



UNIVERSIDAD  
DE ALMERÍA



TRABAJO FIN DE GRADO

# Búsqueda de agentes biorremediadores de hidrocarburos: el género *Rhodococcus*

**Autora:** Inés Castillo Rodríguez

Grado en Biotecnología

**Tutores:** José Joaquín Moreno Casco

Facultad de Ciencias Experimentales

Macarena del Mar Jurado Rodríguez

Área de Microbiología

Universidad de Almería

Departamento de Biología y Geología

Curso 2019/2020



## AGRADECIMIENTOS

“No estoy aceptando las cosas que no puedo cambiar, estoy cambiando las cosas que no puedo aceptar” – Angela Davis.

Me gustaría comenzar agradeciendo a mi profesor y tutor de 2º de bachillerato, Guillermo, su recomendación de buscar otras alternativas al Grado que yo quería hacer por aquel entonces, Biología. De haber sido de otra forma, no estaría aquí escribiendo esto, puesto que así fue como encontré la existencia del Grado en Biotecnología, algo desconocido casi por completo para mí. Comencé esta nueva etapa con bastantes dudas, las cuales se multiplicaron cuando se acercaron los primeros exámenes; me veía incapaz de poder superarlos. Sin embargo, éstos y todos los demás pasaron, y cada vez que terminaba un cuatrimestre pensaba lo mismo “tampoco fue para tanto”. Y hoy no podría estar más contenta y agradecida por haber tomado este camino, durante estos 4 años he conocido a personas maravillosas y he aprendido infinidad de cosas.

Gran parte de lo aprendido durante estos años se lo debo a Joaquín. Desde el primer momento puso todo su esfuerzo y dedicación en cada uno de nosotros y nosotras y gracias a la pasión y el entusiasmo con la que comenzaba cada clase, hizo que a mí también me fascinase el mundo de la microbiología y, durante el último curso, la biotecnología ambiental. Joaquín ha sido como un padre durante estos años, al que sentía que no podía defraudar de ninguna de las formas. Gracias de corazón por confiar en mí y recibirme siempre con los brazos abiertos y darme la oportunidad de realizar este TFG contigo.

Una de las personas a la que más admiro es a Macarena, siempre ha tenido una paciencia increíble para solucionar todas mis dudas y ha confiado en mí y en mis capacidades, mucho más de lo que lo he hecho yo. Me ha enseñado que sí que es posible hacer las cosas de otra forma y a reforzar mi ánimo, a no conformarme con lo que hay. Gracias por tus correcciones, ayuda en el laboratorio y tus enseñanzas. También agradecer a Paqui y a Juan su ayuda en el laboratorio y su brillante labor como profesores, junto con Joaquín y Macarena. Sin duda alguna, las prácticas que más me han entusiasmado han sido las realizadas con vuestro departamento, gracias a la dedicación con la que las hacíais; han sido indispensables para desarrollar la parte experimental de este TFG. Gracias también a todo el departamento de Microbiología, por estar ahí ante cualquier duda y crear un ambiente de trabajo tan acogedor.

Sin el apoyo de mis amigas y amigos, esto tampoco habría sido posible. Cada vez que me desanimaba, allí estaban para animarme y escucharme y conseguían, casi inexplicablemente, que recuperase esos ánimos perdidos.

Por último, agradecer el apoyo de mi familia que, aunque todavía no tenga muy claro qué es lo que estoy haciendo, se interesa por lo que hago y se ilusiona tanto, o incluso más que yo, con todos mis logros.



# ÍNDICE

RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	2
1. INTRODUCCIÓN .....	3
1.1. Derivados de petróleo: contaminación e impacto ambiental .....	3
1.2. Métodos de control y eliminación basados en estrategias biotecnológicas .....	5
1.3. El género <i>Rhodococcus</i> como agente con potencial biorremediador .....	9
1.4. Objetivos .....	12
2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	13
2.1. Diseño experimental .....	13
2.2. Colección de cepas del género <i>Rhodococcus</i> .....	14
2.3. Ensayos de toxicidad de los compuestos BTX .....	15
2.4. Crecimiento de microorganismos en medios líquidos adicionados con BTX .....	17
2.5. Análisis estadístico .....	19
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	20
3.1. Efecto tóxico de hidrocarburos aromáticos (BTX) sobre cepas pertenecientes al género <i>Rhodococcus</i> .....	20
3.1.1. Estudio de la toxicidad sobre medio sólido .....	20
3.1.2. Estudio de la toxicidad sobre compuestos volátiles .....	22
.....	27
3.2. Utilización de compuestos BTX como fuente de carbono y energía en medio líquido. 27	
4. CONCLUSIONES .....	33
BIBLIOGRAFÍA .....	34

## RESUMEN

Desde el origen de la industria petrolera, a principios del siglo XX, se ha venido haciendo una mala gestión de sus residuos que ha derivado en casos tan graves como el vertido de petróleo de Deepwater Horizon en el Golfo de México, considerado el más importante de la historia. Es por ello por lo que será de especial importancia encontrar una solución para biorremediar los ambientes contaminados con petróleo mientras se desarrollan alternativas más respetuosas con el medioambiente que vayan sustituyendo el uso masivo que se hace de estos compuestos contaminantes.

El objetivo de este trabajo fue buscar cepas del género *Rhodococcus* capaces de degradar algunos de los principales componentes del petróleo: benceno, tolueno y xileno, comúnmente conocidos con las siglas BTX. A partir de una colección de 16 cepas se analizó primero la toxicidad de los hidrocarburos tanto en medio sólido como sobre su condición de compuestos volátiles. Las cepas que soportaron este ambiente tóxico pasaron a la siguiente etapa en la cual se hizo un análisis cualitativo y cuantitativo de la capacidad de degradación de las distintas cepas seleccionadas en medios líquidos adicionados con BTX, para estudiar su metabolismo y cometabolismo. Se elaboraron curvas de crecimiento a partir de este experimento. Finalmente se comprobó la presencia de genes relacionados con la degradación de hidrocarburos en base a las identidades de las cepas más prometedoras.

La colección de *Rhodococcus* fue, en general, tolerante a los compuestos BTX, sobre todo al encontrarse éstos incorporados a los medios de cultivo, ya que la volatilidad del benceno sí resultó en una mayor inhibición del crecimiento microbiano. Las cepas más prometedoras para su selección como potenciales agentes biodescontaminantes de compuestos derivados del petróleo fueron 578 (*Rhodococcus pyridinivorans*) y 722 (*Rhodococcus indicum*) que no sólo soportaron la toxicidad emitida por los hidrocarburos estudiados (BTX), sino que además fueron capaces de utilizarlos como fuentes de carbono y energía.

**Palabras clave:** Biorremediación, benceno, tolueno, xileno, *Rhodococcus pyridinivorans*, *Rhodococcus indicum*.

## ABSTRACT

Since the origin of the oil industry, in the early twentieth century, the mismanagement of its waste has resulted in serious disasters as the Deepwater Horizon oil spill in the Gulf of Mexico, considered the most important in history. That is why it will be particularly important to find a solution to bioremediate oil-contaminated environments while developing more environmentally friendly alternatives that replace the massive use of these polluting compounds.

The objective of this work was to search for strains of the genus *Rhodococcus* capable of degrading some of the main components of petroleum: benzene, toluene and xylene, commonly known as BTX. From a collection of 16 strains, the toxicity of hydrocarbons was first analysed in both solid medium and volatile state. The strains that supported these toxic conditions were moved on to the next stage in which a qualitative and quantitative analysis of the degradation capacity of the different selected strains in liquid media added with BTX was made, to study their metabolism and cometabolism. Growth curves were developed from this experiment. Finally, the presence of genes related to hydrocarbon degradation was found based on the identities of the most promising strains.

The *Rhodococcus* collection was generally tolerant to BTX compounds, especially as they were incorporated into the culture media, since the volatility of benzene did result in a greater inhibition of microbial growth. The most promising strains for selection as potential biodecontaminant agents of petroleum-derived compounds were 578 (*Rhodococcus pyridinivorans*) and 722 (*Rhodococcus indicum*) which not only supported the toxicity emitted by the hydrocarbons studied (BTX), but were also able to use them as sources of carbon and energy.

**Keywords:** Bioremediation, benzene, toluene, xylene, *Rhodococcus pyridinivorans*, *Rhodococcus indicum*.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Derivados de petróleo: contaminación e impacto ambiental

El petróleo es una mezcla compleja de hidrocarburos y otros compuestos orgánicos, incluyendo algunos constituyentes organometálicos, mayoritariamente complejos de vanadio y níquel (Van Hamme *et al.*, 2003). Tras el procesado del petróleo crudo, se obtienen diferentes fracciones (gasolina, queroseno, nafta, gasóleo, fuelóleo, aceites pesados, parafinas y asfaltos, etc.) que tienen una extensa cobertura de mercado a nivel global. De hecho, en 2018, la demanda de barriles ascendía a 99,3 millones de barriles por día (Sevilla, 2019). Es indudable el impacto de este producto, tanto indirectamente, derivado de su consumo indiscriminado y debido a la mala gestión de los residuos generados a partir de él, como directamente, principalmente por vertidos y derrames. En cualquier caso, el daño que cause el petróleo dependerá del tipo de ecosistema donde sea detectado.

El principal problema asociado a la contaminación por vertidos de petróleo crudo en los ecosistemas terrestres es el enorme impacto negativo que genera en las primeras fases de la producción alimentaria. Por un lado, afecta a la germinación y el crecimiento de algunas plantas e incluso a la fertilidad, aunque esto último dependerá de la cantidad y el tipo de contaminante. Por otro lado, el petróleo varía parámetros del suelo como el contenido en minerales y en materia orgánica, la capacidad de intercambio de iones, las propiedades redox y el valor de pH. Éste también crea unas condiciones anaerobias en el suelo que derivarán en una alta acumulación de aluminio e iones de magnesio que pueden ser tóxicos para el crecimiento de las plantas y para el desarrollo y la diversidad de los microorganismos del entorno (Onwurah *et al.*, 2007).

Sin embargo, el ecosistema más vulnerable es el marino. Se estima que, aproximadamente, 3,8 miles de millones de litros de petróleo entran en los océanos cada año por acción antropogénica. Sólo el 8% se cree que deriva de fuentes naturales como la rotura de trampas petrolíferas (se trata de rocas impermeables que impiden el ascenso de los hidrocarburos menos densos) y al menos el 22% se libera debido a cargas operacionales que se realizan de forma rutinaria, el 12% entra por derrames accidentales de petroleros y el 36% por escorrentía y residuos municipales e industriales (Suchanek, 1993).

Cuando el petróleo crudo se derrama en el mar, éste forma una superficie aceitosa cuyos componentes pueden seguir diferentes vías. Algunas de estas sustancias pueden llegar a persistir durante un periodo largo de tiempo en el mar antes de ser degradadas por los microorganismos allí presentes. Su naturaleza oleosa en agua causa una disminución del oxígeno disuelto debido a la transformación de los componentes orgánicos en inorgánicos, lo que se traduce en una pérdida de biodiversidad, principalmente de anfípodos que son sumamente importantes en la cadena trófica y como bioindicadores de eutrofización (Onwurah *et al.*, 2007).

No se puede olvidar que existe una estrecha relación entre la salud ambiental y la de las personas. Algunas enfermedades son consecuencia de la contaminación por petróleo, ya sea por el consumo de agua o alimentos contaminados o por emisiones y vapores de petróleo. Los hidrocarburos del petróleo pueden afectar a la integridad genética de muchos organismos, resultando en carcinogénesis, mutagénesis y deterioro de la capacidad reproductiva, sin embargo, éstos no son los

únicos posibles efectos, destacando también la inhibición de la síntesis de proteínas, daños en la membrana plasmática, interrupción en el sistema de transporte de membrana, oxidación de lípidos y proteínas, agravamiento de afecciones respiratorias como el asma, bronquitis y envejecimiento acelerado de los pulmones, etc. (Onwurah *et al.*, 2007).

Un ejemplo de vertido de petróleo en el ecosistema marino es el que se produjo en Prince William Sound, Alaska, por el buque petrolero Exxon Valdez. El 24 de marzo de 1989 se derramaron 42 millones de litros de petróleo crudo que contaminaron al menos 1990 km de costa produciendo daños en el ecosistema cuyas consecuencias hoy en día aún se siguen estudiando (Figura 1). El petróleo permaneció después de una década en enormes cantidades de formas tóxicas que estaban suficientemente biodisponibles para inducir exposiciones biológicas crónicas, lo cual tuvo un enorme impacto sobre la población a largo plazo (Peterson *et al.*, 2003). La conclusión a la que llegaron los expertos tras estudiar el área afectada fue que las prácticas de actuación utilizadas fueron insuficientes y que se necesita el desarrollo de nuevas técnicas que permitan una descontaminación más eficaz. Podría pensarse que se han producido cambios sustanciales desde 1989 para evitar estos desastres, pero desafortunadamente no ha sido así. El 29 de mayo de este año tuvo lugar un vertido de 20.000 toneladas de combustible diésel al río Ambárnaya, en Norilsk, Rusia (Figura 2). Este vertido trae consigo consecuencias devastadoras, debido a la gran toxicidad que presenta este derivado del petróleo y, además, está afectando a una de las zonas de la reserva natural Gran ártico (Sahuquillo, 2020).



**Figura 1.** Ballena gris muerta encontrada por un pescador local en la costa de la isla de Latouche, Alaska tras el desastre del petrolero Exxon Valdez. Fotografía tomada por John Gaps III/Associated Press File (abril, 1989)



**Figura 2.** Vertido de diésel en el río Ambárnaya, en Norilsk, Rusia (mayo, 2020).

Teniendo en cuenta la complejidad de estos productos, sus residuos asociados son muy difíciles de eliminar de ambientes contaminados. Desde que en la década de 1970 comenzaron a documentarse los efectos de la contaminación del petróleo, así como sus consecuencias para la salud del planeta en general, no se ha dejado de avanzar, en primer lugar, en el control de los potenciales vertidos y, en segundo lugar, una vez fracasado ese punto relativo a las medidas de prevención, en las operaciones más adecuadas para su limpieza y, por tanto, descontaminación de ambientes contaminados. Hoy en día, éste continúa siendo un tema preocupante en el mundo entero (Onwurah *et al.*, 2007).

