



Biodegradación de HAPs durante la biorremediación aeróbica de suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo. Análisis de poblaciones bacterianas y genes funcionales

Andrés Ricardo Izquierdo Romero

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



Universitat de Barcelona

Facultad de Biología
Departamento de Microbiología

Programa de doctorado
Microbiología Ambiental y Biotecnología

**Biodegradación de HAPs durante la biorremediación aeróbica de
suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo.
Análisis de poblaciones bacterianas y genes funcionales**

Memoria presentada por

Andrés Ricardo Izquierdo Romero

para optar al grado de Doctor por la Universitat de Barcelona

Tesis realizada bajo la dirección de la Dra. Magdalena Grifoll Ruiz (Profesora Titular) y el Dr. Joaquim Vila Grajales (Profesor Asociado e Investigador) del Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universitat de Barcelona

Directora y Tutora,

Director,

Magdalena Grifoll Ruiz

Joaquim Vila Grajales

Autor,

Andrés Ricardo Izquierdo Romero

Barcelona, Noviembre 2013



Esta tesis ha sido financiada por el Gobierno Nacional de la República del Ecuador, a través de una beca de la Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación (Senescyt), convocatoria Francia 2008, para estudios de postgrado de master y doctorado, y del proyecto financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación del Gobierno de España, *Identificación, evaluación y explotación de las funciones catabólicas de la rizosfera para la recuperación de suelos contaminados con hidrocarburos aromáticos policíclicos* (CGL2010-22068-CO2-02).

Cubierta: Andrés Izquierdo Romero (2013)

A toda mi familia, mis hermanos, mis tíos y tías, mi abuelita y en especial a mis padres, por el amor y apoyo incondicional que he recibido durante todos estos años de sacrificio.

A mi país, Ecuador.

Agradecimientos

Quiero comenzar dando gracias a Dios y a mi Madre Dolorosa, por darme esta oportunidad de terminar mis estudios de doctorado, son muchas personas e instituciones que me han ayudado y me han permitido terminar esta etapa de mi vida, espero nombrarles a todos, primeramente a la Secretaria Nacional de Educación Superior, Ciencia y Tecnología (Senescyt) y al Gobierno del Ecuador, por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de postgrado en el extranjero por medio de una beca, a la Escuela Politécnica del Ejército (ESPE, Quito-Ecuador), por formarme como Ingeniero en Biotecnología y su auspicio para poder acceder a la beca.

A los profesores del Master en Contaminación y Toxicología Ambientales y compañeros del laboratorio de Biología Celular Histología de la Universidad de País Vasco (Bilbao, España), Dr. Ibon Cancio, Dr. Ionan Marigomez, Amaia, Oihane, Eider, a mis amigos en Bilbao, Alberto, Diana, Vinicio, Edwin, Miguel, Fabrice, Pilar por compartir su amistad durante mi estancia durante un año en Bilbao, una etapa previa para comenzar mi investigación doctoral en la Universidad de Barcelona.

Ya en la etapa de mi doctorado, quiero agradecer primeramente y de manera muy especial a la Dra. Magdalena Grifoll por aceptarme en su grupo de investigación y ser mi directora de tesis, por permitirme realizar mi investigación doctoral en biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos, una prioridad y una necesidad en mi país, por impartirme sus conocimientos, su paciencia, su tiempo y su ayuda durante todos estos años, especialmente en la fase de escritura de la tesis, muchas gracias por todo.

En segundo lugar al Dr. Joaquim Vila por ser mi codirector, por su ayuda recibida durante toda la investigación de la tesis, especialmente en la fase de laboratorio, por su gran experiencia, sus enseñanzas y de igual manera en la etapa de escritura de la tesis, gracias por su tiempo y su paciencia. También a su novia Aintzane por su ayuda.

Al Dr. José María Nieto, por sus saludos día a día, sus consejos, ánimos, sus conversaciones en el laboratorio, su manera de ser y su ayuda brindada durante todo este tiempo.

A la empresa Geotecnia 2000, a Lina Ortega, por brindarme la oportunidad de trabajar con la empresa privada, especialmente por la facilidad de las muestras de suelos contaminados de un emplazamiento real y poder trabajar con ellas en mi investigación y por la ayuda brindada durante todo este tiempo.

Al Dr. Pierre Peyret y la Dra. Corinne Petit por permitirme realizar mi estancia doctoral fuera de Barcelona, en su grupo de investigación en el Laboratory Microorganisms, Genome and Environment (LMGE) - UMR CNRS 6023, Clermont-Ferrand, France, y la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación, un tiempo muy productivo y muy importante para mi investigación, además de la posibilidad de recordar y practicar el francés.

Agradecer también a mis compañeros del laboratorio 5, a Salva, Laia, Sara G., William, Naiara por compartir buenos momentos en el laboratorio, a Sara M. por su amistad durante mi primer año de investigación y a Marga Tauler por su ayuda en el laboratorio, durante la investigación y su compañía durante estos tres años de estancia en el laboratorio.

Al personal administrativo del Departamento de Microbiología, a los amigos y compañeros de la fase 1 y 2, por compartir saludos, conversaciones en el pasillo, Mónica, Lily, Susana, Silvia, Amanda, Tania, Frank, Lucia, Nerea, Ivania, Raquel, Silvia C., Tarik, Anna, Marta, Xavi, Laura, Byron, Julia, Alex, Byron y Sandra, y más. Un agradecimiento especial al Doctor Ayalke y al Dr. Jesús (Chus) por brindarme una verdadera amistad y compartir buenos momentos fuera y dentro del laboratorio, especialmente por ser los primeros en invitarme a tomarme unas cervezas en el lab, y la oportunidad de conocer a mas buenos amigos como Daniel y Meritxell.

A mis amigos y compañeros de mi convocatoria de beca, que compartimos la experiencia de estudiar fuera del país, Marco, Mauricio, Tony, Luis, Danilo, Esteben, Marjorie, Miguel y más. A mis compañeros y amigos becarios de la Senescyt en Barcelona, Andrés, Juan Carlos, Willian, David, Luis, Yani, Lourdes, Santiago, Gliset, Liliana, Pablo, por los gratos momentos compartidos fuera de las aulas y su amistad.

A mis amigos en Barcelona, con los que compartimos buenos momentos, salidas, viajes y cervezas, a Juan Pablo cuantos años de amigos, Antonio, Rui, Ines, Jorge, Marco, Agata, Marta, Isabel, Helena, Irina, Ana y a toda la gente de Pokaż cycki. A Sandra e Igor mis amigos y compañeros de piso. Por tantos buenos momentos y salidas durante este tiempo en Barcelona.

A mis amigos de mi colegio y de la universidad en Ecuador, Pablo, Francisco, José, Juan Pablo, Geovanny, Alejandra, Rommel, Ricardo y muchas más.

A mis amigos en Ecuador, Carlos, Juan Francisco, Juan Carlos, Jorge, Byron, Paul y muchos más y en especial a Alberto y José Sánchez por tantos años de amistad y experiencias vividas juntos, gracias hermanos.

Por ultimo agradecer a lo que me impulso y me dio aliento durante todo este tiempo fuera de mi país, lo más importante en mi vida, toda mi familia, a mi padre Carlos y mi madre Magdalena, por su amor y ejemplo, y su gran sacrificio por permitirme estudiar y ser lo que soy, a mis hermanos, Juan Carlos por su entrega y ayuda a toda mi familia, María y Nicole mi hermana pequeña que espero lo mejor para ella. A mi abuelita un ejemplo de vida, por sus bendiciones y ser la unión de toda la familia, a mis tías Carmelita, Mónica, Silvia por su apoyo y cariño, a mis tíos Carlos, Eduardo, Marcelo por su ayuda en la obtención de mi beca y creer en mí, a Geovanny por ser mi tío y profesor en el colegio e introducirme el gusto a la Biología. A mis primos Luis Esteban, Toby y Cristian, a mi prima Katty que me esta observando desde el cielo. A todos ellos gracias por creer en mí, por su apoyo incondicional en todo momento, yo no sería nadie sin la ayuda y la presencia de todos ellos. Y este logro no solo es mío, sino de todos ustedes, muchas gracias por todo.

CONTENIDO DE LA TESIS

Agradecimientos	i
Contenido de la Tesis	v
1. Introducción	1
1.1. Hidrocarburos del Petróleo	3
1.1.1. Crudo de petróleo y sus derivados	3
1.1.2. Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs)	8
1.2. Contaminación del suelo por hidrocarburos del Petróleo	13
1.2.1. Estructura y componentes del suelo	13
1.2.2. Características de los suelos contaminados.....	14
1.2.3. Destino ambiental de hidrocarburos en suelos	16
1.3. Biodegradación de hidrocarburos por microorganismos del suelo.	17
1.3.1. Biodegradación aeróbica de hidrocarburos alifáticos	19
1.3.1.1. La captación bacteriana de <i>n</i> -alcanos	20
1.3.1.2. Vías de degradación de <i>n</i> -alcanos	21
1.3.1.3. Alcano hidroxilasas	22
1.3.1.4. Degradación de alcanos de cadena ramificada	28
1.3.2. Biodegradación aeróbica de HAPs	29
1.3.2.1. Vías de degradación de HAPs.....	29
1.3.2.2. Dioxigenasas dihidroxilantes del anillo aromático (RHDs)	31
1.3.2.3. Biodegradación y cometabolismo de HAPs alquilados	40
1.4. Comunidades Microbianas Degradadoras de HCs.	45
1.4.1. Microorganismos degradadores de hidrocarburos	45
1.4.2. Análisis de comunidades microbianas degradadoras	48
1.5. Biorremediación.....	60
1.5.1. Factores que determinan la biodegradación de hidrocarburos en en el suelo	60
1.5.2. Biorremediación de emplazamientos contaminados por hidrocarburos ...	62
1.5.3. Estrategias de biorremediación.....	64
1.5.4. Tecnologías de Biorremediación.....	71
1.5.5. Biorremediación se suelos contaminados por hidrocarburos del petróleo mediante biopilas aeróbicas estáticas.....	75
2. Objetivos	79
3. Materiales y Métodos	83
3.1. Diseño experimental.....	85
3.1.1. Suelo de estudio y proceso de bioremediación.....	85
3.1.2. Estudio de los procesos bacterianos implicados en la biodegradación de HAPs en biopilas de suelo contaminado con hidrocarburos del petróleo..	87
3.1.3. Biodegradación de fracciones del petróleo en microcosmos inoculados con suelo de las biopilas	90
3.2. Análisis químico.	92

3.2.1. Obtención de las fracciones de TPHs y metabolitos de muestras de suelo	92
Preparación de las muestras	92
Extractos orgánicos y de TPHs de muestras de suelo.....	93
Metabolitos de muestras de suelo	94
<i>Obtención de lixiviados</i>	94
<i>Detección de metabolitos ácidos en lixiviados</i>	94
<i>Metabolitos neutros</i>	95
3.2.2. Obtención de las fracciones saturada y aromática de un crudo de petróleo envejecido	96
3.2.3. Extracción orgánica de microcosmos en medio líquido	96
3.2.4. Análisis por GC y GC-MS.....	97
3.3. Análisis microbiológicos dependientes de cultivo.	98
3.3.1. Medios de cultivo	98
3.3.2. Recuentos de microorganismos del suelo	98
3.3.3. Aislamiento y caracterización catabólica de microorganismos degradadores de HAPs	99
3.4. Análisis microbiológicos mediante técnicas moleculares.	101
3.4.1. Extracción de DNA.....	101
3.4.2. Amplificación por PCR	101
Amplificación del ADNr 16S.....	101
Amplificación por PCR de genes funcionales en los microcosmos ..	103
3.4.3. Análisis de comunidades microbianas mediante DGGE (<i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</i>)	105
3.4.4. Análisis de comunidades microbianas mediante librerías de clones	105
Librería de clones del gen ARNr 16S de muestras de suelo de las biopilas	105
Librería de clones de genes funcionales de microcosmos.....	106
3.4.5. Secuenciación	107
3.4.6. Análisis de comunidades bacterianas mediante pirosecuenciación de librerías del gen ARNr 16S (<i>bar-coded pyrosequencing</i>).....	107
3.4.7. Análisis de genes funcionales mediante <i>microarrays</i>	109
Diseño de las sondas de oligonucleótidos y construcción del <i>microarray</i>	109
Preparación y etiquetaje de muestras	110
Hibridación del microarray	110
Normalización de datos y análisis estadístico.....	111
Método de evaluación del ruido de fondo	111
4. Cambios en la comunidad bacteriana asociados a la degradación de HAPs durante el tratamiento con biopila activa de un suelo contaminado con hidrocarburos del petróleo.....	113
4.1. Antecedentes.....	115
4.2. Biodegradación de hidrocarburos en el suelo durante el tratamiento en biopila.	115
4.2.1. Evolución del contenido de materia orgánica total (MOE) del suelo	115
4.2.2. Análisis del contenido en TPHs	117

4.2.3. Análisis del contenido en HAPs	119
4.2.4. Detección de metabolitos de HAPs.....	123
4.3. Estudio de la comunidad microbiana.....	127
4.3.1. Recuento de las poblaciones microbianas heterótrofas y degradadoras de hidrocarburos mediante la técnica del NMP	127
4.3.2. Dinámica de las poblaciones bacterianas mediante análisis por DGGE ..	128
4.3.3. Librería de clones del 16S rARN	131
4.3.4. Análisis de la composición de la comunidad microbiana mediante pirosecuenciación.....	137
Géneros principales.....	139
Especies principales	141
Análisis de la diversidad.....	143
4.3.5. Estudio de las comunidades bacterianas degradadoras de fenantreno y pireno.....	144
4.3.6. Comparación metodológica de la comunidad microbiana mediante diferentes técnicas	149
5. Análisis de poblaciones y funciones microbianas asociadas a la degradación de las fracciones alifática y de HAPs en microcosmos inoculados con suelo contaminado	153
5.1. Biodegradación de las fracciones alifática y de HAPs.	155
5.1.1. Análisis del contenido en TPHs	156
5.1.2. Degradación de alifáticos.....	158
Microcosmos incubados con fracción alifática (F1).....	158
Microcosmos incubados con fracciones alifática y de HAPs combinadas (F1F3)	159
5.1.3. Degradación de la fracción de HAPs	160
Microcosmos incubados con fracción de HAPs (F3).....	161
Microcosmos incubados con fracciones alifática y de HAPs combinadas (F1F3)	163
5.2. Estudio de la comunidad microbiana.....	166
5.2.1. Dinámica de las poblaciones bacterianas mediante análisis por DGGE ..	166
5.2.2. Dinámica de la estructura de la comunidad microbiana mediante pirosecuenciación.....	167
Microcosmos control sin fuente de carbono	171
Microcosmos incubados con fracción alifática (F1).....	172
Microcosmos incubados con fracción de HAPs (F3).....	173
Microcosmos incubados con fracciones alifática y de HAPs combinadas (F1F3)	174
Análisis de la diversidad.....	175
5.3. Análisis de genes funcionales.	176
5.3.1. Librería de clones de genes funcionales.....	176
5.3.1.1. AlkB (Alcano monooxigenasa)	177
5.3.1.2. Citocromo P450 monooxigenasa	181
5.3.1.3. Dioxigenasas de HAPs en Gram-negativos (Cebadores Clase B)	184
5.3.1.4. Tolueno/bifenil dioxigenasas (Cebadores Clase D)	185

5.3.1.5. Detección de genes funcionales a lo largo de la incubación en los distintos microcosmos	188
Oxigenasas en microcosmos con fracción alifática (F1)	188
Oxigenasas en microcosmos con fracción de HAPs (F3)	189
Oxigenasas en microcosmos con fracciones alifática y de HAPs combinadas (F1F3)	189
5.3.2. Detección de genes involucrados en la degradación de HAPs mediante <i>Microarrays</i>	190
Microcosmos con fracción alifática (F1).....	192
Microcosmos con fracción de HAPs (F3)	193
Microcosmos con fracciones alifática y de HAPs combinadas (F1F3)	194
6. Discusión	197
6.1. Cambios en la comunidad bacteriana asociados a la degradación de HAPs durante el tratamiento con biopila activa de un suelo contaminado con hidrocarburos del petróleo.....	199
6.2. Análisis de poblaciones y funciones microbianas asociadas a la degradación de las fracciones alifática y de HAPs en microcosmos inoculados con suelo contaminado.	215
7. Conclusiones	233
8. Referencias	237
9. Anexos	263

Esta tesis doctoral se ha escrito siguiendo el formato clásico de tesis. Sin embargo, en el futuro próximo los resultados obtenidos se van a someter para su publicación en revistas científicas del campo de la biorremediación y la microbiología ambiental.

