



Rastreo y selección de inoculantes para biorremediación de suelos contaminados con alpechín

Autor José Antonio Ibáñez Barón

Titulación Máster en Biotecnología Industrial y Agroalimentaria

Tutores José Joaquín Moreno Casco
María José López López

Departamento Biología y Geología

Universidad de Almería

Trabajo Fin de Máster

Almería, julio 2018





Este trabajo ha sido financiado a través del proyecto
LIFE+REGROW (LIFE16 ENV/ES/000331)
“Reclamation of olive oil waste abandoned lagoons
using biorecovering strategies in a circular economy”



Índice

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1. Alpechín y problemática asociada: Balsas de evaporación	2
1.2. Inoculantes para biorremediación de matrices contaminadas por alpechín	6
1.3. Objetivos	8
2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	9
2.1. Muestras	11
2.2. Recuento de microorganismos: Carga total y específica	12
2.3. Aislamiento de microorganismos	14
2.3.1. <i>Siembra en medios selectivos.....</i>	14
2.3.2. <i>Enriquecimiento</i>	17
2.3.3. <i>Colección de aislados y mantenimiento.....</i>	18
2.4. Selección de microorganismos	18
2.4.1. <i>Pruebas cualitativas: enzimas</i>	19
2.4.2. <i>Pruebas cuantitativas: degradación de tirosol</i>	21
2.5. Pruebas complementarias de cepas seleccionadas	23
2.5.1. <i>Identificación</i>	23
2.5.2. <i>Pruebas de compatibilidad.....</i>	24
2.5.3. <i>Rango térmico de crecimiento.....</i>	24
2.6. Preparación de inóculos.....	24
2.7. Análisis de datos	25
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
3.1. Carga microbiana total y degradadora de polifenoles	25
3.2. Colección de microorganismos degradadores de alpechín	28
3.3. Selección de inoculantes	31
3.4. Características de inoculantes	34
3.5. Producción de inoculantes para aplicación en biorremediación	37
4. CONCLUSIONES	38
AGRADECIMIENTOS	39
BIBLIOGRAFÍA.....	39

RESUMEN

El aceite de oliva es uno de los aceites vegetales más consumidos en el mundo, principalmente en la Cuenca Mediterránea. La gestión inadecuada del alpechín, residuo líquido de la agroindustria de extracción del aceite de oliva, provoca contaminación de suelos y masas de agua. Los principales responsables de tal efecto son los compuestos polifenólicos, que presentan actividad fitotóxica y antimicrobiana.

Con el fin de descontaminar unas balsas de acúmulo de alpechín ubicadas en el municipio de Mora (Toledo), se realizó una búsqueda y selección de microorganismos que pudiesen emplearse en estrategias de bioaumentación para asegurar la descontaminación de las balsas. Para ello, se tomaron muestras de los sedimentos de las balsas y mediante procedimientos de enriquecimiento y siembra en medios selectivos constituidos por compuestos fenólicos o alpechín se aislaron diversos hongos y bacterias. Cada uno de estos aislados fue sometido a una batería de pruebas cualitativas para determinar la expresión de actividades enzimáticas relacionadas con la degradación de polifenoles, así como a la cuantificación de su capacidad degradativa del tirosol, polifenol presente en el alpechín. Por último, las cepas seleccionadas fueron identificadas mediante técnicas moleculares y se produjeron a gran escala.

Como resultado se obtuvo una colección de 60 cepas. En general, los hongos fueron más efectivos en la degradación del tirosol que las bacterias, 12 hongos y 2 bacterias eliminaron más del 50 % del compuesto. Entre ellos se seleccionaron dos hongos, identificados como *Scedosporium apiospermum* H2 y *Aspergillus ochraceus* H16, que presentaron numerosas actividades enzimáticas y eliminaron más de un 97 % de tirosol. Estos hongos presentan unas condiciones de manejo adecuadas para su producción masiva, transporte y aplicación conjunta en campo en estrategias de biorremediación *in situ*.

Palabras clave: Polifenoles, tirosol, bioaumentación, *Scedosporium apiospermum*, *Aspergillus ochraceus*.

ABSTRACT

Olive oil is one of the most consumed vegetable oils in the world, mainly in the Mediterranean Basin. The inadequate management of alpechín, the liquid residue from olive oil extraction agroindustry, causes contamination of soils and bodies of water. The main responsible for this effect are the polyphenolic compounds, which have phytotoxic and antimicrobial activity.

In order to decontaminate accumulation ponds of alpechín located in the municipality of Mora (Toledo), a screening and selection of microorganisms that could be used in bioaugmentation strategies to ensure decontamination of ponds was conducted. For this, samples of the sediments of the ponds were taken and by means of enrichment procedures and seeding in selective media constituted by phenolic compounds or alpechin, various fungi and bacteria were isolated. Each of these isolates were subjected to a range of qualitative tests to determine the expression of enzymatic activities related to the degradation of polyphenols, as well as to the quantification of their degradative capacity of tyrosol, polyphenol present in alpechin. Finally, the selected strains were identified by molecular techniques and produced on a large scale.

As a result, a collection of 60 strains was obtained. Overall, fungi were more effective than bacteria in tyrosol degradation, 12 fungi and 2 bacteria eliminated more than 50% of the compound. Among them two fungi were selected, identified as *Scedosporium apiospermum* H2 and *Aspergillus ochraceus* H16, which presented numerous enzymatic activities and eliminated more than 97% of tyrosol. These fungi present adequate handling properties for their large scale production, transport and joint application in the field for *in situ* bioremediation strategies.

Keywords: Polyphenols, tyrosol, bioaugmentation, *Scedosporium apiospermum*, *Aspergillus ochraceus*.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Alpechín y problemática asociada: Balsas de evaporación

El aceite de oliva es uno de los aceites comestibles más consumidos en el mundo, principalmente en la Cuenca del Mediterráneo. Según datos estadísticos de la F.A.O (2014), de las 3.050.390 t de aceite de oliva producidas en el mundo en el año 2014, 2.865.975 t procedían de los países de la cuenca Mediterránea, lo que supone casi el 94% de la producción global (Figura 1). A nivel individual, los principales países productores son España (1.738.600 t), Italia (294.914 t), Grecia (208.900 t) y Túnez (179.700 t). Por esta razón, la industria del aceite de oliva tiene un importante peso económico en los países Mediterráneos y especialmente en España.

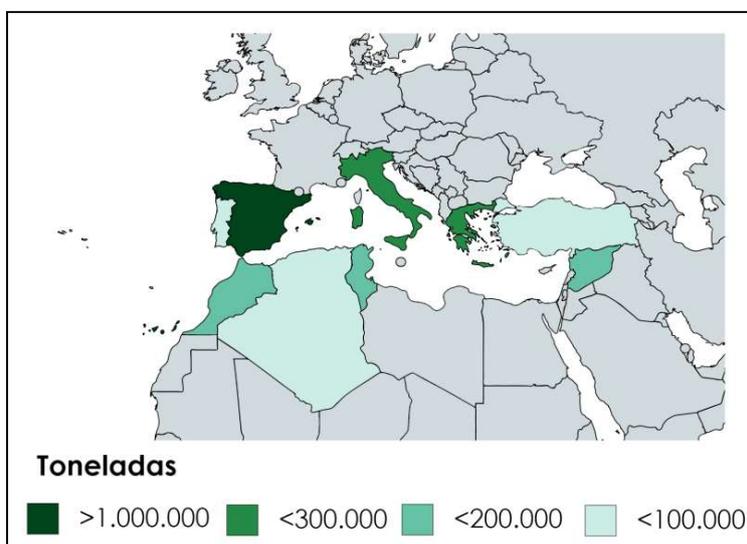


Figura 1. Principales países productores de aceite de oliva a nivel mundial (elaboración propia a partir de datos F.A.O 2014).

El aceite de oliva puede extraerse mediante procesos discontinuos (prensado) o continuos (centrifugado) (Figura 2). En el proceso discontinuo se consigue separar la fracción sólida, denominada orujo, de la fracción líquida, mediante el prensado de la pasta de aceituna obtenida por molturación de la misma. En la fracción líquida, el aceite se separa de la fracción acuosa, denominada alpechín, mediante decantación (Di Giovacchino *et al.*, 2002). Aunque el proceso discontinuo es barato y requiere poca cantidad de agua, ha ido cayendo en desuso ante el auge del proceso continuo. Este requiere de una centrifuga horizontal para separar la fase sólida de la líquida. Esta centrifuga puede funcionar como sistema trifásico o bifásico. El primer sistema continuo implantado en la década de los 70 fue el de centrifugación trifásica que genera tres fracciones: un residuo sólido (orujo) y dos fases líquidas (aceite y alpechín). A pesar de que permitía automatizar el proceso y obtener buena calidad del aceite, el sistema tiene un elevado consumo energético y requiere la

incorporación de elevadas cantidades de agua lo que conduce a la producción de elevados volúmenes de alpechín. Este sistema estuvo ampliamente implantado en las almazaras desde finales de los años 70 hasta mediados de los 90, década en la que se introdujo el sistema de centrifugación a dos fases que emplea menores cantidades de agua tibia y genera un residuo semisólido con alto contenido de humedad, denominado alpeorujo, y aceite (Roig *et al.*, 2006).

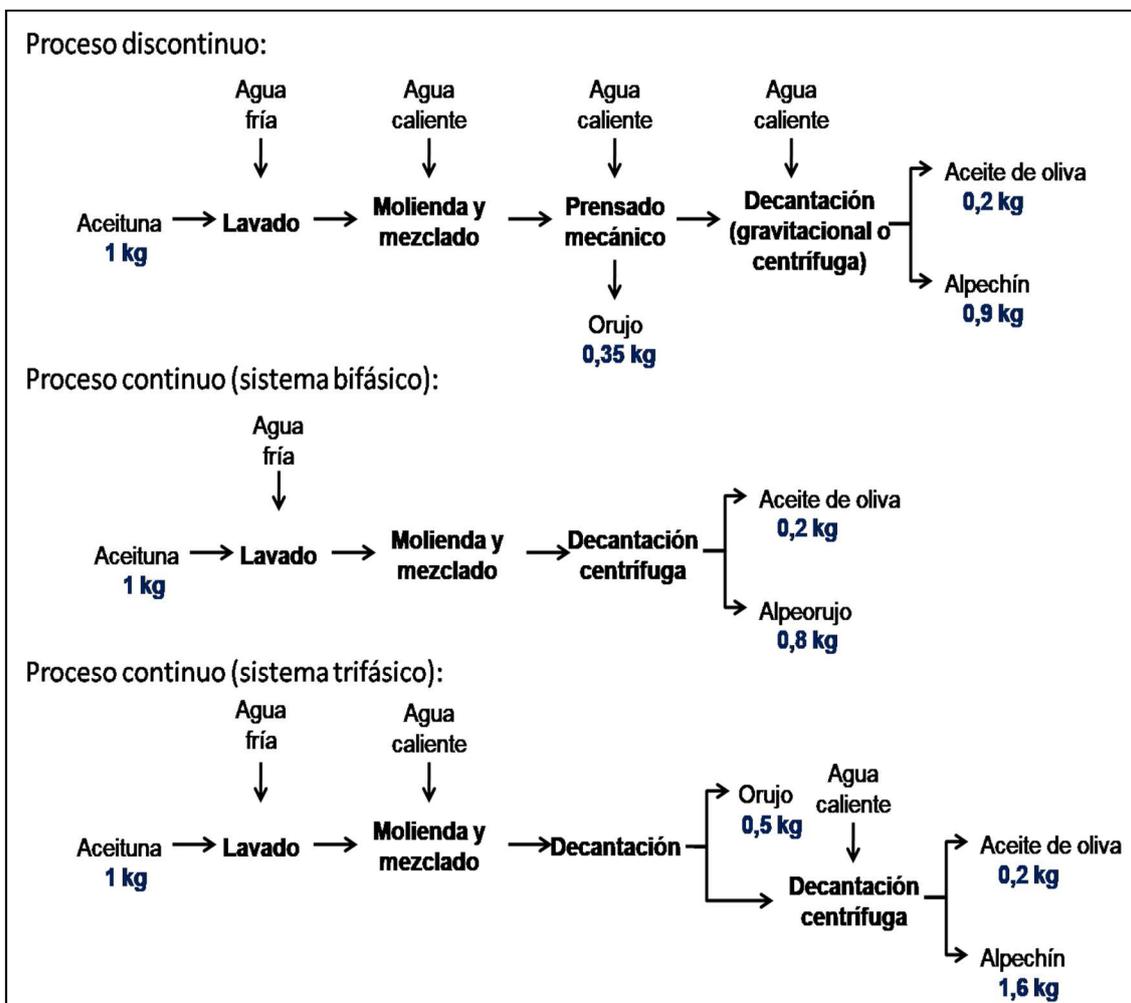


Figura 2. Esquema comparativo entre los distintos procesos de extracción del aceite (elaboración propia a partir de Vlyssides *et al.*, 2004).

El alpechín es un líquido marrón-negruzco que presenta un pH ácido, restos de aceite y material particulado, así como un olor característico, que puede tornarse en desagradable cuando es transformado por microorganismos. Esto ocurre cuando el alpechín se almacena a temperatura ambiente, como consecuencia del crecimiento de microorganismos a expensas de los compuestos orgánicos presentes en el mismo, y la consiguiente producción de compuestos orgánicos volátiles responsables del mal olor.

La composición del alpechín (Tabla 1) varía cualitativa y cuantitativamente en función de la variedad de aceituna, condiciones climáticas, prácticas de cultivo o los tiempos de almacenamiento de la aceituna y el sistema empleado en la

extracción del aceite de oliva entre otros parámetros. Además de agua (83-92%), el alpechín está constituido por compuestos polifenólicos, azúcares, ácidos orgánicos y nutrientes minerales, especialmente potasio (Dermeche *et al.*, 2013). Los compuestos polifenólicos presentes en el alpechín representan el 98% de los que inicialmente contienen las aceitunas (Obied *et al.*, 2005). Estas moléculas constan de un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo y una cadena lateral funcional (Bravo, 1998). En función de su estructura pueden clasificarse principalmente en ácidos fenólicos, socoiridoides y flavonoides, siendo hidroxitirosol, tirosol y oleuropeína los compuestos fenólicos más abundantes (Obied *et al.*, 2005). Las estructuras de estos polifenoles se muestran en la Figura 3.

Tabla 1. Principales componentes del alpechín (Paredes *et al.*, 1999).

Parámetros (%)	Alpechín	
	Media	Rango
Materia seca	7,19	4,12-16,38
Materia orgánica	64,60	58,45-70,63
Carbono orgánico total	47,52	43,61-53,45
Nitrógeno total	0,88	0,58-1,13
P	0,19	0,06-0,32
K	5,24	3,30-6,94
Na	0,15	0,04-0,48
Ca	0,42	0,32-0,53
Mg	0,18	0,06-0,22
Lípidos	4,27	0,55-11,37
Polifenoles	2,21	1,32-3,99
Carbohidratos	12,22	3,37-32,91

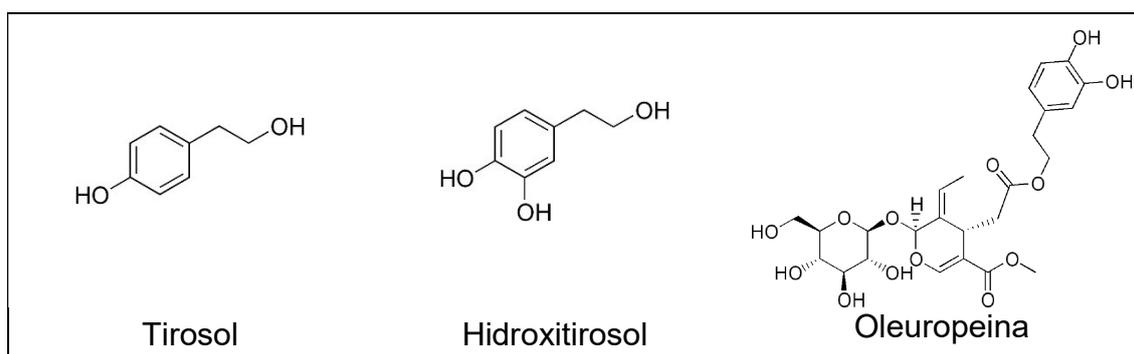


Figura 3. Estructura de los principales polifenoles del alpechín.

