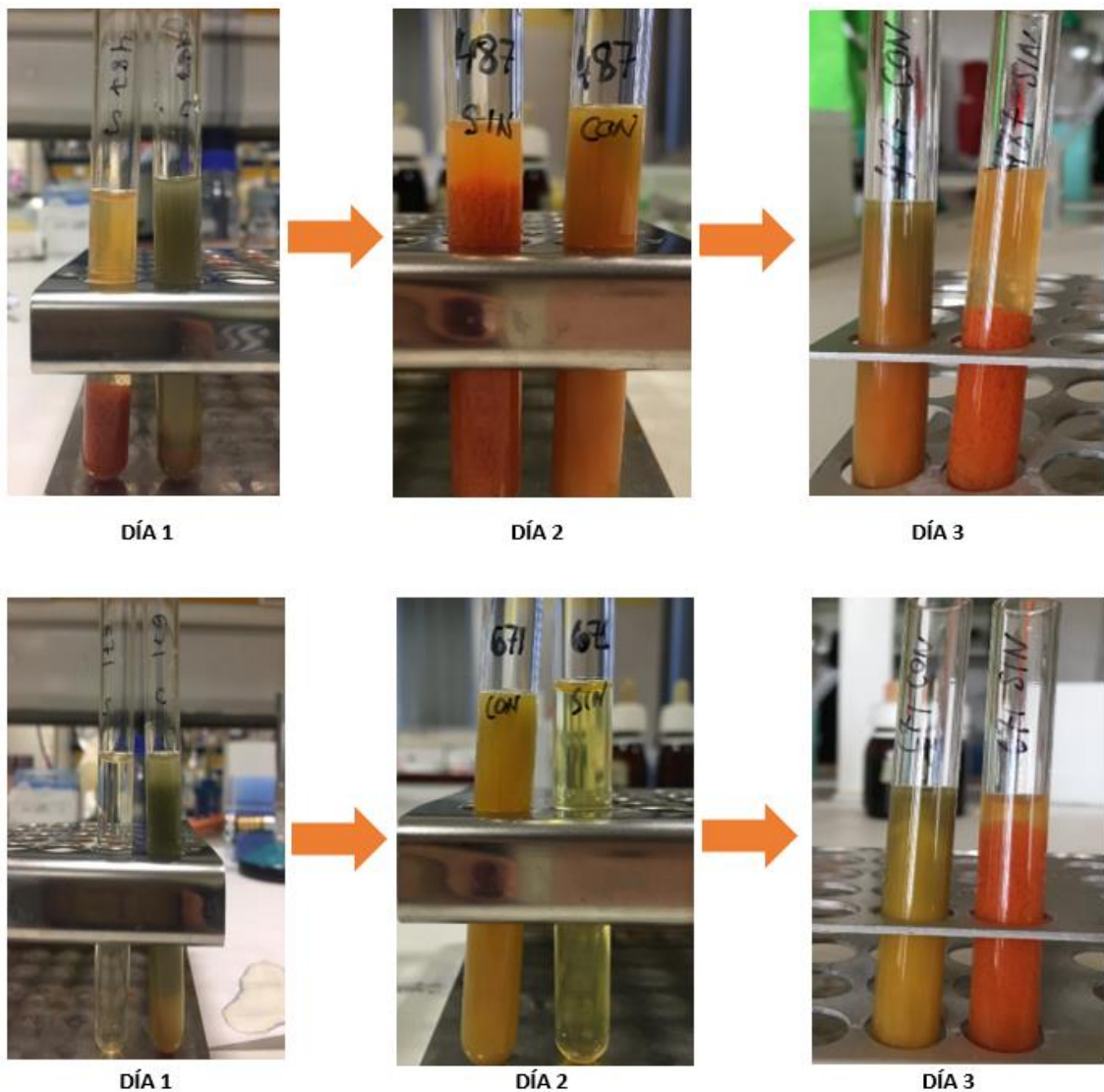


Figura 20. Fotografías de los resultados de producción de amonio. Arriba, los tubos de la cepa 487 y, abajo, los de la cepa 671. Los medios vienen indicados en los tubos como: Sin o S para el Medio Sin Glucosa, y, Con o C para el Medio Con Glucosa.