1.1. Hidrocarburos del Petróleo

1.1.1. Crudo de petróleo y sus derivados

El crudo de petróleo es la mezcla más compleja de compuestos orgánicos que se produce de forma natural en la Tierra. Estudios recientes con espectrometría de masas de ultra-alta-resolución han permitido identificar más de 17000 componentes químicos distintos (Head et al., 2006).

Es un líquido negro, viscoso y heterogéneo. En su composición predominan los hidrocarburos (50-98%), que a su vez constituyen uno de los principales grupos de contaminantes ambientales, tanto por su abundancia como por su persistencia en distintos compartimentos.

Tabla 1.1. Composición elemental típica de un crudo de petróleo
(Fuente: Howe-Grant, 1996).

Porcentaje	Composición elemental de un crudo de petróleo
84-87%	C
11-14%	H
0-8%	S
0-4%	O, N, metales como el níquel y el vanadio

La composición química de los crudos puede presentar gran variabilidad en función de su origen, observándose cambios en las proporciones entre las distintas familias de hidrocarburos. Los componentes del crudo se separan en cuatro fracciones en función de su solubilidad en disolventes orgánicos: saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos (Sugiura et al., 1997).

La **fracción saturada (alifática)**, se encuentra formada por *n*-alcanos, alcanos de cadena ramificada (isoprenoides), y cicloparafinas o cicloalcanos, incluidos los hopanos.

Los *n*-alcanos son hidrocarburos de cadena lineal que van desde el metano hasta el C₄₀. Entre ellos, los compuestos de 1 a 10 átomos de carbono (C₁-C₁₀) son volátiles, y por lo tanto susceptibles de pérdidas abióticas por evaporación. Dentro de este grupo, los compuestos de C₁₀ a C₂₀ son los más fácilmente degradables. A los isoprenoides, sus ramificaciones les conceden un alto grado de resistencia a la

degradación biológica en comparación a los lineales. Los más abundantes son el pristano (2,6,10,14-tetrametilpentadecano) y el fitano (2,6,10,14-tetrametilhexadecano), antiguamente utilizados como marcadores internos del grado de biodegradación de un crudo, pero que actualmente no se usan, ya que se ha descrito su degradación en condiciones naturales y las vías catabólicas implicadas (Watkinson y Morgan, 1990).

Los cicloalcanos (naftenos o cicloparafinas), son compuestos de distinto número de anillos (entre 1 y 5), predominando los derivados alquilados (fundamentalmente metilados), que pueden llegar a representar un 31% del crudo. Los compuestos mono- y dicíclicos corresponden al 50-55% de esta fracción, los tricíclicos al 20% y los tetracíclicos al 25%. Esta familia engloba a los hopanos (5 anillos), compuestos muy recalcitrantes que han substituido a los isoprenoides como marcadores internos para evaluar el grado de biodegradación de residuos de petróleo en muestras ambientales (Prince et al., 1994).

La fracción aromática del crudo de petróleo está formada por compuestos que poseen uno o más anillos bencénicos en su estructura. Dentro de esta fracción se pueden distinguir los hidrocarburos monoaromáticos, los cuales se forman mediante la sustitución de los átomos de hidrógeno del benceno por grupos alquilo y arilo, dando lugar a los alquilbencenos, polifenilos, o a una mezcla de ambos. El benceno, tolueno, etilbenceno y los tres isómeros del xileno (BTEX), son de gran importancia ambiental debido a su volatilidad y toxicidad, y por su abundancia en los combustibles fósiles. Los **hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs)** están formados por dos o más anillos bencénicos fusionados, siendo el representante más simple de esta clase el naftaleno. Los HAPs del petróleo pueden presentar distinto grado de alquilación, predominando en el crudo los compuestos metilados sobre los no alquilados. La proporción de hidrocarburos alquilados en un crudo de petróleo depende del rango de las temperaturas a que se ha formado (Blumer, 1976).

Las fracciones de resinas y asfaltenos, son mezclas complejas integradas por núcleos policíclicos o naftenoaromáticos. Contienen cadenas hidrocarbonadas con heteroátomos de oxígeno, nitrógeno y azufre (compuestos NOS) y a veces están asociadas con pequeñas concentraciones de metales como el vanadio y el níquel. Las resinas y asfaltenos son los compuestos del crudo de petróleo que presentan una mayor resistencia a la degradación biológica. Se trata de agregados de piridinas, quinolinas, carbazoles, tiofenos, sulfóxidos, amidas, HAPs, sulfuros, ácidos

nafténicos, ácidos grasos, metaloporfirinas y fenoles polihidratados (Howe-Grant, 1996). Estas fracciones comprenden entre el 10 y el 60% del total del crudo.

Derivados del crudo de petróleo

Anualmente se producen más de 2 billones de toneladas de petróleo en el mundo, a partir del qual, mediante los procesos de refinado, se obtienen distintos derivados. Debido a su amplia utilización estos derivados, que pueden presentar una composición química muy variada, son potenciales contaminantes del medio ambiente.

El refinado es un proceso de destilación cuya finalidad es obtener distintas fracciones separándolas del residuo, en el que se encuentran, entre otros, los compuestos NOS. En este proceso se destilan, a temperaturas crecientes, cuatro fracciones principales: gasolina, queroseno, destilados medios (gasoil, aceites lubricantes) y un residuo. Posteriormente este residuo se destila al vacío obteniéndose aceites lubricantes pesados, ceras y parafinas, y betunes asfálticos (alquitranes) (Tabla 1.2). En el proceso de refinado se eliminan componentes de la fracción asfáltica (altamente recalcitrante) lo que implica que los refinados intermedios (gasoil, fueles, querosenos y también las gasolinas) sean productos relativamente más biodegradables que los coques o alquitranes residuales.

La **gasolina** es un combustible que se utiliza en motores de combustión interna con encendido por chispa convencional o por compresión, así como en estufas, lámparas, limpieza con solventes y otras aplicaciones. Se almacena en tanques subterráneos y, ocasionalmente, se producen fugas provocando la contaminación de suelos. Forma parte de la fracción ligera del crudo de petróleo, obteniéndose a temperaturas de entre 20 y 180 °C (Tabla 1.2), y su producción es inferior a la de diésel y fueles. Este hecho implica que los suelos contaminados por gasolina presenten, básicamente, hidrocarburos de cadena corta (C₆-C₁₁). Sus componentes principales son *n*-butano, isopentano, *n*-pentano, mono y dimetilpentanos, *n*-hexano, BTEX, mono y dimetilhexanos, trimetilbencenos, metiletibencenos, naftalenos y *n*-heptano, estos dos últimos en menor grado.

Tabla 1.2. Fracciones que se pueden obtener en la destilación fraccionada de un crudo de petróleo (Ramos, 1997).

Fracciones	T° ebullición	Composición	Uso
Gasolina ligera	20-100	C ₅ H ₁₂ -C ₇ H ₁₆	Disolvente
Benzina	70-90	C ₆ -C ₇	Lavado en seco
Ligroína	80-120	C ₇ -C ₈	Disolvente
Gasolina	20-180	C ₆ -C ₁₁	Carburante
Queroseno, Jet fuel	200-300	C ₁₂ -C ₁₆	Iluminación y carburante
Gasoil, Diesel	200-350	C ₁₃ -C ₁₈	Carburante
Aceite lubricante	250-350	C ₁₆ -C ₂₀	Lubricantes
Grasas, vaselinas	245-400	C ₁₈ -C ₂₂	Farmacéutica
Cera de parafina	245-540	C ₂₀ -C ₄₅	Velas
Betún asfáltico (35% peso)	>540	C ₃₀ -C ₄₅	Alquitrán asfáltico Coque de petróleo
Fueloil	175 - 600	C ₉ -C ₇₀	Combustible para plantas eléctricas, calderas

El **diésel** forma parte de la fracción media del crudo de petróleo, que es destilada después del queroseno, y se encuentra en el rango de 200 a 350°C (Tabla 1.2). En el diésel encontramos hidrocarburos entre C₁₅ y C₂₅, siendo lo más abundantes los que poseen entre 15 y 17 átomos de carbono (Figura 1.1). En suelos contaminados por diésel predominan los compuestos alifáticos (alrededor del 75%), siendo el resto monoaromáticos y HAPs. Se utiliza como combustible, y al igual que la gasolina, se encuentra en suelos debido al deterioro de tanques de almacenamiento y a vertidos accidentales. A menudo, los derrames de diésel se extienden a lo largo de distancias considerables y se desplazan verticalmente en sentido descendente contaminando las aguas subterráneas.

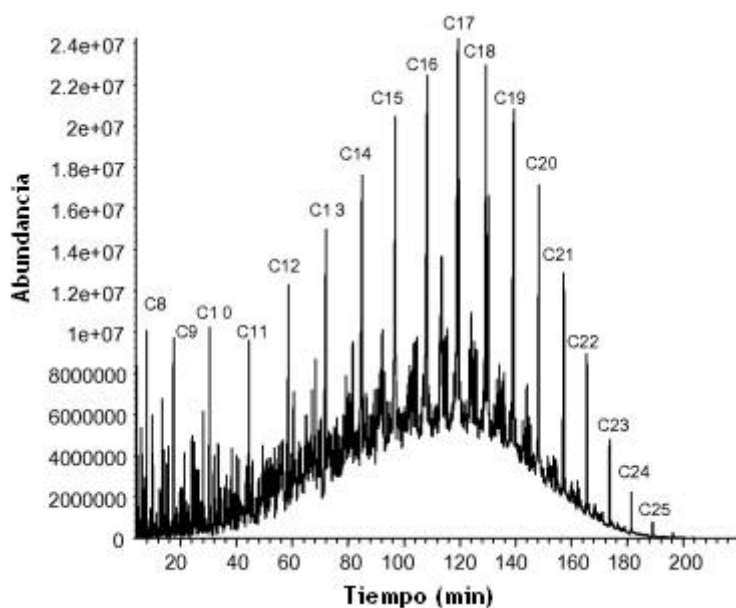


Figura 1.1. Perfil cromatográfico de GC-MS de un diésel. Las etiquetas de C8-C25 indican los picos correspondientes a los alcanos de cadena lineal con su número de átomos de carbono (Knothe & Steidley, 2007).

Los **aceites minerales** se utilizan como lubricantes en motores de combustión, en sistemas de transmisión e inclusive como disolventes. Los episodios de contaminación son frecuentes y van ligados a actividades de mantenimiento en talleres de reparación de automóviles, industrias, puertos pesqueros y deportivos, maquinaria agrícola, etc. Los residuos de estas actividades son peligrosos para el medio ambiente, y la normativa vigente (Real Decreto 679/2006) obliga a los fabricantes a crear sistemas integrados de gestión de los aceites industriales usados (SIG) y a asumir el coste total de las operaciones necesarias (recogida, transporte y tratamiento) (Agència de Residus de Catalunya).

Los suelos contaminados por aceites minerales presentan un alto contenido de alcanos y cicloalcanos, que representan el 80-90% de su composición, siendo el resto compuestos aromáticos (10-20%). Se distinguen una gran variedad de aceites minerales en función de sus rangos de ebullición y la estructura de sus componentes. Los aceites minerales pesados están formados por compuestos de entre 25 y 40 carbonos, y, por ende tienen rangos de ebullición más elevados que los aceites minerales ligeros, constituidos por compuestos de entre 15 y 25 carbonos.

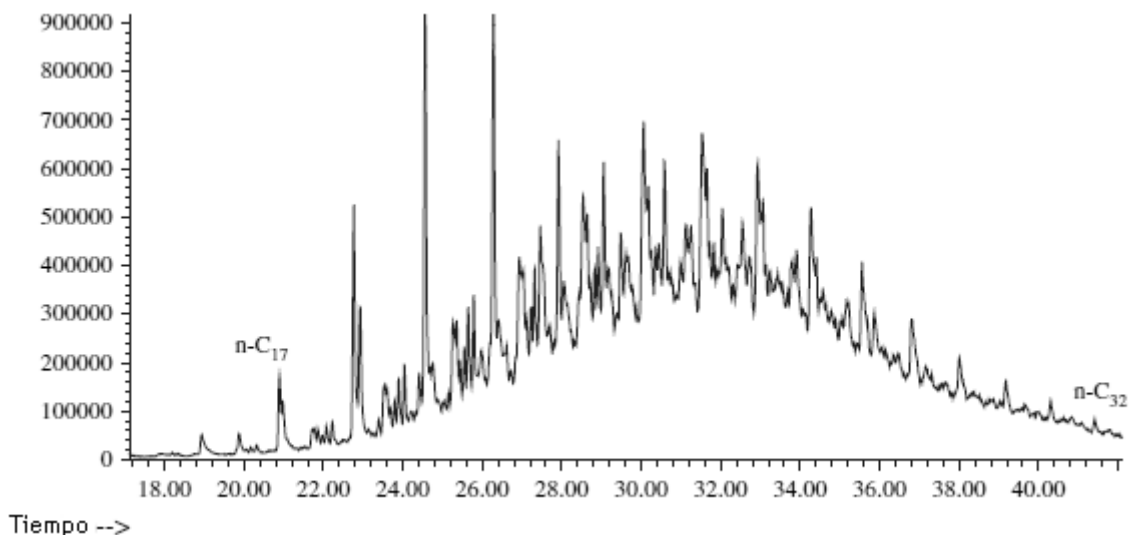


Figura 1.2. Perfil cromatográfico (GC-MS) de un aceite mineral (Menendez-Vega et al., 2007).

1.1.2. Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs)

Los HAPs representan un grupo de compuestos químicos muy diversos formados por dos o más anillos bencénicos fusionados en forma lineal, angular o agrupada. Actualmente se conocen unos 100 tipos diferentes de HAPs, ya que existe una elevada cantidad de isómeros. La especial distribución de electrones en los anillos aromáticos (resonancia) les proporciona una elevada estabilidad, característica que los hace resistentes a la oxidación tanto química como biológica. Debido a su amplia distribución, toxicidad y persistencia han sido considerados agentes contaminantes de gran interés.

Origen y comportamiento de los HAPs en el medio ambiente

En emplazamientos contaminados los HAPs se encuentran habitualmente formando parte de NAPLs (del inglés *Non Aqueous Phase Liquids*) como consecuencia de vertidos de combustibles de origen petrogénico o de productos derivados del carbón (origen pirolítico). Sin embargo, los HAPs se encuentran también ampliamente distribuidos como consecuencia de la contaminación difusa que provoca la combustión incompleta de combustibles o de cualquier material orgánico. Las mezclas de origen pirolítico se encuentran constituidas en su mayor parte por HAPs sin grupos alquilo (Blumer, 1976). Un derivado de este tipo de mezclas es la creosota, que ha sido utilizado para el tratamiento de madera con el objetivo de evitar su deterioro. En mezclas de origen petrogénico, en cambio, predominan los

HAPs alquilados. De hecho, las ratios entre HAPs de ambos tipos se utilizan para distinguir las mezclas pirogénicas de las petrogénicas (Yunker et al., 2002).

El HAP más simple es el naftaleno, incluido en este grupo por razones prácticas, ya que sólo posee dos anillos y por lo tanto no es policíclico en sentido estricto. Con el aumento del número de anillos en la molécula aumenta su hidrofobicidad y recalcitrancia, siendo menos biodisponibles para su biodegradación.

Los HAPs tienden a adsorberse a las superficies de partículas, especialmente a las constituidas por materia orgánica del suelo, lo que dificulta su degradación haciendo que estos compuestos tengan una gran persistencia en condiciones naturales (Singleton, 2005).

En 1979 la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US EPA) incluyó los 16 HAPs de 2 a 6 anillos más frecuentes en su lista de contaminantes de investigación prioritaria (Keith & Telliard, 1979), porque suponen un riesgo para la salud pública (Figura 1.3).