El alpechín tiene un elevado efecto contaminante debido a su alta carga orgánica, y a la amplia gama de contaminantes organohalogenados, ácidos grasos, compuestos fenólicos y taninos que presenta (Ntougias *et al.*, 2013). La

elevada proporción de compuestos aromáticos en el alpechín lo hacen altamente resistente a la biodegradación y adicionalmente presentan efecto antimicrobiano y fitotóxico (Zirehpour *et al.*, 2014). Como consecuencia de su elevado efecto contaminante, el alpechín puede ocasionar daños ambientales de diversa índole. Descargado directamente en el suelo no solo perjudica a la actividad microbiana y a las plantas, sino que también afecta a las propiedades fisicoquímicas del suelo. Mientras que los compuestos fenólicos resultan fitotóxicos, los compuestos oleosos aumentan la hidrofobicidad del suelo y disminuyen la retención del agua y la tasa de infiltración (Kavvadias *et al.* 2010). Con respecto a la contaminación de arroyos y ríos, el efecto más visible es la coloración del agua como consecuencia del color del alpechín y por la oxidación y posterior polimerización de los taninos que dan lugar a compuestos de color oscuro (Niaounakis y Halvadakis, 2006). Además, el alto contenido en azúcares estimula el crecimiento de microorganismos, disminuye las concentraciones de oxígeno disuelto en el agua y, por lo tanto, también disminuye la proporción disponible para otros organismos vivos (McNamara *et al.*, 2008; Souilem *et al.*, 2017). Por su parte, independientemente de si el alpechín se almacena en balsas o se descarga en tierra o aguas naturales, sus azúcares reductores pueden ser biotransformados por microorganismos en condiciones anaeróbicas y emitir gases como metano, sulfuro de hidrógeno o dióxido de azufre, provocando, además una contaminación considerable por olores (Niaounakis y Halvadakis, 2004).

La eliminación, depuración o aprovechamiento de los dos subproductos de la industria del aceite de oliva, alpechín y alpeorujo, constituye uno de los principales retos del sector. Por ello, se han estudiado diferentes métodos de tratamiento y eliminación que abarcan desde procesos biológicos aeróbicos y anaeróbicos, hasta procesos físicos que utilizan membranas, pasando por físico-químicos como neutralización, precipitación, floculación y oxidación, y procesos térmicos que engloban evaporación, destilación, combustión y pirolisis (Niaounakis y Malvadakis, 2006). En ocasiones, los procesos físicos, físico-químicos y térmicos pueden combinarse con procesos biológicos debido a que éstos no son capaces de degradar algunos compuestos fenólicos a altas concentraciones. Sin embargo, y a pesar de que estos métodos consiguen disminuir la demanda química de oxígeno, son menos empleados debido a sus altos costos operativos (Ayed *et al.*, 2017).

La disposición del alpechín en balsas para su evaporación natural constituyó una de las principales alternativas para la gestión de dichos efluentes durante la década de los 80 cuando la mayoría de las almazaras contaban con el sistema a tres fases, se producían grandes volúmenes de alpechín y su vertido directo en el alcantarillado o en cauces estaba prohibido. El efluente se recoge y almacena en balsas donde se evapora de forma natural hasta su secado completo durante el período caluroso del año. Como consecuencia, además de

generar malos olores, se produce una concentración de los componentes del alpechín, entre los que destacan por su efecto contaminante los compuestos polifenólicos (Hachicha *et al.*, 2009). Estas balsas pueden ocasionar impactos ambientales negativos en las zonas de su alrededor derivados de su ineficiente impermeabilización o dimensionado. En el primer caso se producen infiltraciones que conducen a la contaminación de aguas superficiales y subterráneas y a la alteración de la calidad del suelo. En las aguas, el alpechín reduce la disponibilidad de oxígeno, altera el equilibrio del ecosistema y puede ocasionar procesos de eutrofización. En el suelo, los compuestos polifenólicos del alpechín en altas concentraciones, además de resultar fitotóxicos e inhibir la germinación de las semillas, también eliminan o reducen la microbiota edáfica debido a su actividad antibiótica (Dermeche *et al.*, 2013). En el caso de balsas dimensionadas con una gran profundidad, además de que se limita la evaporación del alpechín, se producen condiciones de anaerobiosis en el fondo de la balsa dando lugar a la generación de gases con efecto invernadero tales como metano, por degradación anaerobia de la materia orgánica de los sedimentos (McNamara *et al.*, 2008).

1.2. Inoculantes para biorremediación de matrices contaminadas por alpechín

La biorremediación consiste en el uso de organismos vivos, generalmente microorganismos, o productos derivados de ellos para degradar, desintoxicar o separar sustancias químicas tóxicas presentes en aguas, suelos naturales, sedimentos, lodos e incluso aire. En función de si los contaminantes son tratados en su lugar de contaminación o fuera de él, los procedimientos de descontaminación se denominan *in situ* o *ex situ*, respectivamente. La biorremediación puede verse acelerada bien proporcionando los nutrientes y condiciones necesarios para favorecer el desarrollo de la microbiota autóctona en un proceso conocido como bioestimulación, o bien incorporando las especies capacitadas para degradar al contaminante en un proceso conocido como bioaumentación (Crawford y Rosenberg, 2013).

Un inoculante es un cultivo microbiano introducido en un medio y que, durante el tiempo que permanece en él, tiene la capacidad de consumir o degradar un agente contaminante. En función del tipo de microorganismos utilizados para degradar los compuestos orgánicos y las condiciones en que éstos se aplique, los procesos biológicos de tratamiento pueden clasificarse en aeróbicos y anaeróbicos (Ayed *et al.*, 2017).

En el caso del alpechín, los compuestos fenólicos, además de resultar tóxicos para los procesos biológicos, también limitan procesos de biodegradación y depuración natural en aguas y suelos, incluso por especies adaptadas (Kyriacou *et al.*, 2005). En este sentido, los tratamientos biológicos

aeróbicos, predominantemente con hongos filamentosos y levaduras, han surgido como métodos adecuados para la eliminación de contaminantes del alpechín debido a que resultan eficientes para la reducción de los compuestos polifenólicos y, por consiguiente de la toxicidad, y disminuyen la materia orgánica y, por tanto, también la demanda química y biológica de oxígeno en efluentes acuosos contaminados (Dermeche *et al.*, 2013).

Los parámetros más importantes que afectan a la velocidad de biodegradación de los polifenoles son la temperatura, el pH, la concentración de los compuestos y la adaptación microbiana. Por ello, Abd *et al.* (2015) aislaron y seleccionaron del alpechín los microorganismos con mayor capacidad para degradar los compuestos fenólicos, optimizando dichos factores. De los microorganismos aislados, los hongos mostraron la mayor capacidad para degradar los compuestos fenólicos, presentando *Paecilomyces variotti* una capacidad para degradarlos del 88,4% y de reducir la demanda química de oxígeno del 70%. *P. variotti* ofreció su actividad óptima a pH 6, temperatura 37±11 °C y período de incubación de doce días (Abd *et al.*, 2015).

Los hongos de la podredumbre blanca se han utilizado con éxito para la biodegradación y la biorremediación de una gran variedad de contaminantes orgánicos altamente recalcitrantes o refractarios a la biodegradación, incluidos los hidrocarburos aromáticos policíclicos, compuestos aromáticos policlorados y colorantes sintéticos. Asimismo, varias especies han sido evaluadas en cuanto a su eficiencia para bioconvertir desechos agroindustriales ricos en polifenoles. Aggelis *et al.*, (2002) aislaron ocho hongos de la podredumbre blanca (*Abortiporus biennis*, *Dichomitus squalens*, *Inonotus hispidus*, *Irpex lacteus*, *Lentinus tigrinus*, *Panellus stipticus*, *Pleurotus ostreatus* y *Trametes hirsuta*) y compararon su capacidad para decolorar el alpechín y disminuir el contenido en compuestos fenólicos, además de evaluar su actividad enzimática. Según tales autores, las especies más eficientes fueron *P. ostreatus*, *A. biennis*, *P. stipticus* y *D. squalens*, con una reducción en el contenido total de compuestos fenólicos del 51,5%, 54,5%, 42,2% y 36,4% respectivamente. Sin embargo, solo *P. ostreatus* mostró un alto grado de decoloración del alpechín con un 48,9%. Con respecto a la producción de enzimas, la actividad lacasa fue la principal para todos los hongos, mientras que la manganeso peroxidasa (MnP) solo se detectó en alpechín tratado con *P. ostreatus* y *A. biennis* (Aggelis *et al.*, 2002).

También se han llevado a cabo tratamientos biológicos del alpechín con cepas de *Aspergillus sp.*, generalmente como paso previo a una digestión anaeróbica. Se ha demostrado que varias especies de *Aspergillus* son capaces de degradar fenoles y eliminar el color de una amplia variedad de aguas residuales, probablemente como consecuencia de la intervención de varias enzimas extracelulares. Kyriacou *et al.* (2005) desarrollaron un método para el tratamiento del alpechín que combinaba procesos biológicos utilizando una cepa seleccionada de *Aspergillus niger*, y procesos electroquímicos en presencia de

H₂O₂. El tratamiento con *A. niger* condujo a la eliminación eficiente de la mayoría de los fenoles simples y ácidos orgánicos detectados en el alpechín. Una etapa adicional de electrólisis en condiciones ácidas utilizando H₂O₂, dio como resultado una reducción del 96% tanto de la demanda química de oxígeno como del total de los fenoles medidos (Kyriacou *et al.*, 2005).

Recientemente se ha informado que *Geotrichum candidum* también tiene la capacidad de decolorar efluentes coloreados, atribuida esencialmente a enzimas ligninolíticas como la manganeso peroxidasa y la lignina peroxidasa (LiP). Ayed *et al.*, (2016) aislaron *G. candidum* y demostraron que tratamientos del alpechín con este hongo repercutían en una reducción del 71% en la demanda química de oxígeno y del 60% en los compuestos fenólicos (Ayed *et al.*, 2016).

Los estudios que emplean bacterias para la descontaminación del alpechín en lugar de hongos o levaduras, han logrado reducciones significativas de demanda química de oxígeno, compuestos fenólicos y fitotoxinas. Así, Lamia y Moktar (2003) evaluaron la capacidad de decoloración y biodegradación de los compuestos fenólicos en el alpechín por *Lactobacillus plantarum*. Según sus resultados, el crecimiento de *L. plantarum* implicó la despolimerización de los compuestos polifenólicos de mayor peso molecular, repercutiendo en una decoloración del alpechín del 58%, una reducción de la demanda química de oxígeno del 55% y una disminución del 46% de los compuestos fenólicos (Lamia y Moktar, 2003). Por su parte, Ramos-Cormenzana *et al.*, (1996) propusieron a *Bacillus pumilis* para biorremediación del alpechín debido a su capacidad de degradar los compuestos fenólicos en un 50%.

Teniendo en cuenta la irradiación natural y las temperaturas de los países Mediterráneos, el tratamiento del alpechín con microorganismos fotosintéticos como las microalgas podría ser un área interesante de investigación en el futuro. Así, Pinto *et al.*, (2003) ya trabajaron con *Ankistrodesmus braunii* y *Scenedesmus quadricauda*, demostrando que eran capaces de degradar en torno al 50% de los fenoles de bajo peso molecular presentes en el alpechín (Pinto *et al.*, 2003).

1.3. Objetivos

Este trabajo se enmarca en el contexto de las actuaciones llevadas a cabo en el proyecto LIFE+REGROW (LIFE16ENV/ES/331) cuyo objetivo principal es restaurar un espacio ocupado por unas balsas de alpechín en desuso, aplicando diferentes estrategias de biorremediación *in situ* (Laboreo, Compostaje, Vermicompostaje y Fitorremediación) con el fin de reducir la contaminación del lugar, transformando el área en una infraestructura verde multifuncional con fines recreacionales, educativos y formativos. Mediante esta actuación se recuperará suelo actualmente ocupado por las balsas y, además, contribuirá al

aprovechamiento y reciclaje de residuos orgánicos agrícolas y ganaderos, que se emplean para implementar las estrategias indicadas. Para mejorar dichas estrategias se propone la inoculación (bioaumentación) de microorganismos como agentes aceleradores de la descontaminación y que constituyen el objeto de trabajo de este TFM. El proyecto se desarrolla en unas balsas abandonadas de alpechín ubicadas en el municipio de Mora (Toledo, España) que ocupan 5 ha y que servirá como modelo para su aplicación en entornos similares en países de la Cuenca Mediterránea productores de aceite de oliva.

El objetivo de este trabajo fue la búsqueda y selección de microorganismos que pudiesen emplearse en estrategias de bioaumentación para asegurar la descontaminación de suelos de balsas de alpechín.

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

1. Determinar la carga de microorganismos degradadores de polifenoles de los sedimentos de las balsas de alpechín.
2. Aislar una colección de microorganismos degradadores de polifenoles.
3. Seleccionar microorganismos para su empleo como inoculantes para la biodescontaminación de las balsas.
4. Producir inoculantes en suficiente cantidad para incorporarlos en las distintas estrategias de biorremediación *in situ*.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

Para la consecución de los objetivos planteados se desarrollaron diferentes experimentos que se ejecutaron de acuerdo con el esquema indicado en la Figura 4. Se recogieron muestras de las balsas que se emplearon tanto para la determinación de la carga microbiana como para el aislamiento y selección de inóculos para operaciones de biorremediación.

Para la determinación de la carga microbiana (Objetivo 1), las muestras se sembraron en medios de cultivo sólidos generales y selectivos, tras cuya incubación, se cuantificó la carga microbiana total (bacterias y hongos) y degradadora de polifenoles, respectivamente.

El aislamiento y selección de inóculos se realizó empleando dos estrategias que se ejecutaron en paralelo: siembra directa y enriquecimiento. Las muestras se sembraron directamente en medios de cultivo sólidos selectivos constituidos por compuestos polifenólicos o alpechín y, paralelamente, fueron sometidas a enriquecimiento en cultivos líquidos para estimular el crecimiento de poblaciones microbianas degradadoras de contaminantes. En el primer caso, tras la incubación, se detectaron las colonias positivas (degradadoras de contaminantes) para cada medio selectivo y se obtuvieron sus cultivos puros

mediante aislamiento. En el caso del enriquecimiento, tras la incubación, se aislaron colonias en medios de cultivo selectivo y se obtuvieron finalmente los cultivos puros. Los cultivos puros de las cepas obtenidas mediante las dos estrategias constituyeron la colección de microorganismos degradadores de polifenoles (Objetivo 2). Cada uno estos aislados fueron sometidos a una batería de pruebas para determinar la expresión de actividades enzimáticas relacionadas con la degradación de polifenoles, así como a la cuantificación de su capacidad degradativa del tirosol, polifenol presente en alpechín. Los resultados de estas pruebas junto con la capacidad de los aislados para crecer a una determinada temperatura constituyeron los criterios empleados para la selección de inoculantes para la biodescontaminación de las balsas de alpechín (Objetivo 3). Las cepas seleccionadas fueron identificadas mediante técnicas moleculares y se realizaron estudios de compatibilidad entre distintas cepas y rango térmico de crecimiento. Finalmente se produjeron a gran escala para su aplicación en campo (Objetivo 4).

En los siguientes apartados se describen detalladamente cada uno de los procedimientos indicados.



Figura 4. Esquema general de la metodología empleada.

2.1. Muestras

Para el recuento y aislamiento de los microorganismos de interés se recogieron muestras de 7 de las 8 balsas de alpechín ubicadas en el Municipio de Mora (Toledo), que ocupan una superficie total de 5 ha, y que constituyen el área de intervención del proyecto LIFE+REGROW en el que se enmarca este TFM (Figura 5). Las muestras se obtuvieron de sedimentos de las balsas 1 a 7, que estaban casi completamente desecadas, mientras que la balsa 8 no se muestreó debido a que presentaba una elevada cantidad de alpechín líquido y por su potencial escasa importancia para el aislamiento de especies microbianas aerobias por existir en las mismas condiciones anaeróbicas, visibles por la abundante emisión de gases, probablemente metano.



Figura 5. Disposición de las 8 balsas de alpechín (izquierda) y recogida de muestras en campo (derecha).

En todos los casos se recogieron muestras superficiales (3-5 cm de profundidad) de aproximadamente 100 g en frascos estériles. Para ello, se seleccionaron preferentemente zonas donde se observaba coloración especial como síntoma de crecimiento microbiano (Tabla 2). Las muestras recogidas fueron refrigeradas durante su transporte.

Tabla 2. Códigos y características de las muestras.