### **1.2. Métodos de control y eliminación basados en estrategias biotecnológicas**

La mayoría de los hidrocarburos de petróleo son biodegradables, pero algunos son recalcitrantes o tienen una biodegradabilidad media, dependiendo de su estructura química, los derivados aromáticos clorados y nitrados, por ejemplo, presentan una mayor resistencia a la biodegradación; y de su estado físico, los compuestos volátiles, por ejemplo, están menos biodisponibles que los disueltos en agua (Tyagi *et al.*, 2011). Normalmente, la biodegradabilidad de los componentes del petróleo disminuye en este orden: n-alcanos > alcanos de cadena ramificados > alcanos ramificados > n-alquilo aromáticos de bajo peso molecular > monoaromáticos > cicloalcanos > aromáticos polinucleares > asfaltenos (Van Hamme *et al.*, 2003). Esto nos permite comprender la dificultad que presentan estos compuestos para ser gestionados y la importancia de encontrar métodos eficaces para su control y eliminación.

Las técnicas tradicionalmente utilizadas para la remediación consistían en desenterrar el suelo contaminado y llevarlo a un vertedero, o tapar y contener el área contaminada. Sin embargo, estos métodos tienen inconvenientes. En el primero, existen riesgos en la excavación, manejo y transporte

del material peligroso, además de que es muy complicado y caro encontrar nuevos vertederos. El segundo, es sólo una solución provisional ya que la contaminación permanece en el sitio y requiere monitoreo y mantenimiento de las barreras de aislamiento, con todos los costes asociados y la responsabilidad que supone (Vidali, 2001).

Otras técnicas utilizadas con mejores resultados han sido la incineración a altas temperaturas y varios tipos de descomposición química como, por ejemplo, la descloración catalizada por bases o la oxidación por radiación ultravioleta (UV). Aunque han sido muy eficientes a la hora de reducir ciertos niveles de contaminantes, presentan varios inconvenientes, principalmente la complejidad tecnológica, el alto coste de su aplicación a pequeña escala y la falta de aceptación pública, especialmente debido a que la incineración puede incrementar la exposición de contaminantes a la población cercana (Vidali, 2001).

Como alternativa, han surgido una batería de métodos basados en biotecnología, por ejemplo, la biorremediación. Ésta consiste en la aplicación de sistemas biológicos para eliminar tanto contaminantes orgánicos como inorgánicos, siendo los microorganismos los organismos más ampliamente utilizados para ello (Gadd, 2010). Este método tiene un coste asumible y utiliza una baja tecnología, por lo que tiene una alta aceptación pública (Vidali, 2001).

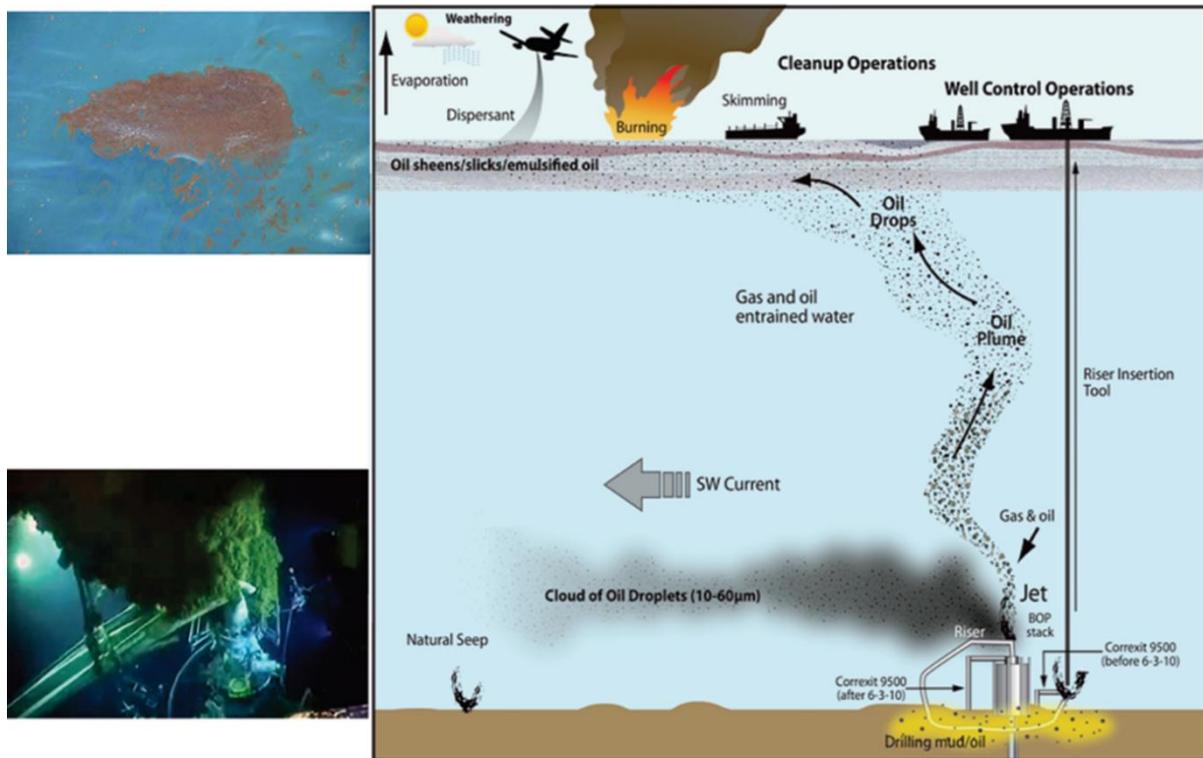
Existen dos estrategias para aplicar las técnicas de biorremediación en función del lugar en el que se lleven a cabo: *ex situ*, lo cual exige el traslado del material contaminado; e *in situ*, cuando el tratamiento se lleva a cabo en el propio ambiente contaminado. Algunos ejemplos de técnicas de biorremediación *in situ* y *ex situ* son (Boopath, 2000):

- **Laboreo de tierra o *landfarming*.** Sistema de tratamiento en fase sólida para eliminar contaminantes del suelo. Puede realizarse tanto *in situ* como *ex situ*.
- **Compostaje.** Consiste en la mezcla del suelo contaminado con enmiendas orgánicas, ya que la adecuación del proceso requiere el ajuste de distintos parámetros como la relación Carbono/Nitrógeno o la densidad aparente, con el objetivo de alcanzar una biodegradación aeróbica y temperaturas termófilas que contribuyan a la higienización y transformación de la materia prima compostada. Habitualmente se lleva a cabo *ex situ*, aunque en determinadas circunstancias puede realizarse *in situ* (Martínez-Gallardo *et al.*, 2020).
- **Biorreactores.** Biodegradación en un contenedor o reactor; pueden usarse para tratar líquidos o lodos. Se utiliza *ex situ*.
- **Bioventilación o bioventeo.** Consiste en la inyección de oxígeno en el suelo para estimular la actividad microbiana. Se utiliza *in situ*.
- **Biofiltros.** Uso de columnas de separación microbianas para tratar las emisiones de aire. Se utiliza principalmente *ex situ*.
- **Bioaugmentación.** Adición de cultivos microbianos, adecuadamente caracterizados como biodegradantes, a un sitio contaminado para favorecer su biodescontaminación. Se utiliza en sistemas *in situ* y *ex situ*.
- **Bioestimulación.** Estimulación de las poblaciones microbianas autóctonas mediante la adicción de los nutrientes necesarios. Se utiliza en sistemas *in situ* y *ex situ*.

Otro método de eliminación de contaminantes es la fitorremediación, que consiste en el uso de plantas *in situ* para eliminar contaminantes o hacerlos inofensivos de suelos o sedimentos. Se trata de una tecnología emergente que promete grandes resultados. La fitorremediación se suele utilizar en sitios en donde la contaminación es superficial (<5 m de profundidad) y los contaminantes son: moderadamente hidrofóbicos como los compuestos BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno y xileno), solventes clorados, desechos de municiones de nitrotolueno o excesos de nutrientes (nitrato, amonio o fosfato). Esta estrategia podría aplicarse en derrames petroquímicos y de combustibles, así como en áreas de almacenamiento contaminadas. Normalmente, se suele utilizar en combinación con otras técnicas de biorremediación (Salt *et al.*, 1998; Schnoor *et al.*, 1995).

La mayoría de los constituyentes del petróleo crudo son biodegradables, por lo que se ha demostrado que la biorremediación es más efectiva y barata que otras técnicas. Posiblemente, la biodegradación por poblaciones nativas de microorganismos sea la forma más eficaz de eliminar este tipo de contaminantes del ambiente (Bharathi *et al.*, 2017).

El desastre del vertido de petróleo de Deepwater Horizon en el Golfo de México (Figura 3), producido el 20 de abril de 2010, alentó a muchos investigadores a estudiar la dinámica de las comunidades bacterianas *in situ* en lugares contaminados con hidrocarburos, debido a que los estudios previos eran escasos. Los trabajos anteriores se centraban en el estudio de los microorganismos degradadores de hidrocarburos en condiciones de laboratorio o, en todo caso, en la eficiencia de la bioestimulación de la microbiota presente en dichos lugares perjudicados, añadiendo, por ejemplo, nutrientes para mejorar la biorremediación. De hecho, muchos de estos estudios se centraron en las comunidades de bacterioplancton de las profundidades marinas (Kostka *et al.*, 2011).



**Figura 3.** Representación del derrame de Deepwater Horizon y su limpieza (Atlas y Hazten, 2011).

En el estudio realizado por Atlas y Hazen (2011), destacaron la formación de una especie de nube de petróleo disperso donde la densidad bacteriana era significativamente mayor (hasta  $10^5$  células/mL) respecto a fuera de ella (aproximadamente  $10^3$  células/mL). Se detectaron 951 subfamilias de bacterias de 62 filos; las bibliotecas clonales, qPCR, fosfolípidos y arrays de genes funcionales respaldaron el hallazgo de microorganismos degradadores de petróleo. La comunidad bacteriana presente fue eminentemente psicrotrófica, ya que la temperatura rondaba los 2-5 °C (Atlas y Hazten, 2011).

En un estudio realizado por Shekhar *et al.* (2015) se aislaron de cuatro zonas contaminadas con hidrocarburos veinte microorganismos degradadores de este tipo de compuestos que se clasificaron como cepas de *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. De hecho, se encontró que una alta densidad de estas bacterias se había aclimatado a la degradación de hidrocarburos (concretamente gasolina) en el suelo. Además, estas cepas se cultivaron en medios suplementados con benceno, tolueno, xileno y ciclohexano a 3 concentraciones diferentes y en 3 intervalos diferentes de tiempo. Los resultados indicaron que todas poseían la capacidad de degradar esta variedad de hidrocarburos, pero el microorganismo más eficiente fue *Pseudomonas aeruginosa*.

Un claro ejemplo práctico del uso de microorganismos para la eliminación de petróleo de ambientes contaminados es el uso de *Alcanivorax borkumensis*. Se trata de una bacteria marina que utiliza los hidrocarburos del petróleo como fuente exclusiva de carbono y energía. Esta bacteria se encuentra en bajas concentraciones en ambientes no contaminados, pero rápidamente se convierten

en el microorganismo predominante cuando estos ambientes se contaminan con petróleo. De hecho, puede llegar a comprender entre el 80-90% de las comunidades de microorganismos degradadores de petróleo (Schneiker *et al.*, 2006).

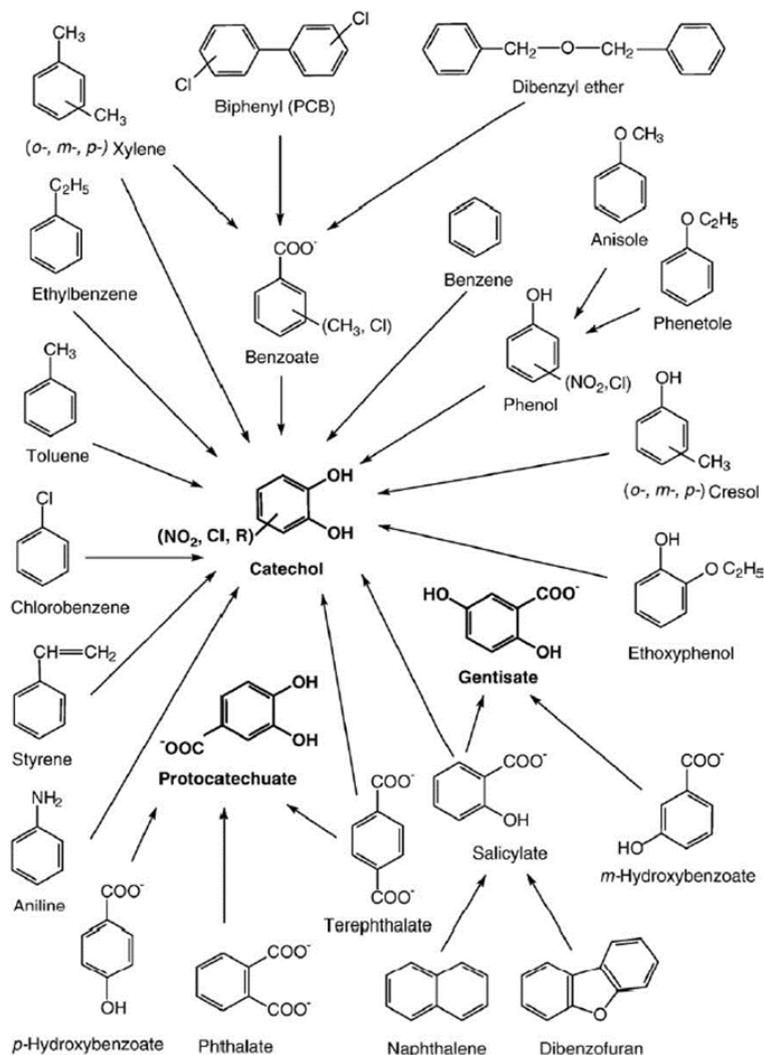
### **1.3. El género *Rhodococcus* como agente con potencial biorremediador**

El género *Rhodococcus* está formado por especies aeróbicas, no esporulantes, Gram positivas y actinobacterias nocardiformes no móviles que contienen ácidos micólicos en su pared celular, por lo que es considerado parcialmente ácido alcohol resistente. Presenta un metabolismo oxidativo y buen crecimiento en medios estándar de laboratorio, en cultivo axénico (Finnerty, 1992). Estos microorganismos han sido aislados de distintos hábitats como suelos y agua marina. Gracias a su elevado número de actividades enzimáticas, su pared celular única y, en definitiva, a que cuenta con las propiedades biotecnológicas adecuadas, *Rhodococcus* puede utilizarse en la industria química y farmacéutica, además de poder emplearse en la remediación ambiental (Martínková *et al.*, 2009).

*Rhodococcus* es capaz de degradar compuestos naturales hidrofóbicos y xenobióticos, incluyendo policlorobifenilos (PCBs) (van der Geize y Dijkhuizen, 2004). Puede catabolizar cadenas cortas y largas de alcanos, ácidos aromáticos (halogenados y nitro-sustituídos) y compuestos aromáticos heterocíclicos y policíclicos. Además, sus habilidades degradativas se extienden a compuestos de más difícil biorremediación, por ejemplo, compuestos orgánicos halogenados y compuestos heterocíclicos como el tiocarbamato o 2-mercaptobenzotiazol (MBT), por ser recalcitrantes y con una potente toxicidad microbiana (Larkin *et al.*, 2005). Es por esto por lo que este género es una opción prometedora para limpiar sitios contaminados.