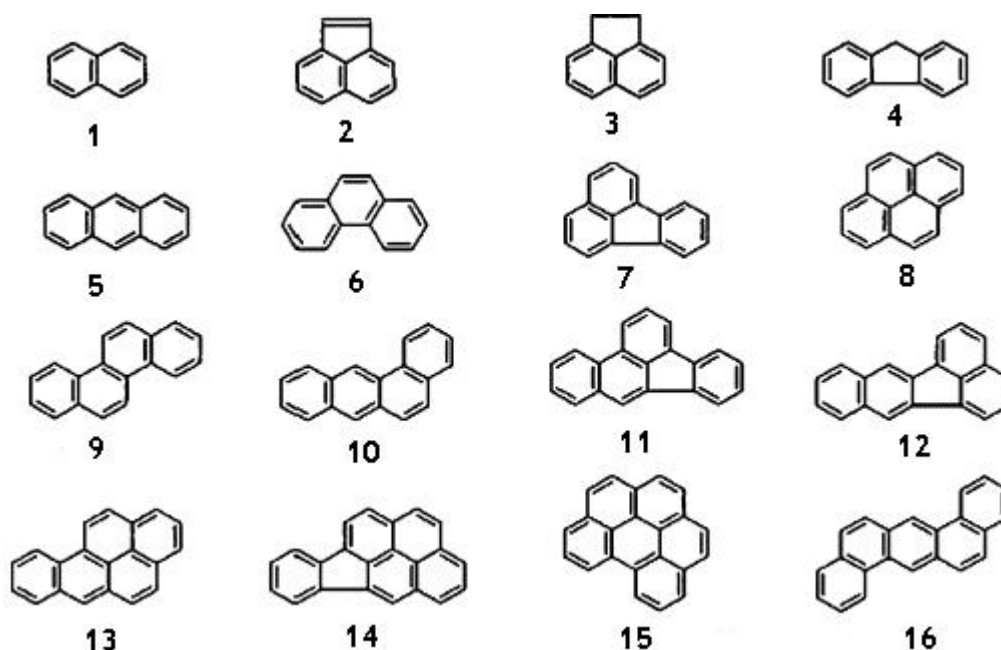


Figura 1.3. Estructura de los 16 HAPs incluidos en la lista de contaminantes prioritarios de la US-EPA: 1: naftaleno, 2: acenaftileno, 3: acenafteno, 4: fluoreno, 5: antraceno, 6:fenantreno, 7: fluoranteno, 8: pireno, 9: criseno, 10: benzo(a)antraceno, 11: benzo(b)fluoranteno, 12: benzo(k)fluoranteno, 13: benzo(a)pireno, 14: indeno(1,2,3-cd)pireno, 15: benzo(g,h,i)perileno, 16: dibenzo(a,h)antraceno.

El comportamiento ambiental de los HAPs está determinado por varios aspectos, como su peso molecular, su configuración estructural, el grado de solubilidad, número de anillos aromáticos, volatilidad y su coeficiente octanol/agua ($\log K_{ow}$) (Harmsen, 2004) (Tabla 1.3). Los HAPs de bajo peso molecular (2 y 3 anillos) son más fácilmente degradables debido a su naturaleza semivolátil y mayor solubilidad (Wild et al., 1995). Por su parte los HAPs de elevado peso molecular (4 o más anillos) presentan una baja solubilidad en agua y se encuentran en suelo asociados principalmente a la materia orgánica, lo que limita notablemente su biodegradación (Howsam et al., 1998).

Tabla 1.3. Propiedades de los 16 HAPs incluidos en la lista de contaminantes de estudio prioritario de la US-EPA.

Compuesto	Nº de anillos	Peso Molecular	Solubilidad en agua (mg/L)	Log k_{ow}	Factor carcinogénico
1 Naftaleno	2	128	31,7	3,37	0,001
2 Acenaftileno	3	152	16,1	4,00	0,001
3 Acenafteno	3	154	3,9	3,92	0,001
4 Fluoreno	3	166	1,8	4,18	0,001
5 Fenantreno	3	178	1,3	4,57	0,001
6 Antraceno	3	178	0,07	4,54	0,01
7 Fluoranteno	4	202	0,26	5,22	0,001
8 Pireno	4	202	0,14	5,18	0,001
9 Benzo[a]antraceno	4	228	0,002	5,91	0,1
10 Criseno	4	228	0,0006	5,91	0,01
11 Benzo [b]fluoranteno	5	252	0,0012	5,80	0,1
12 Benzo[k]fluoranteno	5	252	0,00055	6,00	0,1
13 Benzo[a]pireno	5	252	0,0033	5,91	1
14 Dibenzo[a,h]antraceno	6	278	0,0005	6,75	5
15 Indeno[1,2,3-cd]pireno	6	276	0,062	6,50	0,1
16 Benzo[g,h,i]perileno	6	276	0,00026	6,50	0,01

k_{ow} : equivale a la proporción del número de moléculas que existirían en la fase octanol respecto a la fase agua si utilizáramos una mezcla octanol:agua 1:1 como solvente. (Fuentes: Kästner, 2000; Nisbet & La Goy 1992).

Toxicidad y Ecotoxicidad

Los HAPs pueden persistir en el medio durante largos periodos de tiempo sin modificar sus propiedades tóxicas, con el consecuente riesgo para la salud humana y el ecosistema. Se acumulan en diferentes puntos de la cadena trófica y presentan

toxicidad por inhalación, contacto o ingestión (Eisler, 1987), por lo que su eliminación o contención es esencial para reducir la exposición.

La baja hidrosolubilidad de los HAPs (Tabla 1.3), los convierte en compuestos altamente liposolubles que se adsorben con facilidad a través del tracto gastrointestinal de mamíferos distribuyéndose rápidamente en los tejidos, preferentemente en el tejido adiposo (Twiss et al., 1999). Esto es especialmente cierto para los compuestos de elevado peso molecular como el benzo[*a*]antraceno, criseno, benzo[*b*]fluoranteno, benzo[*k*]fluoranteno, benzo[*a*]pireno, dibenzo[*a,h*]antraceno e indeno[1,2,3-*cd*]pireno, los cuales poseen un potencial carcinogénico y mutagénico, ya que forman aductos con el ADN tras su activación biológica (Goldman, 2001). Entre los 16 HAPs incluidos en la lista de contaminantes de estudio prioritario de la US-EPA, el benzo[*a*]pireno está descrito como uno de los más potentes carcinógenos (Juhász & Naidu, 2000); de hecho, el potencial carcinogénico de los otros HAPs se representa en relación al del benzo[*a*]pireno, como se puede observar en la tabla 1.3. Como consecuencia de exposición prolongada a HAPs se ha descrito un incremento en la incidencia de cánceres de piel, pulmón y vejiga, y de lesiones en riñones e hígado (EPA, 2004).

Se han realizado muchos estudios experimentales en animales, donde se demuestra también la capacidad que poseen estos compuestos para producir cuadros tóxicos agudos. El naftaleno es un inhibidor de la respiración mitocondrial que puede causar una intoxicación aguda en humanos, pudiendo dar lugar a anemia hemolítica y nefrotoxicidad, además de irritaciones en la piel y mucosas (Falahatpishen et al., 2001). El fenantreno puede inducir cambios leves en la cromatina y es un potente inhibidor de la comunicación intracelular (Weis et al., 1998).

Como se ha dicho anteriormente, los HAPs metilados son más abundantes que los no alquilados en las mezclas petrogénicas. En estas mezclas se ha visto que los HAP alquilados representan el grupo principal entre la fracción mutagénica de HAPs de bajo peso molecular (Griest et al., 1979), lo que pone de manifiesto la relevancia de su destino ambiental. De hecho, en estudios con fluoreno, fenantreno y antraceno, estos compuestos resultaron negativos en el ensayo de mutagenicidad de Ames, mientras que sus derivados metilados fueron mutagénicos para *Salmonella typhimurium* TA 100 (LaVoie et al. 1979). Los metilfenantrenos (MP) y dimetilfenantrenos (dMP), presentaron actividad mutagénica que parece depender de la posición de los grupos metilo (LaVoie et al., 1981).

En un trabajo reciente se demuestra claramente la carcinogenicidad y genotoxicidad del 1-metil pireno, que puede ser activado para producir un metabolito genotóxico tanto *in vitro* como en estudios con animales (The MAK Collection for Occupational Health and Safety, 2012).

Los análisis de riesgo en suelos contaminados por lo general se llevan a cabo por medio de determinaciones químicas y físicas, sin embargo el análisis químico por si solo no es suficiente para la evaluación del riesgo biológico (Fernández et al., 2005). Un análisis de riesgo biológico debe integrar los efectos de todos los contaminantes biodisponibles y de su interacción, en el medio ambiente.

En cuanto a la **ecotoxicidad**, se han llevado a cabo pocos estudios con organismos del suelo, y estos solo han utilizado una o pocas sustancias y especies (Sverdrup et al., 2002). En general para los ensayos ecotoxicológicos se seleccionan plantas e invertebrados terrestres (lombrices, colémbolos) en base a su capacidad para medir la toxicidad química, puesto que pueden acumular contaminantes en sus tejidos. La biodisponibilidad es un punto clave en el destino de los contaminantes en ecosistemas y sus efectos sobre las especies individuales y poblaciones (Peijnenburg et al., 2002). Como veremos más adelante, varios autores han descrito que la biodisponibilidad de HAPs está notablemente afectada por las propiedades del suelo y su grado de envejecimiento (Ortega-Calvo et al., 2013). Aunque los HAPs son responsables de la contaminación de una amplia gama de suelos industriales, los datos ecotoxicológicos sobre los suelos contaminados con HAPs son escasos. Los pocos estudios disponibles se han realizado en suelos contaminados con creosota, alquitrán, residuos procedentes de hornos de coque y en suelos procedentes de plantas de gas (Eom et al., 2007).

Se han recomendado bioensayos acuáticos para evaluar la toxicidad de la fracción extraíble con agua de los contaminantes del suelo, la misma que puede poner en peligro las aguas superficiales y subterráneas. Ello incluye ensayos de ecotoxicidad aguda de lixiviados utilizando *Vibrio fischeri* o *Daphnia magna*, y de toxicidad crónica con la microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*. Sin embargo, estas últimas se realizan de forma mucho menos frecuente que las de toxicidad aguda.

1.2. Contaminación del suelo por hidrocarburos del petróleo

1.2.1. Estructura y componentes del suelo

El Real Decreto 9/2005 del Gobierno español define al suelo como un recurso natural, no renovable, que cumple la función de interfase reguladora entre la corteza terrestre (geosfera), el aire (atmósfera) y el agua (hidrosfera). El suelo es el resultado de la descomposición de la roca madre por factores climáticos y la acción de los seres vivos, estando constituido por partículas minerales de meteorización (arena, arcilla, etc.), materia orgánica, agua, aire y organismos vivos, que interactúan entre ellos en un equilibrio dinámico que puede ser modificado por las características intrínsecas de cada uno de ellos (Bardgett, 2005). El suelo ofrece al ser humano posibilidades de efectuar actividades de asentamiento urbano, agropecuarias, forestales, industriales y de recreo, sin embargo, muchas de estas actividades resultan en su sobreexplotación causando daño al medio ambiente.

La composición de los suelos depende del tipo de roca que les da origen, del tipo de organismos que se desarrollan en ellos y de sus condiciones climáticas y topográficas. Según las proporciones de arenas (2-0,05 mm diámetro), limos (50-2 μm de diámetro), arcillas (inferior a 2 μm de diámetro) y materia orgánica, principalmente humus y derivados, existe una gran variedad de tipos diferentes de suelos. Los componentes minerales y la materia orgánica se distribuyen en el espacio generando una estructura porosa (Figura 1.4). Estos poros pueden contener agua o aire, de manera que en el suelo existen tres fases: sólida, líquida y gaseosa. El agua contenida en estos poros contiene sales minerales y nutrientes, constituyendo el medio en el cual se puede desarrollar la actividad metabólica de los microorganismos que lo colonizan. Las oscilaciones en el contenido de agua, habituales en el suelo, pueden por lo tanto afectar dicha actividad. La materia orgánica procede, fundamentalmente, de la vegetación y por lo tanto podemos encontrar concentraciones muy diferentes variando entre suelos muy ricos (bosques) y pobres (desiertos) en materia orgánica. Su descomposición forma el humus bruto que aporta al suelo diferentes minerales y gases: amoníaco, nitratos, fosfatos, etc.; en su mayoría con un pH ácido.

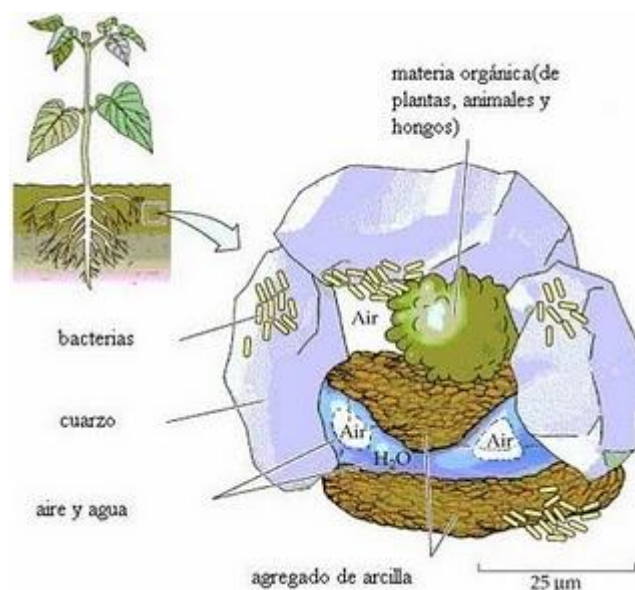


Figura 1.4. Esquema de la disposición espacial de los agregados constituyentes de un suelo.
(Fuente: <http://www.forest.ula.ve/~rubenhg/ecofisiologia/>)

1.2.2. Características de los suelos contaminados

El suelo constituye uno de los medios receptores de la contaminación más sensibles y vulnerables. En la Cumbre de Río, en 1992, se reconoció la importancia de la protección de los suelos y de sus usos potenciales en el contexto de un desarrollo sostenible, en particular contra la contaminación procedente de actividades de origen antrópico. El Real Decreto 9/2005, Artículo 2, define el suelo contaminado como aquel cuyas características han sido alteradas negativamente por la presencia de componentes químicos de carácter peligroso de origen humano en concentraciones que pueden causar un riesgo inaceptable para la salud humana o el medio ambiente.

Las estimaciones generales de la Agencia Europea del Medio Ambiente (EEA) identifican a los metales y aceites minerales como los principales contaminantes del suelo en Europa. Así, los metales, aceites minerales, hidrocarburos aromáticos policíclicos, y hidrocarburos monoaromáticos (benceno, tolueno, etilbenceno y xileno) afectan a casi el 90% de los suelos europeos para los cuales se posee información química, mientras que su contribución relativa puede variar mucho de país a país (EEA, 2007).

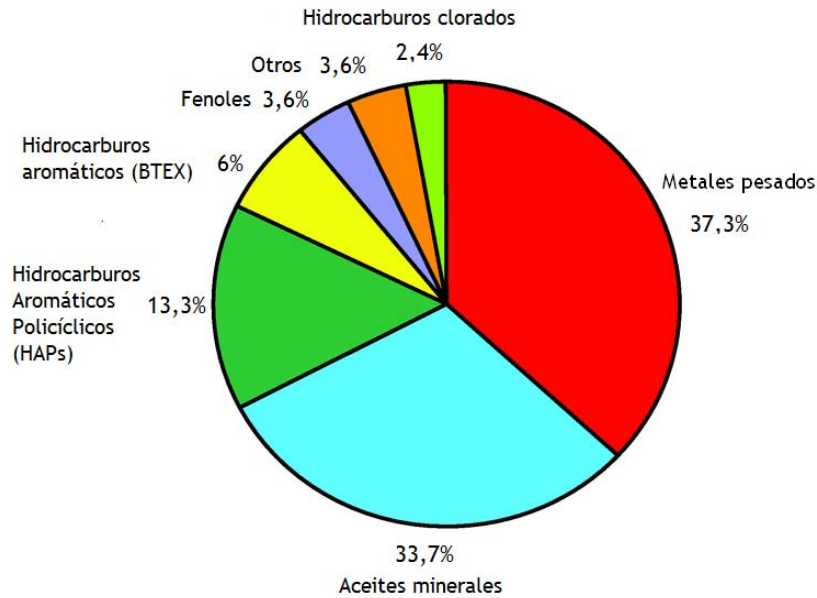


Figura 1.5. Descripción general de los contaminantes que afectan el suelo y las aguas subterráneas en Europa (Fuente: EEA, 2007).