Como se muestra en la Figura 18, tanto la cepa 487 como la 671 tuvieron dificultades para crecer en el Medio Con Glucosa (medio líquido). Estos resultados difieren de lo observado previamente en los ensayos de toxicidad y caracterización cualitativa, en los que sí se observó crecimiento por parte de las cepas 487 y 671 en el mismo medio, en estado sólido (Tabla 7 y 8, respectivamente). Aún así, al llevar a cabo la medida de pH en los medios con glucosa, se observa una tendencia a la acidificación, lo que podría sugerir que, en los primeros días, está ocurriendo la fermentación del polisacárido, pero sin utilización del acetonitrilo, situación ya señalada anteriormente. Asimismo, se deben tener en cuenta los tiempos de incubación de los distintos experimentos, ya que podrían indicar la capacidad de resistencia de las actinobacterias a corto plazo para tolerar la presencia del contaminante (algo ampliamente probado a lo largo del desarrollo del trabajo), pero su incapacidad para seguir evolucionando en tiempos sucesivos a costa de los limitantes nutrientes del medio.

Este controvertido resultado, que *a priori* muestra la contrariedad en el comportamiento de las cepas en medio sólido y líquido, se ha observado en estudios similares, en los que algunos investigadores defienden que la presencia de glucosa en los medios de cultivo puede causar represión catabólica, viéndose disminuida la cantidad de nitrilasa formada en proporción a la concentración de glucosa incorporada (Kobayashi et al., 1991).

En cualquier caso, las dos cepas seleccionadas parecen ser las candidatas más prometedoras en tareas de biorremediación, mejor aun teniendo en cuenta que no necesitan suplemento de nutrientes fácilmente asimilables (estrategias de bioestimulación mediante la aplicación de fuentes de carbono sencillas), sino que requieren exclusivamente del número de individuos adecuado (bioaumentación) y el tiempo suficiente para la biodegradación óptima de los compuestos tóxicos.

3.3. Efecto de *Rhodococcus* como agente bioprotector *in vitro*.

Para comprobar la efectividad *in vitro* de las cepas 487 y 671 para retener los posibles daños que pueden provocar contaminantes como el acetonitrilo sobre el ambiente, se llevó a cabo un ensayo conformado por dos partes.

La primera parte tuvo como objetivo comprobar los posibles efectos fitotóxicos de estas actinobacterias sobre el proceso de germinación de semillas y el desarrollo de las plántulas durante los primeros días de crecimiento. Para ello, se sembraron 100 semillas de berro por cepa en presencia de una concentración microbiana de 10^5 . Los resultados de este ensayo se basaron en comparar la germinación y la elongación de la radícula en presencia de las cepas 487 y 671 con el control de agua, mediante el cálculo del porcentaje de germinación de las semillas (%G) y, principalmente, del porcentaje de índice de germinación (%IG) (fórmulas en Apartado 2.5). En la Figura 21 se muestran los resultados de %IG obtenidos de cada conjunto de placas.

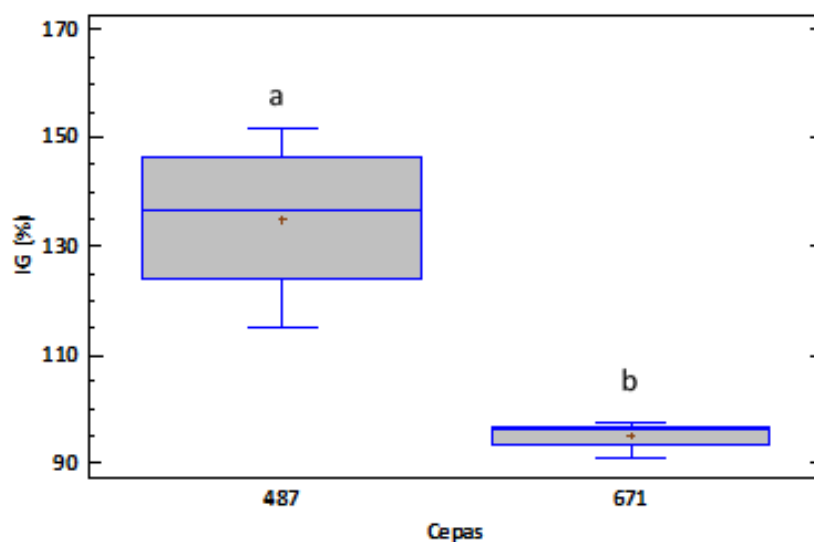


Figura 21. Gráfico de caja y bigotes que muestra los índices de germinación (IG) de las cepas seleccionadas (487 y 671) a partir de la colección de *Rhodococcus* objeto de estudio. Los valores se indican como % de IG. Todos los resultados son promedios de 4 repeticiones. De acuerdo con el Test de Mínima Diferencia Significativa (LSD) de Fisher a $P = 0.05$, diferentes letras implican diferencias significativas.