Balsa	Código	Descripción
1	B1	Muestra de líquido concentrado extremadamente denso y con consistencia alquitranosa recogido de un pequeño charco de la balsa
2	B2	Capa blanca a 3-5 cm de profundidad
3	B3a	Capa blanca a 3-5 cm de profundidad
3	B3b	Costra de sedimento con aparente crecimiento superficial de micelio fúngico
4	B4	Capa blanca a 3-5 cm de profundidad
5	B5	Capa rosácea a 3-5 cm de profundidad.
6	B6	Capa blanca a 3-5 cm de profundidad
7	B7	Capa blanca a 3-5 cm de profundidad

2.2. Recuento de microorganismos: Carga total y específica

La cuantificación de la carga microbiana total (bacterias y hongos) y específica (degradadores de polifenoles) en las muestras se realizó mediante recuento de colonias en medios de cultivo sólidos generales para bacterias en APHA (Panreac) y hongos en Rosa de Bengala (Panreac); y medios selectivos para bacterias y hongos degradadores de polifenoles en APHA y PDA (Panreac) adicionados de una solución estéril de ácido tánico (Sigma) al 0,5% p/v (APHA-TAN y PDA-TAN). Para ello se obtuvo una dilución 1/10 (10^{-1}) de las muestras añadiendo 5 g de cada una a 45 mL de solución salina estéril (NaCl 0,9%, p/v). Esta suspensión se mantuvo en agitación orbital a 90 rpm durante 30 min. A partir de esta primera dilución (10^{-1}) se obtuvieron diluciones decimales seriadas, hasta 10^{-5} , mediante la transferencia en condiciones asépticas de 1 mL a tubo conteniendo 9 mL de solución salina estéril. Estas diluciones se emplearon para sembrar placas Petri con cada uno de los medios previamente indicados, en las que se incorporaron 100 μ L de diluciones seleccionadas, que se distribuyeron en la superficie de la misma empleando bolitas de vidrio estériles. Para cada medio y dilución se sembraron dos réplicas. Estas placas se incubaron a 30 °C durante 48 h (APHA) o 5-7 días (PDA, APHA-TAN y PDA-TAN). Finalizado el tiempo de incubación se realizó la lectura en placas con diluciones adecuadas tal y como sigue:

- Bacterias y hongos totales: Se contaron las colonias crecidas en APHA y Rosa de Bengala, respectivamente (Figura 6).

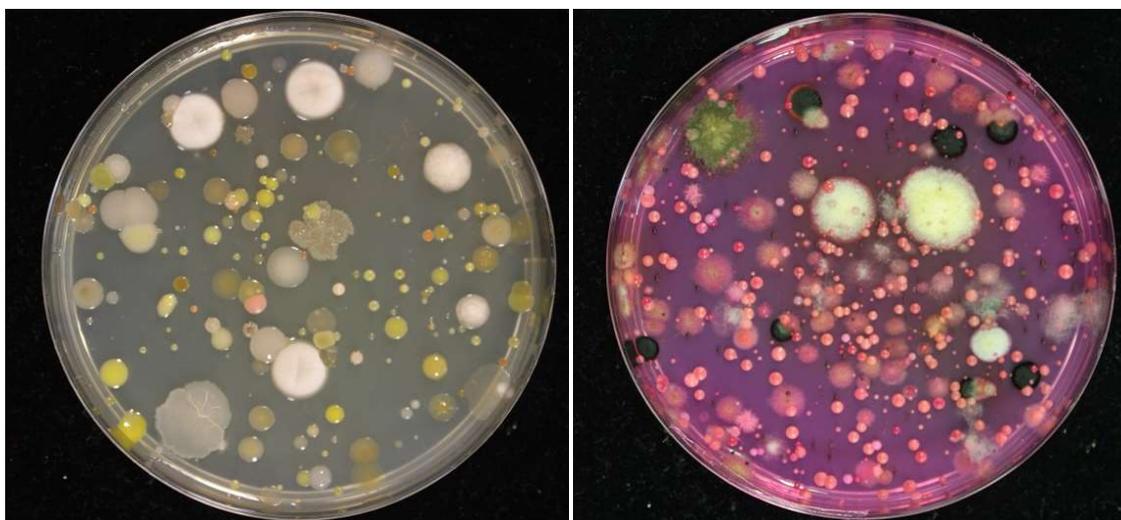


Figura 6. Placas para recuento de bacterias totales en APHA (izquierda) y hongos totales en Rosa de Bengala (derecha).

- Degradadores de polifenoles: Se contaron las colonias de hongos (PDA-TAN) y bacterias (APHA-TAN) que demostraron actividad polifenoloxidasas, visible por una coloración marrón en torno a las mismas (Figura 7). El ácido tánico es un polímero compuesto por varios ácidos fenólicos. Por ello, si en la

muestra hay presentes microorganismos capaces de degradarlos, presumiblemente también serán capaces de degradar los compuestos polifenólicos del alpechín. Aquellos microorganismos que manifiestan tal actividad durante el período de incubación mostrarán en primer lugar una zona de aclaramiento en el medio alrededor de las colonias seguido por una coloración marrón oscuro por liberación y oxidación de ácido gálico (Kumar *et al.*, 2010; Rasiravuthanahalli *et al.*, 2017) (Figura 7).

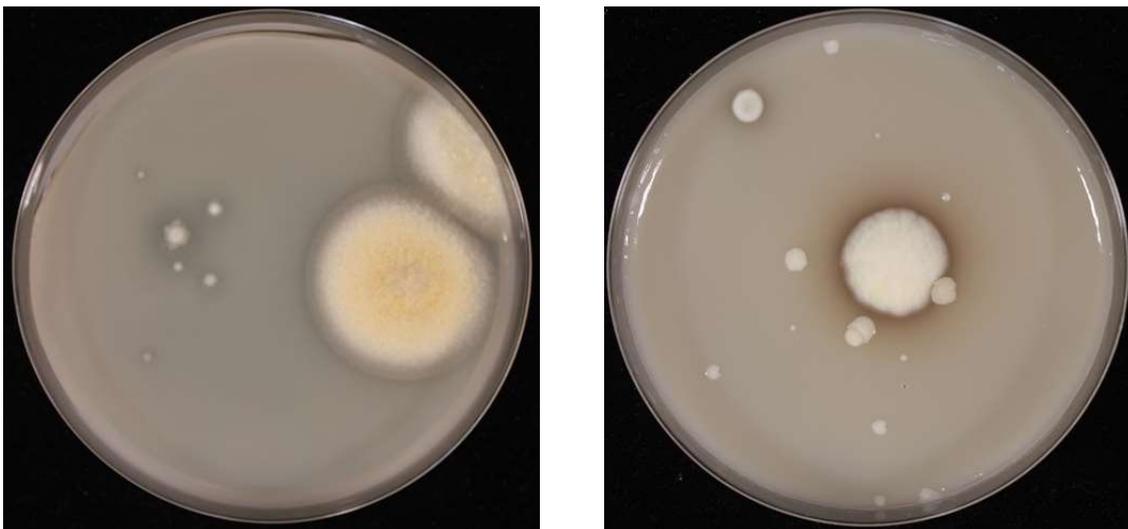


Figura 7. Colonias de microorganismos degradadores de polifenoles en medio APHA-TAN. Aclaramiento inicial del medio (izquierda) y coloración marrón tras incubación prolongada (derecha).

Los resultados se expresaron en unidades formadoras de colonias por peso seco de muestra (UFC/g ps) de acuerdo con la fórmula siguiente:

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

Para expresar los resultados en peso seco de muestra, se calculó la humedad de las muestras mediante la determinación de la pérdida de peso tras desecarlas a 105 °C hasta peso seco constante.

2.3. Aislamiento de microorganismos

Para el aislamiento de los microorganismos a partir de las muestras de las balsas se utilizaron dos estrategias, al objeto de asegurar el máximo éxito en la búsqueda de cepas de interés (Figura 4):

- Siembra directa en medios sólidos selectivos para detectar microorganismos degradadores de polifenoles, compuestos del alpechín y moléculas relacionadas.
- Enriquecimiento de las muestras en poblaciones microbianas degradadoras y posterior siembra en medios sólidos selectivos.

Los microorganismos obtenidos en ambos procedimientos constituyeron la colección de cepas degradadoras de polifenoles.

2.3.1. Siembra en medios selectivos

Para este procedimiento se emplearon las diluciones de las muestras descritas en el apartado anterior (2.2.), con las que se sembraron 100 μ L distribuidos en superficie de los siguientes medios de cultivo sólidos:

- Medio RBBR
- Medios con alpechín (OMW)
- Medio con alpechín y glucosa (OMWG)
- Medio con alpechín sin glucosa (OMWSG)

Adicionalmente se incorporaron en este programa de aislamiento placas con los medios APHA-TAN y PDA-TAN descritas en el apartado anterior.

Las placas sembradas se incubaron a dos temperaturas, 30 °C y 50 °C, con la finalidad de buscar microorganismos con rangos diferentes de temperatura de crecimiento, dado que una de las aplicaciones finales de los inóculos sería su incorporación en estrategias de biorremediación que implicaban compostaje, proceso en el que se generan elevadas temperaturas. Tras incubación durante 5-7 días se detectaron las colonias que demostraron actividades de interés y se procedió a su aislamiento en APHA o PDA para bacterias y hongos, respectivamente. La composición, fundamento y lectura para cada medio selectivo se indica a continuación.

Medio RBBR

La composición y preparación de este medio se especifica en la Tabla 3. El Azul brillante de remazol R (RBBR) es un colorante de tipo antraquinónico que presenta una estructura similar a la lignina, polímero complejo formado por compuestos fenólicos. Por tanto y, al igual que ocurría con el ácido tánico, si en la muestra existen microorganismos capaces de degradarlos, podrían hacerlo también con los compuestos polifenólicos del alpechín. Aquellos microorganismos que mostraron una decoloración del medio alrededor de las colonias fueron aislados (Figura 8).

Tabla 3. Composición del medio de cultivo sólido con RBBR 0,02 %*.

Componente ¹	Cantidad
Glucosa	10 g
Peptona bacteriológica	5 g
Extracto de levadura	2 g
Agar	20g
Agua	730 mL
Incorporar tras esterilización	
SET ²	70 mL
Remazol Brilliant Blue R-1mg/mL (R8001-Sigma) disuelto y esterilizado por filtración	200 mL

¹ Preparación: Esterilizar el medio base Incorporar en condiciones estériles SET y el colorante. Conservar a 4°C. ²Solución de elementos traza (Kirk *et al.*, 1986): SET

Solución de elementos traza (SET):

Componente	Concentración (g/L)
Ácido nitriloacético	1,5
MgSO ₄ .7H ₂ O	3
MnSO ₄ .H ₂ O	0,5
NaCl	1
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,1
CoSO ₄	0,1
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,1
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,1
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,01
AlK(SO ₄) ₂ .12H ₂ O	0,01
H ₃ BO ₃	0,01
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,01

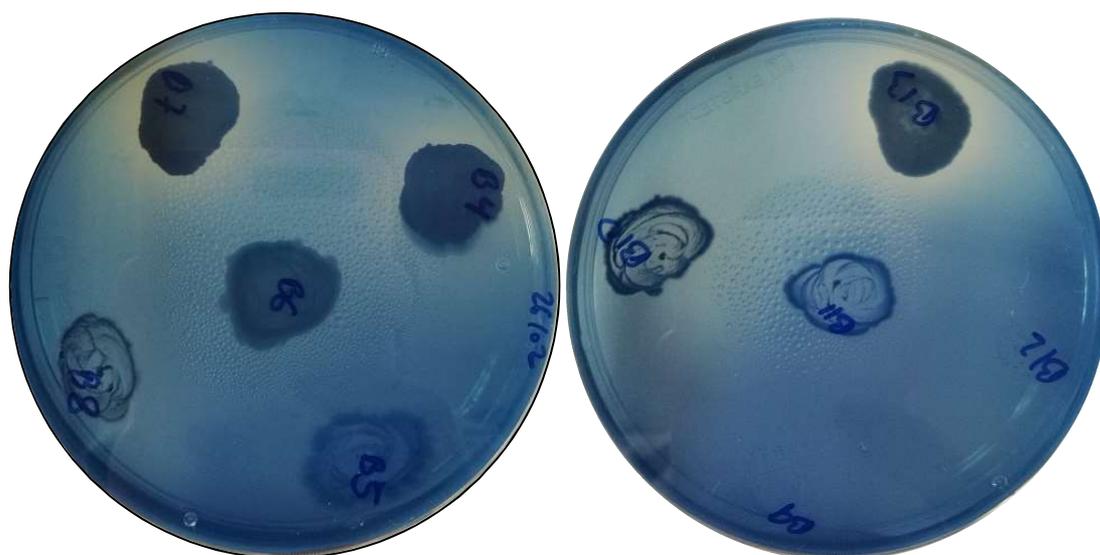


Figura 8. Colonias de microorganismos degradadores de RBBR, se observa por una decoloración del medio RBBR.

Medios OMW

Para la búsqueda de microorganismos se incorporaron medios que contenían alpechín, denominados medios OMW, por las siglas en inglés Olive Mill Wastewaters. El alpechín que se empleó para la elaboración de estos medios procedía de una dilución obtenida a partir del concentrado recogido en la Balsa 1 (Tabla 4). Se pesaron 10 g de OMW de la Balsa 1 que se disolvieron en 500 mL de agua destilada y la solución (2%, p/v) se mantuvo 1h en agitación magnética hasta disolución completa. Dada la imposibilidad de realizar filtración esterilizante porque se colmataban los filtros, el alpechín se incorporó en los medios antes de su esterilización en autoclave. Se prepararon tres medios diferentes con alpechín: Medio OMW, medio con alpechín como única fuente de carbono y energía (Tabla 4); Medio OMW-Glucosa (OMWG), medio con alpechín y glucosa (Tabla 5); Medio OMW- sin Glucosa (OMWSG): Medio con alpechín sin glucosa (Tabla 6). El aspecto de las colonias crecidas en estos medios se muestra en la Figura 9. Los distintos morfotipos coloniales crecidos en estos medios fueron aislados en APHA (bacterias) o PDA (hongos).

Tabla 4. Composición del medio OMW.

Componente	Cantidad (500 mL)
Agar	10g
OMW (2% p/v)	50mL
Agua destilada	300ml
Incorporar después de esterilizar	
Medio mínimo de sales (MMJ), volumen de cada sal*	50mL

*Preparación: Se disuelven/suspenden los componentes del medio en 300mL de agua destilada y se esteriliza 20 minutos a 121°C en autoclave. Tras la esterilización se incorporan las sales en condiciones asépticas. Enfriar, agitar y repartir en placas.

*Medio mínimo de sales (MMJ) (Sales de Janshekar: Janshekar *et. al.*, 1982)

Solución A:		Solución B:		Solución C:	
K ₂ HPO ₄	16,0 g	NaCl	2,5 g	(NH ₄) ₂ SO ₄	12,5 g
KH ₂ PO ₄	5,0 g	MgSO ₄ ·7·H ₂ O	5,8 g	(NH ₄)NO ₃	10,0 g
Agua Dest c.s.p.	1000,0 mL	CaCl ₂ ·2·H ₂ O	0,13 g	FeCl ₃ ·6·H ₂ O	0,025 g
		Agua Dest c.s.p.	1000,0 mL	Agua Dest c.s.p.	1000,0 mL

c.s.p.: Cantidad suficiente para

Tabla 5. Composición del medio OMWG.

Componente	Cantidad (500 mL)
Glucosa	5g
Extracto de levadura	1g
OMW (2% p/v)	50mL
Agar	10g
Agua destilada	300mL
Incorporar después de esterilizar	
MMJ, volumen de cada sal*	50mL

*Preparación: Se disuelven/suspenden los componentes del medio en 300mL de agua destilada y se esteriliza 20 minutos a 121°C en autoclave. Tras la esterilización se incorporan las sales en condiciones asépticas. Enfriar, agitar y repartir en placas.

Tabla 6. Composición del medio OMW-sin Glucosa (OMWSG).

Componente	Cantidad (500 mL)
Extracto de levadura	1g
OMW (2% p/v)	50mL
Agar	10g
Agua destilada	300mL
Incorporar después de esterilizar	
Medio mínimo de sales, volumen de cada sal*	50mL

*Preparación: Se disuelven/suspenden los componentes del medio en 300mL de agua destilada y se esteriliza 20 minutos a 121°C en autoclave. Tras la esterilización se incorporan las sales en condiciones asépticas. Enfriar, agitar y repartir en placas.



Figura 9. Colonias bacterianas y fúngicas en medio OMW (izquierda), OMWG (centro) y OMWSG (derecha).