Esta contaminación del suelo puede tener consecuencias importantes en términos de capacidad de los suelos de funcionar. Los suelos pueden dejar de apoyar la vegetación y de producir biomasa y/o dejar de proporcionar materiales valiosos y sustrato a las actividades humanas, los sistemas ecológicos y biológicos. Puede también interrumpirse el ciclo de nutrientes o quedar incapacitado para actuar como filtro, afectando a la hidrosfera y poniendo en peligro los recursos hídricos subterráneos. Esto supone una amenaza para los ecosistemas acuáticos. En los casos de contaminación severa y donde se observan riesgos para la salud humana y/o el medio ambiente, es necesaria la recuperación del suelo (van Straalen, 2002). Del mismo modo es necesario desarrollar tecnologías que nos permitan evaluar la existencia de esa contaminación y monitorizarla a través del tiempo (ensayos análisis químicos, microbiológicos y ecotoxicológicos), así como mitigarla de una forma sostenible (descontaminación). Para evaluar correctamente el impacto potencial de la contaminación, no sólo se debe tener en cuenta su concentración, sino también su comportamiento ambiental.

La industrialización ha causado numerosos problemas de contaminación en suelos y aguas. En el caso de la industria de los hidrocarburos, durante la producción, refinado y posterior utilización de crudos y derivados, se genera gran cantidad de desechos ricos en estos productos que deben ser dispuestos en lugares seguros, como fosas de almacenamiento o tanques especiales, hasta que sean reutilizados o

tratados (Eweiss et al., 1999). Accidentes como la ruptura de tuberías y tanques, o la inadecuada manipulación, transporte y almacenamiento de los productos generados y de sus residuos, ha llevado a la aparición de numerosos emplazamientos contaminados. Estos accidentes impiden el aprovechamiento de los recursos naturales afectados, ya que alteran los procesos productivos o modifican directamente el hábitat de especies y la estética del paisaje natural (Levin y Gealt, 1997, Eweis et al., 1999). Estos emplazamientos presentan riesgos para la salud humana, lo que ha obligado a reforzar los parámetros legales que rigen los niveles de contaminación de acuerdo a cada legislación de cada país.

La contaminación de suelos por hidrocarburos es un problema importante en la mayor parte de los países productores y exportadores de petróleo. Éste es el caso del Ecuador cuya principal fuente de ingresos es la explotación petrolera, significando entre el 43 y el 46% de las exportaciones totales del país en la década actual. Los derrames de petróleo en las zonas de explotación en la Amazonía son comunes, representando un grave perjuicio para las plantas, animales y personas de esta región. Ello ha sido mi principal motivación para la realización de mi Tesis Doctoral en este tema.

1.2.3. Destino ambiental de hidrocarburos

Cuando los hidrocarburos son introducidos en el medio ambiente, en nuestro caso concreto el suelo, estos pueden estar sujetos a distintos fenómenos físicos, químicos y biológicos, que pueden dar lugar a su transformación, eliminación o transporte a otros compartimientos ambientales (Figura 1.6).

Los procesos a que se enfrentan estos contaminantes incluyen la evaporación, dilución, precipitación, reacciones abióticas (hidrólisis, fotooxidación, oxidaciones químicas, etc), biodegradación microbiana, bioacumulación y secuestro. En la mayoría de los casos estos fenómenos tienen como resultado una redistribución de los contaminantes, siendo la degradación microbiana, catalizada por bacterias, algas, hongos y levaduras, el proceso más importante que interviene en la eliminación total o parcial de los contaminantes mediante su mineralización o transformación. Las tecnologías de biorremediación explotan este potencial degradador de las poblaciones microbianas naturales, que son utilizadas como alternativa, o de forma complementaria, a los tratamientos físico-químicos en la descontaminación de suelos, acuíferos, sedimentos y playas.

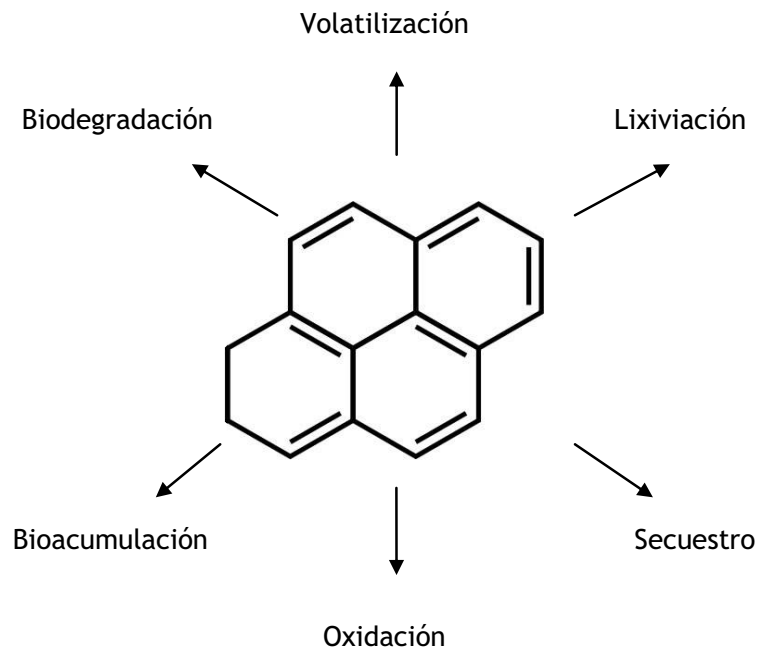


Figura 1.6. Procesos que puede sufrir un contaminante en el ambiente (Adaptado de Semple et al., 2003).

1.3. Biodegradación de hidrocarburos por microorganismos del suelo

Existe un gran número de bacterias y hongos que poseen la capacidad de degradar hidrocarburos. Como se verá, esta Tesis se ha centrado en la degradación aerobia de hidrocarburos del petróleo por bacterias del suelo.

Aunque estudios recientes demuestran la degradación de hidrocarburos alifáticos y aromáticos de bajo peso molecular en condiciones de anaerobiosis y en presencia de aceptores de electrones apropiados (NO_3^- , SO_4^{2-} , CO_2 , Fe^{3+} , algunas moléculas orgánicas, etc.) (Wideel & Rabus, 2001), la degradación en presencia de oxígeno es más rápida y extensa. Los hidrocarburos son utilizados como fuente de carbono para el crecimiento por bacterias heterótrofas con metabolismo respiratorio aeróbico, lo cual implica una degradación gradual de la molécula para formar al final uno o más fragmentos capaces de ingresar en el metabolismo central (Figura 1.7).

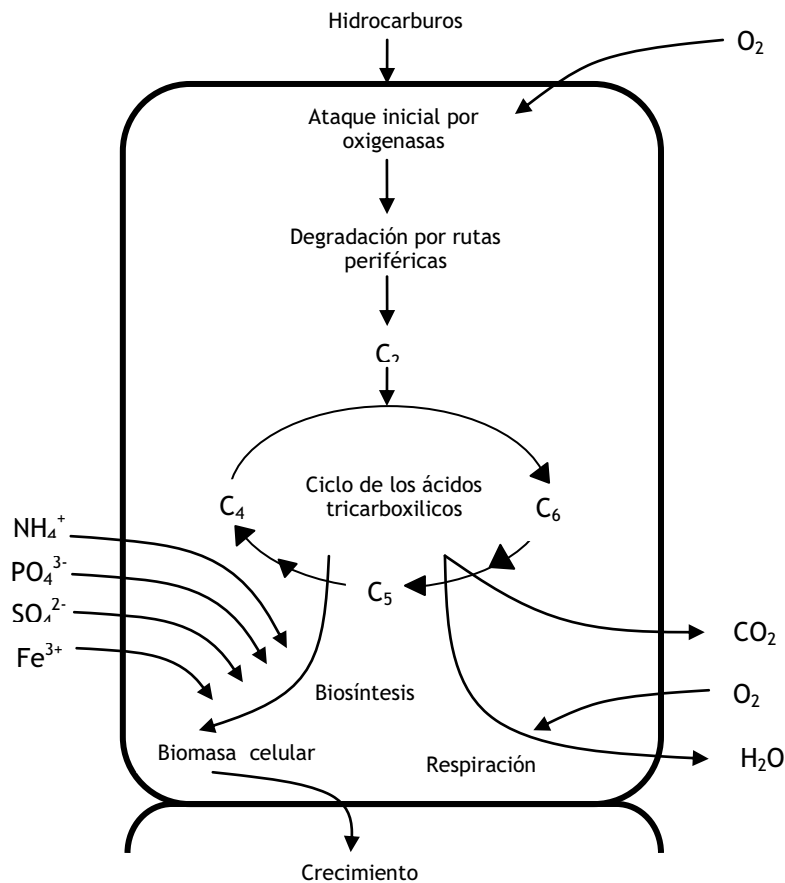


Figura 1.7. Principios generales de la degradación microbiana aerobia de los hidrocarburos asociada a crecimiento (Adaptado de Fritsche & Hofrichter, 2000).

Los procesos implicados pueden resumirse en los siguientes pasos:

- 1) Procesos metabólicos para la optimización del contacto entre las células microbianas y los hidrocarburos. Los hidrocarburos deben ser accesibles para los microorganismos que van a realizar la biodegradación.
- 2) Ataque inicial al sustrato en el interior celular. Se trata de un proceso oxidativo, realizado por enzimas como las oxigenasas y peroxidasas, que activan e incorporan oxígeno al contaminante.
- 3) La degradación por rutas periféricas, que paso a paso, convierten los hidrocarburos en intermediarios del metabolismo central, como por ejemplo del ciclo de los ácidos tricarboxílicos.
- 4) La biosíntesis de biomasa celular a partir de metabolitos precursores como acetil-CoA, succinato o piruvato. Los azúcares requeridos para los procesos biosintéticos y para el crecimiento son sintetizados por gluconeogénesis.

Si la bacteria degradadora posee todos los enzimas necesarios, la utilización de hidrocarburos como fuente de carbono puede conducir a su completa mineralización (conversión de una parte de los elementos que los integran en productos inorgánicos como CO_2 o H_2O). En cambio, a menudo se produce un metabolito intermediario que no es reconocido como sustrato por algunos de los enzimas de la vía, dando lugar a una degradación parcial. Cuando esta transformación no produce carbono para el crecimiento se habla de **cometabolismo**. En general, la degradación parcial y el cometabolismo son producto de la baja especificidad de algunas enzimas presentes en las rutas metabólicas de degradación, y parecen jugar un papel importante en la degradación de contaminantes en el medio ambiente, donde las rutas de degradación probablemente implican a distintas poblaciones de las comunidades microbianas presentes.

Las reacciones enzimáticas clave de la degradación aerobia incluyen oxidaciones catalizadas por oxigenasas (mono y dioxigenasas) y peroxidasas. Las **oxigenasas** son oxidoreductasas que utilizan moléculas de O_2 , para introducir oxígeno en el contaminante desestabilizándolo. Las dioxigenasas incorporan ambos átomos de oxígeno, mientras que las monooxigenasas incorporan únicamente uno y el otro es reducido a agua. La oxigenasas son metaloenzimas que en su mayoría utilizan hierro en su centro activo para ligar el oxígeno molecular y activarlo antes de su transferencia al sustrato durante la catálisis.

1.3.1 Biodegradación aeróbica de hidrocarburos alifáticos

Dentro de los compuestos alifáticos, los *n*-alcanos son los que se degradan más rápidamente en una mezcla de hidrocarburos (Atlas, 1981). Los alcanos son moléculas altamente reducidas con un elevado contenido de carbono y energía, por lo tanto constituyen un buen sustrato para los microorganismos (bacterias, hongos filamentosos y levaduras) (van Beilen et al, 2003; Wentzel et al, 2007). Sin embargo, el metabolismo de los alcanos no es sencillo, esto se debe a que estos compuestos son muy hidrófobos y su solubilidad en agua es extremadamente baja, lo que plantea un problema para su absorción. Su hidrofobicidad y la de varios de los productos generados durante su metabolismo, facilita su acumulación en la membrana citoplasmática, lo que es perjudicial para el microorganismo al alterar la fluidez de misma. Por otro lado, al igual que sucede con todos los hidrocarburos, los alcanos deben ser activados antes de ser metabolizados lo cual es un proceso energéticamente costoso.

Un suelo, arena o sedimento marino típico contiene 10^4 - 10^6 microorganismos degradadores de hidrocarburos por gramo (Rosenberg, 1993), aunque estos valores pueden aumentar considerablemente en sitios contaminados con petróleo (Harayama et al., 2004).

Muchos degradadores de alcanos son bacterias con un metabolismo muy versátil. Sin embargo, en los últimos años se han identificado especies bacterianas muy especializadas en la degradación de hidrocarburos, las cuales son denominadas hidrocarbonoclasticas, que parecen jugar un papel clave en la eliminación de hidrocarburos al menos en ambientes marinos (Harayama et al., 2004; Head et al., 2006; Yakimov et al., 2007). Por ejemplo, la bacteria marina *Alcanivorax borkumensis* puede asimilar alcanos lineales y ramificados, pero es incapaz de utilizar hidrocarburos aromáticos, azúcares, aminoácidos, ácidos grasos y la mayoría de los otros sustratos comunes como fuente de carbono (Schneiker et al., 2006; Yakimov et al., 1998). Los miembros de *Alcanivorax* se encuentran habitualmente en aguas no contaminadas a concentraciones bajas, creciendo probablemente a expensas de los alcanos producidos continuamente por las algas y otros organismos marinos. Sin embargo, tras un derrame de crudo, sus poblaciones se vuelven predominantes desempeñando un papel importante en su biorremediación natural. Observaciones similares se han realizado para otras bacterias hidrocarbonoclasticas degradadoras de alcanos de los géneros *Thalassolituus*, *Oleiphilus* y *Oleispira* (Rojo, 2010). Hasta el momento no se han descrito cepas tan especializadas en suelos.

1.3.1.1 La captación bacteriana de *n*-alcanos

El mecanismo mediante el cual los alcanos entran en la célula no está claro, pero se asume que varía dependiendo de las especies bacterianas, del peso molecular del alcano y de las características físico-químicas del entorno (Wentzel et al., 2007). La solubilidad en agua de los *n*-alcanos disminuye exponencialmente a medida que su peso molecular aumenta (ver Tabla 1.4), de modo que los alcanos con más de nueve átomos de carbono poseen una solubilidad insignificante desde el punto de vista de su absorción por los microorganismos, dificultando su biodegradación. Por lo tanto, la captación directa de moléculas de alcanos en una fase acuosa sólo puede ser considerada para los compuestos de bajo peso molecular, que son suficientemente solubles para asegurar una transferencia de masa adecuada a la célula. En cuanto a los alcanos de cadena media y larga, los microorganismos pueden acceder a ellos mediante la adhesión a gotitas de hidrocarburos (que se ve facilitada por una

superficie celular hidrófoba) o mediante un proceso facilitado por tensioactivos. De hecho, la mayoría de bacterias que degradan *n*-alcanos pueden producir y secretar biotensioactivos de diversa naturaleza química lo cual facilita la emulsión de los hidrocarburos. Estos productos incrementan la superficie expuesta por los compuestos hidrofóbicos a las fases acuosas, sin embargo, en suelos su utilidad para la captación de alcanos es menos evidente (Holden et al., 2002). Para que se produzca una emulsificación eficiente se requiere la producción de cantidades relativamente grandes de surfactantes, lo que implicaría una elevada densidad de población del microorganismo productor.

Tabla 1.4. Solubilidad en agua, a 25°C, de alcanos representativos (Fuente: Rojo, 2010).