Siguiendo los criterios de interpretación descritos por Zucconi *et al.* (1981) con respecto al %IG, valores iguales o superiores al 80% indicarían que las cepas no son fitotóxicas, entre 50% y 80% se interpretaría como fitotoxicidad moderada y valores inferiores al 50% implicarían una fuerte presencia de sustancias fitotóxicas producidas por el agente empleado. Por lo tanto, se puede confirmar que ni la cepa 487 ni la 671 presentaron fitotoxicidad, ya que dieron lugar a Índices de Germinación (%IG) del 135% y 95%, respectivamente.

A pesar de que la dispersión de los datos obtenidos para la cepa 487 fue alta, como se puede observar en el gráfico de la Figura 21, todos los resultados fueron superiores al 100%, por lo que se puede considerar a esta cepa como agente fitoestimulante o promotor del crecimiento vegetal (Figura 22). En el caso de la cepa 671, la dispersión de los datos fue mucho menor, pero en ningún caso superó el 100%, por lo que este microorganismo no se consideró fitotóxico, pero tampoco podría ser clasificado como agente promotor del crecimiento.

No es de extrañar que algunas cepas de *Rhodococcus* sean fitoestimulantes, ya que las actinobacterias son reconocidas como un grupo potencial de rizobacterias que influyen en el crecimiento de las plantas y en la captación de nutrientes, a través de un conjunto de mecanismos que incluye, por ejemplo, la fijación de nitrógeno y la solubilización de fosfato (Sathya *et al.*, 2017). *Rhodococcus*, en concreto, posee una gran capacidad para interactuar con las plantas (Francis y Vereecke, 2019) y, se ha demostrado que muchas de las especies de este género producen y secretan fitohormonas como las auxinas y también, en algunas especies, citoquininas, modulando directamente el crecimiento de las plantas al estimular la división, elongación y diferenciación de las células

vegetales, la germinación de las semillas o la proliferación de las raíces (Tsavkelova *et al.*, 2006; Francis *et al.*, 2010).

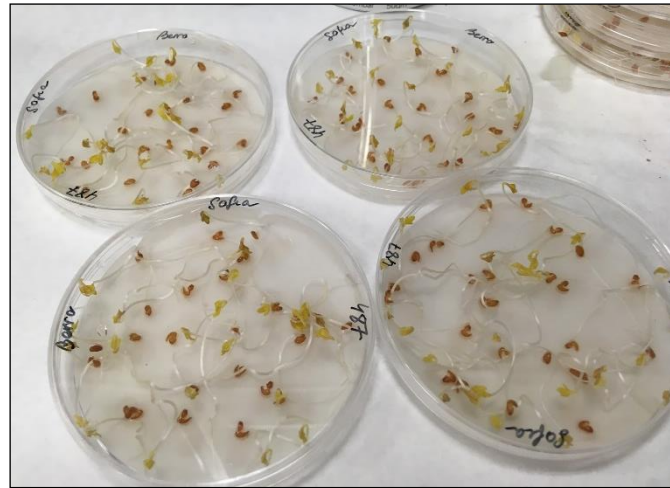


Figura 22. Fotografía de las semillas germinadas en presencia de la cepa 487.

A la luz de la información obtenida a partir de este ensayo y, apoyada por la de los ensayos anteriores, se seleccionó finalmente para la segunda parte de este experimento y la posterior caracterización molecular a la cepa 487, identificada como *Rhodococcus rhodochrous* y considerada la más prometedora de la colección. Esta afirmación quedó apoyada al comparar ambas cepas, 487 y 671, en base a distintos parámetros a los que fueron sometidas durante el ensayo cuantitativo de metabolismo y cometabolismo, así como teniendo en cuenta el inicial índice de tolerancia a la toxicidad del acetonitrilo (Figura 23)