2.3.2. Enriquecimiento

El enriquecimiento tuvo por objeto favorecer el crecimiento de determinados microorganismos que estuvieran en baja proporción en las muestras o que presentasen un crecimiento muy lento. Para ello, se suspendieron 5 g de cada muestra en frascos ISO de 250 mL con 45 mL de medio líquido constituido por medio mínimo de sales (Tabla 4) y un 0,5% (p/v) glucosa para estimular el crecimiento. Se prepararon dos medios de enriquecimiento por muestra, cada uno de los cuales se incubó a una

temperatura diferente, 30 °C y 50 °C. Tras incubación durante 21 días se realizó aislamiento en medio de cultivo sólido selectivo con tirosol como única fuente de carbono y energía (TIR) (Tabla 7) (Allouche y Sayadi, 2005). En este caso la lectura positiva fue la presencia de crecimiento. A partir de los morfotipos coloniales que crecieron en estos medios se obtuvieron cultivos puros que se mantuvieron en el mismo medio.

Tabla 7. Composición del medio de cultivo sólido con TIROSOL 0,05 % (TIR)*.

Componente	Cantidad (400 mL)
Glucosa	4g
Extracto de levadura	0,8g
Agar	8g
Agua destilada	278mL
Incorporar después de esterilizar	
Medio mínimo de sales, volumen de cada sal*	40mL
Tirosol, solución 1g/10 mL esterilizado por filtración	2 mL

*Preparación: Se disuelven/suspenden los componentes del medio en 278mL de agua destilada y se esteriliza 20 minutos a 121 °C en autoclave. Tras la esterilización se incorporan la solución de tirosol y las sales en condiciones asépticas. Enfriar, agitar y repartir en placas.

2.3.3. Colección de aislados y mantenimiento

Se obtuvieron cultivos puros de todas las bacterias y hongos que se preservaron en tubo de APHA o PDA inclinado a 4 °C y criogenizados a -80 °C con el sistema Cryoinstant (Deltalab, España). El mantenimiento rutinario y a corto plazo de los aislados fúngicos y bacterianos, consistió en la resiembra mensual en tubos con PDA y APHA, respectivamente.

La nomenclatura empleada para la codificación de los microorganismos permitía trazar la muestra de la cual procedían (B1,...B7), la temperatura de incubación (30 °C o 50 °C) y el medio de aislamiento (APHA-TAN, PDA-TAN, RBBR, OMW, OMWG, OMWSG). Las cepas que procedían del protocolo de enriquecimiento incluían el prefijo ENR en su código.

2.4. Selección de microorganismos

Toda la colección de aislados fue sometida a una serie de pruebas para evaluar su capacidad de degradar contaminantes presentes en el alpechín y compuestos relacionados. Independientemente del programa de procedencia (siembra directa o enriquecimiento), se evaluó en todas las cepas su crecimiento y actividad en los medios APHA-TAN y PDA-TAN (Figura 7), RBBR (Figura 8) y TIR (apdo. 2.2.2.). Adicionalmente se realizaron pruebas cualitativas para poner de manifiesto la expresión de determinadas enzimas, así como pruebas cuantitativas para determinar la capacidad de degradación de un polifenol modelo, el tirosol, tal y como se describe a continuación.

2.4.1. Pruebas cualitativas: enzimas

La colección de hongos y bacterias fue sometida a distintas pruebas para determinar la presencia de actividad ligninolítica debido a la reconocida conexión entre el metabolismo de la lignina y de compuestos aromáticos como los polifenoles. Todos los microorganismos se sometieron a siete pruebas cualitativas incluyendo: test de Sundman o fenoloxidasa, Lacasa1, Lacasa2, test de oxidasa, Tirosinasa y Peroxidasa (Rayner y Boddy, 1988).

Para el análisis cualitativo en el caso de las bacterias se recogió con asa 2-3 colonias y en hongos se tomó una porción del hongo crecido en placa de PDA (aproximadamente 0,5 cm²) con un sacabocados, en ambos casos se sembró el medio de cultivo específico. Los cultivos se incubaron a 30 °C o 50 °C durante 24-48h (bacterias), 3 días (actinobacterias) o 5 días (hongos), tras los cuales se efectuó la lectura.

A continuación se describen los medios y reactivos utilizados para cada prueba.

Test de Sundman: Prueba que determina la actividad fenoloxidasa. Para efectuar este test (Sundman y Näse, 1971) cada cepa a ensayar se sembró sobre el Medio de Sundman (MS) (Tabla 8). El medio de siembra contiene lignina y, tras incorporarle un reactivo, se vuelve de color verde cuando se liberan los compuestos fenólicos como consecuencia de la acción de la fenoloxidasa (Sundman y Näse, 1971).

Tabla 8. Composición del medio sólido para la detección de la actividad ligninolítica-Sundman.

Componente	Cantidad por litro
Lignina	1 g
Medio mínimo de sales (MMJ), volumen de cada sal*	100 mL
Agar	20 g
Agua destilada	700 mL

*Preparación: Se disuelven los componentes del medio en 700mL de agua destilada y se esteriliza 20 minutos a 121 °C en autoclave. Tras la esterilización se incorporan las sales en condiciones asépticas. Enfriar, agitar y repartir en placas (una placa con 18-20mL de medio permite ensayar 8 microorganismos problema y el control positivo). El medio es turbio.

La incubación se prolongó hasta la obtención de colonias visibles. Seguidamente se adicionó, hasta cubrir el medio de cultivo, una mezcla a partes iguales de una solución acuosa de FeCl₃·6H₂O (1%, p/v) y K₃[Fe(CN)₆] (1%, p/v), elaborada momentos antes de su aplicación. Estos reactivos provocaron, transcurridos 5-10 minutos, la aparición de una coloración verde debida a la presencia de ácidos fenólicos liberados a partir de la lignina que compone el medio MS. Aquellas colonias capaces de alterar este polímero presentaron un halo de aclaramiento, ya que consumieron estos ácidos fenólicos libres (Figura 10).

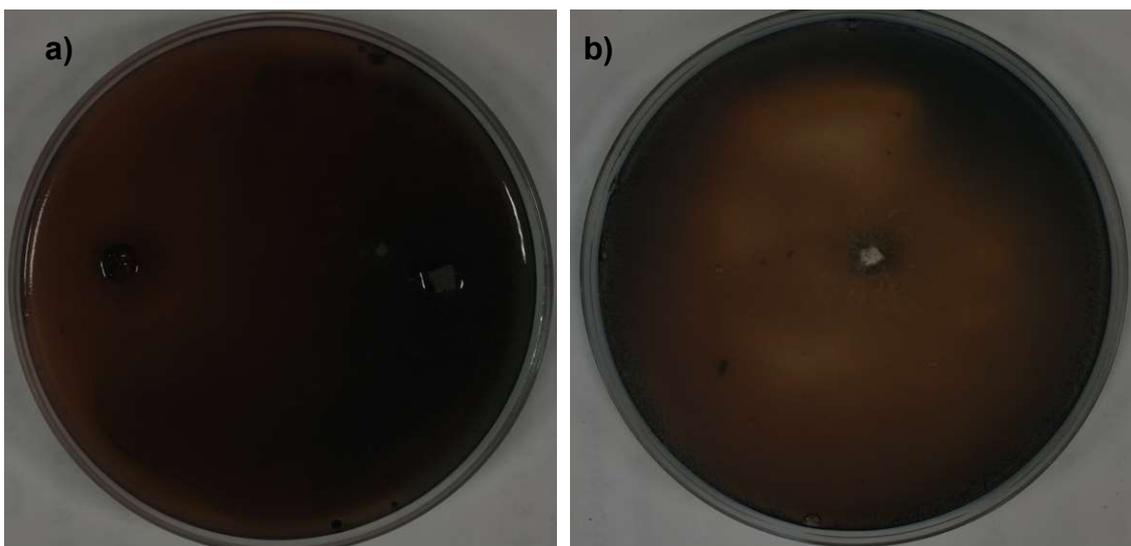


Figura 10. Revelado de la prueba de Sundman: a) Cepa FEN positiva (izquierda) y FEN negativa (derecha); b) Control FEN positivo.

Pruebas de actividad lacasa, oxidasa o prueba de nobles, tirosinasa y peroxidasa: Para poner de manifiesto estas actividades se utilizó el protocolo descrito por Rayner y Boddy (1988). A las colonias de los microorganismos crecidos en PDA (hongos) o en APHA (bacterias) se incorporaron un par de gotas de reactivo específico para cada actividad. La composición de dichos reactivos, así como la interpretación de las lecturas y el tiempo necesario para efectuarlas, aparecen detallados en la Tabla 9. En la Figura 11 se muestra un ejemplo de revelado de estas pruebas.

Tabla 9. Reactivo de revelado, tiempos de lectura y resultados de las actividades lacasa, oxidasa, tirosinasa y peroxidasa.

Prueba	Reactivo	Tiempo de lectura	Positivo
Lacasa 1	1,44 g de α -naftol/ 100 mL de etanol (96%)	4-24 h	Púrpura
Lacasa 2	1,24 g de guaiacol/ 100 mL de etanol (96%)	4-24 h	Púrpura
Oxidasa	0,5 g de goma guaiac/ 30 mL de etanol (96%)	Instantánea	Azul violeta
Tirosinasa	1,08 g de p-cresol/ 100 mL de etanol (96%)	4-48 h	Naranja-marrón
Peroxidasa	Mezcla extemporánea (1:1) de solución acuosa de pirogalol al 1% (p/v) con solución de peróxido de hidrógeno al 13,3% (v/v)	4-24 h	Marrón

* Una vez incorporados los productos químicos al solvente correspondiente, cada solución se almacenó protegida de la luz. Todos los productos son de Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri, EEUU).

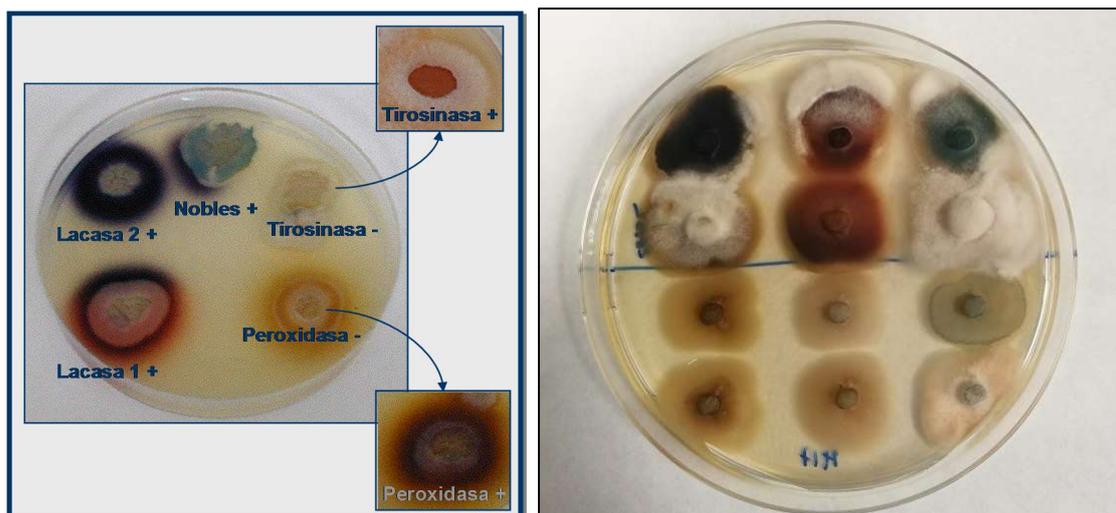


Figura 11. Lectura de las pruebas de actividad oxidasa extracelular, lacasa, tirosinasa y peroxidasa (Guisado, 2009).

2.4.2. Pruebas cuantitativas: degradación de tirosol

Uno de los polifenoles presentes en el alpechín es el tirosol. Para cuantificar la capacidad de degradación de este polifenol por parte de la colección de aislados, cada uno de ellos se sembró en medio con dicho componente como única fuente de carbono y energía y, tras el período de incubación, se determinó la concentración remanente de tirosol. El procedimiento se detalla a continuación.

Estos análisis se realizaron en microplacas estériles de 48 pocillos (Thermo Scientific) (Figura 12) con 500 μ L de medio TIR (Tabla 10) inoculado con 2-3 colonias de las bacterias o con una porción de cultivo de 5 días de hongo en PDA o actinomiceto en APHA cortado con sacabocados de 4 mm de diámetro. Los cultivos se incubaron a 30 °C durante 7 días

Tabla 10. Composición del medio de cultivo con Tirosol 0,05%.

Componente	Cantidad
Agua destilada	278 mL
Medio mínimo de sales, volumen de cada sal Janshekar	40 mL
Tirosol, solución 1g/10 mL esterilizado por filtración	2 mL

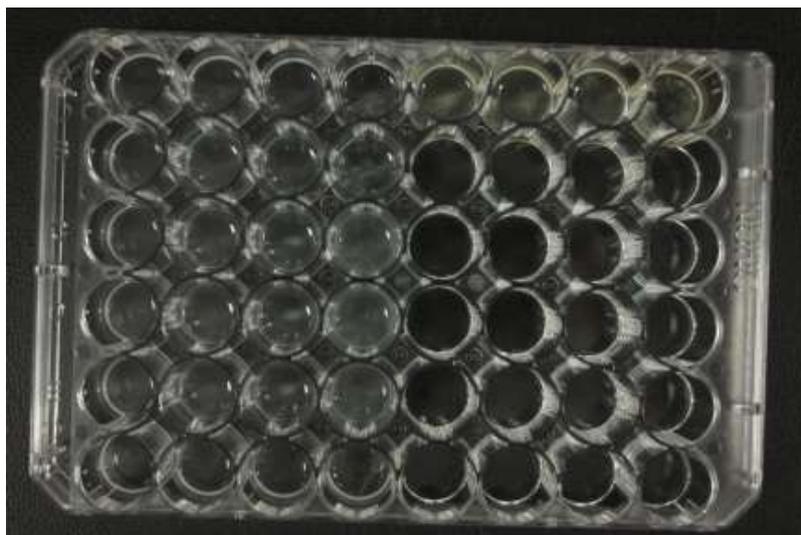


Figura 12. Cultivo de las cepas en microplacas con medio con tirosol.

Tras el período de incubación se cuantificó la concentración de tirosol empleando el reactivo Folin-Ciocalteu de acuerdo con un protocolo modificado de Sánchez-Rangel *et al.*, 2013. De cada pocillo se recogieron 300 μL que se transfirieron a un eppendorf en el que se incorporaron 180 μL de H_2O_2 y la mezcla se agitó vigorosamente con vortex. Este tratamiento permite eliminar azúcares reductores y otras sustancias que interfieren en la medida de polifenoles con el reactivo Folin-Ciocalteu (Singleton *et al.*, 1999). A partir de la mezcla se recogieron 255 μL que se transfirieron a microplaca de 96 pocillos y en cada uno de ellos se incorporaron 15 μL de reactivo Folin-Ciocalteu (Sigma) y 30 μL de Na_2CO_3 1N empleando micropipetas multicanal. La reacción del Folin-Ciocalteu con el tirosol en medio alcalino da lugar a una especie química de coloración azul. Tras mantener 1h en oscuridad se midió la absorbancia en un espectrofotómetro de microplacas EON (Biotek, USA) a 765 nm, obteniéndose la concentración de tirosol mediante comparación con una curva patrón de tirosol con un rango de 0 a 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($r^2=0,92$).

Los resultados de esta analítica se expresaron como porcentaje de degradación del tirosol (% Degr. Tirosol), de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{Degr. Tirosol} = \frac{[\text{Tirosol inicial}] - [\text{Tirosol final}]}{[\text{Tirosol inicial}]} \times 100$$

Donde:

- [Tirosol inicial]: Concentración de tirosol en el medio de cultivo.
- [Tirosol final]: Concentración de tirosol tras 7 días de incubación.

2.5. Pruebas complementarias de cepas seleccionadas

Una vez seleccionados los microorganismos que mostraron mayor capacidad para degradar contaminantes presentes en el alpechín, se realizaron una serie de pruebas complementarias incluyendo identificación de aislados seleccionados, pruebas de compatibilidad y pruebas de rango térmico de crecimiento, las cuales se detallan a continuación.