<i>n</i> -Alcano	Átomos de carbono	Peso Molecular	Solubilidad (mol L ⁻¹)
Propano	3	44,1	5 x 10 ⁻³
Hexano	6	86,2	1,4 x 10 ⁻⁴
Noneno	9	128,3	10 ⁻⁶
Dodecano	12	170,3	2 x 10 ⁻⁸
Hexadecano	16	226,4	2 x 10 ⁻¹⁰
Eicosano	20	282,6	10 ⁻¹²
Hexacosano	26	366,7	4 x 10 ⁻⁶

1.3.1.2 Vías de degradación de *n*-alcanos

La degradación aeróbica de los alcanos se inicia mediante una monooxigenación en la cadena hidrocarbonada, que en función de la posición en que se produce, da lugar a tres rutas metabólicas distintas: la oxidación terminal, la oxidación subterminal y la ω -oxidación (figura 1.8).

La ruta más habitual es la **oxidación terminal**, en donde una **monooxigenasa** actúa sobre uno de los carbonos terminales de la molécula para formar un grupo alcohol. A continuación, una **alcohol deshidrogenasa** produce un aldehído que es convertido a ácido graso por acción de una **aldehído deshidrogenasa**. Estos ácidos grasos, mediante la ruta de la β -oxidación, pueden incorporar su carbono al metabolismo central. En la ruta de la **ω -oxidación**, el ácido graso producido después de oxidación terminal no es degradado directamente mediante β -oxidación, si no que antes sufre una segunda monooxigenación en el carbono terminal del extremo opuesto de la cadena. Por último, la **vía de oxidación subterminal** comienza con la formación de un alcohol secundario que mediante deshidrogenación da lugar a una cetona subterminal, que sufre un segundo ataque monooxigénico (reacción biológica de Baeyer-Villiger) para formar un éster que facilita la ruptura de la cadena. La

citocromo P450 solubles que son activas contra alcanos intermedios (C_5 - C_{11}). Finalmente varias cepas que asimilan alcanos con más de 18 átomos de carbono, contienen alcano hidroxilasas que no parecen tener relación con las enzimas anteriores y que solo recientemente han comenzado a caracterizarse (Rojo, 2010).

Algunas levaduras que asimilan alcanos realizan su ataque inicial mediante enzimas pertenecientes a la familia de las **citocromo P450 microsomales**. La implicación de levaduras en la degradación de alcanos en emplazamientos contaminados puede ser más importante de lo que se había creído inicialmente (Schmitz et al, 2000).

Tabla 1.5. Clases de enzimas implicadas en la hidroxilación inicial de alcanos (Adaptado de van Beilen y Funhoff, 2007; van Beilen et al, 2003).

Clase de enzima	Características	Tamaño del sustrato	Huésped
PMR, propano monooxigenasa	Monooxigenasa hierro no-hemo similar a MMOs	C_3	Bacterias
BMOs, butano monooxigenasa	Monooxigenasa hierro no-hemo similar a MMOs	$C_2 - C_9$	Bacterias
BMOp, butano monooxigenasa	Monooxigenasa que contiene cobre	$C_2 - C_9$	Bacterias
CYP153	Citocromo P450 soluble	$C_5 - C_{12}$	Bacterias
CYP52	Citocromo P450 unida a la membrana	$C_{10} - C_{16}$	Levaduras
Relacionadas con Alk B	Monooxigenasa hierro no-hemo	$C_3 - C_{13}$ ó $C_{10} - C_{20}$	Bacterias
AlmA	Monooxigenasa flavin- <i>binding</i>	$C_{20} - C_{30}$	Bacterias
LadA	Monooxigenasa termofílica flavin-dependiente	$C_{10} - C_{30}$	Bacterias
Dioxigenasa	Dioxigenasa cobre flavin-dependiente	$C_{10} - C_{30}$	Bacterias

Alcano hidroxilasas relacionadas con metano monooxigenasas

Varias cepas bacterianas que pueden crecer en alcanos gaseosos C_2 - C_4 , pero no con metano, poseen alcano hidroxilasas relacionadas con la **metano monooxigenasa**. Por otro lado, existen dos tipos distintos de metano monooxigenasas. Todos los metanotrofos producen una metano monooxigenasa unida a membrana (MMOp) que oxida un rango pequeño de alcanos, pero algunos producen además una metano

monooxigenasa soluble (MMOs), que es activa frente a un rango más amplio de sustratos y que oxida alcanos de C_1 - C_7 a sus correspondientes alcoholes. *Pseudomonas butanovora* puede crecer con alcanos C_2 - C_4 mediante la oxidación secuencial del grupo terminal metilo del hidrocarburo. La primera enzima de esa vía es una monooxigenasa similar a la MMOs que puede hidroxilar alcanos C_2 - C_9 . Enzimas similares se han encontrado en cepas de *Gordonia*, *Mycobacterium* y *Pseudonocardia* degradadoras de propano (Ramos et al, 2010).

La familia de alcano hidroxilasas AlkB

La vía de degradación de alcanos más ampliamente caracterizada es la codificada por el plásmido OCT de *P. putida* GPo1 (anteriormente *Pseudomonas oleovorans* GPo1), que se ha convertido en el sistema modelo. La primera enzima de esta ruta es una monooxigenasa con dihierro no-hemo ligada a membrana denominada **AlkB** que hidroxila los alcanos en posición terminal y que requiere dos proteínas solubles de transferencia de electrones, una rubredoxina (AlkG) y una rubredoxina reductasa (AlkT). La rubredoxina reductasa, mediante su cofactor FAD, transfiere electrones desde el NADH a la rubredoxina, que a su vez los transfiere a AlkB (Figura 1.9).

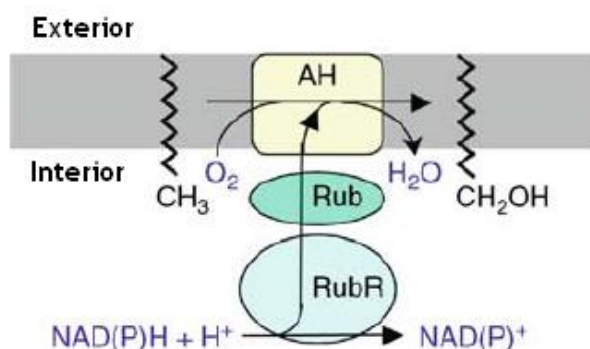


Figura 1.9. Oxidación de *n*-alcanos por alcano hidroxilasas pertenecientes a la familia AlkB. AH, alcano hidroxilasa integrada en la membrana; Rub, rubredoxina; RubR, rubredoxina reductasa. La barra gris representa la membrana citoplasmática, la capa de fosfolípidos hacia el citoplasma está marcada como "interior" (Adaptado de Rojo, 2010).

Aunque no se dispone de la estructura cristalina de AlkB, se ha podido deducir que posee seis segmentos transmembranales y un centro catalítico en el citoplasma. Este centro catalítico incluye cuatro secuencias motivo con histidinas, que se hallan conservadas en otras hidrocarburo-monooxigenasas, y dos átomos de hierro quelados (Figura 1.10).

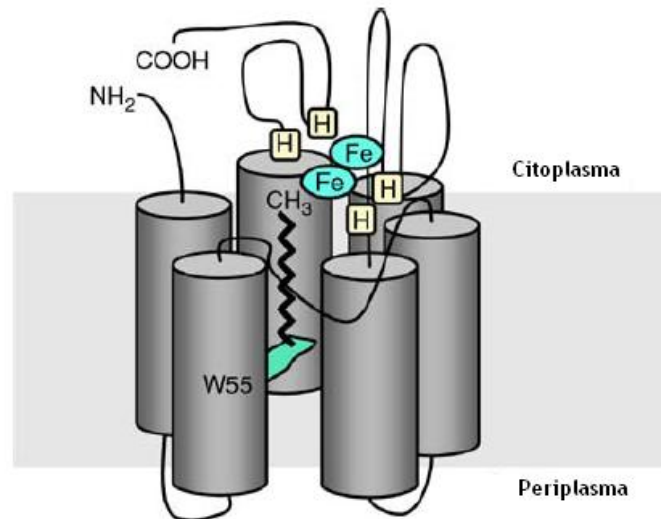


Figura 1.10. Modelo propuesto para la estructura de la alceno hidroxilasa AlkB unida a la membrana de *P. putida* GPo1. La barra gris representa la membrana citoplasmática. Los cuatro grupos de histidina (H) se cree que sirven para unir los dos átomos de hierro (Fe) en el centro catalítico. Adaptado de van Beilen et al., 2005b; Rojo, 2005.

El cluster de dihierro permite la activación dependiente de oxígeno de las moléculas de alceno a través de un radical intermedio. Uno de los átomos de la molécula de O₂ es transferido al grupo metilo terminal del alceno, convirtiéndolo en alcohol, mientras que el otro es reducido a H₂O por los electrones transferidos por la rubredoxina. La oxidación es regio-estereoespecífica. La AlkB de *P. putida* GPo1, puede oxidar propano, *n*-butano, así como alquenos de C₅ - C₁₃, que pueden servir para el crecimiento, mientras que el metano, etano y alquenos con más de 13 carbonos no pueden ser utilizados.

Actualmente se conocen más de seis homólogos de AlkB que han sido encontrados tanto en microorganismos Gram-positivos como Gram-negativos, y que presentan una alta diversidad de secuencias. Sin embargo, solo unas pocas de esas enzimas pueden oxidar alquenos de C₅ -C₁₃, como lo hace *P. putida* GPo1, el resto de enzimas de esta familia prefiere alquenos mayores de entre 10 y 20 carbonos.

Citocromo P450 monooxigenasas

Las citocromo P450 son proteínas con un grupo hemo unido a cisteína mediante su tiolato que catalizan la oxigenación de un gran número de compuestos. Se encuentran propagadas entre todos los reinos y pueden ser agrupadas en más de 100 familias en base a su similitud de secuencias. La mayoría de los P450 eucariotas son

enzimas unidas a la membrana, mientras que la mayoría de los P450 procariotas son solubles. Varias cepas bacterianas que degradan alcanos C_5 - C_{10} contienen alcano hidroxilasas que pertenecen a una familia específica de monooxigenasas citocromo P450 solubles. El primer miembro caracterizado de esa familia fue **CYP153A1** de *Acinetobacter sp.* EB104 (Maier et al., 2001), pero se han encontrado enzimas similares en diversas cepas de micobacterias, rhodococos y proteobacterias (Sekine et al, 2006; van Beilen et al., 2005a, 2006). Estas enzimas citocromo P450 requieren de la presencia de una ferredoxina y de una ferredoxina reductasa que transfieran electrones de NAD(P)H al citocromo (Figura 1.11).

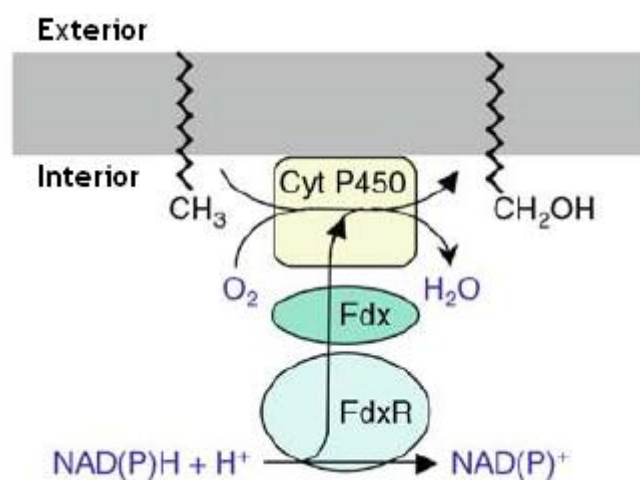


Figura 1.11. Oxidación de *n*-alcanos por alcano hidroxilasas pertenecientes a la familia bacteriana de las citocromo P450. Cyt P450, citocromo P450 soluble; Fdx, ferredoxina; FdxR, ferredoxina reductasa. La barra gris representa la membrana citoplasmática, la capa de fosfolípidos hacia el citoplasma está marcada como "interior" (Adaptado de Rojo, 2010).

Ensayos de complementación mostraron que muchas de estas proteínas del citocromo P450 pueden sustituir funcionalmente a AlkB de *P. putida* GPo1, demostrando que son verdaderas alcano hidroxilasas (van Beilen et al., 2006). El citocromo P450 purificado de *Mycobacterium sp.* HXN-1500 hidroxila alcanos de C_6 - C_{11} a 1-alcánolos con alta afinidad y regioselectividad (Funhoff y col., 2006).

Como se ha mencionado anteriormente varias levaduras pueden asimilar alcanos. En los casos estudiados, las enzimas involucradas en la oxidación inicial de la molécula de alcano son enzimas citocromo P450 de la familia CYP52 unidas a la membrana (Rojo, 2010).

Alcano hidroxilasas de n-alcanos de cadena larga

Se han descrito varias cepas bacterianas capaces de asimilar alcanos con más de 20 carbonos (Wentzel et al., 2007). Las enzimas responsables de la oxidación de tales alcanos, que son sólidos a temperatura ambiente, no se encuentran muy bien caracterizadas.

En *Acinetobacter* sp. M1, que puede crecer en alcanos C₁₃-C₄₄, se han detectado varias enzimas que pueden oxidar estos compuestos. Dos de ellas, llamadas AlkMa y AlkMb, están relacionadas con AlkB de *P. putida* GPo1 y están unidas a la membrana (Tani et al., 2001). En cambio, una tercera enzima soluble, que requiere Cu²⁺, no recibe electrones de NADH y no está claramente relacionada con la familia de las hidroxilasas AlkB (Maeng et al., 1996). Se ha propuesto que es una dioxigenasa que oxida alcanos de C₁₀-C₃₀, que genera hidroperóxidos de *n*-alquilo que darían lugar a su correspondiente aldehído.

Otra cepa de *Acinetobacter*, DSM 17874, que crece en alcanos C₁₃-C₄₄, también contiene al menos tres enzimas oxidantes de alcanos. Dos de ellos son parálogos de AlkB similares a las enzimas AlkMa y AlkMb descritas anteriormente y pueden oxidar alcanos de C₁₀-C₂₀ (Trono-Holst et al., 2006). Una tercera enzima oxida alcanos de C₂₀ hasta mayores de C₃₂. Su gen, designado *alma*, ha sido identificado y codifica para una monooxigenasa de unión a flavina (Trono-Holst et al., 2007). Han sido identificados genes homólogos de *alma* en varias cepas degradadoras de *n*-alcanos de cadena larga, incluyendo *Acinetobacter* M1. De hecho, en el genoma de *Alkanivorax borkumensis* SK2 se detectaron dos genes similares a *alma*.

En la bacteria termófila *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 se ha identificado una hidroxilasa de alcanos de cadena larga (C₁₅-C₃₆) distinta que se ha denominado **LadA** (Feng et al., 2007) y que pertenece a la familia de proteínas de la luciferasa bacteriana, que son oxigenasas dependientes de flavina de dos componentes (Li et al., 2008).

Finalmente, se han descrito varias cepas bacterianas capaces de degradar alcanos con más de 20 carbonos, cuyos sistemas enzimáticos no han sido caracterizados.

Algunas cepas bacterianas, como es el caso de *P. putida* GPo1, contienen sólo una alcano hidroxilasa. Sin embargo, como hemos visto, es bastante común encontrar cepas que contienen más de un sistema de oxidación de alcanos. En la mayoría de los casos, estas enzimas de oxidación de alcanos poseen distintos sustratos o diferentes patrones de inducción. *Alkanivorax borkumensis* SK2, especializada en la asimilación

de alcanos, posee dos alcano hidroxilasas relacionadas con AlkB y dos genes que codifican para citocromos P450 que se cree que están implicados en la degradación de alcanos, uno de los cuales está duplicado (Hara et al, 2004; Sabirova et al, 2006; Schneiker et al, 2006; van Beilen et al, 2004). Igualmente mencionado anteriormente esta cepa posee también dos genes que codifican para alcano hidroxilasas similares a *almA* (Trono-Holst et al., 2007).