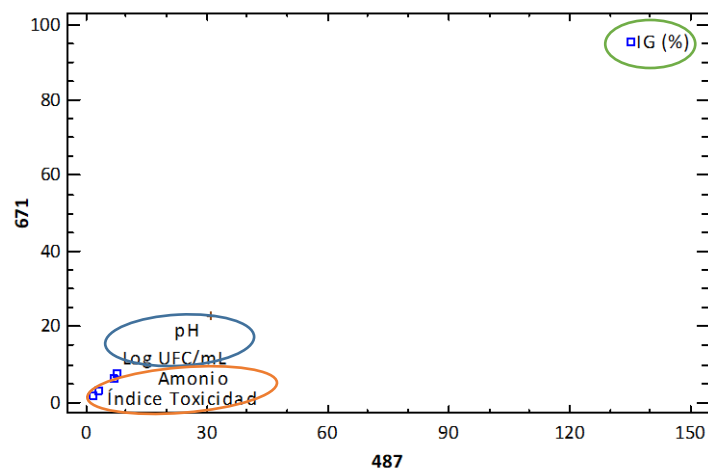


Figura 23. Diagrama de dispersión en base a los parámetros: índice de tolerancia a la toxicidad y pH, carga microbiana (Log UFC/mL) y amonio, en medio MSM con acetonitrilo y sin glucosa.

Aunque ambas cepas se agrupan de un modo similar respecto a los valores de pH y recuentos en medio líquido selectivo sin glucosa, por un lado, y en función de los valores de amonio, además de teniendo en cuenta el índice de tolerancia a la toxicidad emitida por el acetonitrilo (apartado 3.1), por el otro, fueron los valores de índice de germinación los que marcaron la diferencia respecto a la selección final de una de las cepas para el siguiente paso, en este caso, la 487.

La segunda parte de este bioensayo no pudo realizarse como consecuencia del Estado de Alarma decretado a causa del COVID-19. Este experimento hubiera consistido en comprobar si la cepa 487 es capaz de remitir, o no, los daños que provoca el acetonitrilo. Para ello, se sembrarían en un sustrato estéril las mismas semillas de berro, previamente sumergidas en una concentración microbiana de 10^5 de la cepa 487, y se incubarían en presencia de acetonitrilo volatilizado. De nuevo, los resultados de este ensayo se basarían en el cálculo del %G y, principalmente, del %IG.

Buss y Mašek (2014) llevaron a cabo un experimento muy similar en el que se investigaron los efectos fitotóxicos producidos por compuestos orgánicos volátiles (COVs), presentes en biocarbón o *biochar*, sobre la germinación de semillas de berro sembradas en dicho sustrato. La exposición a estos compuestos produjo efectos negativos en el crecimiento de las semillas, como cambios en la longitud de la radícula o del brote, o directamente, la inhibición total de la germinación. Si se hubiera podido llevar a cabo este segundo ensayo de fitotoxicidad, un posible resultado habría sido la observación de estos mismos efectos adversos en las semillas sembradas, como consecuencia de su exposición al acetonitrilo volátil. Este resultado nos habría indicado que la cepa 487 no es capaz de remitir el daño que produce el acetonitrilo en el ambiente y, por lo tanto, no es una buena candidata para la biorremediación de este tipo de contaminantes.

Sin embargo, y como se ha demostrado en múltiples estudios, el género *Rhodococcus* posee un papel clave en la eliminación de COVs, de hecho, su empleo en biofiltración para la eliminación de estos compuestos de efluentes gaseosos está siendo cada vez mayor (Aldric y Thonart, 2008; López *et al.*, 2013; Baltrénas *et al.*, 2015). En concreto, cabe destacar *Rhodococcus rhodochrous*, especie a la que pertenece la cepa 487 (Zhang y Pierce, 2009). Por lo tanto, teniendo en cuenta no sólo la información positiva presente en bibliografía acerca de la aplicación de *Rhodococcus* y, concretamente, *Rhodococcus rhodochrous*, en la eliminación de contaminantes volátiles; sino también, los resultados obtenidos para esta cepa en el ensayo de volátiles realizado en el presente TFG (Apartado 3.1), puede sugerirse que el resultado más probable sería que se produjese con total normalidad la germinación y el crecimiento de las semillas de berro, al ser la cepa 487 capaz de degradar el acetonitrilo presente en el ambiente y remitir el daño que podría haber causado en las semillas. Este resultado apoyaría la premisa de que la cepa 487 posee un gran potencial como agente biorremediador de contaminantes orgánicos como el acetonitrilo.

3.4. Presencia genes asociados a la degradación de nitrilos

En vista de los resultados obtenidos en los ensayos anteriores, se procedió a llevar a cabo una búsqueda molecular de genes asociados a la degradación de nitrilos en la cepa 487.