2.5.1. Identificación

Los aislados seleccionados fueron hongos y se procedió a su identificación mediante la amplificación y secuenciación de la región ITS (ITS1/ITS4) del ADN ribosomal (ADNr) (Jurado et al., 2014). El ADN fúngico se extrajo mediante el Kit comercial plant DNAZOL® Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU) según instrucciones del fabricante. La amplificación de las secuencias génicas se realizó en termociclador MyCycler (Biorad, California, EEUU), con cebadores universales ITS1/ITS4 y con las condiciones de amplificación que se muestran en la Tabla 11. La mezcla para amplificación estuvo constituida por 2 µL de muestra problema, 10 µL de mix PCR 2x BioMix Red (Bioline), 0,4 µL de cada cebador y agua suficiente para completar 20 µL.

Tabla 11. Programa empleado en la amplificación de la región ITS (hongos).

Cebadores para la amplificación de la región ITS		
ITS1	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'	
ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTCATATGC-3'	
Programa de amplificación	Temperatura y tiempo	Nº de ciclos
Desnaturalización inicial	94 °C-2 min	35 ciclos
Desnaturalización	94 °C-30 s	
Alineamiento	55 °C-30 s	
Elongación	72 °C-45 s	
Elongación final	72 °C-7 min	

La longitud de los fragmentos amplificados se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% con tampón SB (Invitrogen) suplementado con 0,002% de GelRed TM (Biotium, Hayward, EEUU) y comparados con el marcador DNA ladder (50-10.000pb DirectLoad TM Wide Range DNA Marker, Sigma-Aldrich, EEUU). Las bandas se visualizaron con luz UV en transiluminador y se analizaron con el software Gel DocTMXR + System (Biorad, California, EEUU). Tras comprobar que la amplificación se había realizado correctamente, el producto de la PCR fue purificado mediante mi-PCR Purification Kit (Metabion). La secuenciación fue llevada a cabo por los Servicios Centrales de Investigación de la Universidad de Almería. Las secuencias obtenidas fueron analizadas por una serie de programas informáticos: Sequence scanner v1.0 (disponible en www.appliedbiosystems.com) para visualizar y copiar las secuencias Forward y Reverse; Reverse complement (disponible en www.bioinformatics.org) para obtener el reverso complementario del fragmento

antisentido; ClustalX v2.0.11 (disponible en www.clustal.org/) para alinear la secuencia Forward y el reverso complementario; Mega 5.05 (www.megasoftware.net/) para editar las secuencias alineadas y construir el fragmento completo y la base de datos online del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast.ncbi.nlm.nih.gov/) para comparar los fragmentos obtenidos con secuencias depositadas en esta base de datos.

2.5.2. Pruebas de compatibilidad

En el caso de que se seleccione más de un aislado y se pretendan incorporar en campo conjuntamente, es preciso determinar si existe algún efecto inhibitorio o deletéreo de un aislado frente a otros. Para determinar esto, se realizaron enfrentamientos duales de las cepas en medios sólidos de PDA de los microorganismos conjuntamente. Dichos medios fueron sembrados con un plug de 0,5 cm de diámetro. Tras el período de cultivo de 4 días se determinó el diámetro de crecimiento de cada microorganismo y la presencia o ausencia de solapamientos de colonias.

2.5.3. Rango térmico de crecimiento

Para determinar el rango de crecimiento de los aislados seleccionados se sembraron placas de PDA con un plug de 0,5 cm de diámetro cada uno de los microorganismos y se incubaron a 25, 30, 40 y 50 °C. Transcurridos 7-10 días se determinó el grado de crecimiento realizando 3 mediciones de diámetro por placa.

2.6. Preparación de inóculos

Las cepas seleccionadas fueron producidas en grandes cantidades para su aplicación en campo. Para la producción masiva de biomasa, se realizaron los cultivos en placas Petri de vidrio estériles de 20 cm de diámetro inoculadas con 5 plugs de 0,5 cm de diámetro de hongos crecidos en PDA durante 5 días. El crecimiento en los medios se monitorizó visualmente durante 7 y 10 días para determinar el tiempo óptimo de recogida. Los cultivos se incubaron a la temperatura idónea de crecimiento de las cepas seleccionadas, de acuerdo con los resultados obtenidos en el ensayo descrito en el apartado 2.5.3. Transcurrido el tiempo de cultivo, la biomasa se separó manualmente de la mayor parte del medio de cultivo y se congeló a -80 °C para su posterior liofilización en liofilizador Telstar Cryodos (Telstar, Terrasa). La biomasa liofilizada fue homogenizada con una batidora y envasada a vacío para su transporte e inoculación en la zona afectada. Se tomó una alícuota (100 mg) de la biomasa de cada cepa antes de su envasado al vacío para cuantificar las células viables (UFC/g) de acuerdo con el protocolo especificado en el apartado 2.2. para hongos totales.

2.7. Análisis de datos

Todos los resultados fueron procesados mediante el programa Microsoft Office Excel 2010 para Windows, así como sus gráficas correspondientes. En el ensayo de determinación de rango térmico de crecimiento de los hongos seleccionados, se analizó el efecto de las temperaturas de incubación sobre el diámetro de crecimiento del hongo mediante un Análisis Factorial de Varianza (ANOVA), mientras que para evaluar las diferencias significativas entre temperaturas se empleó el Test de Mínima Diferencia de Fisher (LSD), utilizando un intervalo de confianza del 95% ($p < 0,05$). Para estos análisis se utilizó el programa Statistix Version 8.0.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En consonancia con los objetivos planteados en este TFM y la secuencia experimental especificada en la Figura 4, a continuación se exponen los resultados obtenidos en las distintas fases del trabajo, incluyendo los correspondientes a la determinación de la carga microbiana total y degradadora de polifenoles de las muestras empleadas para el aislamiento de las cepas de interés, seguida de la descripción de la colección de aislados degradadores de alpechín y la correspondiente selección de inoculantes. Finalmente se exponen los resultados de caracterización de los aislados seleccionados, seguido de los relativos a la preparación del inóculo que se aplicó en campo.

3.1. Carga microbiana total y degradadora de polifenoles

Para la determinación de la carga microbiana total, las muestras de sedimentos de las balsas de alpechín se sembraron en medios de cultivo sólidos generales y selectivos, tras cuya incubación, se cuantificó la carga microbiana total (bacterias y hongos) y degradadora de polifenoles, respectivamente. Estos resultados se muestran en las Figuras 13 y 14.

La balsa 5 presentó el mayor número de bacterias totales ($6,74 \cdot 10^8$ UFC/g); mientras que los menores recuentos bacterianos se obtuvieron en la balsa 1 ($1,41 \cdot 10^5$ UFC/g) (Figura 13). El mismo patrón se observó para el caso de hongos totales, con máximos recuentos en la balsa 5 ($3,78 \cdot 10^7$ UFC/g) y mínimos en la balsa 1 ($8,05 \cdot 10^2$ UFC/g). La reducida carga microbiana en la balsa 1, puede derivar de las características de la muestra procedente de dicha balsa. A diferencia del resto de muestras, que estaban constituidas por sedimentos, la muestra de la balsa 1 era un líquido extremadamente denso (Tabla 2), en la que probablemente el crecimiento microbiano estaría más dificultado. Exceptuando este caso, por lo general, se puede considerar que los recuentos, tanto de hongos como de bacterias, fueron bastante más elevados de lo que cabría esperar para un ambiente con elevada concentración de compuestos antimicrobianos. Además, en cierta medida, están en consonancia con lo descrito por otros autores en escenarios similares. Así por ejemplo, Mekki

et al. (2006) en un estudio acerca del efecto de la aplicación de alpechín sobre las comunidades microbianas del suelo, demostraron que la aplicación de alpechín provocaba un incremento de la población fúngica ($1,7 \cdot 10^5$ UFC/g) con respecto a un suelo control. Aunque tras sucesivas aplicaciones de alpechín obtuvieron una disminución en el recuento de hongos ($1,4 \cdot 10^5$ UFC/g), estos niveles seguían siendo mayores que los del suelo control ($2,7 \cdot 10^4$ UFC/g). Por su parte Saadi *et al.* (2007) obtuvieron recuentos fúngicos del orden de 10^7 UFC/g en muestras superficiales (0-5 cm de profundidad) de suelos regados con alpechín y sometidos a un ensayo para evaluar el efecto de la estrategia biorremediadora de *landfarming*. Por tanto, los niveles descritos son muy similares a los obtenidos en este trabajo, que se encuentran en el rango de 10^5 a 10^7 UFC/g. Sin embargo, en el caso de las bacterias, aunque en el estudio realizado por Mekki *et al.* (2006) se constató un incremento en la población bacteriana conforme se realizaban aplicaciones de alpechín, los niveles alcanzados para dicho grupo, $1,6 \cdot 10^5$ UFC/g, fueron muy inferiores a los obtenidos en este trabajo (en el rango de 10^6 a 10^8 UFC/g).

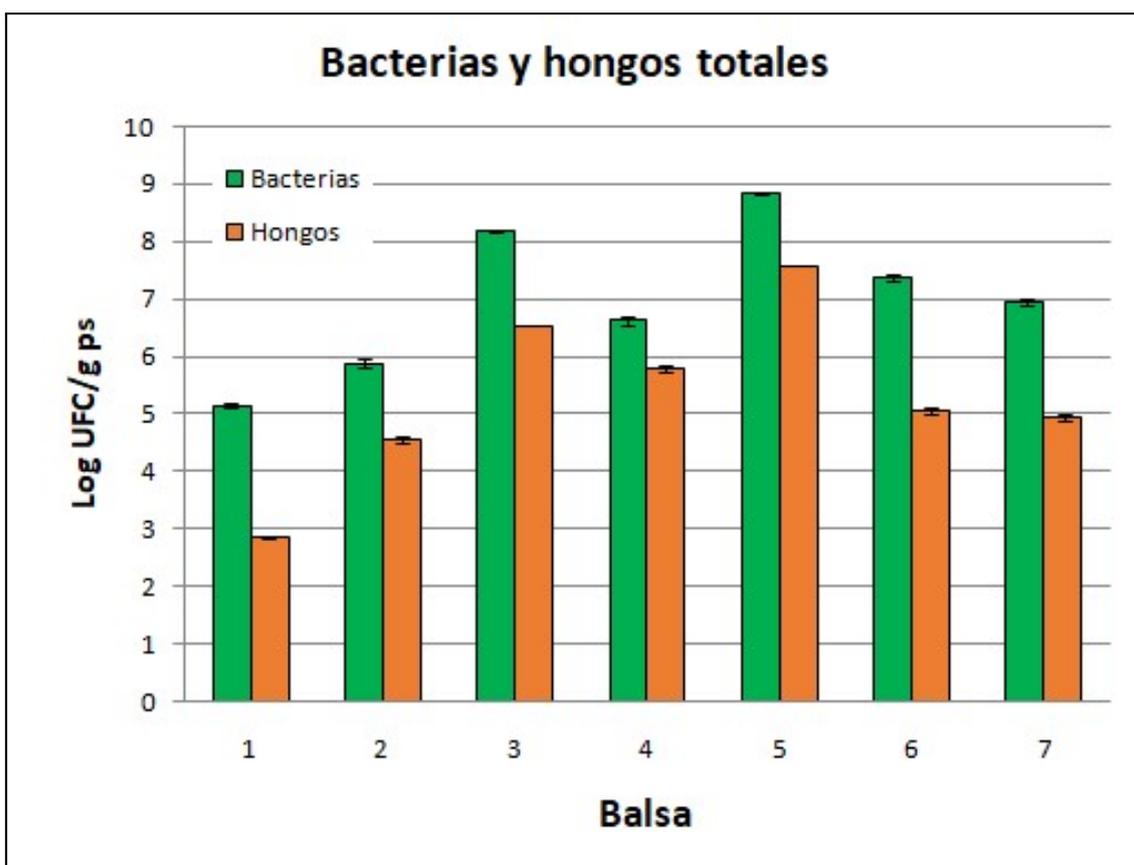


Figura 13. Carga bacteriana y fúngica total (expresado en log UFC por g de peso seco) de las muestras obtenidas en las balsas de alpechín. Los resultados son la media de dos repeticiones. Las barras de error muestran la desviación estándar.

En relación a la carga bacteriana degradadora de polifenoles o productores de polifenoloxidasa (Figura 14), las muestras de las balsas 3 y 5 fueron las que presentaron el mayor número de bacterias con tal actividad (alrededor de 10^6 UFC/g) mientras que en el caso de hongos los mayores recuentos se obtuvieron en las balsas 3 y 6, con valores en torno a 10^5 UFC/g. En la balsa 1 no se obtuvieron bacterias ni hongos con dicha capacidad, y estos últimos tampoco se detectaron en la muestra de la balsa 2. De acuerdo con estos datos, en general, la proporción de microorganismos degradadores de polifenoles respecto al total de población, tanto fúngica como bacteriana, fue bastante elevada (Figura 15). En la mayoría de las balsas más del 40% de bacterias y hongos totales eran degradadores de polifenoles, siendo las balsas 3 y 6 las que mayores proporciones de bacterias (84,5%) y hongos (100%) degradadores de polifenoles presentaron, respectivamente. Esto se debe probablemente a un enriquecimiento natural de las poblaciones microbianas capaces de degradar los componentes más recalcitrantes del alpechín, como consecuencia de la presencia prolongada de tales compuestos en el suelo. Otros autores como Gamba *et al.* (2007) y Saad *et al.* (2007) observaron un efecto similar.

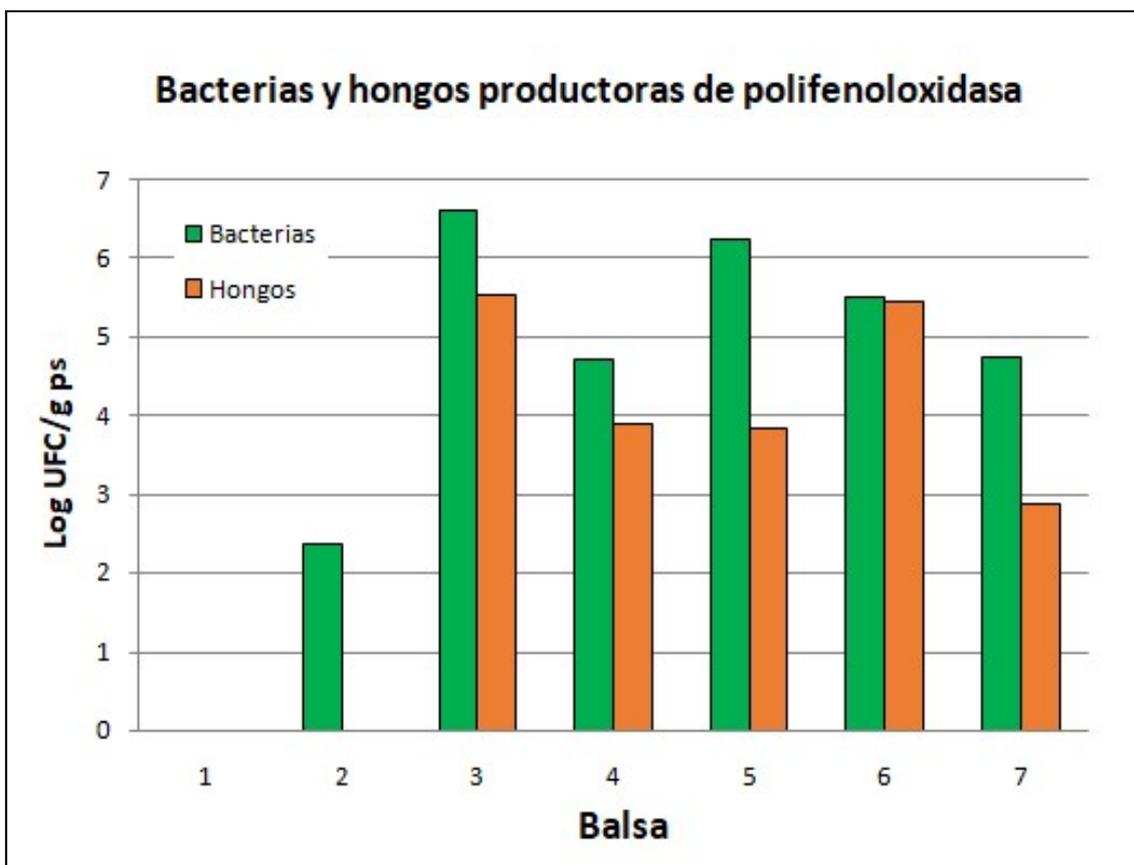


Figura 14. Carga bacteriana y fúngica degradadora de polifenoles (productores de polifenoloxidasa) (expresado en log UFC por g de peso seco) en las muestras obtenidas en las balsas de alpechín.