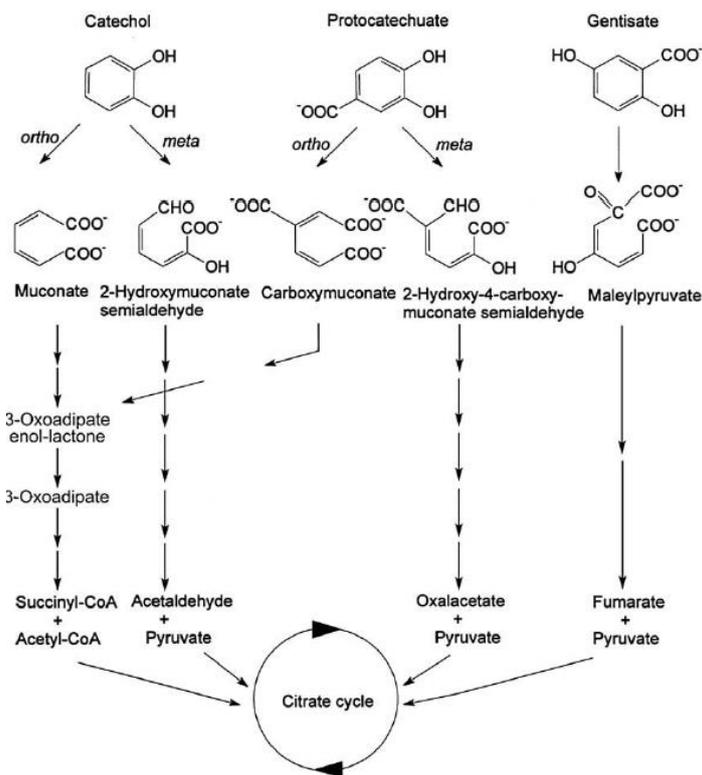
Los rodococos se caracterizan por tener muchos tipos de monooxigenasas y dioxigenasas. Esta diversidad de reacciones de oxigenación facilita la degradación de un amplio rango de contaminantes. Una de las más importantes es la enzima citocromo P450, una mono-oxigenasa hemo-dependiente que se ha demostrado que participa en la degradación de compuestos aromáticos sustituidos, tiocarbamatos, atrazina y etil ter-butyl éter (ETBE) (Larkin *et al.*, 2005).

Un amplio rango de compuestos naturales y xenobióticos son catabolizados aeróbicamente por bacterias a través de vías superiores o periféricas hasta un número limitado de intermediarios. Dentro de las rutas periféricas, los compuestos aromáticos son modificados mediante monooxigenasas y dioxigenasas resultando en la formación de tres intermediarios principales: catecol, protocatecuato y gentisato (Figura 4).



**Figura 4.** Rutas periféricas de degradación de compuestos aromáticos asociadas al género *Rhodococcus*. R=alquilo (Martínková *et al.*, 2009).

Posteriormente, estos intermediarios son degradados en las rutas centrales del catabolismo hasta proveer finalmente intermediarios del ciclo del citrato (Figura 5). La rotura del anillo del catecol y el protocatecuato está catalizada por dioxigenasas y puede producirse entre los grupos hidroxilo (escisión en *orto*) o adyacente a uno de los grupos hidroxilo (escisión en *meta*). La escisión en *orto* de ambos intermediarios converge en una molécula de 3-oxoadipato, por lo que a esta ruta se le denomina ruta del 3-oxoadipato (o  $\beta$ -ceto adipato). Las dioxigenasas del catecol, protocatecuato y genticato desempeñan los papeles principales en la degradación de compuestos aromáticos porque catalizan la reacción de escisión del anillo aromático, un paso crítico y muy difícil químicamente (Martínková *et al.*, 2009).



**Figura 5.** Rutas centrales del catabolismo de compuestos aromáticos en el género *Rhodococcus* (Martínková *et al.*, 2009).

Esta capacidad de degradar compuestos recalcitrantes también se debe a ciertos atributos fisiológicos que permiten a este género tolerarlos. Se ha visto que *Rhodococcus* puede tolerar tanto los disolventes miscibles en agua (etanol, butanol y dimetilformamida, hasta 50% v/v), como los disolventes inmiscibles en agua (dodecaeno, y tolueno, hasta 5% v/v). Las largas cadenas de los ácidos micólicos presentes en la pared celular de los rodococos, al igual que sucede en los géneros *Mycobacterium*, *Nocardia* y *Croynbacterium*, facilitan la entrada de sustancias hidrofóbicas a la célula. Este potencial para metabolizar compuestos hidrofóbicos también está relacionado con la producción de biosurfactantes, concretamente de moléculas anfipáticas que tienen la capacidad de interaccionar con compuestos hidrofóbicos e hidrofílicos a la vez y, por lo tanto, ubicarse en su interfase. La habilidad de modular la composición de ácidos grasos de la envoltura celular junto con la capacidad de formar biopelículas permite a estas células resistir y tolerar la presencia de muchos compuestos tóxicos. *Rhodococcus* puede soportar condiciones de inanición y, en muchos casos, la degradación de contaminantes no se ve reprimida por la presencia de otras fuentes de carbono más fácilmente asimilables (Larkin *et al.*, 2005; Martínková *et al.*, 2009).

En el género *Rhodococcus* parecen haberse dado una serie compleja de recombinaciones que han resultado en microorganismos con un genoma muy grande y redundante. Esto ha derivado en genes homólogos, los cuales pueden explicar por qué muchas cepas se han adaptado a catabolizar un gran número de sustratos. Además del cromosoma bacteriano, presenta plásmidos lineales que almacenan múltiples copias de genes biodegradativos. El agente degradador de PCBs más efectivo,

*Rhodococcus* sp. cepa RHA1, contiene 3 plásmidos lineales pRHL1 (1100 kb), pRHL2 (450 kb) y pRHL3 (330 kb) que comprenden genes bph de degradación de bifenilos/PCBs, muchos de los cuales codifican enzimas dioxigenasa. También hay evidencia de que ciertos genes catabólicos están corregulados en clústeres de genes separados lo que sugiere múltiples recombinaciones adaptativas (Larkin *et al.*, 2005, van der Geize y Dijkhuizen, 2004).

En un estudio realizado por van der Geize y Dijkhuizen (2004) se describen ejemplos en donde se hace uso de la ingeniería genética para optimizar la biodesulfuración por *Rhodococcus*. Este proceso es de especial interés para eliminar específicamente el azufre orgánico del carbón y de productos derivados del petróleo. La hidrodesulfuración de los combustibles fósiles resulta en la formación de compuestos cíclicos recalcitrantes como el benzotiofeno (BT), el dibenzotiofeno (DBT) y el 4,6 dimetildibenzotiofeno. Una de las cepas de *Rhodococcus* capaz de desulfurizar estos compuestos es *R. erythropolis* KA2-5-1. Esta cepa se recombinó para que contuviera 2 copias del grupo de genes *dszABC* (codifica una monooxigenasa, una desulfinaasa y otra monooxigenasa, respectivamente) y una del gen *dszD* (codifica una flavin reductasa) y mostró una capacidad de desulfuración DBT cuatro veces mayor que la cepa KA2-5-1. Otros experimentos permitieron que la bacteria recombinante desulfurizara el DBT incluso en presencia de metionina, cisteína o sulfato inorgánico (inhibidores de la biodesulfuración) gracias a la adición de la región promotora *rrn* del gen ARN ribosómico 16S para impulsar la expresión del gen *dszABCD* (Matsui *et al.* 2002).

Un ejemplo que muestra la capacidad biorremediadora de este género se observa en la cepa *Rhodococcus* sp. UW1. Este microorganismo se aisló a partir de un suelo contaminado y fue capaz de utilizar pireno como única fuente de carbono y energía. Consiguió mineralizar el 72% de este contaminante hasta CO<sub>2</sub> en 2 semanas y sólo el 3% del <sup>14</sup>C se encontró en la fase orgánica; el 25% del <sup>14</sup>C restante estaba en la fase acuosa que correspondía con metabolitos solubles en agua y residuos asociados a la célula. Se recuperó un metabolito de la degradación de pireno cuya fórmula molecular es C<sub>16</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>, lo que indica que es el resultado de la oxidación y la fisión del anillo en meta del pireno. En este proceso participan dioxigenasas (Walter *et al.*, 1991).

En definitiva, teniendo en cuenta todo lo mencionado anteriormente, parece evidente la capacidad de las actinobacterias del género *Rhodococcus* para ser empleadas como agentes biodescontaminantes, ya que están dotadas genéticamente y adaptadas fisiológicamente para ejecutar la biorremediación de materiales complejos de diversa índole.

#### **1.4. Objetivos**

La historia reciente de los desastres naturales en los que se han visto involucradas las industrias petrolíferas, así como la generación de residuos derivados del petróleo en otras actividades comerciales, no siempre con las mejores garantías de ser gestionados y minimizados, han puesto en el punto de mira las técnicas tradicionalmente empleadas para contener y eliminar a este tipo de contaminantes. En este contexto, surge la necesidad de buscar alternativas sostenibles ambientalmente y que no supongan un coste desorbitado para que su aplicación sea real y no se quede en un mero experimento de laboratorio. En este sentido, las herramientas biotecnológicas tienen la

clave. Por ello, el objetivo general de este TFG consistió en la caracterización de cepas del género *Rhodococcus* aisladas de un proceso de compostaje de restos lignocelulósicos, para comprobar su potencial biotecnológico en tareas de biorremediación de hidrocarburos aromáticos (benceno, tolueno y xileno).

Para conseguir este objetivo principal, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Comprobar la posible toxicidad de los compuestos denominado BTX (Benceno, Tolueno y Xileno) sobre las cepas ensayar.
2. Analizar cualitativamente la capacidad de degradación de la colección de cepas.
3. Analizar cuantitativamente la capacidad de degradación de la colección de cepas.
4. Comprobar la presencia de genes relacionados con la degradación de hidrocarburos.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

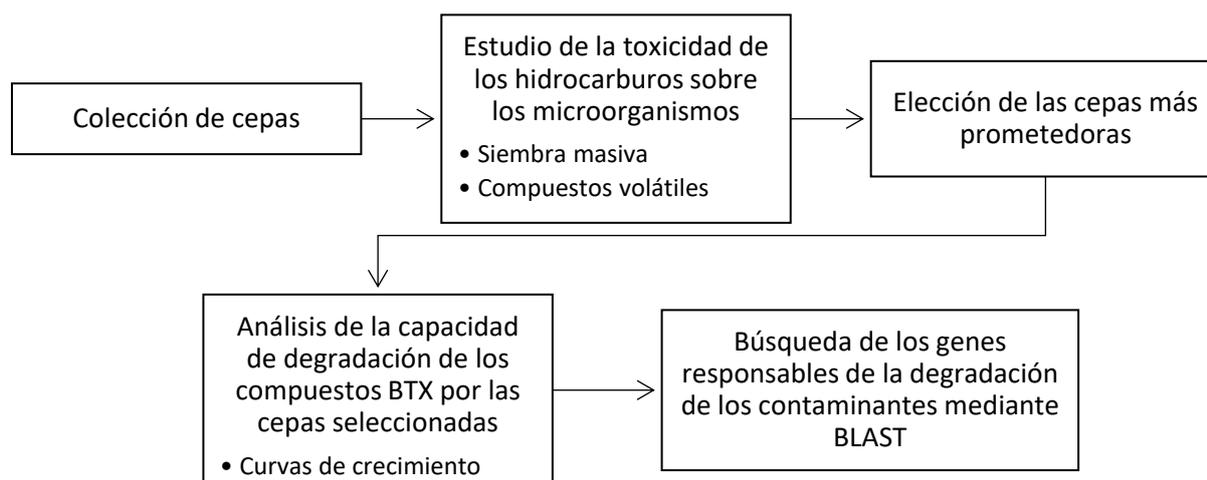
### 2.1. Diseño experimental

Para poder alcanzar los objetivos propuestos, se desarrolló un diseño experimental que constó de las siguientes etapas (Figura 6):

**Experimento I.** Estudio de la posible toxicidad de los hidrocarburos sobre las cepas en cultivo puro. Para ello se llevaron a cabo dos tipos de ensayos. El primero consistente en una siembra masiva de las distintas cepas con ayuda de un hisopo en placas de APHA adicionadas con los compuestos Benceno (B), Tolueno (T) y Xileno (X). En el segundo, se sembraron los microorganismos en aislamiento sobre placa de APHA y se colocaron en recipientes cerrados junto el compuesto a ensayar, para el estudio de toxicidad en forma volátil.

**Experimento II.** Análisis cualitativo y cuantitativo de la capacidad de degradación de la colección de cepas. Las cepas que mostraron poca o ninguna toxicidad a los hidrocarburos aromáticos a ensayar se pasaron a la siguiente fase. Para ello, con cada microorganismo se realizaron curvas de crecimiento en medios líquidos con cada compuesto (B, T y X), para el estudio del metabolismo y cometabolismo de las mismas.

**Experimento III.** Comprobación de la presencia de genes relacionados con la degradación de hidrocarburos utilizando la herramienta bioinformática BLAST del NCBI y las identidades de las cepas.



**Figura 6.** Esquema general del diseño experimental

## 2.2. Colección de cepas del género *Rhodococcus*

Las 16 cepas del género *Rhodococcus* utilizadas, previamente aisladas de un proceso de compostaje de restos lignocelulósicos, forman parte de una colección de trabajo del grupo de investigación BIO-175 de la Universidad de Almería y fueron las siguientes:

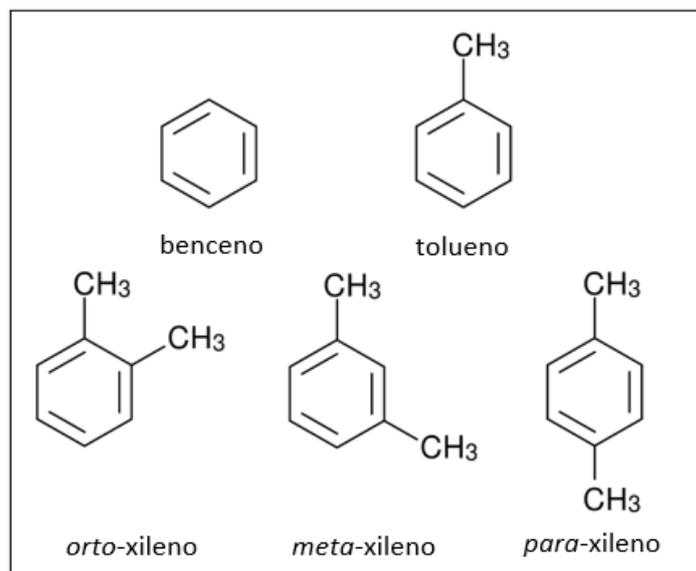
**Tabla 1.** Colección de cepas estudiadas, pertenecientes al género *Rhodococcus*.