En primer lugar, se extrajo el ADN de este microorganismo mediante un choque térmico convencional, luego se llevó a cabo la amplificación del gen asociado a la degradación de nitrilos escogido, que fue el gen de la enzima nitrilo hidratasa, 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.

Sin embargo, a pesar de que se pudo llevar a cabo el procedimiento mencionado, no se pudieron obtener resultados concluyentes para este ensayo antes de que se decretase el Estado de Alarma por el COVID-19.

No obstante, en base a la información aportada por otras investigaciones, sólo hay 2 resultados posibles para este ensayo: el gen codificante de la enzima nitrilo hidratasa se encuentra presente en el genoma de la cepa 487 o, por el contrario, no se detecta dicho gen y la actividad degradativa de la cepa es proporcionada por otra enzima, como la nitrilasa. Según lo consultado en bibliografía, existen numerosos antecedentes que indican que dicho gen sí forma parte del genoma de la especie *Rhodococcus rhodochrous* junto al gen codificante de la enzima amidasa, confirmando así que esta especie es capaz de degradar completamente el acetonitrilo hasta ácido acético y amonio mediante el sistema enzimático nitrilo hidratasa/amidasa (Leonova *et al.*, 2000; Ryabchenko *et al.*, 2006; Fang *et al.*, 2015). Por lo tanto, si se hubiera podido optimizar este ensayo, el resultado que se habría esperado obtener sería la confirmación de la presencia del gen de la enzima nitrilo hidratasa en la cepa 487.

Además, también ha sido demostrado que las cepas productoras de la enzima nitrilasa pertenecen principalmente a la especie *R. rhodochrous* (Sahu *et al.*, 2019; Yu *et al.*, 2019; An *et al.*, 2020), por lo que este microorganismo seguramente posea los dos sistemas enzimáticos implicados en la degradación de nitrilos, demostrando así el enorme potencial en biorremediación ambiental de estos compuestos que posee la cepa seleccionada.

4. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos permitieron obtener las siguientes conclusiones:

1. El género *Rhodococcus* posee una tolerancia excelente frente al acetonitrilo cuando dicho compuesto se encuentra directamente inoculado en el medio de crecimiento.

2. El acetonitrilo en forma volátil resultó ser más restrictivo para el crecimiento microbiano al verse intensificados sus efectos tóxicos, aumentando así la susceptibilidad de las cepas de *Rhodococcus* ante su presencia.

3. Las cepas 487-*Rhodococcus rhodochrous* y 671-*Rhodococcus coprophilus* presentan un amplio espectro de actuación *in vitro* sobre diferentes medios selectivos adicionados con el compuesto a ensayar, lo cual posiciona a estas dos cepas como potenciales candidatas para su uso en tareas de biorremediación.

4. La cepa 487-*Rhodococcus rhodochrous* exhibe los mejores resultados *in vitro* como agente bioprotector frente al acetonitrilo, lo cual convierte a esta cepa en la mejor candidata para su aplicación como un agente biotecnológico en tareas de biodescontaminación.

5. La elevada actividad metabólica de la cepa 487-*Rhodococcus rhodochrous* es debida a la presencia en su genoma de los genes codificantes para el sistema enzimático nitrilo hidratasa/amidasa y para la enzima nitrilasa.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Aldric, J. M. y Thonart, P. (2008). Performance evaluation of a water/silicone oil two-phase partitioning bioreactor using *Rhodococcus erythropolis* T902. 1 to remove volatile organic compounds from gaseous effluents. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*, 83(10), 1401-1408.
- Alkorta, I., Epelde, L. y Garbisu, C. (2017). Environmental parameters altered by climate change affect the activity of soil microorganisms involved in bioremediation. *FEMS microbiology letters*, 364(19).
- An, X., Cheng, Y., Miao, L., Chen, X., Zang, H. y Li, C. (2020). Characterization and genome functional analysis of an efficient nitrile-degrading bacterium, *Rhodococcus rhodochrous* BX2, to lay the foundation for potential bioaugmentation for remediation of nitrile-contaminated environments. *Journal of Hazardous Materials*, 389, 121906.
- Ang, E. L., Zhao, H. y Obbard, J. P. (2005). Recent advances in the bioremediation of persistent organic pollutants via biomolecular engineering. *Enzyme and microbial technology*, 37(5), 487-496.
- Arbeli, Z. (2009). Biodegradación de compuestos orgánicos persistentes (COP): I. El caso de los bifenilos policlorados (PCB). *Acta Biológica Colombiana*, 14(1), 55-86.
- Arslan, M., Imran, A., Khan, Q. M. y Afzal, M. (2017). Plant–bacteria partnerships for the remediation of persistent organic pollutants. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(5), 4322-4336.
- Baltrėnas, P., Zagorskis, A. y Misevičius, A. (2015). Research into acetone removal from air by biofiltration using a biofilter with straight structure plates. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 29(2), 404-413.
- Blakey, A. J., Colby, J., Williams, E. y O'Reilly, C. (1995). Regio- and stereo-specific nitrile hydrolysis by the nitrile hydratase from *Rhodococcus* AJ270. *FEMS microbiology letters*, 129(1), 57-61.