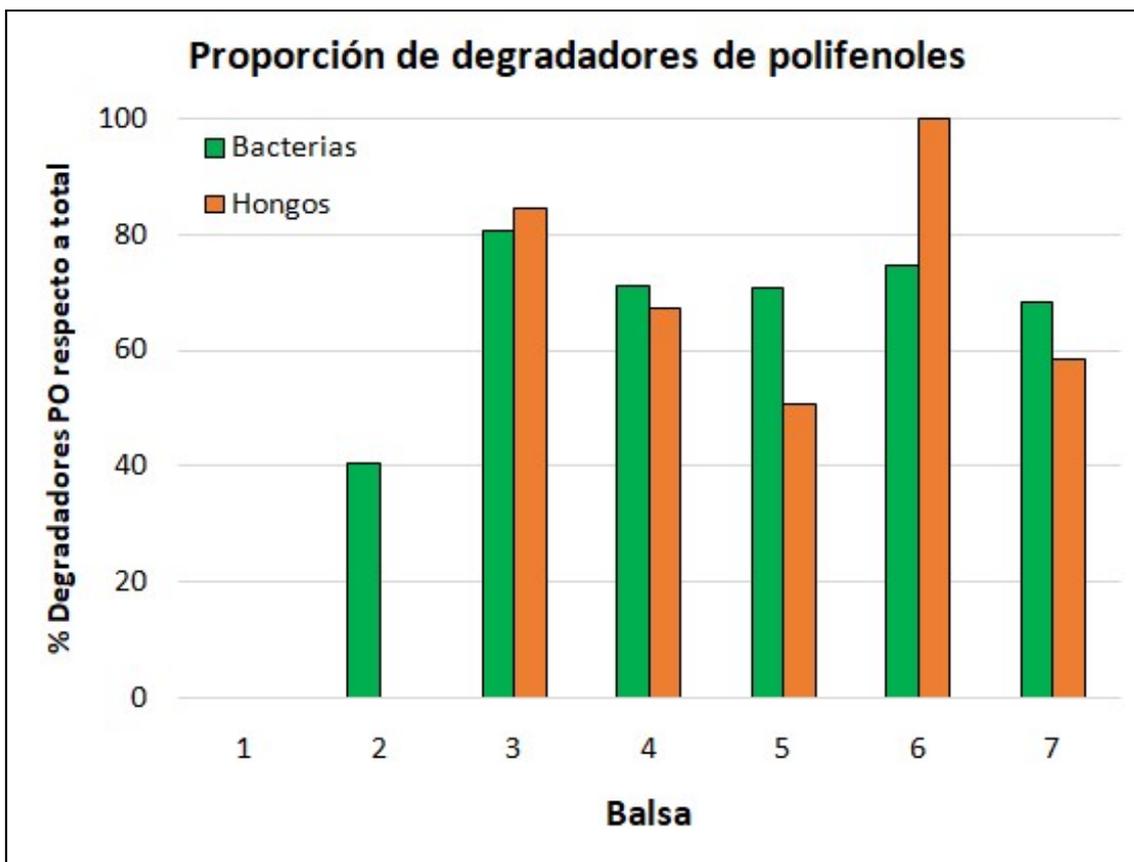


Figura 15. Proporción de microorganismos degradadores de polifenoles (PO) respecto al total en las muestras obtenidas en las balsas de alpechín.

3.2. Colección de microorganismos degradadores de alpechín

El protocolo de aislamiento de microorganismos degradadores de componentes del alpechín incluía dos procedimientos que implicaban la siembra directa de las muestras en medios selectivos y, en paralelo, su enriquecimiento y posterior siembra en medios selectivos. Estos procedimientos permitieron obtener una colección final de 60 cepas de interés, incluyendo 36 eubacterias, 4 actinomicetos y 20 hongos, cuyo origen por balsas se muestra en la Figura 16. La mayoría de los aislados procedieron de la muestra de balsa 3, con 19 cepas, seguidos de la balsa 6, con 10 aislados; mientras que las muestras de las balsas 1, 2 y 5 fueron las que menor número de aislados aportaron con 5 microorganismos cada una. Estos resultados están en consonancia con las proporciones de degradadores descritas previamente para cada una de las balsas. De esta forma, se pudo constatar que la probabilidad de aislar microorganismos con actividades de interés para ser empleados como inoculantes en descontaminación de alpechín fue mayor para muestras cuyos niveles de degradadores de polifenoles era superior.

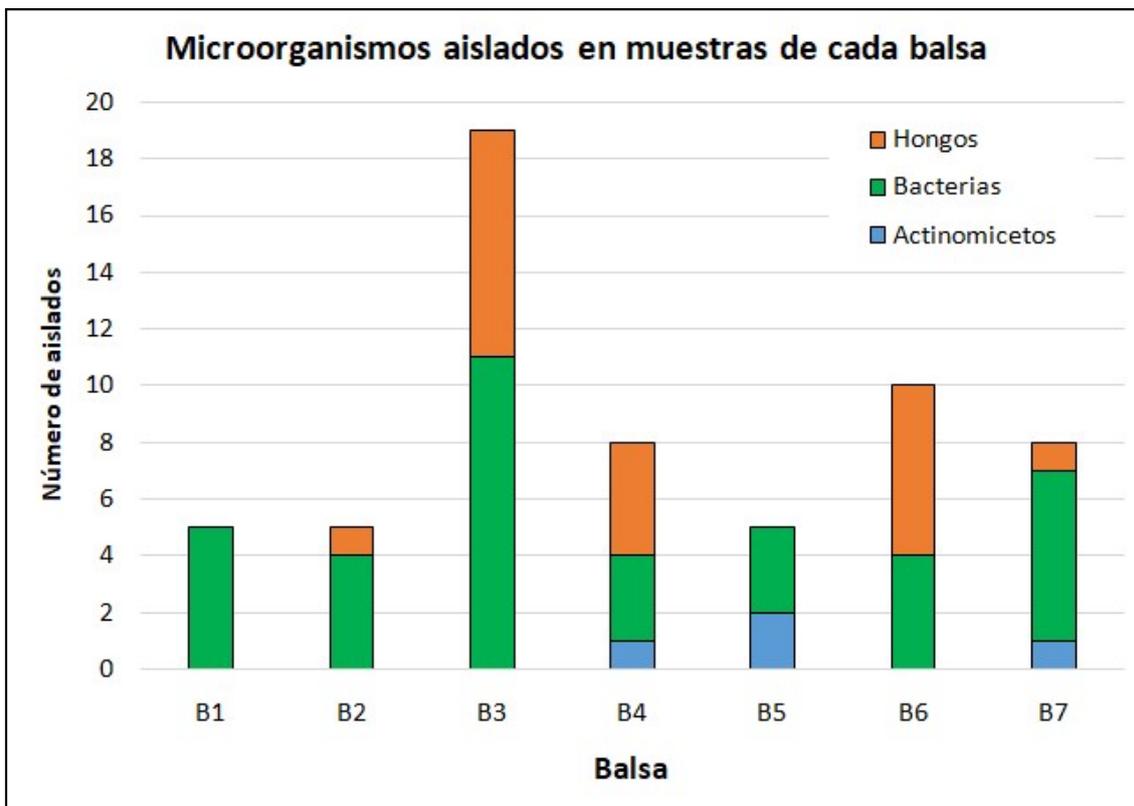


Figura 16. Número de aislados obtenidos a partir de cada balsa.

Respecto a la capacidad de sondeo de los dos programas establecidos, siembra directa o enriquecimiento, y los distintos medios empleados para el aislamiento de los 60 aislados que constituyeron la colección, el programa que mayor número de aislados suministró fue el que implicó una fase de enriquecimiento en medio líquido seguido de un aislamiento en medios selectivos constituidos por tirosol (Figura 17). Mediante esta estrategia se obtuvieron un total de 37 cepas (61,7% del total de aislados), incluyendo 32 de las 36 eubacterias de la colección. Esto se debe a que el enriquecimiento tiene como objetivo favorecer el crecimiento de microorganismos presentes en la muestra en baja proporción o cuyo desarrollo es demasiado lento como para poder crecer con facilidad en el resto de medios sólidos utilizados en la siembra directa. Asimismo, todas las cepas termotolerantes aisladas a 50 °C, que incluyeron 14 bacterias y 1 hongo, provinieron de este programa. Este tipo de microorganismos resultan de especial interés para su aplicación en procesos de estrategias biorremediadoras mediante compostaje, en los que las fluctuaciones térmicas recomiendan el empleo de microorganismos que soporten elevadas temperaturas (Xu *et al.*, 2018).

El resto de aislados de la colección procedieron de siembra directa de las muestras en medios sólidos para la detección de actividad polifenoloxidasa (APHA-TAN y PDA-TAN) con 14 cepas y del medio con colorante RBBR, con 9 cepas. Cabe destacar que no se obtuvo ningún aislado a partir de los medios con alpechín (OMW), ya que fueron poco selectivos (Figura 9), y en ellos crecieron una elevada cantidad de microorganismos, por lo que fueron desechados como procedimiento de aislamiento específico. Esto se debe probablemente a la elevada dilución del alpechín incorporado al medio de cultivo, de modo que, en proporciones reducidas pierde su efecto antimicrobiano y actúa como fuente de nutrientes (Paraskeva y Diamadopoulou, 2006) y, por tanto, no permite seleccionar poblaciones resistentes o degradadoras del alpechín concentrado.

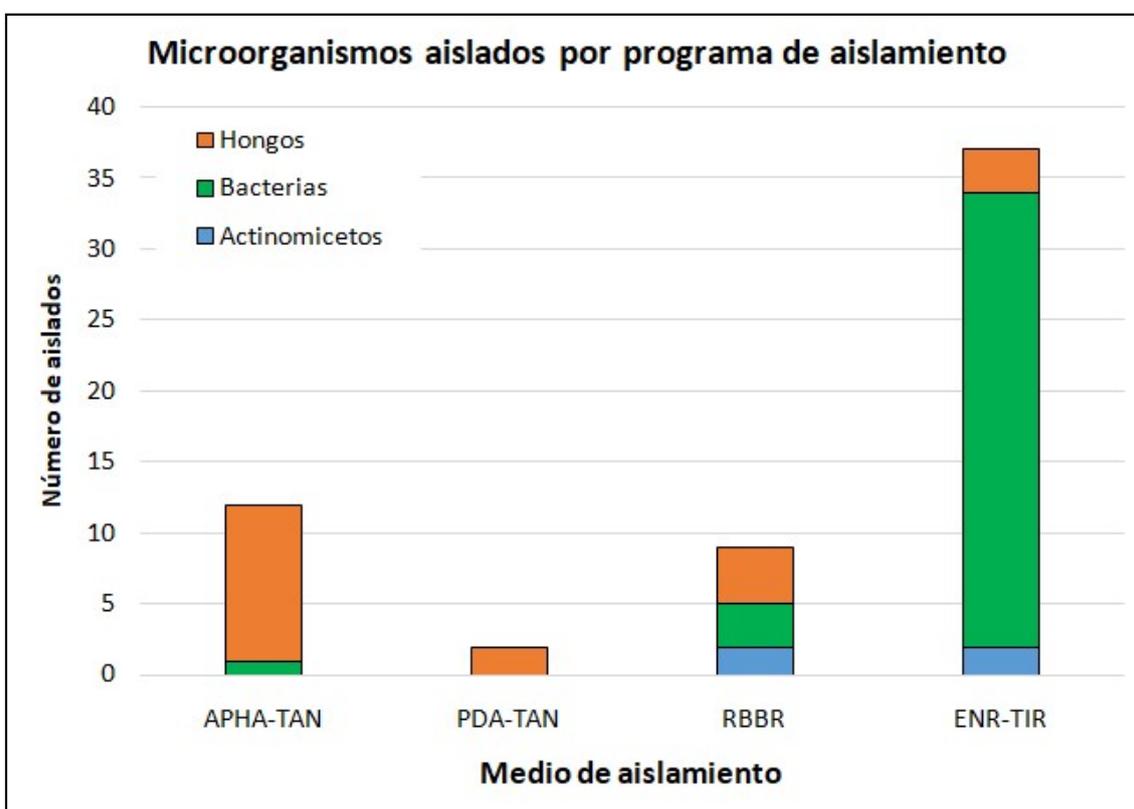


Figura 17. Número de aislados obtenidos a partir de cada programa de aislamiento. ENR-TIR, programa de aislamiento mediante enriquecimiento selectivo y siembra en medios selectivos con tirosol; RBBR, siembra directa en medios con colorante RBBR; APHA-TAN y PDA-TAN, siembra directa en medios selectivos con ácido tánico que ponen de manifiesto la producción de polifenoloxidasa.

3.3. Selección de inoculantes

La colección de 60 cepas obtenida fue sometida a una batería de pruebas cualitativas para poner de manifiesto la expresión de determinadas enzimas y actividades implicadas de forma directa o indirecta en la degradación de los componentes del alpechín. Los resultados obtenidos en estos análisis se muestran en la Tabla 12, en la que se indica el número de cepas que mostraron cada una de las actividades analizadas. Cabe destacar que todas las cepas de la colección tuvieron capacidad para crecer en medio con tirosol como única fuente de carbono, lo que implica que son capaces de crecer a expensas de uno de los principales polifenoles del alpechín (Obied *et al.*, 2005). De forma más general, la actividad polifenoloxidasas detectada en medios con ácido tánico estuvo presente en 22 cepas. La actividad peroxidasa se detectó en 43 de las cepas, demostrando su capacidad para oxidar compuestos orgánicos del alpechín (Zerva *et al.*, 2017). Relacionadas con las actividades de las peroxidadas, resultan más interesantes las cepas que mostraron capacidad para decolorar el colorante RBBR (26 cepas), actividad ligninasa (14 cepas) y otras actividades como la producción de lacasa, oxidasa y tirosinasa que, aunque minoritarias, resultan de especial interés debido a su conexión con el metabolismo de la lignina, uno de los compuestos naturales de mayor recalcitrancia. Los microorganismos capaces de degradar tal compuesto tienen capacidades metabólicas para degradar una amplia gama de compuestos de naturaleza aromática como los que se encuentran en el alpechín (Zerva *et al.*, 2017). En general los hongos presentaron mayor número de actividades que las bacterias. Una característica única de los hongos es su capacidad para atacar compuestos orgánicos mediante el empleo de oxidorreductasas extracelulares relativamente inespecíficas como consecuencia de un proceso evolutivo que ha favorecido su crecimiento en sustratos recalcitrantes de estructura aleatoria. Por ello, estas enzimas dan a los hongos una ventaja ecológica frente a las bacterias (Harms *et al.*, 2011).

Tabla 12. Número de aislados de la colección que mostraron actividades en las pruebas cualitativas de expresión de actividades realizadas.

Grupo	Prueba*								
	RBBR	PO	TYR	LAC1	LAC2	OXI	TI	PER	LIG
Actinomicetos	2		4	1		1		3	1
Bacterias	11	4	36					32	11
Hongos	13	18	20	6	4	5	8	8	2
Total	26	22	60	7	4	6	8	43	14

* Deco. RBBR: Decoloración Azul brillante de remazol R; PO: Polifenoloxidasas; TYR: Crecimiento en tirosol; LAC1: Lacasa1; LAC2: Lacasa2; OXI: Oxidasa; TI: Tirosinasa; PER: Peroxidasa; LIG: Ligninasa.

Además de las pruebas cualitativas indicadas, se cuantificó la capacidad de cada uno de los aislados para degradar el tirosol, compuesto polifenólico modelo, cuyos resultados se muestran en la Tabla 13, en la que se indican los rangos de degradación obtenidos para las distintas cepas. De las 60 cepas de la colección, solo 9 fueron capaces eliminar entre el 80-100% de tirosol, 6 entre el 50-80% y 8 entre el 20-50%, el resto de cepas retiraron menos del 20 %.

Tabla 13. Porcentajes de degradación del tirosol por las cepas de la colección.