	Código	Identidad	% Identidad (BLAST)	Número de Acceso (BLAST)
1	410	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	99	AB562467.1
2	487	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	99	JQ040005.1
3	494	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	99	AB562467.1
4	517	<i>Rhodococcus phenolicus</i>	99	AB562489.1
5	578	<i>Rhodococcus pyridinivorans</i>	98	JQ229777.1
6	656	<i>Rhodococcus ruber</i>	99	JX979148.1
7	661	<i>Rhodococcus phenolicus</i>	99	AB562489.1
8	671	<i>Rhodococcus coprophilus</i>	98	KF410348.1
9	702	<i>Rhodococcus indicum</i>	99	JQ889713.1
10	722	<i>Rhodococcus indicum</i>	99	JQ889713.1
11	801	<i>Rhodococcus indicum</i>	99	JQ889713.1
12	1031	<i>Rhodococcus phenolicus</i>	98	AB562489.1
13	2535	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	98	AB562467.1
14	2576	<i>Rhodococcus pyridinivorans</i>	99	KF953541.1
15	2724	<i>Rhodococcus pyridinivorans</i>	99	KF975435.1
16	2794	<i>Rhodococcus gordoniae</i>	98	EU741104.1

### 2.3. Ensayos de toxicidad de los compuestos BTX

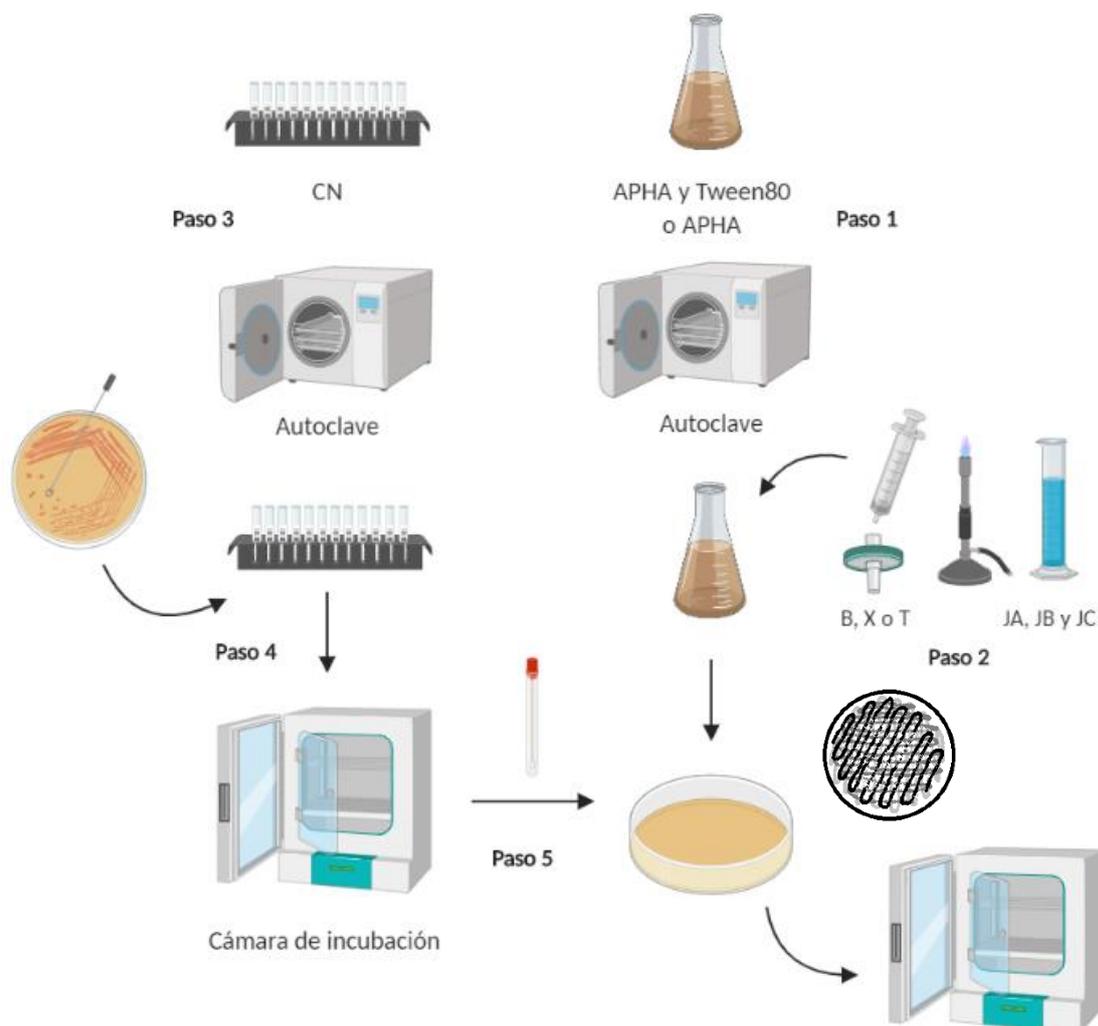
Durante el periodo de tiempo en el que se llevaron a cabo los experimentos, la colección de cepas se conservó en cámara fría en tubos de agar inclinado o *agar slant* con el medio general APHA (Panreac). En todos los casos, se utilizaron las colonias aisladas provenientes de un aislamiento en placa de Petri de las cepas como preinóculo.

Para realizar el ensayo inicial, primero se prepararon los medios selectivos. Para ello, en un matraz de Erlenmeyer de un litro se vertieron 990 mL de APHA y 5 mL de Tween 80 (Panreac), el cual se utilizó para que el hidrocarburo se dispersara de manera homogénea en el medio. También se preparó 1 L de APHA para utilizarlo como control. Posteriormente, el contenido se esterilizó en autoclave mediante un programa de 20 minutos a 121 °C (Paso 1, Figura 8), en todos los casos en los que se utilizó el autoclave se emplearon estas condiciones. Una vez enfriado el medio lo suficiente, se procedió a añadir 5 mL de benceno (Merck), xileno (RPL-UCB, Bélgica) o tolueno (Merck) (Figura 7) con ayuda de un filtro estéril para materiales orgánicos de nitrato de celulosa de 0,22 µm de poro (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Alemania) y una jeringuilla (Paso 2, Figura 8). Este es el método por el que se incorporaron los compuestos BTX en todos los ensayos y siempre en condiciones de asepsia, en el entorno de la llama, pero teniendo cuidado de no acercarlos demasiado porque son inflamables. Los compuestos BTX, al ser compuestos volátiles y tóxicos, tuvieron que extraerse de su frasco en una campana de extracción de gases. Es importante comprender que no se pueden incorporar los compuestos BTX antes de autoclavar el material porque son compuestos volátiles. Finalmente, el medio se vertió en placas de Petri y se dejó solidificar.



**Figura 7.** Estructura de los compuestos BTX.

Por otro lado, se preparó caldo nutritivo (CN) (Panreac) en tubos cortos de 5 mL, los cuales se colocaron en una gradilla, perfectamente cerrados con tapón de algodón hidrófobo, y se autoclavaron (Paso 3, Figura 8). Enfriados los tubos, se inocularon cada uno con una cepa distinta de la colección y se mantuvieron en incubación durante 72 h a 30 °C (Paso 4, Figura 8). La razón para dicho tiempo de incubación, más largo que en el caso de bacterias, es porque los *Rhodococcus* son actinomicetos (o actinobacterias) y estos tardan más en crecer. Para realizar la siembra masiva sobre la superficie del medio en placa, se humedeció el hisopo en el caldo nutritivo (CN) sembrado con el preinóculo y se hicieron estrías muy juntas sobre la placa. La finalidad de este tipo de siembra es que toda la superficie de la placa quede cubierta por el microorganismo, por lo que las estrías, además de realizarse muy juntas, se hicieron en tres direcciones (horizontal, vertical y transversal) (Paso 5, Figura 8). Para cada cepa se sembraron 4 placas: APHA (control), APHA + benceno, APHA + tolueno y APHA + xileno. Finalmente, las placas se mantuvieron en incubación durante 72 h a 30 °C. La lectura de las placas se hizo asignando un número del 0 al 2 según el crecimiento: crecimiento igual o superior que el control (2), crecimiento menor que en placas control (1) y ausencia de crecimiento (0).



**Figura 8.** Esquema del ensayo de toxicidad: siembra masiva

Para realizar el segundo ensayo, se llevaron a cabo siembras en estrías en una misma placa de Petri con APHA 2 cepas distintas, cada una en una mitad de la placa y realizando dos repeticiones de cada cepa (Paso 1, Figura 9). A su vez, con este diseño se hicieron dos réplicas en dos placas de APHA distintas, una se utilizó como control, manteniéndose fuera del ambiente tóxico, y la otro se introdujo en un recipiente estéril para ensayos de compuestos volátiles junto con 10 mL del compuesto a ensayar (B, X o T) en un vaso de precipitado (Paso 2, Figura 9). Ambos conjuntos de placas se mantuvieron en incubación durante 72 h a 30 °C (Paso 3, Figura 9). Igual que en el ensayo anterior, la lectura se hizo asignando un número del 0 al 2 según el crecimiento.



**Figura 9.** Esquema del ensayo de toxicidad: compuestos volátiles.

#### 2.4. Crecimiento de microorganismos en medios líquidos adicionados con BTX

Para el ensayo de las curvas de crecimiento en medios líquidos selectivos primero se prepararon dos frascos ISO de 250 mL en los que se añadieron 1,25 mL de Tween 80, y 172,5 mL de agua destilada. A uno de ellos, además, se le incorporó 2,5 g de glucosa. Por otro lado, se prepararon 200 mL de caldo nutritivo (CN) el cual sirvió como control. Una vez ambos frascos ISO estuvieron listos, al igual que el matraz con el caldo nutritivo, se procedió a su autoclavado (Paso 1, Figura 10). Cuando se enfriaron, se procedió a incorporar 1,25 mL del hidrocarburo correspondiente (B, T o X) con ayuda de un filtro y una jeringuilla y 25 mL de cada una de las sales de Jankshekar (JA, JB y JC) (Janshekar *et al.*, 1982) (Tabla 2), todo en condiciones de esterilidad. Las sales se incorporaron en el frasco ISO con una probeta de 25 mL previamente esterilizada en autoclave (Paso 2, Figura 10).

**Tabla 2.** Preparación de los medios de cultivo para el análisis cuantitativo y cualitativo de la capacidad de degradación de los compuestos BTX por las bacterias de la colección.

<b>Componentes</b>	<b>Cantidad</b>
Compuesto a ensayar (BTX)	1,25 mL
Tween 80	1,25 mL
Glucosa	2,5 g
Sales de Janshekar (JA, JB, JC)	25 mL de cada una
Agua destilada	172,5 mL

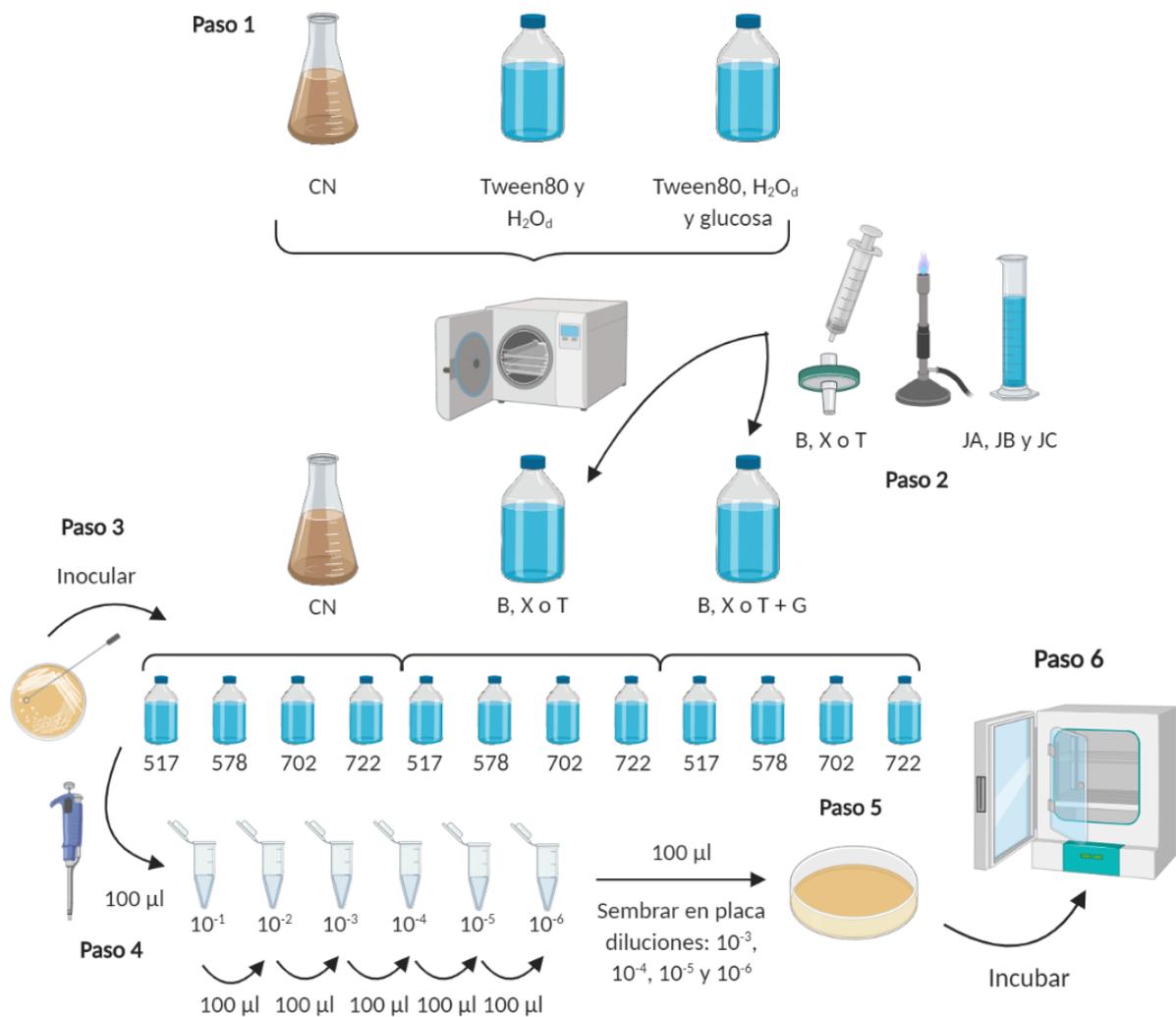
A la vez que se prepararon los medios líquidos, se esterizaron 12 frascos ISO de 100 mL (3 para cada bacteria) y se prepararon placas de Petri con medio sólido general (APHA). También se preparó solución salina estéril (NaCl al 0,9% p/v) en tubos eppendorfs de 1,5 mL, para poder realizar las diluciones decimales seriadas.