- Buss, W. y Mašek, O. (2014). Mobile organic compounds in biochar—a potential source of contamination—phytotoxic effects on cress seed (*Lepidium sativum*) germination. *Journal of Environmental Management*, 137, 111-119.
- Castillo, F. (2005). *Biotecnología ambiental*. Editorial Tebar. Madrid, España.
- Chaban, V. V. y Prezhdo, O. V. (2011). How toxic are ionic liquid/acetonitrile mixtures? *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 2(19), 2499-2503.
- De Paepe, P., Colin, P., Depuydt, P., Decavele, A. S., De Smet, J., Boussey, K., Stove, C., Benoit, D., Verstraete A., Van Bocxlaer J. y Buylaert, W. (2016). Disulfiram inhibition of cyanide formation after acetonitrile poisoning. *Clinical Toxicology*, 54(1), 56-60.
- Deribe, E., Rosseland, B. O., Borgstrøm, R., Salbu, B., Gebremariam, Z., Dadebo, E., Norli, H. R. y Eklo, O. M. (2011). Bioaccumulation of persistent organic pollutants (POPs) in fish species from Lake Koka, Ethiopia: the influence of lipid content and trophic position. *Science of the Total Environment*, 410, 136-145.
- Devotta, S. y Rao, C. V. C. (2008). *Environmental status of India*. Atlantic. Nueva Delhi, India.
- Egelkamp, R., Schneider, D., Hertel, R. y Daniel, R. (2017). Nitrile-degrading bacteria isolated from compost. *Frontiers in Environmental Science*, 5, 56.
- Fang, S., An, X., Liu, H., Cheng, Y., Hou, N., Feng, L., Huang, X. y Li, C. (2015). Enzymatic degradation of aliphatic nitriles by *Rhodococcus rhodochrous* BX2, a versatile nitrile-degrading bacterium. *Bioresource technology*, 185, 28-34.
- Feierman, D. E. y Cederbaum, A. I. (1989). Role of cytochrome P-450 IIE1 and catalase in the oxidation of acetonitrile to cyanide. *Chemical research in toxicology*, 2(6), 359-366.
- Francis, I. M. y Vereecke, D. (2019). Plant-associated *Rhodococcus* species, for better and for worse. En: Alvarez, H. M. (Ed.). *Biology of Rhodococcus* (pp. 359-377). Springer. Comodoro Rivadavia, Chubut, Argentina.
- Francis, I., Holsters, M. y Vereecke, D. (2010). The Gram-positive side of plant–microbe interactions. *Environmental Microbiology*, 12(1), 1-12.
- Gadd, G. M. (2001). *Fungi in bioremediation*. Cambridge University Press. Cambridge, United Kingdom.
- Galán-Huertos, E., Gómez-Ariza, J. L., Bellinfante-Crocci, N. y Aparicio-Fernández, P. (2003). Contaminación de suelos por compuestos orgánicos. Informe final. *Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía*.