Grupo	% Degradación tirosol				
	0%	0-20%	20-50%	50-80%	80-100%
Actinomicetos	1		1		2
Bacterias	8	25	3		
Hongos	2	1	4	6	7
Total	11	26	8	6	9

En relación con la distribución de capacidad degradativa de tirosol por grupos microbianos, se obtuvo una amplia diferencia en el porcentaje de degradación de dicho compuesto entre hongos y actinomicetos con respecto a bacterias (Figura 18). Mientras que las mejores cepas de hongos y actinomicetos eliminaron más del 90% de dicho compuesto, en bacterias apenas llegaban al 30 %. Los microorganismos capaces de degradar polímeros a través de la producción de enzimas extracelulares pueden usar una amplia gama de fuentes de carbono. La efectividad de las bacterias aerobias para reducir la fitotoxicidad del alpechín varía mucho, ya que pueden ser muy efectivas contra algunos compuestos fenólicos y relativamente ineficaces contra otros. Ramos-Cormenzana *et al.* (1996) demostraron que la bacteria *Bacillus pumilis* era capaz de degradar completamente los compuestos aromáticos protocatéuico y caféico, pero tuvo mucho menos efecto sobre el tirosol, mientras que Knupp *et al.* (1996) informaron sobre la transformación completa del tirosol en ácido 4-hidroxifenilacético realizada por *Arthrobacter sp.*

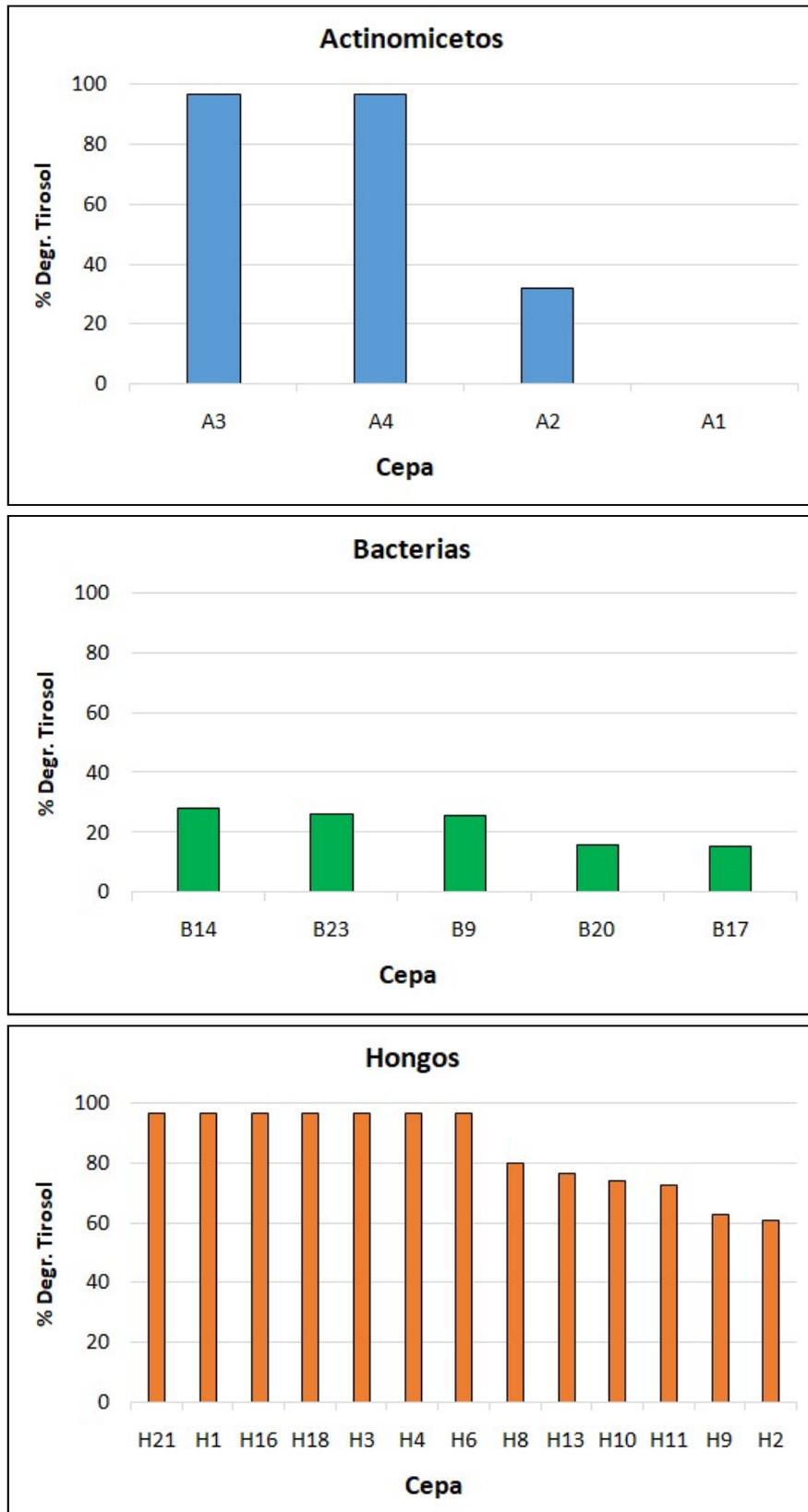


Figura 18. Degradación de tirosol por actinomicetos, bacterias y hongos de la colección. En cada grupo se muestran sólo cepas que produjeron una degradación significativa.

Los resultados de las pruebas analíticas previamente descritas, tanto cualitativas como cuantitativas, permitieron la preselección de 9 cepas (6 hongos, 2 actinobacterias y 1 bacteria) en base al número de actividades exhibidas (tres o más actividades positivas), temperatura de aislamiento, grupo microbiano y capacidad para degradar el tirosol (Tabla 14). Según estos criterios, estas 9 cepas presentan una gama de actividades metabólicas y capacidades fisiológicas que los hacen potencialmente adecuados para la biodescontaminación de ambientes contaminados por alpechín. No obstante, a efectos prácticos, se decidió limitar el número de cepas finalmente seleccionadas a dos, al objeto de caracterizarlas y producirlas en masa para su aplicación en campo. A tal efecto se seleccionaron las cepas H2 y H16 debido a su elevado número de actividades relacionadas con el metabolismo de compuestos recalcitrantes y capacidad degradativa de tirosol, en comparación con el resto de cepas.

Tabla 14. Cepas potencialmente útiles para biorremediación de suelos contaminados por alpechín

Nº ID	T (°C)	RBBR	PO	TYR	LAC1	LAC2	OXI	TI	PER	LIG	%degr.Tyr
A3	30	0	0	1	0	0	0	0	1	1	96.6
A4	30	0	0	1	0	0	0	0	1	0	96.6
B14	30	1	0	1	0	0	0	0	1	1	28.4
H21	50	0	0	1	0	0	0	0	1	0	96.6
H1	30	1	1	1	0	0	0	0	0	0	96.6
H16	30	0	1	1	1	1	1	1	0	0	96.6
H18	30	1	1	1	0	0	0	0	0	0	96.6
H2	30	1	1	1	0	0	0	1	1	1	76.6
H10	30	1	1	1	1	1	1	1	1	0	73.8

A: Actinomiceto; B: Bacteria; H: Hongo; Nº ID: Número de identificación; Med. aisl: Medio de aislamiento; T^a (°C): Temperatura de aislamiento; RBBR: Decoloración Azul brillante de remazol R; PO: Polifenoloxidasas; TYR: Crecimiento en tirosol; LAC1: Lacasa1; LAC2: Lacasa2; OXI: Oxidasa; TI: Tirosinasa; PER: Peroxidasa; LIG: Ligninasa; %degr. Tyr: Porcentaje de degradación del tirosol.

3.4. Características de inoculantes

Los hongos seleccionados se identificaron como *Aspergillus ochraceus* (H2) (Número de Acceso NCBI KT803068.1) y *Scedosporium apiospermum* (H16) (Número de Acceso NCBI KP132631.1) y con un porcentaje de similitud del 100 % y 99 %, respectivamente.

El género *Scedosporium* comprende un grupo de hongos filamentosos ubicuos presentes en suelos, plantas en descomposición, agua contaminada, estiércol y compost (García-Peña *et al.*, 2001). *Scedosporium apiospermum*, ha sido encontrado en compost y materiales orgánicos a temperaturas mesófilas y termófilas (Ryckeboer *et al.*, 2003). Reyes-César *et al.* 2014 aislaron una serie

de cepas fúngicas de suelo contaminado con petróleo crudo, entre las que se encontraba *S. apiospermum*, y demostraron que era capaz de utilizarlo junto con varios hidrocarburos aromáticos policíclicos como fuente de carbono. Por su parte, Tigini *et al.* (2009) demostraron su interesante potencial en biorremediación de bifenilos policlorados, uno de los contaminantes más nocivos fabricados por el ser humano.

Con respecto al género *Aspergillus*, se han llevado a cabo tratamientos biológicos del alpechín, generalmente como paso previo a una digestión anaeróbica, ya que diversas cepas de dicho género son capaces de degradar fenoles y eliminar el color de una amplia variedad de aguas residuales (Kyriacou *et al.*, 2005). Saratale *et al.* 2006 demostraron que *Aspergillus ochraceus* tiene la capacidad de biodegradar varios tintes xenobióticos empleados en industrias como la textil, cosmética o farmacéutica. También se demostró que puede degradar el queroseno, hidrocarburo empleado principalmente como combustible, mediante la producción de enzimas (Saratale *et al.*, 2007). Por último pero no menos importante, *Aspergillus ochraceus* ha sido propuesto como hongo prometedor en la biorremediación del alpechín (Bevilacqua *et al.* 2017).

Para determinar algunos aspectos prácticos relativos a la aplicación en campo de los dos hongos como inoculantes para biorremediación, se analizó su rango térmico de crecimiento y su compatibilidad, ya que serían inoculados conjuntamente.

La determinación del rango térmico de crecimiento se realizó sembrando cada uno de los dos hongos en placas con PDA que fueron incubadas durante 4 días a cuatro temperaturas diferentes (25, 30, 40 y 50 °C), tras lo cual se midió el diámetro de crecimiento. Los resultados de este análisis se muestran en la (Figura 19). *A. ochraceus* H2 sólo creció a 25 y 30 °C, mostrando mayor crecimiento a esta última temperatura. Por su parte, y *S. apiospermum* H16 fue capaz de crecer entre 25 y 40 °C con máximos de crecimiento a 30 y 40 °C. Ninguno de los dos hongos creció a 50 °C.

Para determinar la compatibilidad los hongos, se sembraron conjuntamente en placa Petri con PDA y se incubaron en el rango de temperaturas establecido de acuerdo con los resultados del ensayo previamente descrito. En la Figura 20 se muestra el comportamiento de los hongos en estas condiciones. En general no se observó efecto inhibitorio de un hongo frente al otro, tal y como se refleja por el solapamiento de micelio de ambos hongos a 25 °C. Además, como cabría esperar, a 40 °C sólo creció *S. apiospermum* H16. Para completar este estudio, los dos hongos se cultivaron en medio líquido con tirosol, de forma separada y conjunta, al objeto de determinar la existencia de efecto sinérgico en la degradación de dicho polifenol. Tras el cultivo durante 7 días se cuantificó el tirosol remanente cuyo análisis reveló que ambos hongos de forma separada degradaban alrededor de un 96 % y en crecimiento conjunto

eliminaban completamente el polifenol (Figura 21). Esta cuantificación se realizó con pretratamiento de la muestra a analizar con H₂O₂, que se emplea para eliminar compuestos que interfieren en la detección del polifenol (Sánchez-Ragel et al., 2013), aunque no se obtuvieron diferencias con los resultados obtenidos en muestras sin tal pretratamiento. De acuerdo con estos resultados, los dos hongos mantienen su capacidad degradativa de polifenoles en crecimiento en consorcio e incluso realizan dicha actividad de forma sinérgica.

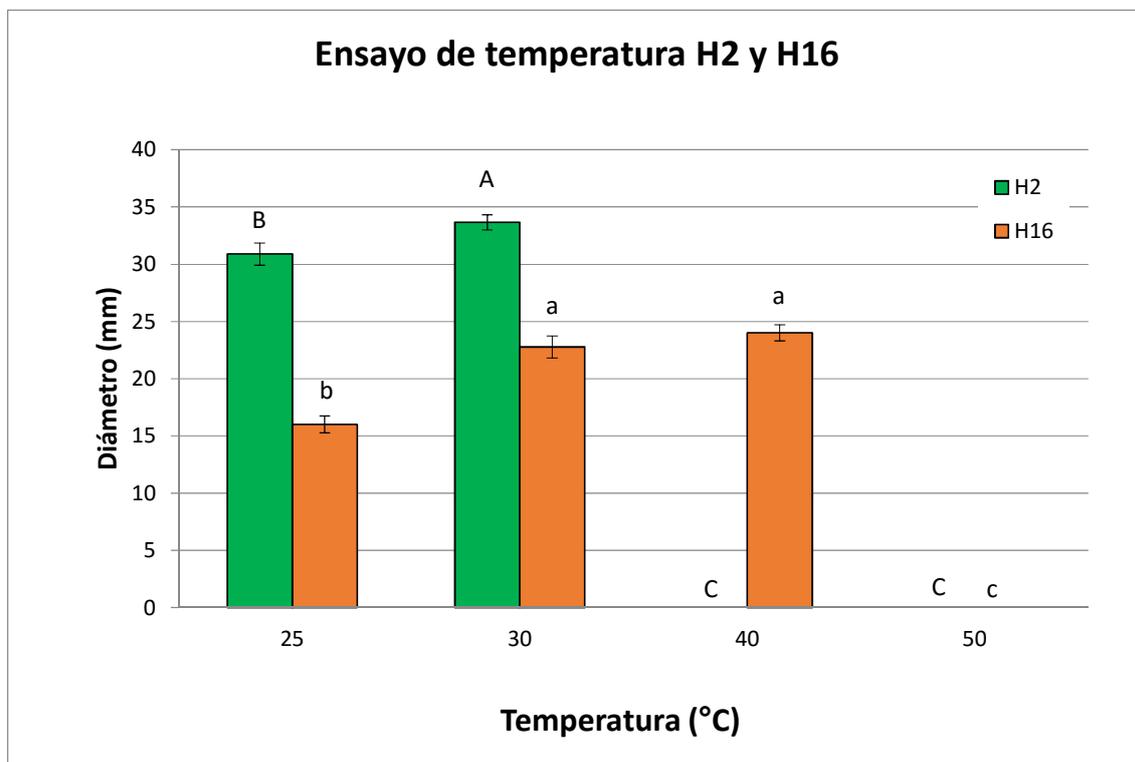


Figura 19. Efecto de la temperatura de incubación en el crecimiento de *A. ochraceus* H2 y *S. apiospermum* H16. Los resultados son la media de tres determinaciones. Las barras de error muestran la desviación estándar. Las letras indican diferencias estadísticas entre temperaturas ($p < 0,05$).

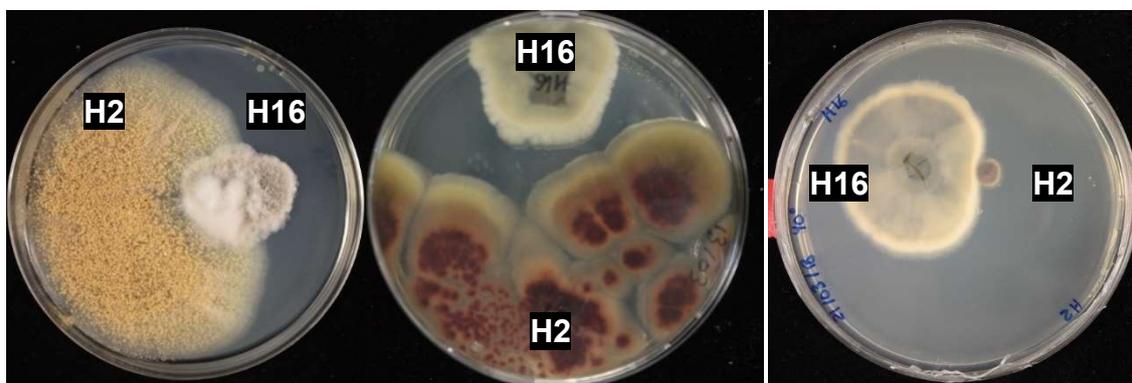


Figura 20. Enfrentamiento de *A. ochraceus* H2 y *S. apiospermum* H16 a 25 °C (izquierda), 30 °C (centro) y 40 °C (derecha) tras 10 días de cultivo.