Finalmente, se obtuvieron tres medios líquidos distintos: caldo nutritivo (CN), medio sólo con el hidrocarburo (B, T o X) y medio con el hidrocarburo más la glucosa (B, T o X + G). Se vertieron 25 mL de cada medio en los frascos ISO de 100 mL esterilizados anteriormente para tener 4 réplicas por medio, uno para cada una de las bacterias a ensayar.

Cada ensayo de metabolismo y cometabolismo tuvo una duración de 5 días. El primer día se llevó a cabo la inoculación de los frascos ISO con las cepas (Paso 3, Figura 10) y las diluciones decimales seriadas para conocer el número de bacterias viables con las que se comenzó el experimento (Paso 4, Figura 10). Los tubos eppendorf se llenaron previamente con 0,9 mL de la solución salina estéril (NaCl al 0,9% p/v) y con ayuda de una micropipeta se añadió en uno de ellos 0,1 mL de uno de los frascos ISO para obtener la primera dilución ( $10^{-1}$ ) y así sucesivamente, tomando volumen del anterior al siguiente, para obtener diluciones hasta  $10^{-6}$ . De la dilución  $10^{-3}$  hasta  $10^{-6}$  con ayuda de bolitas de vidrio estériles se sembraron alícuotas de 0,1 mL en placas de Petri con medio APHA (Paso 5, Figura 10). Finalmente, se guardaron las placas durante 72 h a 30 °C y los 12 frascos ISO se mantuvieron en agitación a 30 °C hasta el día siguiente (Paso 6, Figura 10). Esto se realizó durante 5 días consecutivos.

Una vez crecidas las colonias, se procedió a su recuento y los resultados se expresaron en unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL), según la siguiente fórmula:

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



**Figura 10.** Esquema del diseño experimental para determinar la capacidad de degradación de los compuestos BTX por las 4 cepas seleccionadas de la colección.

## 2.5. Análisis estadístico

Todos los datos y los resultados fueron procesados y obtenidos mediante el programa Microsoft Office Excel 2010 para Windows. También se hizo uso del programa Statgraphics Centurion 18 para realizar un Análisis Factorial de Varianza (ANOVA) y comprobar las diferencias significativas entre las medias mediante el Test de Mínima Diferencia de Fisher (LSD), utilizando un intervalo de confianza del 95% ( $p < 0,05$ ). Asimismo, se usó dicho programa para el graficado de un análisis de factores y otro de conglomerados a partir de los parámetros estudiados en el apartado 3.1., y un análisis de componentes principales con los parámetros relativos al apartado 3.2.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Efecto tóxico de hidrocarburos aromáticos (BTX) sobre cepas pertenecientes al género *Rhodococcus*

Antes de realizar los ensayos pertinentes para comprobar la capacidad de las cepas de la colección para degradar alguno (sino todos) los compuestos BTX, fue necesario estudiar la posible toxicidad de dichos compuestos sobre las actinobacterias. Si alguno de estos hidrocarburos resulta tóxico para las bacterias, será prácticamente imposible que tengan la capacidad de utilizarlos como fuentes de carbono y energía. Por lo tanto, lo primero que se realizó fue un estudio de toxicidad, el cual se evaluó de dos formas distintas, la primera mediante la adición de estos compuestos en un medio sólido general (APHA) y la segunda, sometiendo a las diferentes cepas a un ambiente contaminado con estas sustancias. En todos los casos se estudió el comportamiento de los microorganismos respecto a cada compuesto de manera independiente, sin mezclarlos, con el objetivo de caracterizar las cepas en función de cada contaminante individualmente. A continuación, se muestran los resultados obtenidos a partir de estos experimentos.

##### 3.1.1. Estudio de la toxicidad sobre medio sólido

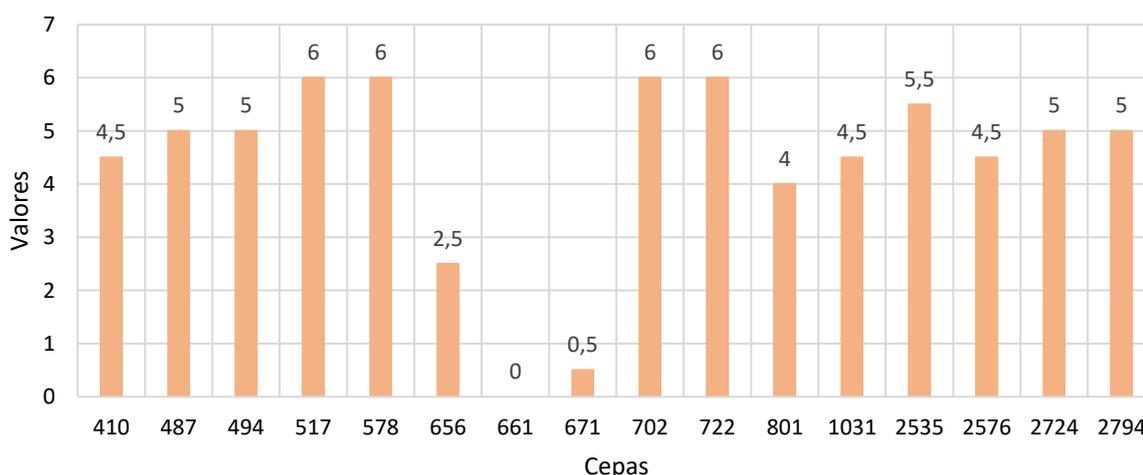
Para cada cepa, de un total de 16, se obtuvieron 4 resultados: uno para APHA, otro para APHA + Tolueno, otro para APHA + Xileno y finalmente otro para APHA + Benceno. Estos resultados se recogen en la Tabla 3. Se asignaron números del 0 al 2 para cuantificar el crecimiento de las cepas: 2 si el crecimiento es igual o mayor que el control, 1 si éste es menor que el control y 0 si hay ausencia de crecimiento. También se hizo uso de valores intermedios, 1,5 (el crecimiento era considerable, pero algo menor que en APHA) y 0,5 (había crecimiento, pero era muy escaso), para designar algunos de los resultados.

**Tabla 3.** Datos obtenidos del análisis de la toxicidad de los compuestos BTX en medios sólidos sobre las cepas de *Rhodococcus*.

<b>Id General</b>	<b>APHA</b>	<b>A + T</b>	<b>A + X</b>	<b>A + B</b>
<b>410</b>	2	1	1,5	2
<b>487</b>	2	2	2	1
<b>494</b>	2	1	2	2
<b>517</b>	2	2	2	2
<b>578</b>	2	2	2	2
<b>656</b>	2	1	0,5	1
<b>661</b>	2	0	0	0
<b>671</b>	2	0	0	0,5
<b>702</b>	2	2	2	2
<b>722</b>	2	2	2	2

<b>801</b>	2	1	1	2
<b>1031</b>	2	1	1,5	2
<b>2535</b>	2	1,5	2	2
<b>2576</b>	2	1,5	1	2
<b>2724</b>	2	1	2	2
<b>2794</b>	2	2	1	2

Para poder visualizar más claramente las diferencias entre los datos obtenidos, éstos se representaron mediante una gráfica de barras (Figura 11) en la que se representó la suma de todos los valores, excepto el obtenido en la placa control (APHA), para cada cepa. Por lo tanto, aquellas cepas que crecieron igual que en el control en los tres escenarios estudiados presentaron como máximo un valor de 6, mientras que aquellas que no consiguieron crecer en ninguno de los medios adicionados con los compuestos tóxicos presentaron valores cercanos a 0.



**Figura 11.** Gráfica de barras en la que se representan los valores de crecimiento de cada cepa en medio sólido adicionado con los compuestos BTX.

De las 16 cepas, 4 pudieron crecer en las 3 situaciones con el mismo vigor que en las placas control, éstas fueron las cepas 517, 578, 702 y 722. Sólo una fue incapaz de crecer en todos los medios adicionados con los distintos hidrocarburos (661). En general, el resto de cepas de la colección mostraron resistencia a la toxicidad emitida por los hidrocarburos, con valores que rondaron entre el 5,5 y el 4. De hecho, además de la cepa 661 que no pudo crecer en ninguna condición, sólo dos cepas mostraron valores que se desviaron de esta tendencia, es el caso de la cepa 656, con un valor de crecimiento de 2,5, y la 671, que sólo creció en el medio adicionado con benceno y de un modo bastante pobre, por lo que se le asignó un valor de 0,5.

En general, podría decirse que el crecimiento de la mayoría de las cepas fue aceptable en todos los medios probados, con un promedio de 4,375. Al comparar las medias de los 3 ensayos se pudo

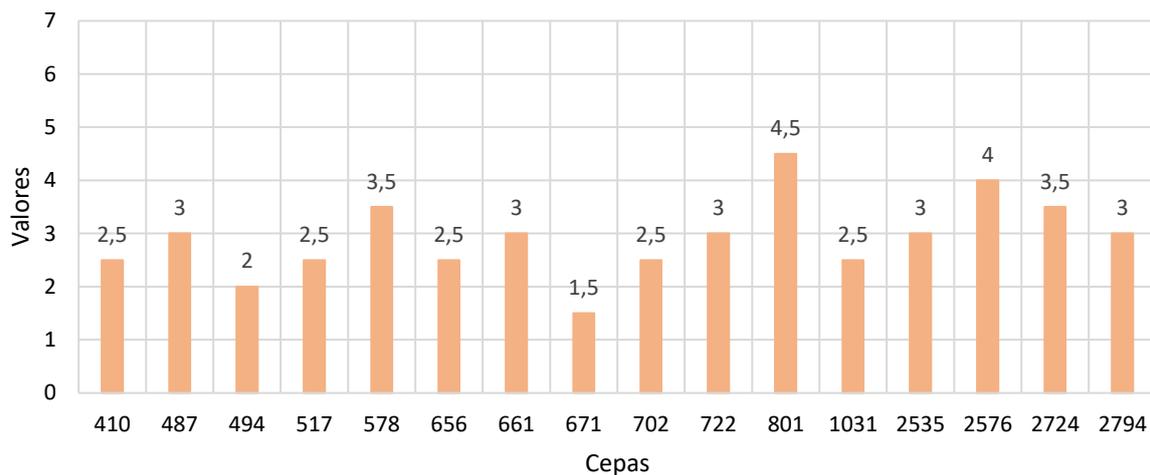
observar que todas fueron muy parecidas, de menor a mayor: APHA + Tolueno (1,313), APHA + Xileno (1,406) y APHA + Benceno (1,656). Mediante el Análisis Factorial de Varianza (ANOVA), se comprobó que, efectivamente, no existieron diferencias estadísticamente significativas entre las medias de las 3 variables con un nivel del 5% de significación, puesto que el valor-P (0,3543) de la razón-F (1,06) fue mayor que 0,05. En definitiva, las cepas de *Rhodococcus* estudiadas presentaron una tolerancia similar antes la toxicidad de los tres compuestos (B, T y X).

### 3.1.2. Estudio de la toxicidad sobre compuestos volátiles

Para estudiar la toxicidad que presentan estos hidrocarburos aromáticos sobre la colección de cepas de *Rhodococcus* como compuestos volátiles se llevó a cabo el mismo análisis cualitativo que en el apartado 3.1.1. Se asignaron valores de 0 a 2 según el crecimiento de cada cepa con respecto al control, placas de Petri crecidas en APHA sin ambiente tóxico (Tabla 4, Figura 12).

**Tabla 4.** Datos obtenidos del análisis de toxicidad de los compuestos BTX sobre las cepas de *Rhodococcus* en compuestos volátiles

ID	APHA	A + T	A + X	A + B
410	2	0,5	2	0
487	2	1	1,5	0,5
494	2	1	1	0
517	2	1	1	0,5
578	2	1	2	0,5
656	2	1	1,5	0
661	2	1,5	1	0,5
671	2	1	0,5	0
702	2	1	1	0,5
722	2	1	1,5	0,5
801	2	2	2	0,5
1031	2	1	1,5	0
2535	2	1,5	1,5	0
2576	2	2	2	0
2724	2	2	1,5	0
2794	2	0,5	2	0,5



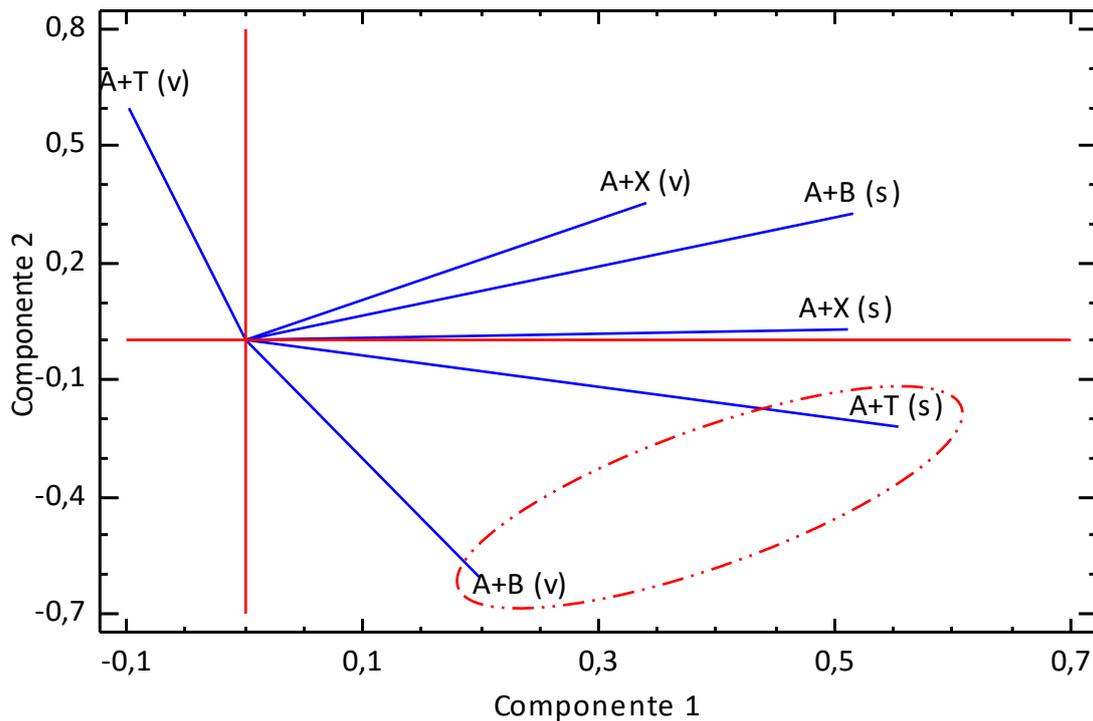
**Figura 12.** Gráfica de barras en la que se representan los valores de crecimiento de cada cepa cuando están sometidas a un ambiente tóxico debido a la presencia de los compuestos BTX.