La presencia de múltiples alcano hidroxilasas no está restringida a especies hidrocarbonoclásticas, pudiéndose encontrar en cepas con metabolismo versátil. Por ejemplo, las cepas de *P. aeruginosa* PAO1 y RR1 contienen dos alcano hidroxilasas relacionadas con AlkB que están reguladas de forma diferente, o como ya hemos visto, *Acinetobacter sp.* DSM17874 y otras cepas de este género, poseen por lo menos tres enzimas de oxidación de alcanos. Ejemplos similares se han observado también en actinobacterias de los géneros *Mycobacterium*, *Nocardioides* o *Rhodococcus*, donde se ha detectado la presencia de alcano hidroxilasas similares a AlkB y citocromos P450 de la familia CYP153 (van Beilen et al., 2006), que presentan la capacidad de oxidar compuestos de distintos rangos de tamaño. Esta coexistencia de distintos genes de oxidación de alcanos, a menudo altamente divergentes, sugiere mecanismos de transferencia horizontal. De hecho, varios de estos genes han sido encontrados en transposones o en plásmidos. Es interesante señalar que los dos genes *AlkB* de *A. borkumensis* SK2 se encuentran en sitios separados de su genoma que probablemente fueron adquiridos de un antepasado del linaje de *Yersinia*, y que fueron más tarde transferidos de *Alkanivorax* a *Pseudomonas* (Reva et al., 2008).

1.3.1.4 Degradación de alcanos de cadena ramificada

Como ya se ha comentado, la degradación de alcanos de cadena ramificada es más difícil que la de *n*-alcanos lineales. A pesar de esto, existen varias cepas bacterianas que pueden degradar alcanos ramificados simples como el isooctano (Solano-Serena et al., 2004), o compuestos mucho más complejos como el pristano (Watkinson & Morgan, 1990).

Los miembros de *Alkanivorax* pueden degradar alcanos ramificados tales como pristano y fitano, una propiedad que parece proporcionarles una ventaja competitiva en el agua de mar contaminada con petróleo (Hara et al., 2003). Las vías metabólicas responsables para la asimilación de alcanos ramificados están menos caracterizadas que las de *n*-alcanos, y pueden implicar una ω - o β -oxidación de la molécula de

hidrocarburo (Watkinson y Morgan, 1990). En nuestro laboratorio se dispone de una cepa de *Gordonia amicalis* degradadora de alcanos de cadena larga (resultados no publicados) y otra de *Mycobacterium gilvum* degradadora de pireno (Vila et al., 2001) que degradan tanto pristano como fitano y que fueron aisladas de arena de playa.

1.3.2. Biodegradación aeróbica de HAPs

A pesar de su elevada estabilidad, la capacidad de degradar compuestos aromáticos se ha descrito en una gran variedad de microorganismos, entre ellos bacterias y hongos capaces de degradar compuestos de entre 1 a 5 anillos aromáticos (Cerniglia, 1992; Kanaly & Harayama 2000). La degradación aeróbica de HAPs es generalmente iniciada por la acción de dioxigenasas multicomponente que catalizan la incorporación de dos átomos de oxígeno y dos electrones desde el NADH para formar *cis*-dihidrodióles. Estas dioxigenasas generalmente consisten en una reductasa, una ferredoxina y una proteína que contiene hierro y azufre que catalizan la formación de intermediarios dihidroxilados, que son posteriormente degradados mediante la ruptura del anillo y la eventual formación de intermediarios del ciclo del ácido cítrico. En bacterias, los HAPs puede ser metabolizados también por citocromo P450 monooxigenasas para formar *trans*-dihidrodióles, aunque esta actividad es generalmente menor que la actividad dioxigenasa en el mismo organismo (Heitkamp et al., 1988a; 1988b; Kelley et al., 1990).

La degradación microbiana de los HAPs depende de su tasa de captación celular y de su metabolismo. Se conoce poco sobre como los HAPs atraviesan las membranas bacterianas para alcanzar las enzimas catabólicas presentes en el citoplasma. Los mecanismos descritos incluyen tanto difusión pasiva como una captación dependiente de energía que se activaría durante el crecimiento con HAPs como única fuente de carbono (Neher & Lueking, 2009).

1.3.2.1. Vías de degradación de HAPs

Debido a su elevada estabilidad química, la activación del anillo aromático es esencial para que se pueda producir su ruptura en fragmentos que sean más fácilmente metabolizables. Como se ha mencionado, las mono y dioxigenasas (dioxigenasas hidroxilantes de anillo, RHDs) catalizan reacciones de hidroxilación que

activan el anillo aromático mediante la adición de átomos de oxígeno molecular a uno o más átomos de carbono del sustrato (Figura 1.12).

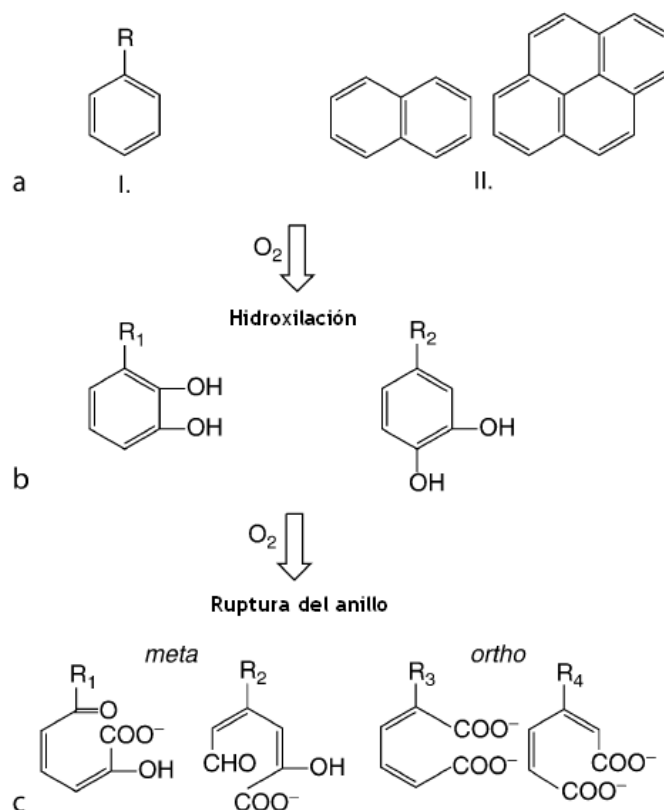


Figura 1.12. Estructuras químicas de hidrocarburos aromáticos representativos y de sus productos intermedios de degradación. (a) Ejemplos de hidrocarburos aromáticos que son sustratos de reacciones catalizadas por mono y dioxigenasas. I. Hidrocarburos aromáticos mono- y bicíclicos, R = H, benceno; CH_3 , tolueno; C_6H_5 , bifenilo. II. Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), naftaleno y pireno. (b) Sustratos comunes para la ruptura de anillos resultado de su hidroxilación por mono- y dioxigenasas. $R_1 = H$, catecol; CH_3 , 3-metil catecol; C_6H_5 , bifenilo 2,3-dihidroxi. $R_2 = :$ CH_3 , 4-metil catecol; COO^- , protocatecuato. (c) Intermediarios comunes de la ruptura de anillo extradiólica (*meta*) e intradiólica (*orto*) catalizadas por dioxigenasas. $R_1 = :$ H, 2-hidroxi-6-oxo-hexa-2,4-dienoato de etilo; CH_3 , 2-hidroxi-6-oxo-hepta-2,4-dienoato de etilo; C_6H_5 , 2-hidroxi-6-oxo-6-fenilhexa-2,4-dienoato de etilo. $R_2 = :$ CH_3 , 2-hidroxi-4-metil-6-oxo-hexa-2,4-dienoato de etilo; COO^- , 2-hidroxi-4-carboxi-6-oxohexa-2,4-dienoato de etilo. $R_3 = :$ H, *cis*, *cis*-muconato. $R_4 = COO^-$, 3-carboxi-*cis*, *cis*-muconato.

Tras esta hidroxilación inicial, los compuestos resultantes, que contienen dos sustituyentes hidroxilo en posiciones vecinales, sirven de sustrato para el ataque de dioxigenasas de ruptura de anillo, que producen una ruptura del enlace C-C, ya sea entre los carbonos hidroxilados (ruptura *orto*) o entre un carbono hidroxilado y uno no hidroxilado (ruptura *meta*). Las rutas para la degradación de una gran variedad de compuestos aromáticos convergen mediante la canalización de los productos

resultantes hacia la producción de unos pocos intermediarios monoaromáticos, sobre todo catecoles y protocatecuato (o sus derivados metilados), que son subsecuentemente degradados a intermediarios del metabolismo central que entran en el ciclo de los ácidos tricarbónicos o se utilizan para la biosíntesis (Fuchs, 1999).

1.3.2.2. Dioxigenasas dihidroxilantes del anillo aromático (RHDs)

Las RHDs catalizan la oxidación de anillos aromáticos mediante la adición de ambos átomos del oxígeno molecular a dos átomos de carbono adyacentes. Esta reacción, requiere dos electrones y sus productos son dihidrodioles en disposición *cis*, ya que ambos grupos hidroxilo están situados en el mismo lado del plano formado por los carbonos en el anillo. Ejemplos bien caracterizados de estas enzimas son las tolueno, naftaleno y bifenilo dioxigenasas, muy similares en tamaño, composición y estructura molecular.

Como ya se ha comentado, se trata de enzimas multicomponentes que constan de tres dominios distintos, que son solubles y no están vinculados a la membrana. El centro activo se ubica en un dominio hidroxilasa, mientras que una reductasa y una ferredoxina se encargan de transferir electrones a la hidroxilasa procedentes de un NADH. La reductasa es una flavoproteína que contiene FAD como centro redox y que oxida el NADH transfiriendo los electrones a la ferredoxina, una proteína de bajo peso molecular que contiene un centro redox hierro-azufre [2Fe-2S] de tipo de Rieske. Los iones de hierro de las proteínas Rieske [2Fe-2S] contienen dos ligandos cisteína y dos histidina, en contraposición a las ferredoxinas de tipo vegetal que contienen cuatro ligandos de cisteína (Cammack, 1992). La ferredoxina reducida transfiere los electrones a la hidroxilasa, que contiene sitios de unión para el oxígeno molecular y el substrato aromático. La reductasa de la naftaleno dioxigenasa es algo diferente a la de las otras dioxigenasas, porque contiene un centro de hierro-azufre similar a los de origen vegetal, además de FAD.

El componente catalítico de la hidroxilasa se compone de una subunidad grande (α) (aprox. 50 kDa) y una subunidad pequeña (β) (aprox. 20 kDa), estrechamente asociadas una a la otra en una estructura cuaternaria $\alpha_3\beta_3$. La estructura cristalina de la hidroxilasa de la naftaleno dioxigenasa de la cepa *Pseudomonas* sp. NCIB 9816-4 revela que las seis subunidades interactúan.

La subunidad α contiene un centro redox Rieske [2Fe-2S] que acepta electrones de la componente ferredoxina y los transfiere a un núcleo de hierro mononuclear no-hemo, también situado en la subunidad α (Figura 1.13).

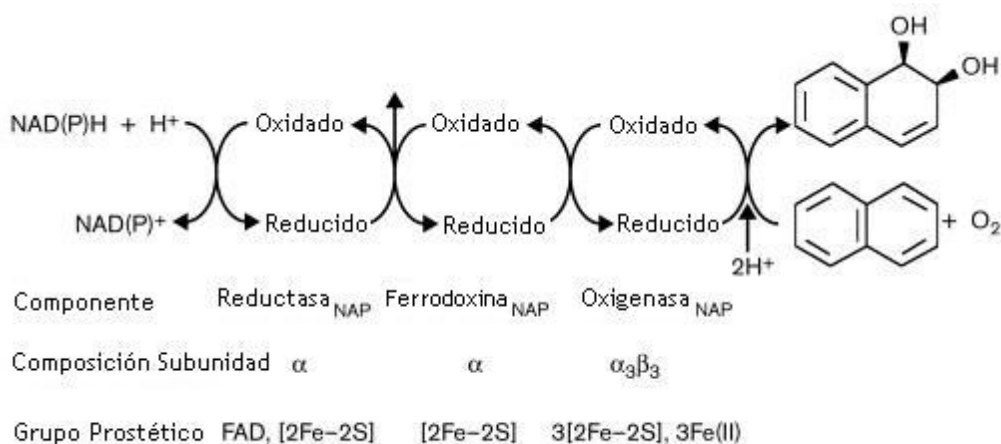


Figura 1.13. Organización de los componentes del sistema de la naftaleno dioxigenasa de *Pseudomonas* sp. NCIB 9816-4 (Adaptado de Gibson & Parales, 2000).

El mecanismo catalítico de la dihidroxilación de anillos aromáticos no se conoce en detalle, basándose el conocimiento actual en el estudio de las naftaleno, benzoato y ftalato dioxigenasas (Kovaleva et al., 2007). El hierro ferroso mononuclear de la subunidad α , que tiene un aspartato y dos histidinas como ligandos, es el que se une y activa el oxígeno molecular. Esta activación implica la formación de un intermediario que ataca a dos átomos de carbono adyacentes del anillo aromático, dando lugar a un *cis*-dihidrodiol como producto (Figura 1.14). Esta reacción consume dos electrones que son suministrados por la reductasa y la ferredoxina. Se cree que la subunidad β está involucrada en el mantenimiento de la estructura y/o interacción proteína-proteína con la ferredoxina. A pesar de ello, considerando que las estructuras cristalinas de la bifenilo dioxigenasa de *Sphingobium yanoikuyae* B1 y de la dioxigenasa hidroxilante de anillo de *Sphingomonas* sp. CHY-1, capaces de oxidar hidrocarburos aromáticos policíclicos de hasta cinco anillos aromáticos fusionados, son muy similares a la de la naftaleno dioxigenasa, estos mecanismos podrían ser comunes para las distintas dioxigenas dihidroxilantes (Ferraro et al, 2007.; Jakoncic et al., 2007).

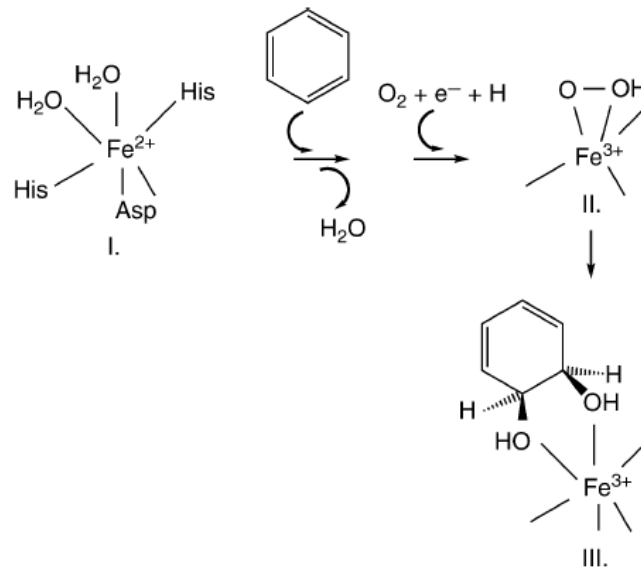


Figura 1.14. Mecanismo catalítico propuesto para las dioxigenasas hidroxilantes de anillos aromáticos. I. Estado de descanso del hierro mononuclear ferroso en el centro activo del componente hidroxilasa; II. Centro activo de hierro después de la unión del sustrato aromático, oxígeno molecular y la transferencia de un electrón desde el centro Rieske; III. *cis*-dihidrodiol atado producido por la adición de dos átomos de oxígeno en el anillo (Kovaleva & Lipscomb, 2008).

Clasificación de las RHDs

Actualmente se conocen más de 1300 tipos de RHDs, que se distribuyen en varios taxones tanto de bacterias Gram-positivas como Gram-negativas. En general, su identificación se ha realizado en base a la similitud de sus secuencias con las compiladas en la base de datos del NCBI. Todas ellas comparten características estructurales comunes, incluyendo la estructura cuaternaria y residuos conservados en el dominio Rieske y el dominio catalítico de la subunidad alfa, implicados en la unión de los centros metálicos. Sin embargo, difieren considerablemente en términos de secuencia de aminoácidos y de la estructura de los transportadores de electrones asociados. En 1992, Batie y colaboradores, propusieron una clasificación de las dioxigenasas en base al número de transportadores de electrones asociados y a la naturaleza de sus centros redox. Se definieron tres clases: Clase I, que correspondía a sistemas enzimáticos de dos componentes (reductasa y oxigenasa terminal), como la ftalato dioxigenasa de *Burkholderia cepacia*; Clase II, que incluía sistemas de tres componentes, con una reductasa con FAD como grupo prostético, y una ferredoxina [2Fe-2S], como la bifenil dioxigenasa; y Clase III, que comprendía sistemas enzimáticos de tres componentes en que la reductasa contenía tanto FAD como un grupo [2Fe-2S], representada por la naftaleno dioxigenasa. Sin embargo más tarde se

identificaron nuevas RHDs que no encajaban en esta clasificación, como la carbazol dioxigenasa de *Pseudomonas sp.* CA10 (Sato et al., 1997), y enzimas de tres componentes en los que la ferredoxina contiene un grupo [3Fe-4S].