- Gaur, N., Narasimhulu, K. y PydiSetty, Y. (2018). Recent advances in the bio-remediation of persistent organic pollutants and its effect on environment. *Journal of cleaner production*, 198, 1602-1631.
- Guo, H., Lee, S. C., Chan, L. Y. y Li, W. M. (2004). Risk assessment of exposure to volatile organic compounds in different indoor environments. *Environmental Research*, 94(1), 57-66.
- Guo, W., Pan, B., Sakkiah, S., Yavas, G., Ge, W., Zou, W., Tong, W. y Hong, H. (2019). Persistent Organic Pollutants in Food: Contamination Sources, Health Effects and Detection Methods. *International journal of environmental research and public health*, 16(22), 4361.
- Håkansson, K. y Mattiasson, B. (2002). Microbial degradation of acetonitrile using a suspended-carrier biofilm process. *Biotechnology letters*, 24(4), 287-291.
- Hashimoto, K. (1991). Toxicology of acetonitrile. *Sangyo igaku. Japanese journal of industrial health*, 33(6), 463-474.
- Iluțiu-Varvara, D. A., Mârza, C. M., Aciu, C., Hădărean, A., Domnița, F. V., Sas-Boca, I. M. y Mihiu, A. M. (2016). An assessment of pollution with volatile organic compounds in the electric arc furnaces. *Procedia Technology*, 22, 452-456.
- Jones, K. C. y De Voogt, P. (1999). Persistent organic pollutants (POPs): state of the science. *Environmental pollution*, 100(1-3), 209-221.
- Kamal, M. S., Razzak, S. A. y Hossain, M. M. (2016). Catalytic oxidation of volatile organic compounds (VOCs)—A review. *Atmospheric Environment*, 140, 117-134.
- Khan, F. I. y Ghoshal, A. K. (2000). Removal of volatile organic compounds from polluted air. *Journal of loss prevention in the process industries*, 13(6), 527-545.
- Kobayashi, M., Yanaka, N., Nagasawa, T. y Yamada, H. (1991). Hyperinduction of an aliphatic nitrilase by *Rhodococcus rhodochrous*K22. *FEMS Microbiology Letters*, 77(1), 121–124.
- Kohyama, E., Yoshimura, A., Aoshima, D., Yoshida, T., Kawamoto, H. y Nagasawa, T. (2006). Convenient treatment of acetonitrile-containing wastes using the tandem combination of nitrile hydratase and amidase-producing microorganisms. *Applied microbiology and biotechnology*, 72(3), 600-606.
- Kumari, P., Bahadur, N. y Dumée, L. F. (2020). Photo-catalytic membrane reactors for the remediation of persistent organic pollutants—A review. *Separation and Purification Technology*, 230, 115878.
- Lau, M. H. Y., Leung, K. M. Y., Wong, S. W. Y., Wang, H. y Yan, Z. G. (2012). Environmental policy, legislation and management of persistent organic pollutants (POPs) in China. *Environmental pollution*, 165, 182-192.

- Leonova, T. E., Astaurova, O. B., Ryabchenko, L. E. y Yanenko, A. S. (2000). Nitrile hydratase of *Rhodococcus*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 88(1-3), 231-241.
- Lodolo, A., González-Valencia, E. y Miertus, S. (2001). Overview of remediation technologies for persistent toxic substances. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, 52(2), 253-280.
- López, M. E., Rene, E. R., Malhautier, L., Rocher, J., Bayle, S., Veiga, M. C. y Kennes, C. (2013). One-stage biotrickling filter for the removal of a mixture of volatile pollutants from air: performance and microbial community analysis. *Bioresource technology*, 138, 245-252.
- Lu, L., Wang, G., Yeung, M., Xi, J. y Hu, H. Y. (2018). Response of microbial community structure and metabolic profile to shifts of inlet VOCs in a gas-phase biofilter. *AMB Express*, 8(1), 160.
- Martínková, L., Uhnáková, B., Pátek, M., Nešvera, J. y Křen, V. (2009). Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus*. *Environment International*, 35(1), 162-177.
- MITECO (Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico) (2020). *Informative Inventory Report, Edition 2020 (1990-2018)*. Recuperado de https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/sistema-espanol-de-inventario-sei-/spain_2020-necd-iir_tcm30-488225.pdf.
- Morillo, E. y Villaverde, J. (2017). Advanced technologies for the remediation of pesticide-contaminated soils. *Science of the Total Environment*, 586, 576-597.
- Nawaz, M. S., Chapatwala, K. D. y Wolfram, J. H. (1989). Degradation of acetonitrile by *Pseudomonas putida*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55(9), 2267-2274.
- Novotný, Č., Svobodová, K., Erbanová, P., Cajthaml, T., Kasinath, A., Lang, E. y Šašek, V. (2004). Ligninolytic fungi in bioremediation: extracellular enzyme production and degradation rate. *Soil Biology and Biochemistry*, 36(10), 1545-1551.
- Okamoto, S. y Eltis, L. D. (2007). Purification and characterization of a novel nitrile hydratase from *Rhodococcus* sp. RHA1. *Molecular microbiology*, 65(3), 828-838.
- Pariatamby, A. y Kee, Y. L. (2016). Persistent organic pollutants management and remediation. *Procedia Environmental Sciences*, 31, 842-848.
- Ponce-Granillo, C. V., Monroy-Dosta, M. C., Becerril-Cortés, D., Castro-Mejía, J. y Ocampo-Cervantes, J. A. (2016). Potential use in aquaculture of *Rhodococcus* sp. (Zopf, 1891). *Revista Digital E-bios*, 1(12), 1-6.
- Precigou, S., Goulas, P. y Duran, R. (2001). Rapid and specific identification of nitrile hydratase (NHase)-encoding genes in soil samples by polymerase chain reaction. *FEMS microbiology letters*, 204(1), 155-161.