En comparación con los datos obtenidos en los ensayos de toxicidad en medio sólido, en los ensayos de volátiles el crecimiento fue considerablemente menor, pasando de un promedio de 4,375 a uno de 2,906. El valor mínimo de crecimiento obtenido fue 1,5 para la cepa 671 y el máximo fue de 4,5 para la cepa 801. La mayoría de los valores de crecimiento quedaron comprendidos entre 3 y 2,5, excepto la cepa 2576, que alcanzó un valor de 4, las cepas 578 y 2724, ambas con un valor de 3,5, y la cepa 494, con un valor sumatorio de crecimiento de 2.

Al comparar el promedio de crecimiento entre los 3 ensayos se observaron diferencias significativas, ya que en el ambiente tóxico con Benceno el promedio de crecimiento fue mucho menor (0,25) que en el ambiente tóxico con Tolueno (1,188) y con Xileno (1,469). Mediante ANOVA se pudo corroborar este hecho, ya que se observó que al comparar las 3 variables el valor-P fue menor de 0,05. De hecho, al terminar el experimento, las placas de Petri habían sido degradadas por el benceno adquiriendo el material plástico una coloración blanca, quedando el vaso de precipitado que contenía el benceno completamente vacío, debido a la total volatilización de éste, algo que no había ocurrido ni con el Tolueno ni con el Xileno. Posiblemente, la cantidad de Benceno volátil fue demasiado alta para que cualquiera de las cepas de la colección pudiese tolerarlo adecuadamente.

A continuación, se muestra un análisis de componentes principales elaborado teniendo en cuenta tanto los valores de tolerancia a la toxicidad emitida por los compuestos BTX estando incorporados en el medio sobre el que se hicieron crecer las actinobacterias como en su forma volátil (Figura 13).

Gráfica de Pesos del Componente



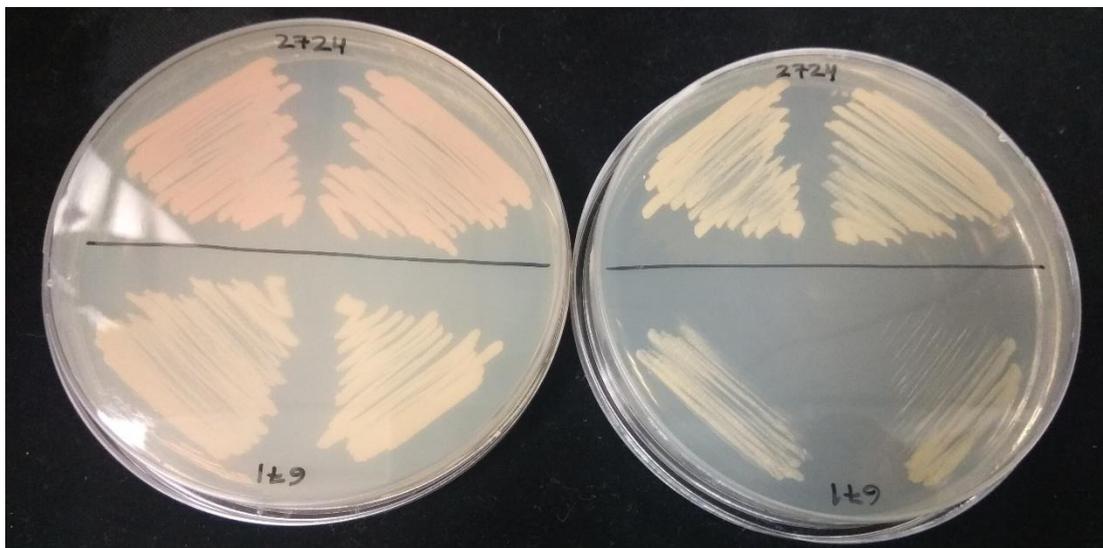
**Figura 13.** Gráfica de pesos del componente, elaborada a partir del Análisis de Componentes Principales a partir de las 6 variables de toxicidad estudiadas para los compuestos BTX, teniendo en cuenta todas las cepas de la colección de *Rhodococcus*. Abreviaturas: A+T (APHA + Tolueno), A+B (APHA + Benceno), A+X (APHA + Xileno); s (medio sólido con compuesto incorporado) y v (ensayo de volátiles).

En la Figura 13 se corrobora lo observado anteriormente, los ensayos de toxicidad en ambiente (volátiles) permitieron una clasificación muy diferente de las cepas de la colección, al contrario que los medios sólidos empleados que influyeron, en los tres casos (A+T, A+B y A+X), de un modo similar sobre las distintas cepas. Aunque, cabe destacar el mayor carácter tóxico del tolueno en este caso. Respecto al ensayo de compuestos en su forma volátil, se pudo comprobar la actuación diferenciada del benceno, mucho más tóxico en estas circunstancias, y del tolueno, todo lo contrario, mostrando una menor volatilidad que para el resto de hidrocarburos ensayados y, por tanto, resultando menos limitante para el crecimiento de las actinobacterias.

Varios contaminantes ambientales, como el tolueno, al ser altamente hidrofóbicos, son tóxicos para los microorganismos al acumularse en las membranas celulares. Cuando esto sucede, se altera la integridad de la membrana y, por consiguiente, su función como barrera, matriz de enzimas y transductor de energía. Esta inactivación de las células puede llegar a observarse incluso en microorganismos capaces de biodegradar estos disolventes orgánicos (Isken y de Bont, 1998). Estos estudios demuestran tanto la excepcionalidad que tiene el género *Rhodococcus*, junto con otros como *Pseudomonas*, de tolerar estos compuestos como de que, aunque sean capaces de degradar estos contaminantes, pueden llegar a resultarles tóxicos.

En bibliografía se han descrito diferentes mecanismos por los cuales *Rhodococcus* es capaz de tolerar la presencia de hidrocarburos. Así, por ejemplo, en un estudio llevado a cabo por Aizawa *et al.* (2005) se aisló una cepa de *Rhodococcus* que podía tolerar y degradar eficientemente varias concentraciones de benceno gracias a la producción de un polisacárido extracelular. Esto se pudo comprobar comparando la tolerancia al benceno de esta cepa con su mutante que no producía dicho exopolisacárido.

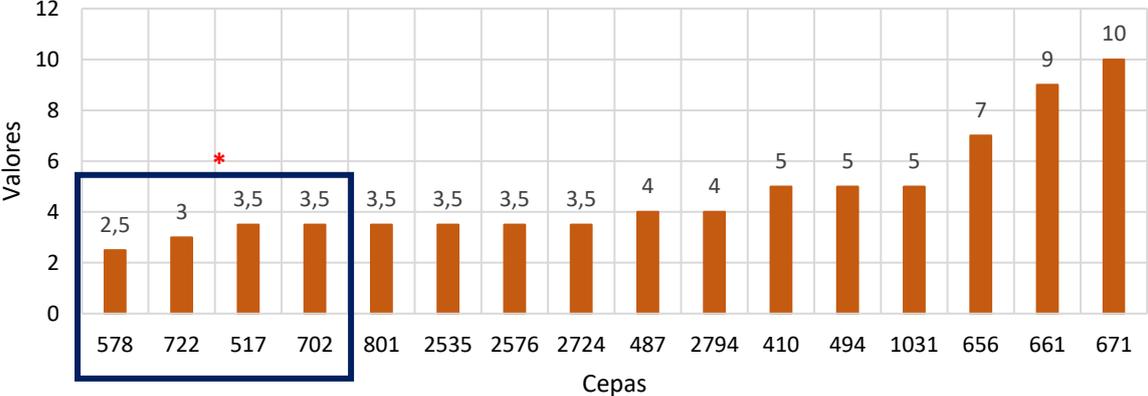
Una de las cosas más llamativas que se observó en el experimento de los compuestos volátiles llevado a cabo en este trabajo, fue la pérdida de la pigmentación roja/anaranjada característica de algunas cepas de *Rhodococcus* ("coco de color rojo"). Cuando se somete a estos microorganismos a condiciones de estrés debido a un ambiente tóxico, las colonias se vuelven blancas (Figura 14). Esto ocurrió tanto en los ensayos de Tolueno y Xileno (en Benceno no se pudo comprobar debido al poco crecimiento que hubo) en las cepas 487, 494, 578, 656, 702 (sólo en xileno), 801, 2535, 2576 y 2724. Esto no sucedió ni en los ensayos de toxicidad en medio sólido ni en el crecimiento de las bacterias en medio líquido para obtener las curvas de crecimiento. Esto podría deberse a que la exposición a los compuestos volátiles supone una situación estresante para la bacteria y se inhibe la ruta de biosíntesis de estos carotenoides. Este cambio de color ha sido descrito previamente en la cepa *R. erythropolis* tras ser sometida a solventes inmiscibles en agua, pasado de un morfotipo típicamente rosa a una coloración de las colonias blancas/amarilla (de Carvalho *et al.*, 2004).



**Figura 14.** Ensayo de compuestos volátiles. A la izquierda se observa el crecimiento de la cepa 2724 (arriba) y la cepa 671 (abajo) en APHA (control) y a la derecha el crecimiento de dichas cepas en un ambiente tóxico con xileno. También se observa la pérdida de pigmentación en ambas cepas.

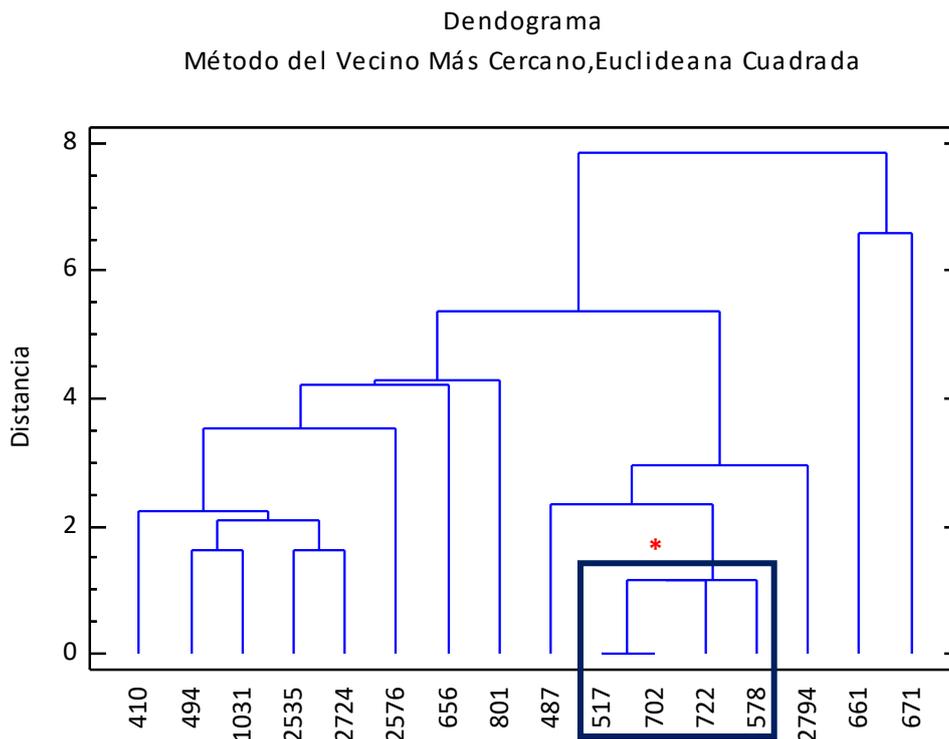
Para poder decidir finalmente qué cepas iban a pasar al siguiente experimento, consistente en el estudio mediante curvas de crecimiento de la capacidad de degradar los compuestos BTX, se realizó la gráfica de la Figura 15. En ella lo primero que se hizo fue normalizar los datos a partir de los resultados obtenidos en el control (APHA). Para ello se restó al valor del control, 2 en todos los casos,

los valores obtenidos para cada compuesto a ensayar, benceno, xileno o tolueno. Esto se hizo tanto para los datos obtenidos en medio líquido como sobre compuestos volátiles. Finalmente se sumaron todos los valores y se representaron en dicha gráfica. Si una cepa hubiese crecido en todos los casos igual que el control el valor obtenido para dicha cepa sería 0 y, por el contrario, si su valor fuese 12, significaría que no ha crecido en ninguno de los ambientes tóxicos.



**Figura 15.** Gráfico que representa la suma de los datos normalizados con respecto al control de los ensayos de toxicidad tanto sobre medio sólido como compuestos volátiles.

Además, con todas esas variables estudiadas, se llevó a cabo un análisis de conglomerados que permitió observar la clasificación de las cepas en función de su afinidad respecto a la tolerancia a la toxicidad de los compuestos BTX (Figura 16).



**Figura 16.** Dendograma resultante del análisis de conglomerados con respecto a los ensayos de toxicidad, tanto sobre medio sólido como compuestos volátiles, a los que fue sometida la colección de cepas de *Rhodococcus*.

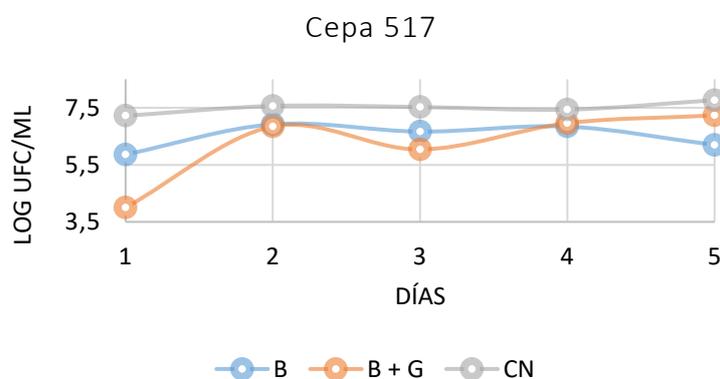
Teniendo en cuenta los resultados mostrados en la Figura 15, las cepas con valores más bajos en el ensayo de volátiles y, por ende, con mayor tolerancia a la toxicidad, fueron 578, que muestra el valor más bajo (2,5), 722 (3), y las cepas 517 y 702 (3,5). Además, 6 de las cepas presentaron el mismo valor, 3,5. Finalmente, para llevar a cabo un cribado y selección de un número asumible de cepas, se tuvo en cuenta el análisis de conglomerados (Figura 15) que situó a las cepas 517, 702, 722 y 578 agrupadas en el mismo clúster y, por tanto, teniendo en cuenta los valores observados en las Figuras 11 y 12, éste fue considerado el grupo más prometedor en relación a su capacidad para tolerar la toxicidad de los hidrocarburos estudiados y potencialmente poder biodegradarlos.