Por lo tanto, Nam y colaboradores (2001) propusieron una clasificación alternativa basada en la similitud entre las secuencias de aminoácidos de las subunidades α de los componentes hidroxilasa. De acuerdo a este criterio filogenético, las RHDs se organizaron en cuatro familias de proteínas, cada una de las cuales correspondía a tipos de enzimas con especificidades de sustrato similares (Tabla 1.6).

Tabla 1.6. Clasificación de las RHDs propuesta por Nam y colaboradores (2001).

Familia	Representantes
Tipo I	Hidroxilasas compuestas solo de subunidades α , muy distintas de otras dioxigenasas en secuencia de AA y rango de sustratos
Tipo II	Benzoato/toluato dioxigenasas
Tipo III	Naftaleno y HAP dioxigenasas
Tipo IV	Bifenil y tolueno dioxigenasas

Este sistema de clasificación posee la ventaja de permitir clasificar nuevas oxigenasas a partir de su secuencia de nucleótidos aunque se desconozcan los transportadores de electrones asociados. Esta situación se da en genomas bacterianos en que los genes catabólicos están dispersos, y, sobre todo cuando los genes de los componentes hidroxilasa no se encuentran adyacentes a los de los transportadores de electrones, por ejemplo, en *Mycobacterium* y en *Sphingomonadaceas*.

Más recientemente se ha propuesto una nueva clasificación en la que se tienen en cuenta las secuencias de los transportadores de electrones asociados (Kweon et al., 2008). Además de las 4 clases propuestas por Nam, esta clasificación contempla una clase V que incluye genes de dioxigenasas descritos en Gram-positivos con ferredoxinas [3Fe-4S].

Genética y diversidad de RHDs en bacterias Gram-negativas

Los genes responsables de la degradación de HAPs, fueron estudiados por primera vez en cepas de *Pseudomonas* aisladas en medios de cultivo con naftaleno como única fuente de carbono.

Los genes de degradación del naftaleno generalmente se agrupan en dos operones estrechamente asociados y localizados en un plásmido específico, tal como se describió inicialmente para el plásmido NAH7 de *P. putida* G7 (Figura 1.15). El operón superior codifica para la naftaleno dioxigenasa (*nahAaAbAcAd*), así como para las enzimas que catalizan la posterior oxidación del naftaleno hasta salicilato (*nahABFCQED*). El operón inferior, llamado operón *sal* (*nahGTHINLOMKJ*), codifica para las enzimas implicadas en la conversión del salicilato a intermediarios del ciclo de Krebs. Entre los dos operones, y orientado en dirección opuesta, se encuentra el gen *nahR*, que codifica para un regulador transcripcional de tipo LysR, que controla la expresión de ambos operones.

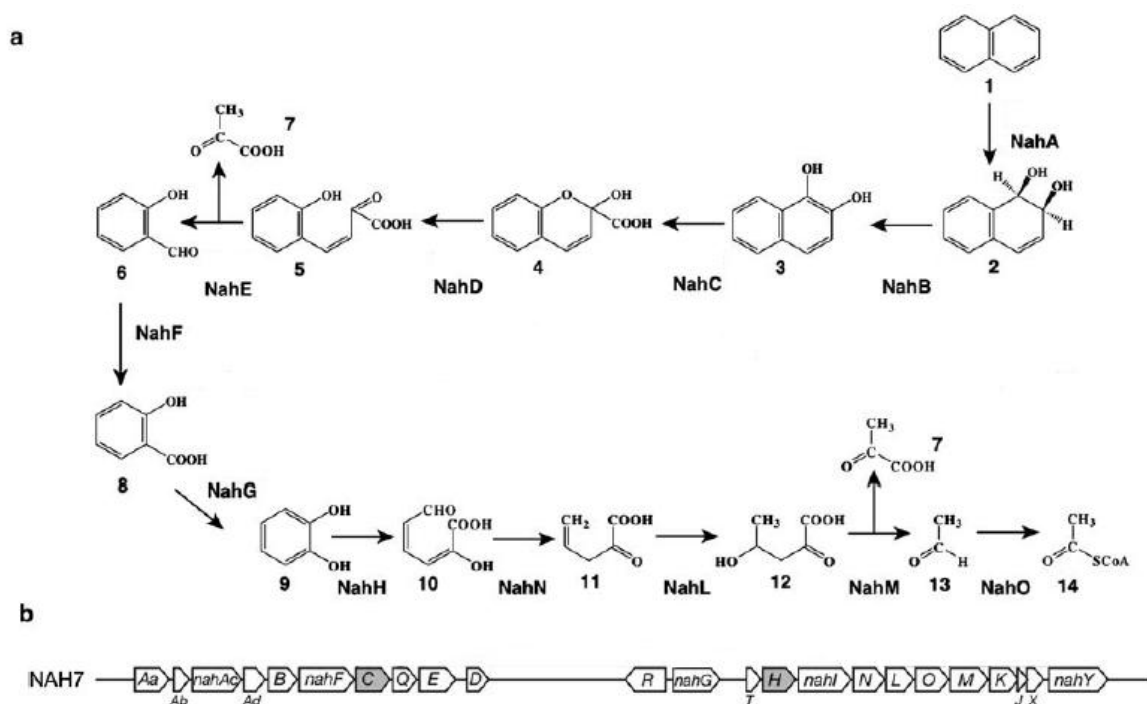


Figura 1.15. Ruta catabólica y organización de los genes de degradación del naftaleno codificados en NAH7 en *P. putida*. (a) Reacciones enzimáticas, Enzimas: NahA, naftaleno dioxigenasa; NahB, *cis*-1,2-dihidro-1,2-dihidroxi-naftaleno-1,2-deshidrogenasa; NahC, 1,2-dihidroxi-naftaleno dioxigenasa; NahD, 2-hidroxicromeno-2-carboxilato isomerasa; NahE, *trans*-*o*-hidroxibencilindeno piruvato hidratasa-aldolasa; NahF, salicilaldehído deshidrogenasa, NahG, salicilato 1-hidroxilasa; NahH, 2-hidroxi-mucónico semialdehído hidrolasa; NahL, 2-oxopenta-4-dienoato hidratasa; NahM, 4-hidroxi-2-oxovalerato aldolasa; y NahO, acetaldehído deshidrogenasa. Productos: (1) naftaleno; (2) *cis*-1,2-dihidro-1,2-dihidroxi-naftaleno; (3) 1,2-dihidroxi-naftaleno; (4) ácido 2-hidroxicromeno-2-carboxílico; (5) *cis*-*o*-hidroxibenzilpiruvato; (6) salicilaldehído; (7) piruvato; (8) salicilato; (9) catecol; (10) 2-hidroxi-mucónico semialdehído; (11) 2-oxopenta-4-dienoato; (12) 4-hidroxi-2-oxovalerato; (13) acetaldehído; (14) acetil-CoA. (b) Organización de los genes *nah* en operones (Adaptado de Suenaga et al., 2009).

Genes similares a *nah* se han encontrado posteriormente en diversas cepas de *Pseudomonas* aisladas de distintas localizaciones por su capacidad de utilizar otros HAPs. Estos genes, denominados genéricamente *nah-like*, incluyen los operones *ndo*, *pah* y *dox*.

En cepas de *Comamonas testosteroni* aisladas de fenantreno, los genes que codifican para la dioxigenasa inicial no hibridan con sondas *nahA*, lo que indica divergencia en la secuencias de sus contrapartes encontradas en cepas de *Pseudomonas*. En cambio, la organización de los genes del catabolismo de fenantreno (*phd*) es muy similar a la observada en *Pseudomonas*, excepto en un gen que codifica para la dihidrodiol deshidrogenasa (*phdB*) el cual fue insertado entre los genes que codifican para la fenantreno dioxigenasa. En *Alcaligenes faecalis* AKF2 se encontró una organización muy similar del grupo de genes responsables de la degradación de fenantreno.

En *Ralstonia* sp. U2, aislada de naftaleno, los genes catabólicos forman un grupo compacto *nagAaGHAbAcAdBFCQED*, donde dos genes, *nagG* y *nagH*, parecen haber sido insertados entre los genes *nagAa* y *nagAd* que codifican para la naftaleno dioxigenasa. Un grupo de genes *nag*, con una organización y secuencia muy similar, se han detectado también en la cepa degradadora de naftaleno *Polaromonas naphthalenivorans* CJ2.

El género *Sphingomonas* designaba inicialmente a un grupo de bacterias capaces de degradar una gran variedad de contaminantes orgánicos, como dibenzo-*p*-dioxinas, dibenzofurano, pesticidas y HAPs. Este grupo taxonómico ha sido dividido recientemente en nuevos géneros llamados *Sphingobium*, *Novosphingobium* y *Sphingopyxis* (Takeuchi et al., 2001). Las rutas degradativas de HAPs de estos géneros son similares a las descritas anteriormente, pero su organización genética es muy singular. Los genes de degradación de HAPs se intercalan con genes *xyl* responsables de la degradación de monoaromáticos y genes *bph* de degradación de bifenilos, de modo que los genes de degradación de un mismo sustrato se encuentran distribuidos entre distintos clusters genéticos. Esta disposición en mosaico de regiones altamente conservadas ha sido observada en numerosas cepas del grupo (Pinyakong et al., 2003). *Sphingomonas* CHY-1, una cepa que crece en criseno, presenta un par de genes que codifican para una dioxigenasa que cataliza la oxidación inicial de distintos HAPs (Demanećjhe et al., 2004). *Novosphingobium aromaticivorans* F199 presenta 79 genes asociados con el metabolismo y el transporte de HAPs en el plásmido pNL1 (184 kb). Seis pares de estos genes posiblemente codifican para las subunidades α y β de distintas hidroxilasas.

Aunque las enzimas periféricas responsables del ataque inicial a varios HAPs pueden ser producto de genes altamente conservados con alta o baja homología (en términos de ordenamiento y secuencia de nucleótidos), la ruta más común en Gram-negativos son varios pasos sucesivos que conducen a la formación de intermediarios comunes análogos del ácido 1-hidroxi-2-naftoico (HNA) y salicilato. Sin embargo hay excepciones, como la formación de ftalato como metabolito. A partir de este punto lo más habitual es la degradación vía acetil CoA y piruvato, mientras que rutas menos comunes conducen a fumarato y piruvato vía salicilato y gentisato.

Genética y diversidad de RHDs en bacterias Gram-positivas

Las bacterias Gram-positivas degradadoras de HAPs se pueden clasificar en dos grupos. El primero, entre las que se encuentran *Rhodococcus* y *Terrabacter*, puede atacar fluoreno, dibenzofurano y sustratos similares mediante una dioxigenación angular que incluye reacciones similares a las de degradación del bifenilo. El segundo, en el que encontramos miembros de *Nocardiodes* y *Mycobacterium*, puede utilizar fenantreno y HAPs de 4 anillos mediante reacciones que, tras un ataque inicial conducen a su total transformación a través de ácido 1-hidroxi-2-naftoico, ftalato y protocatecuato (Figura 1.16).

La primera bacteria descrita capaz de degradar pireno fue la cepa *Mycobacterium* sp. PYR1 (Heitkamp et al., 1988). Esta cepa se ha utilizado como modelo de bacteria Gram-positiva degradadora de compuestos de 4 anillos, y la mayoría de la información disponible sobre los genes implicados en la degradación de estos compuestos deriva de su estudio (Tabla 1.7). De esta forma, se ha observado que los genes implicados en la degradación de fenantreno y pireno en estas cepas son bastante distintos a los de bacterias Gram-negativas con la misma actividad metabólica. Su estudio reveló que se trata de un nuevo sistema enzimático constituido por proteínas Nid. En este caso, los genes *nid* se encontraban en el cromosoma y no hibridaban con los genes *nah*. Estudios posteriores han demostrado que los genes *nid* están ampliamente distribuidos en micobacterias y en miembros de otros géneros, como *Rhodococcus*, donde pueden encontrarse en un orden distinto.

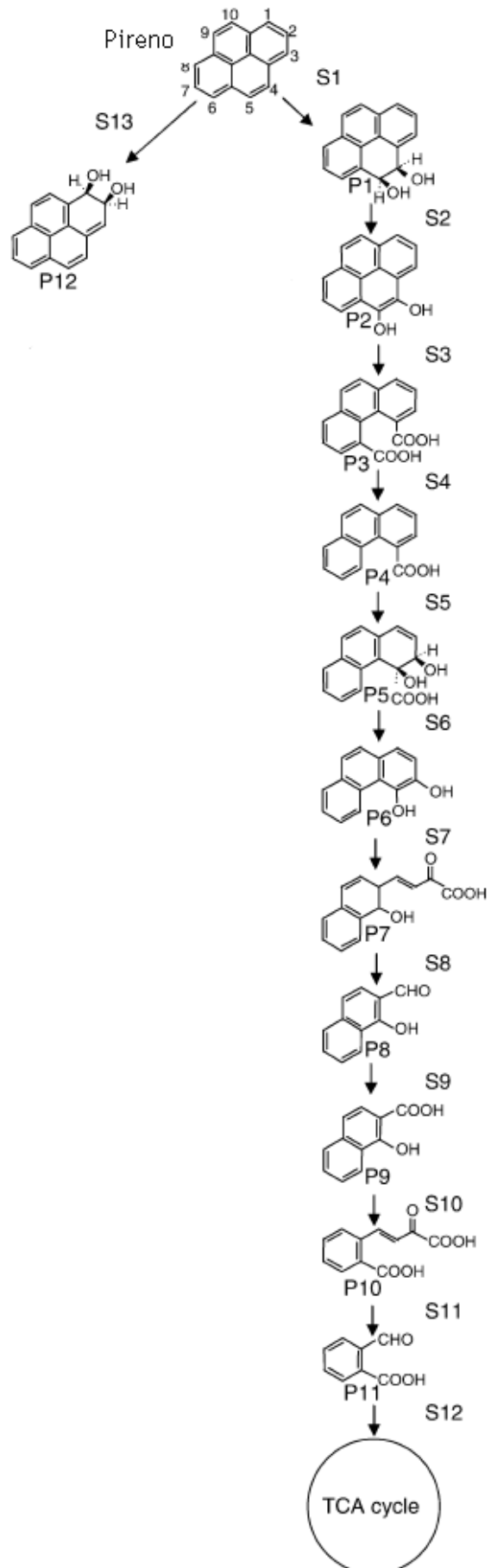


Figura 1.16. Ruta de degradación del pireno en *M. vanbaalenii* PYR-1 basada en análisis de metabolitos, genómico y proteómico (adaptado de Kim et al., 2007). La letra ‘‘S’’ denota las distintas etapas de las reacciones enzimáticas (Tabla 1.9). Los metabolitos intermediarios del pireno son los siguientes: P1, *cis*-4,5-dihidroxi-4,5-dihidropireno; P2, 4,5-dihidroxi-4,5-dihidropireno; P3, ácido fenantreno-4,5-dicarboxílico; P4, ácido fenantreno-4-carboxílico; P5, ácido *cis*-3,4-dihidroxi-4,5-dihidropireno-4-carboxílico; P6 3,4-dihidroxi-4,5-dihidropireno; P7, ácido 2-hidroxi-2H-benzo[*h*]cromeno-2-carboxílico; P8, 1-hidroxi-2-naftaldehído; P9, ácido 1-hidroxi-2-naftoico; P10, *trans*-2'-carboxibenzalpiruvato; P11, ácido 2-carboxibenzaldehído; P12, *cis*-1,2-dihidrodiol pireno (Adaptado de Kweon et al., 2010).