- Resines-Urien, E., Burzurí, E., Fernandez-Bartolome, E., García-Tuñón, M. Á. G., de la Presa, P., Poloni, R., Teat, S. J. y Costa, J. S. (2019). A switchable iron-based coordination polymer toward reversible acetonitrile electro-optical readout. *Chemical science*, 10(27), 6612-6616.
- Ritter, L., Solomon, K. R., Forget, J., Stemeroff, M. y O'leary, C. (1995). A review of selected persistent organic pollutants. *International Programme on Chemical Safety (IPCS). PCS/95.39. Geneva: World Health Organization*, 65, 66.
- Ryabchenko, L. E., Podchernyaev, D. A., Kotlova, E. K. y Yanenko, A. S. (2006). Cloning the amidase gene from *Rhodococcus rhodochrous* M8 and its expression in *Escherichia coli*. *Russian Journal of Genetics*, 42(8), 886-892.
- Sahu, R., Meghavarnam, A. K. y Janakiraman, S. (2019). A simple, efficient and rapid screening technique for differentiating nitrile hydratase and nitrilase producing bacteria. *Biotechnology Reports*, 24, e00396.
- Santoshkumar, M., Nayak, A. S., Anjaneya, O. y Karegoudar, T. B. (2010). A plate method for screening of bacteria capable of degrading aliphatic nitriles. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 37(1), 111.
- Sathya, A., Vijayabharathi, R. y Gopalakrishnan, S. (2017). Plant growth-promoting actinobacteria: a new strategy for enhancing sustainable production and protection of grain legumes. *3 Biotech*, 7(2), 102.
- Singh, H. B., Sarma, B. K. y Keswani, C. (2017). *Advances in PGPR research*. CAB International. Boston, Estados Unidos.
- Sillanpaa, M. (2020). *Advanced Water Treatment: Electrochemical Methods*. Elsevier. Amsterdam, Países Bajos.
- Sulistinah, N. y Riffiani, R. (2018). Nitrile Hydrolysing Enzymes-Producing Bacterium Isolated from Gandang Dewata Mountain, West Sulawesi. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 166(1), 012019.
- Tsavkelova, E. A., Klimova, S. Y., Cherdyntseva, T. A. y Netrusov, A. I. (2006). Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. *Applied biochemistry and microbiology*, 42(2), 117-126.
- Venny, Gan, S. y Ng, H. K. (2012). Current status and prospects of Fenton oxidation for the decontamination of persistent organic pollutants (POPs) in soils. *Chemical engineering journal*, 213, 295-317.
- WHO (World Health Organization) (1993). *International Programme on Chemical Safety, Environmental Health Criteria 154. Acetonitrile*. Geneva, 110 pp.

- Yoshida, N., Inaba, S. y Takagi, H. (2014). Utilization of atmospheric ammonia by an extremely oligotrophic bacterium, *Rhodococcus erythropolis* N9T-4. *Journal of bioscience and bioengineering*, 117(1), 28-32.
- Yu, H., Jiao, S., Wang, M., Liang, Y. y Tang, L. (2019). Biodegradation of nitriles by *Rhodococcus*. En: Alvarez, H. M. (Ed.). *Biology of Rhodococcus* (pp. 173-202). Springer. Comodoro Rivadavia, Chubut, Argentina.
- Zhang, J. y Pierce, G. E. (2009). Laboratory-scale biofiltration of acrylonitrile by *Rhodococcus rhodochrous* DAP 96622 in a trickling bed bioreactor. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 36(7), 971-979.
- Zucconi, F., Pera, A., Forte, M. y de Bertoldi, M. (1981). Evaluating toxicity of immature compost. *BioCycle*, 22(2), 54-57.