### 3.2. Utilización de compuestos BTX como fuente de carbono y energía en medio líquido

En este apartado se muestran los resultados obtenidos a partir de las curvas de crecimiento llevadas a cabo en medio líquido para el estudio del metabolismo y cometabolismo de los compuestos BTX de las 4 cepas de *Rhodococcus* anteriormente seleccionadas. Debido a la situación de la COVID-19, no pudieron obtenerse datos de la biodegradación del Xileno, pero sí del Benceno y Tolueno. No obstante, la respuesta ante sendos compuestos resulta *a priori* más interesante en el transcurso de este trabajo teniendo en cuenta el comportamiento de las cepas de la colección frente a ellos en los medios estudiados previamente (Figura 13).

A continuación, se muestran una serie de gráficas en las que se representa el log de las UFC/mL en función del tiempo (durante los 5 días que duró el experimento). Para cada cepa se representaron en una misma gráfica los resultados del crecimiento en caldo nutritivo (CN) (control), en un medio mínimo de sales sólo con el compuesto a ensayar (benceno o tolueno) (B o T), y en un medio mínimo de sales con el compuesto y, además, glucosa (B + G o T + G). La finalidad de estudiar también el cometabolismo es que, en ocasiones, una fuente de carbono adicional puede estimular el crecimiento de los microorganismos degradadores, pero, para ello, esta fuente de carbono adicional debe inducir la expresión de los genes de degradación y no puede ser tóxica (Arbeli, 2009).

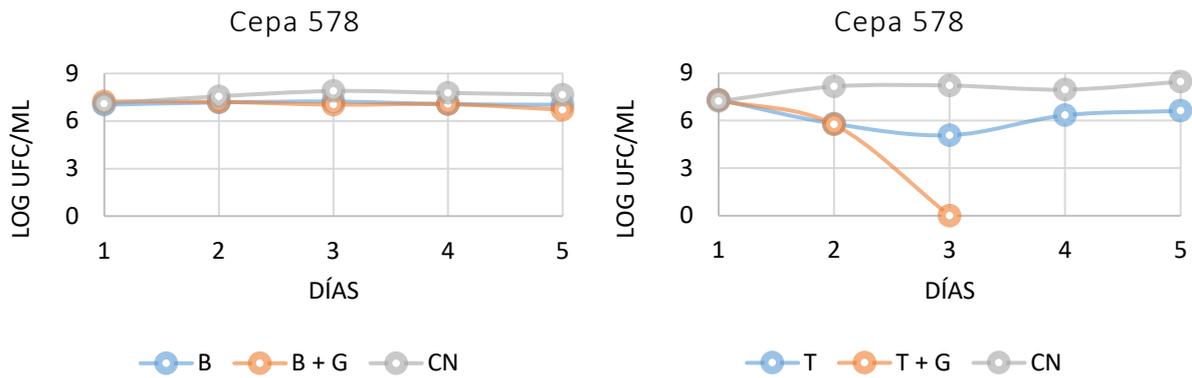
En la Figura 17 se muestran los resultados concernientes a la cepa 517.



**Figura 17.** Curva de crecimiento de la cepa 517 sólo para Benceno.

La cepa 517 mostró un crecimiento parecido cuando se cultivó en benceno y glucosa y cuando se cultivó sólo en benceno (Figura 17). Sin embargo, el crecimiento exponencial en benceno y glucosa es bastante mayor del primer al segundo día que sólo en benceno, y del cuarto al quinto día hay crecimiento en benceno y glucosa y decrecimiento en benceno. En el tercer día ambas curvas de crecimiento sufren un ligero decaimiento, aunque es mayor en el cometabolismo con glucosa. A partir de estos datos se podría deducir que esta cepa es capaz de crecer sin necesidad de suministrar una fuente fácilmente disponible de carbono que active su crecimiento, siendo capaz de utilizar el benceno como única fuente de carbono. Por su parte, a pesar de que el tolueno no resultó tóxico en un medio rico en otros nutrientes (APHA + Tolueno), esta actinobacteria no fue capaz de utilizar ese compuesto en condiciones limitantes de nutrientes como las existentes en los medios líquidos empleados en este experimento.

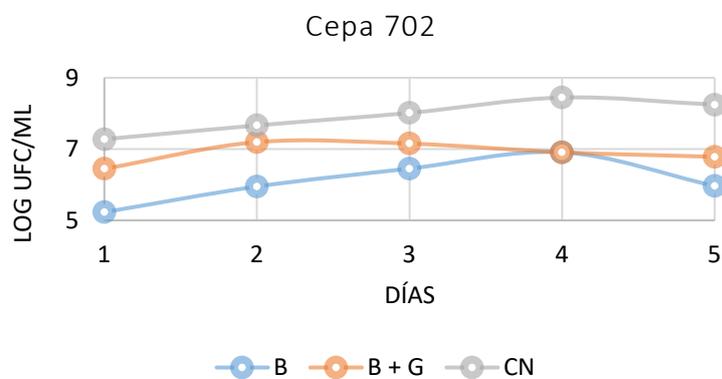
En la Figura 18 se muestran los resultados concernientes a la cepa 578.



**Figura 18.** Curvas de crecimiento de la cepa 578 para Benceno y Tolueno.

En la cepa 578 apenas se apreció evolución del crecimiento en ninguna de las dos situaciones estudiadas para benceno, el cultivo permanece viable sin mostrar un rápido crecimiento, pero sin ser afectado negativamente, tanto en ausencia como en presencia de glucosa. Respecto al tolueno, durante los primeros 3 días se observó un decrecimiento en ambas situaciones (con o sin fuente de carbono fácilmente asimilable), sin embargo, a partir de ese momento se detectó un repunte en el crecimiento de esta cepa en el medio sólo con tolueno, siendo capaz de utilizarlo como única fuente de carbono y energía, mientras que en presencia de glucosa ocurrió algún tipo de inhibición. Precisamente, esta posibilidad fue señalada anteriormente para el caso del tolueno, es decir, se considera que puede llegar a resultar tóxico para microorganismos incluso caracterizados previamente en base a su capacidad para biodegradarlo (Pieper y Reineke, 2000). De hecho, la inhibición del crecimiento microbiano durante el cometabolismo aeróbico de compuestos orgánicos, entre los que se incluyen hidrocarburos, y fuentes asimilables de carbono como la glucosa, ha sido señalada por otros autores (Jesus *et al.*, 2016).

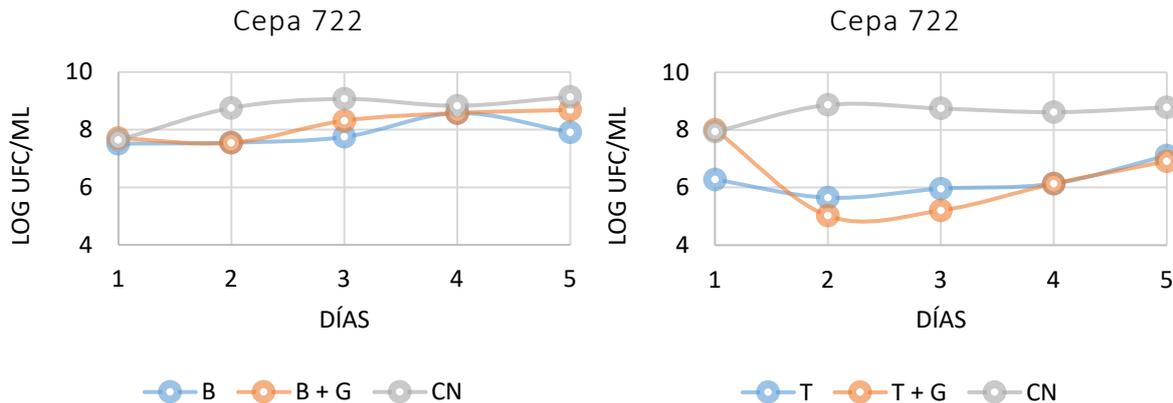
En la Figura 19 se muestran los resultados concernientes a la cepa 702.



**Figura 19.** Curva de crecimiento de la cepa 702 sólo para Benceno.

La cepa 702 mostró un comportamiento similar a la cepa 517, esto es, incapacidad para crecer sobre tolueno y un crecimiento parecido cuando se cultivó en benceno y glucosa y cuando se cultivó sólo en benceno (Figura 19), aunque en este último caso se intuye que, al disponer sólo de benceno como fuente de carbono y energía, el agotamiento de los recursos ocurrió antes de que llegara para el medio adicionado con glucosa, de ahí la caída en el recuento registrado el quinto día.

En la Figura 20 se muestran los resultados correspondientes a la última cepa estudiada, 722.

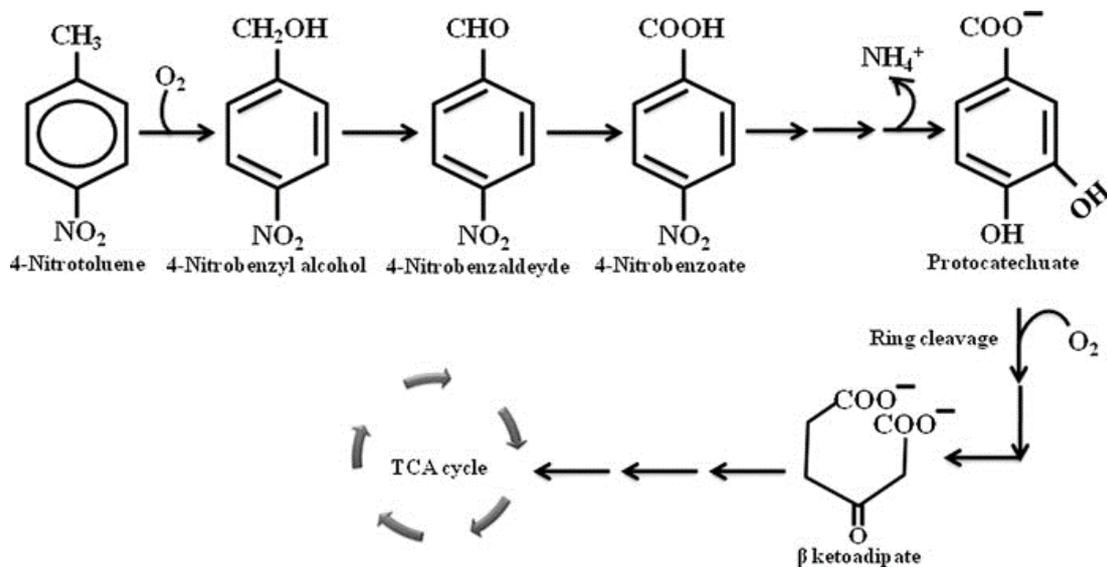


**Figura 20.** Curvas de crecimiento de la cepa 722 para Benceno y Tolueno.

La cepa 722 mostró un gran crecimiento tanto en el medio adicionado sólo con benceno, como en el medio de benceno y glucosa (Figura 20). En ambas curvas hay una primera fase de adaptación, que en la curva de sólo benceno es algo más amplia, y luego el crecimiento es exponencial hasta llegar al cuarto día para benceno sin glucosa y al quinto, para benceno y glucosa. Estos datos confirman que esta cepa es capaz de utilizar el benceno como única fuente de carbono. Respecto al tolueno, la cepa mostró una fuerte caída del crecimiento en el medio adicionado con glucosa al segundo día, pero luego el crecimiento aumentó hasta el quinto día (Figura 20). En cuanto a la curva de crecimiento a partir del medio sólo con tolueno, se observó al segundo día un ligero descenso, pero luego aumentó la carga bacteriana, también hasta el quinto día. Estos resultados confirman que esta cepa también puede utilizar el tolueno como única fuente de carbono.

En un estudio realizado por Kundu *et al.* (2013) consiguieron aislar una cepa capaz de degradar 4-nitrotolueno (4-NT) de un efluente contaminado con pesticidas. Fue identificada como *Rhodococcus pyridinivorans* NT2 en base a propiedades bioquímicas y a su secuencia de ADNr 16S, la cual tiene un 98% de identidad con una de las cepas de nuestra colección con número de identificación general 578. Esta cepa de *Rhodococcus* pudo crecer utilizando 4-nitrotolueno ( $100-400 \text{ mg L}^{-1}$ ) como única fuente de carbono y nitrógeno en un medio mínimo. La ruta propuesta por estos investigadores para la degradación de 4-NT por *R. pyridinivorans* es la que se muestra en la Figura 21, donde se observa que uno de los intermediarios es el protocatecuato, uno de los 3 compuestos en los que puede comenzar la ruta del  $\beta$ -cetoadipato, como se vio en el apartado 1.3 en las Figuras 4 y 5. Debido a que el 4-NT es

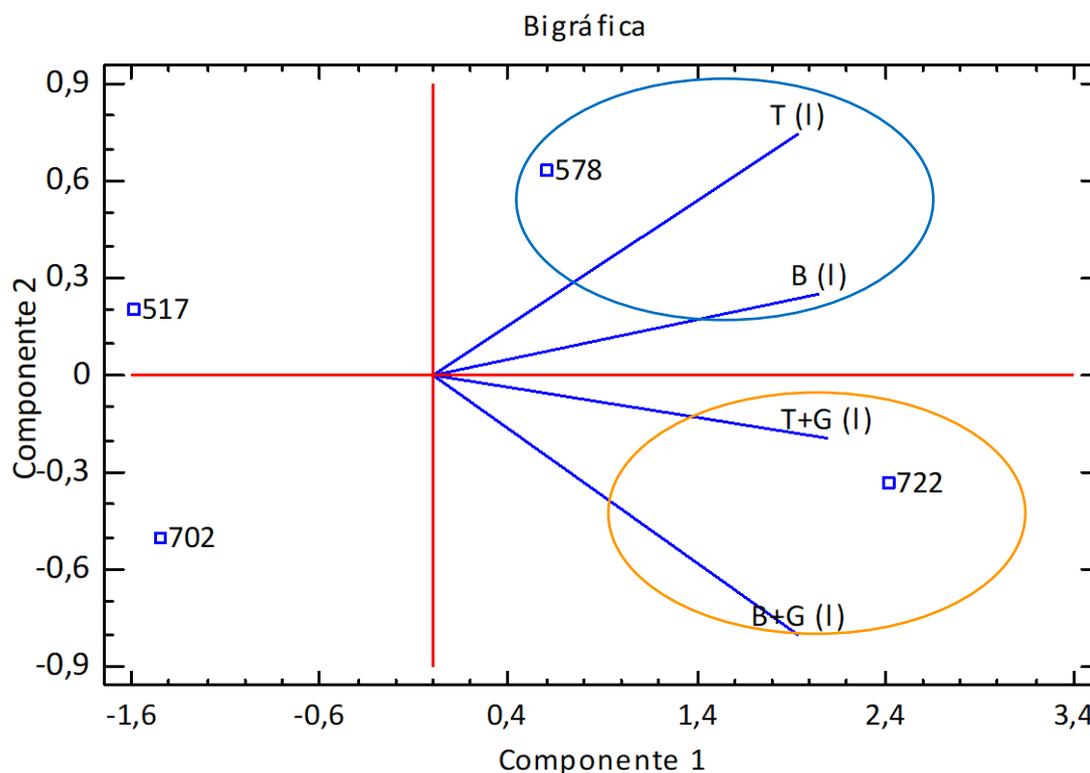
más recalcitrante que los compuestos BTX, podría deducirse que esta cepa también sería capaz de degradar dichos compuestos. Otro estudio llevado a cabo por Jung y Park (2004) demostraron la capacidad de *R. pyridinivorans* PYJ-1 para degradar benceno, tolueno y m-xileno tanto por separado como en mezcla. Estos estudios apoyarían los resultados obtenidos para el benceno y el tolueno y podría pensarse que los resultados para el xileno serían también satisfactorios.