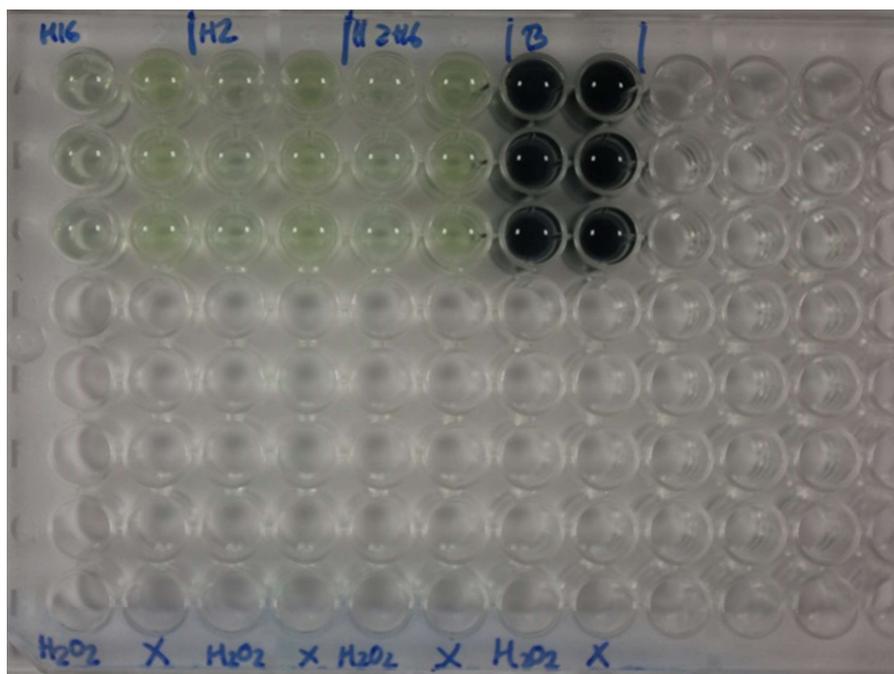


Figura 21. Degradación de tirosol por *A. ochraceus* H2 y *S. apiospermum* H16 en cultivos separados y conjuntos (H2+H16). B. Blanco. La cuantificación del tirosol se realizó con y sin pretratamiento de la muestra con H₂O₂.

3.5. Producción de inoculantes para aplicación en biorremediación

Los dos hongos seleccionados se cultivaron por separado en recipientes con gran superficie y en cultivo estático durante 7-10 días hasta producción de capa abundante de micelio que se retiró manualmente del resto de cultivo (Figura 22). La biomasa fúngica recogida se liofilizó. Se realizaron 4 tandas de producción y los lotes recogidos de cada una de ellas se mezclaron y envasaron a vacío, cada uno de los hongos por separado y en cuatro alícuotas de peso conocido. Antes del envasado al vacío se analizó la viabilidad de los hongos y se realizaron recuentos. El inóculo de *A. ochraceus* H2 tenía una carga de $7,9 \cdot 10^7$ UFC/g, en el caso de *S. apiospermum* H16 fue de $1,1 \cdot 10^8$ UFC/g. Adicionalmente, se realizaron ensayos en laboratorio para determinar las condiciones de rehidratación de la biomasa de los hongos al objeto de establecer las condiciones en las que serían preparados en campo. La biomasa de los dos hongos se rehidrató fácilmente pero formaban una suspensión, por lo que para su distribución homogénea es recomendable mantener agitación durante su aplicación.

Los inóculos envasados al vacío se transportaron refrigerados hasta el lugar de aplicación en las balsas de Mora (Toledo) y se rehidrataron in situ con agua de pozo. Los dos hongos se mezclaron a partes iguales en peso y se aplicaron mediante riego en cuatro parcelas de ensayo de 7,5 m x 7,5 m, en las que se aplicarían estrategias de biodescontaminación *in situ* mediante landfarming, fitorremediación, compostaje y vermicompostaje, respectivamente (Figura 22).



Figura 22. Cultivo en masa de *A. ochraceus* H2 (arriba izda.), biomasa envasada al vacío para transporte (arriba dcha.), dilución y aplicación del inóculo (abajo).

4. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos permitieron extraer las siguientes conclusiones

1. Los sedimentos de las balsas de acúmulo de alpechín constituyen un ambiente naturalmente enriquecido en microorganismos degradadores de polifenoles.
2. El procedimiento de rastreo mediante enriquecimiento y posterior aislamiento en medios selectivos permite una mayor recuperación de microorganismos degradadores de alpechín frente a la siembra directa en medios selectivos.
3. Los hongos *Aspergillus ochraceus* H2 y *Scedosporium apiospermum* H16 presentan una gama de actividades metabólicas y capacidades fisiológicas adecuadas para su empleo en la biodescontaminación de suelos contaminados por alpechín.
4. *Aspergillus ochraceus* H2 y *Scedosporium apiospermum* H16 presentan unas condiciones de manejo adecuadas para su producción masiva, transporte y aplicación conjunta en campo en estrategias de biorremediación *in situ*.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado a través del proyecto LIFE+REGROW (LIFE16 ENV/ES/000331) “Reclamation of olive oil waste abandoned lagoons using biorecovering strategies in a circular economy”

Agradecer la ayuda que me han aportado mis tutores Joaquín Moreno Casco y María José López, por su dedicación, consejos y sobre todo por su gran apoyo. También me gustaría dar las gracias a todas las personas del laboratorio por su infinita paciencia cuando he necesitado ayuda, y en especial a María por su generosidad a la hora de resolver mis dudas.

Una vez más, gracias a todos.

BIBLIOGRAFÍA

- Abd, E. L., Aziz, A. B. E. D., Awad, A. A. E. N., & Zaki, G. H. (2015). Reduction of olive oil mill waste water phenolic compounds and COD using *Paecilomyces variotii*. *Trends Industrial Biotechnology Research*, 1, 1-9.
- Aggelis, G., Ehaliotis, C., Nerud, F., Stoychev, I., Lyberatos, G., & Zervakis, G. (2002). Evaluation of white-rot fungi for detoxification and decolorization of effluents from the green olive debittering process. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59(2-3), 353-360.
- Allouche, N., & Sayadi, S. (2005). Synthesis of hydroxytyrosol, 2-hydroxyphenylacetic acid, and 3-hydroxyphenylacetic acid by differential conversion of tyrosol isomers using *Serratia marcescens* strain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(16), 6525-6530.
- Ayed, L., Asses, N., Chammem, N., & Hamdi, M. (2016). Improvement of green table olive processing wastewater decolorization by *Geotrichum candidum*. *Desalination and Water Treatment*, 57(37), 17322-17332.
- Ayed, L., Asses, N., Chammem, N., Othman, N. B., & Hamdi, M. (2017). Advanced oxidation process and biological treatments for table olive processing wastewaters: constraints and a novel approach to integrated recycling process: a review. *Biodegradation*, 28(2-3), 125-138.
- Bevilacqua, A., Cibelli, F., Raimondo, M. L., Carlucci, A., Lops, F., Sinigaglia, M., & Corbo, M. R. (2017). Fungal bioremediation of olive mill wastewater: using a multi-step approach to model inhibition or stimulation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(2), 461-468.
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56(11), 317-333.

- Crawford, R. L., Rosenberg, E. (2013). Bioremediation. En: Rosenberg, E., DeLong, E. F., Lory, S., Stackebrandt, E., & Thompson, F. L. (Eds.). *The Prokaryotes: Applied Bacteriology and Biotechnology*, Springer, Berlin, Alemania.
- Dermeche, S., Nadour, M., Larroche, C., Moulti-Mati, F., & Michaud, P. (2013). Olive mill wastes: biochemical characterizations and valorization strategies. *Process Biochemistry*, 48(10), 1532-1552.
- Di Giovacchino, L., Sestili, S., & Di Vincenzo, D. (2002). Influence of olive processing on virgin olive oil quality. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104(9-10), 587-601.
- FAO (2014). FAOSTAT. Base de datos estadísticos. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>
- Gamba, C., Piovanelli, C., Papini, R., Pezzarossa, B., Ceccarini, L., & Bonari, E. (2005). Soil microbial characteristics and mineral nitrogen availability as affected by olive oil waste water applied to cultivated soil. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 36(7-8), 937-950.
- García-Peña, E. I., Hernández, S., Favela-Torres, E., Auria, R., & Revah, S. (2001). Toluene biofiltration by the fungus *Scedosporium apiospermum* TB1. *Biotechnology and Bioengineering*, 76(1), 61-69.
- Hachicha, S., Cegarra, J., Sellami, F., Hachicha, R., Drira, N., Medhioub, K., & Ammar, E. (2009). Elimination of polyphenols toxicity from olive mill wastewater sludge by its co-composting with sesame bark. *Journal of Hazardous Materials*, 161(2-3), 1131-1139.
- Harms, H., Schlosser, D., & Wick, L. Y. (2011). Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. *Nature Reviews Microbiology*, 9(3), 177.
- Janshekar, H., Haltmeier, T., & Brown, C. (1982). Fungal degradation of pine and straw alkali lignins. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 14(3), 174-181.
- Jurado, M., López, M. J., Suárez-Estrella, F., Vargas-García, M. C., López-González, J. A., & Moreno, J. (2014). Exploiting composting biodiversity: study of the persistent and biotechnologically relevant microorganisms from lignocellulose-based composting. *Bioresource Technology*, 162, 283-293.
- Kavvadias, V., Doula, M. K., Komnitsas, K., & Liakopoulou, N. (2010). Disposal of olive oil mill wastes in evaporation ponds: Effects on soil properties. *Journal of Hazardous Materials*, 182(1-3), 144-155.

- Kirk, T. K., Croan, S., Tien, M., Murtagh, K. E., & Farrell, R. L. (1986). Production of multiple ligninases by *Phanerochaete chrysosporium*: effect of selected growth conditions and use of a mutant strain. *Enzyme and Microbial Technology*, 8(1), 27-32.
- Knupp, G., Rücker, G., Ramos-Cormenzana, A., Hoyos, S. G., Neugebauer, M., & Ossenkop, T. (1996). Problems of identifying phenolic compounds during the microbial degradation of olive mill wastewater. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 38(3-4), 277-282.
- Kumar, R., Kumar, A., Nagpal, R., Sharma, J., & Kumari, A. (2010). A novel and sensitive plate assay for screening of tannase-producing bacteria. *Annals of Microbiology*, 60(1), 177-179.
- Kyriacou, A., Lasaridi, K. E., Kotsou, M., Balis, C., & Pilidis, G. (2005). Combined bioremediation and advanced oxidation of green table olive processing wastewater. *Process Biochemistry*, 40(3-4), 1401-1408.
- Lamia, A., & Moktar, H. (2003). Fermentative decolorization of olive mill wastewater by *Lactobacillus plantarum*. *Process Biochemistry*, 39(1), 59-65.
- McNamara, C. J., Anastasiou, C. C., O'Flaherty, V., & Mitchell, R. (2008). Bioremediation of olive mill wastewater. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 61(2), 127-134.
- Mekki, A., Dhouib, A., & Sayadi, S. (2006). Changes in microbial and soil properties following amendment with treated and untreated olive mill wastewater. *Microbiological Research*, 161(2), 93-101.
- Niaounakis, M., & Halvadakis, C. P. (2004). Olive-mill waste management: literature review and patent survey. 960-402-123-0, Typothito-George Dardanos Publications, Atenas, Grecia.
- Niaounakis, M., & Halvadakis, C. P. (2006). Olive processing waste management: literature review and patent survey. *Waste Management Series Vol. 5*. Elsevier Ltd, Oxford, Reino Unido.
- Ntougias, S., Gaitis, F., Katsaris, P., Skoulika, S., Iliopoulos, N., & Zervakis, G. I. (2013). The effects of olives harvest period and production year on olive mill wastewater properties—Evaluation of *Pleurotus* strains as bioindicators of the effluent's toxicity. *Chemosphere*, 92(4), 399-405.
- Obied, H. K., Allen, M. S., Bedgood, D. R., Prenzler, P. D., Robards, K., & Stockmann, R. (2005). Bioactivity and analysis of biophenols recovered from olive mill waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(4), 823-837.

- Paraskeva, P., & Diamadopoulos, E. (2006). Technologies for olive mill wastewater (OMW) treatment: a review. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 81(9), 1475-1485.
- Paredes, C., Cegarra, J., Roig, A., Sanchez-Monedero, M. A., & Bernal, M. P. (1999). Characterization of olive mill wastewater (alpechín) and its sludge for agricultural purposes. *BioresourceTechnology*, 67(2), 111-115.
- Pinto, G., Pollio, A., Previtera, L., Stanzione, M., & Temussi, F. (2003). Removal of low molecular weight phenols from olive oil mill wastewater using microalgae. *Biotechnology Letters*, 25(19), 1657-1659.
- Ramos-Cormenzana, A., Juarez-Jimenez, B., & Garcia-Pareja, M. P. (1996). Antimicrobial activity of olive mill wastewaters (alpechín) and biotransformed olive oil mill wastewater. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 38(3-4), 283-290.
- Rasiravuthanahalli, K. G., Revathi, S., Rameshkumar, N., Krishnan, M., & Kayalvizhi, N. (2017). Digestion of Tannin by Bacteria *Enterobacter cloacae* from the Gut of Indian Mole Cricket (*Gryllotalpa krishnani*). *Journal of Bioprocess and Biotechnology*, 7(302), 2.
- Rayner, A. D., & Boddy, L. (1988). Fungal decomposition of wood. Its Biology and Ecology. John Wiley & Sons Ltd, Londres, Reino Unido.
- Reyes-César, A., Absalón, Á. E., Fernández, F. J., González, J. M., & Cortés-Espinosa, D. V. (2014). Biodegradation of a mixture of PAHs by non-ligninolytic fungal strains isolated from crude oil-contaminated soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(3), 999-1009.
- Roig, A., Cayuela, M. L., & Sánchez-Monedero, M. A. (2006). An overview on olive mill wastes and their valorisation methods. *Waste Management*, 26(9), 960-969.
- Ryckeboer, J., Mergaert, J., Vaes, K., Klammer, S., De Clercq, D., Coosemans, J., ... & Swings, J. (2003). A survey of bacteria and fungi occurring during composting and self-heating processes. *Annals of Microbiology*, 53(4), 349-410.
- Saadi, I., Laor, Y., Raviv, M., & Medina, S. (2007). Land spreading of olive mill wastewater: effects on soil microbial activity and potential phytotoxicity. *Chemosphere*, 66(1), 75-83.
- Sánchez-Rangel, J. C., Benavides, J., Heredia, J. B., Cisneros-Zevallos, L., & Jacobo-Velázquez, D. A. (2013). The Folin–Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Analytical Methods*, 5(21), 5990-5999.

- Saratale, G. D., Kalme, S. D., & Govindwar, S. P. (2006). Decolorisation of textile dyes by *Aspergillus ochraceus* (NCIM-1146). *Indian Journal of Biotechnology*, 5(3), 407-410.
- Saratale, G., Kalme, S., Bhosale, S., & Govindwar, S. (2007). Biodegradation of kerosene by *Aspergillus ochraceus* NCIM-1146. *Journal of basic microbiology*, 47(5), 400-405.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. En: Singleton V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R.M. (Eds.). *Methods in Enzymology* Vol. 299, pp. 152-178. Elsevier Ltd., Londres, Reino Unido.
- Souilem, S., El-Abbassi, A., Kiai, H., Hafidi, A., Sayadi, S., & Galanakis, C. M. (2017). Olive oil production sector: environmental effects and sustainability challenges. En: *Olive Mill Waste*, Cap. 1, (pp. 1-28). Elsevier Academic Press, Londres, Reino Unido.
- Sundman, V. & Näse, L. (1971). A simple plate test for direct visualization of biological lignin degradation. *Paper and Timber*, 53, 67-71.
- Tigini, V., Prigione, V., Di Toro, S., Fava, F., & Varese, G. C. (2009). Isolation and characterisation of polychlorinated biphenyl (PCB) degrading fungi from a historically contaminated soil. *Microbial Cell Factories*, 8(1), 5.
- Vlyssides, A. G., Loizides, M., & Karlis, P. K. (2004). Integrated strategic approach for reusing olive oil extraction by-products. *Journal of Cleaner Production*, 12(6), 603-611.
- Xu, J., Lu, Y., Shan, G., He, X. S., Huang, J., & Li, Q. (2018). Inoculation with compost-born thermophilic complex microbial consortium induced organic matters degradation while reduced nitrogen loss during co-composting of dairy manure and sugarcane leaves. *Waste and Biomass Valorization*, 1-11.
- Zerva, A., Zervakis, G. I., Christakopoulos, P., & Topakas, E. (2017). Degradation of olive mill wastewater by the induced extracellular ligninolytic enzymes of two wood-rot fungi. *Journal of Environmental Management*, 203, 791-798.
- Zirehpour, A., Rahimpour, A., Jahanshahi, M., & Peyravi, M. (2014). Mixed matrix membrane application for olive oil wastewater treatment: Process optimization based on Taguchi design method. *Journal of Environmental management*, 132, 113-120.