**Figura 21.** Ruta de degradación del 4-NT por *R. pyridinivorans* NT2.

En un estudio realizado por Na *et al.*, (2005) aislaron de un suelo contaminado con gasolina 22 bacterias oxidantes de benceno y entre ellas, la cepa B-4 fue una de las más tolerantes a disolventes orgánicos. Tras un análisis del ARNr 16S, fue identificada como *Rhodococcus opacus*. Esta cepa es capaz de utilizar un amplio espectro de hidrocarburos aromáticos y alifáticos incluyendo benceno, tolueno, o-, m-, y p-xileno, etilbenceno, propilbenceno, estireno, n-octano y n-decano como fuente de carbono y energía. Estos compuestos fueron suministrados en un sistema de dos fases donde estaban presentes al 10% (v/v). Dos pequeños plásmidos llamados pKNR01 (4,4 kb) y pKNR02 (2,8 kb) son los que permiten a esta bacteria utilizar dicho espectro de hidrocarburos. Debido a que el ADN secuenciado de nuestras 4 cepas de bacterias en BLAST es una secuencia parcial del ARNr 16S, no se pudo comprobar mediante alineamiento si contenía alguno de estos plásmidos. Sin embargo, sí se pudo comparar la secuencia parcial del ARNr 16S de *R. opacus* B-4, con número de acceso AB192962.1, y la secuencia parcial de las 4 cepas de *Rhodococcus* estudiadas utilizando los números de acceso de la Tabla 1 del apartado 2.2. *R. phenolicus* tenía un 96,57% de identidad con *R. opacus* B-4, *R. pyridinivorans* un 96,06% y *R. indicum*, un 94,96%. Con estos datos es posible que alguna de estas cepas tenga alguno de estos plásmidos y sean los encargados de la biodegradación de los compuestos BTX.

En la Figura 22 se muestra un análisis de componentes principales en el que se recoge la distribución seguida por las 4 cepas preseleccionadas para el ensayo de metabolismo y cometabolismo en función de los 4 parámetros estudiados (2 compuestos, tolueno y benceno, en 2 condiciones distintas, con y sin glucosa). En conjunto, estas 4 variables explicaron el 100% de la variabilidad de los datos.



**Figura 22.** Análisis de componentes principales llevado a cabo con los valores de recuento (Log UFC/mL) obtenidos para las 4 cepas preseleccionadas durante el ensayo de metabolismo y cometabolismo en función de los 4 parámetros estudiados: B (I)- Medio líquido mínimo de sales con benceno; B + G (I)- Medio líquido mínimo de sales con benceno más glucosa; T (I)- Medio líquido mínimo de sales con tolueno; y T + G (I)- Medio líquido mínimo de sales con tolueno más glucosa.

Teniendo en cuenta los datos de las curvas de crecimiento para las 4 cepas (Figuras 17, 18, 19 y 20), así como el resultado del análisis estadístico de dichos resultados (Figura 22), se deduce que las cepas 578 (*Rhodococcus pyridinivorans*) y 722 (*Rhodococcus indicum*) son las más prometedoras para su selección como potenciales agentes biorremediadores de hidrocarburos. Además, cabe destacar el distinto comportamiento de cada una de ellas en función del medio empleado, 578 evolucionó mejor en general en ausencia de fuente de carbono extra, mientras que 722 presentó una mejor evolución en condiciones de cometabolismo, es decir, con fuente extra de carbono, lo cual corrobora que no deben ser descartadas ninguna de las dos, antes al contrario, un siguiente experimento para un estudio

enfocado en la optimización de su funcionalidad en condiciones a escala real, debería pasar por el empleo de ambas en forma de consorcio, puesto que podrían complementar las ligeras carencias que presentan cada una sobre la condición preferente de la otra.

#### 4. CONCLUSIONES

A continuación, se describen las conclusiones obtenidas tras la ejecución de este Trabajo Fin de Grado:

1. El género *Rhodococcus* posee una buena tolerancia frente a compuestos derivados del petróleo como el benceno, el tolueno y el xileno (BTX), cuando dichos componentes se encuentran directamente adicionados en el medio de crecimiento de las actinobacterias.

2. Los compuestos BTX en forma volátil resultaron ser más restrictivos para el crecimiento microbiano, especialmente en el caso del benceno, que logró inhibir el crecimiento de las cepas de *Rhodococcus* ante su presencia.

3. Las cepas 517-*Rhodococcus phenolicus*, 578-*Rhodococcus pyridinivorans*, 702-*Rhodococcus indicum*, y 722-*Rhodococcus indicum*, presentan un amplio espectro de actuación *in vitro* sobre diferentes medios selectivos adicionados con los compuestos ensayados, lo cual posiciona a estas cuatro cepas como potenciales candidatas para su uso en tareas de biorremediación.

4. La cepa 578-*Rhodococcus pyridinivorans* exhibe los mejores resultados de metabolismo y cometabolismo, especialmente en presencia exclusivamente de los hidrocarburos contaminantes.

5. La cepa 722-*Rhodococcus indicum* exhibe los mejores resultados de metabolismo y cometabolismo, especialmente en estrategias de bioestimulación, es decir, en presencia de una fuente de carbono adicional fácilmente asimilable, junto al hidrocarburo contaminante.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aizawa, T., Neilan, B.A., Couperwhite, I., Urai, M., Anzai, H., Iwabuchi, N., Nakakima M., Sunairi, M. (2005). Relationship between extracellular polysaccharide and benzene tolerance of *Rhodococcus* sp. 33. *Actinomycetologica*, 19(1), 1-6.
- Arbeli, Z. (2009). Biodegradación de compuestos orgánicos persistentes (COP): I. El caso de los bifenilos policlorados (PCB). *Acta Biológica Colombiana*, 14(1), 55-86.
- Atlas, R. M., Hazen, T. C. (2011). Oil biodegradation and bioremediation: a tale of the two worst spills in US history. *Environmental Science & Technology*, 45(16), 6709-6715.
- Bharathi, B., Gayathiri, E., Natarajan, S., Selvadhas, S., Kalaikandhan, R. (2017). Biodegradation of crude oil by bacteria isolated from crude oil contaminated soil—a review. *International journal of development research*, 7, 17392-1739
- Boopathy, R. (2000). Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource technology*, 74(1), 63-67.
- De Carvalho, C.C., Da Cruz, A.A., Pons, M.N., Pinheiro, H.M., Cabral, J.M., Da Fonseca, M.M.R., Ferreira B.S., Fernandes, P. (2004). *Mycobacterium* sp., *Rhodococcus erythropolis*, and *Pseudomonas putida* behavior in the presence of organic solvents. *Microscopy research and technique*, 64(3), 215-222.
- Finnerty, W.R. (1992). The biology and genetics of the genus *Rhodococcus*. *Annual review of microbiology*, 46(1), 193-218.
- Gadd, G.M. (2010). Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology*, 156(3), 609-643.
- Isken, S., de Bont, J. A. (1998). Bacteria tolerant to organic solvents. *Extremophiles*, 2(3), 229-238.
- Janshekar, H., Haltmeier, T., Brown, C. 1982. Fungal degradation of pine and Straw alkali lignins. *European Journal of Applied Microbiology* 14(3), 174-181.
- Jesus, J., Frascari, D., Pozdniakova, T., Danko, A.S. (2016). Kinetics of aerobic cometabolic biodegradation of chlorinated and brominated aliphatic hydrocarbons: A review. *Journal of hazardous materials*, 309, 37-52.
- Jung, I.G., Park, C.H. (2004). Characteristics of *Rhodococcus pyridinovorans* PYJ-1 for the biodegradation of benzene, toluene, m-xylene (BTX), and their mixtures. *Journal of bioscience and bioengineering*, 97(6), 429-431.
- Kostka, J.E., Prakash, O., Overholt, W.A., Green, S.J., Freyer, G., Canion, A., Delgardio, J., Norton, N., Hazen T.C., Huettel, M. (2011). Hydrocarbon-degrading bacteria and the bacterial community response in Gulf of Mexico beach sands impacted by the Deepwater Horizon oil spill. *Applied And Environmental Microbiology*, 77(22), 7962-7974.

- Kundu, D., Hazra, C., Dandi, N., Chaudhari, A. (2013). Biodegradation of 4-nitrotoluene with biosurfactant production by *Rhodococcus pyridinivorans* NT2: metabolic pathway, cell surface properties and toxicological characterization. *Biodegradation*, 24(6), 775-793.
- Larkin, M.J., Kulakov, L.A., Allen, C.C. (2005). Biodegradation and *Rhodococcus* – masters of catabolic versatility. *Current opinion in Biotechnology*, 16(3), 282-290.
- Martínez-Gallardo, M.R., López, M.J., Jurado, M.M., Suárez-Estrella, F., López-González, J.A., Sáez, J.A., Moral, R., Moreno, J. (2020). Bioremediation of Olive Mill Wastewater sediments in evaporation ponds through in situ composting assisted by bioaugmentation. *Science of the Total Environment*, 703, 135537.
- Martínková, L., Uhnáková, B., Pátek, M., Nešvera, J., Křen, V. (2009). Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus*. *Environment International*, 35(1), 162-177.
- Matsui, T., Noda, K.I., Tanaka, Y., Maruhashi, K., Kurane, R. (2002). Recombinant *Rhodococcus* sp. strain T09 can desulfurize DBT in the presence of inorganic sulfate. *Current microbiology*, 45(4), 240-244.
- Na, K.S., Kuroda, A., Takiguchi, N., Ikeda, T., Ohtake, H., Kato, J. (2005). Isolation and characterization of benzene-tolerant *Rhodococcus opacus* strains. *Journal of bioscience and bioengineering*, 99(4), 378-382.
- Onwurah, I.N.E., Ogugua, V.N., Onyike, N.B., Ochonogor, A.E., Otitoju, O.F. (2007). Crude oil spills in the environment: effects and some innovative clean-up biotechnologies. *International Journal of Environmental Research*, 4, 307-320.
- Peterson, C.H., Rice, S.D., Short, J.W., Esler, D., Bodkin, J.L., Ballachey, B. E., Irons, D.B. (2003). Long-term ecosystem response to the Exxon Valdez oil spill. *Science*, 302(5653), 2082-2086.
- Pieper, D. H., Reineke, W. (2000). Engineering bacteria for bioremediation. *Current opinion in biotechnology*, 11(3), 262-270.
- Sahuquillo, M. (2020). Emergencia en una ciudad del Ártico ruso tras un vertido de 20.000 toneladas de combustible a un río. <https://elpais.com/sociedad/2020-06-02/emergencia-en-una-ciudad-del-artico-ruso-tras-un-vertido-de-20000-toneladas-de-combustible-a-un-rio.html> (enlace activo el 5 de junio de 2020)
- Salt, D.E., Smith, R.D., Raskin, I. (1998). Phytoremediation. *Annual review of plant biology*, 49(1), 643-668.
- Schneiker, S., dos Santos, V.A.M., Bartels, D., Bekel, T., Brecht, M., Buhrmester, J., Chernikova, T., Denaro, R., Ferrer, M., Gertler, C., Goesmann, A., Golyshina, O., Kaminski, F., Khachane, A., Lang, S., Linke, B., McHardy, A., Meyer, F., Nechitaylo, T., Pühler, A., Regenhardt, D., Rupp, O., Sabirova, J., Selbitschka, W., Yakimov, M., Timmis, K., Vorhölter, F., Weidner, S., Kaiser, O., Goesmann, A. (2006). Genome sequence of the ubiquitous hydrocarbon-degrading marine bacterium *Alcanivorax borkumensis*. *Nature biotechnology*, 24(8), 997-1004.

- Schnoor, J.L., Licht, L.A., McCutcheon, S.C., Wolfe, N. L., Carreira, L.H. (1995). Phytoremediation of organic and nutrient contaminants. *Environmental science and technology*, 29(7), 318A-323A.
- Sevilla, B. 2019. Demanda global diaria de petróleo crudo 2006-2020. Statista. (<https://es.statista.com/estadisticas/600689/demanda-mundial-diaria-de-petroleo-crudo/#statisticContainer>).
- Shekhar, S.K., Godheja, J., Modi, D.R. (2015). Hydrocarbon bioremediation efficiency by five indigenous bacterial strains isolated from contaminated soils. *International Journal of Current Microbiology and Applied Science*, 4(3), 892-905.
- Suchanek, T.H. (1993). Oil impacts on marine invertebrate populations and communities. *American Zoologist*, 33(6), 510-523.
- Tyagi, M., da Fonseca, M.M.R., de Carvalho, C.C. (2011). Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. *Biodegradation*, 22(2), 231-241.
- van der Geize, R., Dijkhuizen, L. (2004). Harnessing the catabolic diversity of rhodococci for environmental and biotechnological applications. *Current opinion in microbiology*, 7(3), 255-261.
- Van Hamme, J.D., Singh, A., Ward, O.P. (2003). Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4), 503-549.
- Vidali, M. (2001). Bioremediation. an overview. *Pure and applied chemistry*, 73(7), 1163-1172.
- Walter, U., Beyer, M., Klein, J., Rehm, H.J. (1991). Degradation of pyrene by *Rhodococcus* sp. UW1. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 34(5), 671-676.