Tabla 1.7. Reacciones enzimáticas implicadas en la degradación del pireno por *M. vanbaalenii* PYR-1

Reacción enzimática ^a	Gen/(Mvan ID) ^b	Enzima
S1	<i>nidA</i> /0488	Pireno dioxigenasa hidroxilante de anillo, subunidad α
S1	<i>nidB</i> /0483	Pireno dioxigenasa hidroxilante de anillo, subunidad β
S2/S6	0544	Dihidrodiol deshidrogenasa
S3/S7	<i>phdF</i> /0470	Dioxigenasa de ruptura de anillo
S4	0543	Descarboxilasa
S5	0546	Fenantreno dioxigenasa hidroxilante de anillo, subunidad α
S5	0547	Fenantreno dioxigenasa hidroxilante de anillo, subunidad β
S8	<i>phdG</i> /0472	Hidratasa-aldolasa
S9	<i>nidD</i> /0486	Aldehído deshidrogenasa
S10	<i>phdI</i> /0468	1-hidroxi-2-naftoatodioxigenasa
S11	<i>phdJ</i> /0469	<i>trans</i> -2'-Carboxibenzalpiruvato hidratasa-aldolasa
S12	0522	2-Carboxilbenzaldehído deshidrogenasa
S13	<i>nidB3</i> /0526	Oxigenasa hidroxilante de anillo, subunidad β

^a Indica los distintos pasos de la degradación del pireno mostrados en la figura 14.

^b ORF (Mvan ID) indica el número asignado a cada una de las pautas abiertas de lectura (ORF) en el genoma completo de *M. vanbaalenii* PYR-1 (Kweon et al., 2010).

En general estas bacterias presentan una elevada versatilidad metabólica, siendo capaces de utilizar un amplio espectro de HAPs, e incluso otros contaminantes, como por ejemplo los alcanos. Esta versatilidad se ha atribuido a la presencia de múltiples copias de oxigenasas distintas en su genoma, incluyendo diversas RHDs y monooxigenasas como las dependientes del citocromo P450 (Larkin et al., 2010). Stingley y colaboradores (2004) describieron la presencia de RHDs con distintas preferencias de sustrato en cepas de *Mycobacterium*, lo que explicaría la versatilidad de estas bacterias en la degradación de HAPs y su presencia frecuente en suelos contaminados con estos productos (Pouli, 2011). Observaciones similares se han realizado con miembros de *Rhodococcus*, en los que se ha demostrado la presencia de genes *nid* y *nar*, responsables de la degradación del naftaleno. En la cepa *Rhodococcus* sp. I24 se ha detectado la presencia de una monooxigenasa y una dioxigenasa del naftaleno, ambas inducibles, además de una tolueno dioxigenasa.

Por otra parte, la citocromo P450 monooxigenasa de *Rhodococcus rubber* mostró actividad hidroxilasa frente a naftaleno, fluoreno, acenafteno y otros compuestos aromáticos (Liu et al., 2006).

1.3.2.3. Biodegradación de HAPs alquilados

Como ya se ha comentado anteriormente, los HAPs metilados son los componentes mayoritarios de la fracción aromática de los derivados del crudo de petróleo. Esto, unido a su ya mencionada capacidad mutagénica, pone de manifiesto la relevancia de su destino ambiental.

La presencia de grupos metilos en la molécula, además, aumenta su resistencia a la biodegradación, siendo más recalcitrantes al incrementar el número de sustituyentes. Por otro lado, la distribución de los grupos metilos en la molécula condiciona su degradabilidad, observándose un ataque selectivo de determinados isómeros. Por ejemplo Williams y colaboradores (1975) observaron que miembros de *Pseudomonas* pueden degradar naftaleno y 2-metilnaftaleno, pero no 1-metilnaftaleno. En un estudio en nuestro laboratorio con crudo de petróleo y una cepa de *Mycobacterium* degradadora de pireno, se demostró que la tasa de biodegradación de los diferentes HAPs disminuye con el incremento del número de anillos aromáticos y de sustituyentes alquilo. Además se observó una utilización selectiva de los mono-, di- y trimetil-fenantrenos (Vila & Grifoll, 2009).

A pesar de la información disponible sobre el ataque selectivo a las distintas familias de alquil-HAPs dentro de la matriz del crudo de petróleo, son pocos los trabajos que han abordado el estudio de las rutas metabólicas implicadas en la oxidación de estos compuestos. Mahadehan et al (1994) y Dutta et al. (1998) describieron reacciones de oxidación de metilnaftalenos por *Pseudomonas putida* y *Sphingomonas paucimobilis*, respectivamente. Aproximadamente en la misma época, Gilewicz et al. (1997) describieron una cepa marina de *Sphingomonas* capaz de utilizar 2-metilfenantreno (2MP) como única fuente de carbono y energía, pero no identificaron metabolitos, y poco después Sabaté et al. (1999) propusieron una ruta metabólica para la utilización de este compuesto por la cepa *Sphingomonas* sp. JS5.

De acuerdo con estos trabajos, la oxidación inicial de los HAPs metilados puede tener lugar como resultado de dos estrategias bioquímicas distintas, que implican el ataque al anillo o la oxidación del grupo metilo. Se ha demostrado que estos tipos de oxidación determinan rutas catabólicas alternativas para mono-alquilbencenos

(Smith, 1990) y metilnaftalenos (Mahajan et al.1994). El primer mecanismo es catalizado por una dioxigenasa que conduce a la formación del correspondiente metildihidrodiol, que tras la ruptura del anillo es degradado mediante reacciones similares a las descritas para los hidrocarburos aromáticos no alquilados, pero acomodando intermediarios con el grupo metil. La segunda estrategia es iniciada mediante la monooxigenación del grupo metilo la cual produce un alcohol. Subsecuentes deshidrogenaciones conducen a la formación del correspondiente aldehído y ácido carboxílico, pero en pocos casos se ha descrito la posterior metabolización de los ácidos carboxílicos resultantes (Phale et al. 1995). Por lo tanto, la formación de los ácidos carboxílicos a menudo implica su acumulación como productos finales. En realidad, los ácidos naftoicos son frecuentemente acumulados por bacterias, hongos y algas como resultado del cometabolismo (ver más adelante).

De acuerdo con las vías conocidas para la degradación del fenantreno, la acumulación de ácido 1-hidroxi-6-metil-2-naftoico en cultivos de *Sphingomonas* sp. JS5 creciendo en 2MP (Sabaté et al, 1999) se atribuyó a la degradación de este producto por dioxigenación y *meta*-ruptura del anillo aromático sin que el grupo metilo sufriera oxidación alguna. La dioxigenasa inicial habría acomodado el grupo metilo y oxidado uno de los anillos aromáticos no metilados para producir el correspondiente dihidrodiol metilado.

La posterior deshidrogenación, seguida de la liberación de piruvato por acción de una aldolasa habría dado lugar al ácido 1-hidroxi-6-metil-2-naftoico, y proporcionando piruvato para el crecimiento. La rápida transformación del ácido 1-hidroxi-6-metil-2-naftoico, junto con la identificación de 5-metilsalicilato y la demostración de la actividad catecol 2,3-dioxigenasa en células inducidas con 2-MP, indicaba que la cepa JS5 era capaz de asimilar completamente el esqueleto carbonado del metil fenantreno mediante esta vía (Figura 1.17).

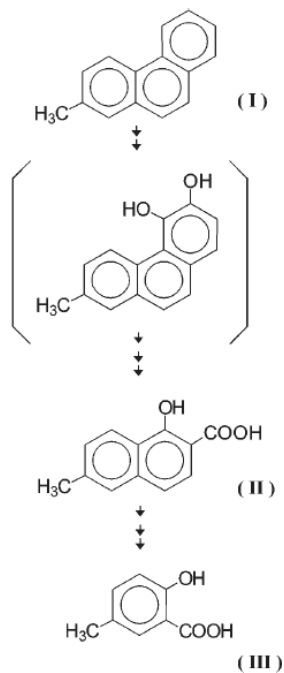


Figura 1.17. Vía metabólica propuesta para la utilización de 2-MP por *Sphingomonas* sp. JS5 (Sabaté et al., 1999).

En un trabajo más reciente, Butzinky y colaboradores (2000) realizaron un análisis de los metabolitos acumulados durante la incubación de la cepa *Sphingomonas* sp. 2MP11 en presencia de 2-MP. De esta forma, identificaron una serie de productos que sugerían la degradación de este producto mediante dos rutas metabólicas alternativas actuando de forma simultánea: la oxidación progresiva de anillos aromáticos sin ataque al grupo metil; y la oxidación inicial del grupo metilo para formar ácido fenantreno carboxílico y su posterior degradación hasta intermediarios del metabolismo central.

Monooxigenación cometabólica de los grupos metilo de los alquilHAPs

Diversos estudios apuntan que las reacciones de monooxidación de los grupos metílicos de los HAPs podrían ser el resultado de un ataque fortuito por dioxigenasas, que en este caso estarían produciendo reacciones metabólicas (productivas) y cometabólicas sobre el mismo sustrato. Se ha demostrado que la tolueno dioxigenasa y la naftaleno dioxigenasa pueden realizar un amplio espectro de reacciones dependiendo del sustrato con que se encuentran. Estas reacciones incluyen la dioxigenación de anillos aromáticos de distintos análogos estructurales de su sustrato habitual, la monooxigenación de grupos metilénicos y metílicos unidos a radicales bencílicos, o la oxidación de heteroátomos (ej. dibenzotiofeno), dando lugar a la formación de cetonas, quinonas y ácidos aromáticos carboxílicos que no pueden ser utilizados por las cepas que los producen (Neilson 2010). En este sentido, Nielsen y colaboradores (2010) demostraron que la naftaleno dioxigenasa actuando sobre

indeno es capaz de llevar a cabo tanto su dioxigenación a *cis*-(1*R*,2*S*)-indandiol como su monooxigenación a 1*S*-indenol, y además cataliza la deshidrogenación de indano a indeno. En la cepa *Pseudomonas* sp. NCBI 9816-4 este enzima cataliza la oxidación de tolueno a benzil alcohol, y del etilbenzeno a (*S*)-1-feniletanol y acetofenona. Mientras la reacción inicial involucra monooxigenación del grupo metilo, la oxidación del aldehído y cetona es dependiente de dioxigenación (Lee & Gibson 1996). Por su parte, la tolueno dioxigenasa de *P. putida* F1, y la clorobenzeno dioxigenasa de *Burkholderia* sp. PS12, que degradan sus sustratos habituales mediante dioxigenación, producen también la monooxigenación de la cadena lateral de 2- y 3-clorotolueno, dando lugar a los correspondientes clorobenzil alcoholes que se oxidan lentamente (Lehning et al., 1997).

Selifonov y colaboradores (1996), demostraron que la ruta más habitual de oxidación de 1,5-, 1,8-, 2,6- y 2,7-dimetilnaftalenos (DMN) catalizada por la naftaleno dioxigenasa codificada por los genes *ndo* del plásmido NAH7 de *P. putida* G7, es la monooxigenación de uno de sus sustituyentes metilo. En un estudio más reciente, se demostró que la naftaleno dioxigenasa (NDO) de la cepa *Ralstonia* sp. U2 y la nitrobenzeno dioxigenasa de *Comamonas* sp. JS765 actúan sobre mono-, di-, tri- y tetrametil naftalenos produciendo una mezcla de productos mono y dioxigenados (Tøndervik et al., 2012).

Por otro lado, la desaparición de numerosos hidrocarburos aromáticos alquilados durante la degradación de crudos de petróleo por cepas bacterianas degradadoras de alcanos (Solanas et al., 1984) se ha atribuido a la monooxigenación cometabólica de los grupos metilos laterales catalizada probablemente por alcanohidroxilasas (Viñas et al., 2002). Esta actividad puede ser importante durante la degradación de las mezclas de origen petrogénico, ricas en fracción saturada y HAPs metilados.

Un tercer enzima que podría ser importante en la oxidación de las cadenas laterales son las citocromo P450 monooxigenasas. Estudios de cometabolismo realizados con la cepa degradadora de pireno *Mycobacterium vanbaalenii* PYR1 demostraron que esta bacteria utiliza tanto dioxigenasas como monooxigenasas del citocromo P450 para metabolizar HAPs. Si bien los *cis*-dihidrodiolés producidos por esta cepa son metabolitos típicos de dioxigenasas dihidroxilantes de anillo aromático, los *trans*-dihidrodiolés son presumiblemente formados tras la acción del citocromo P450, que cataliza la epoxidación del anillo aromático, y su posterior hidratación enzimática mediante una epóxido hidrolasa (Brezna et al., 2006). En este mismo trabajo, se identificaron tres genes que codifican enzimas alternativas para la monooxidación de

HAPs (*pipA*, *cyp150*, *cyp51*), todos de la familia de los citocromos P450. Dos de ellos (*pipA*, *cyp150*), tras ser clonados y expresados en *E. coli*, produjeron metabolitos de monooxigenación del pireno, del dibenzotiofeno y del grupo metilo de 7-metilbenzo[*a*]antraceno (Figura 1.18).

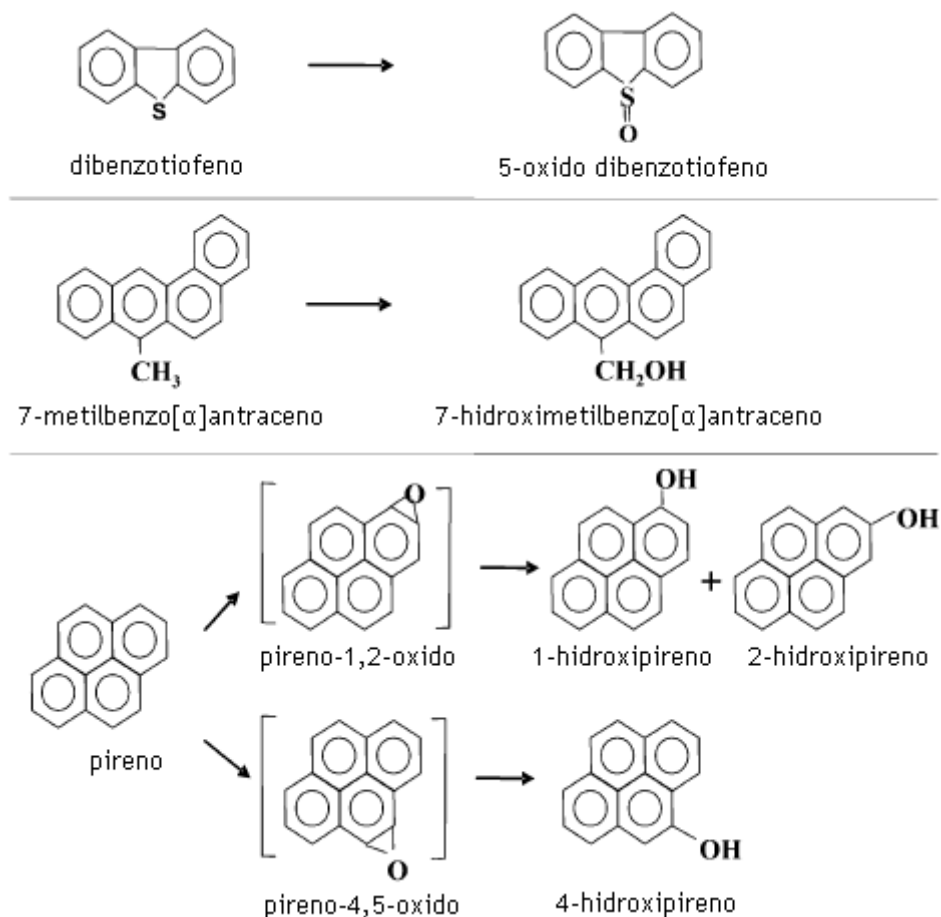


Figura 1.18. Reacciones catalizadas por células de *E. coli* expresando los citocromos P450 *pipA* y CYP150 de *M. vanbaalenii* PYR-1 (Brezna et al., 2006).

En el medio ambiente estos procesos cometabólicos podrían determinar las rutas cooperativas de degradación de los alquilHAPs por las comunidades microbianas presentes, pudiendo, en algunos casos, retrasar la mineralización del producto y dar lugar a la acumulación, más o menos transitoria, de productos de oxidación parcial. Hasta ahora, no se ha investigado la importancia y las consecuencias de las actuaciones cometabólicas de estos enzimas en la degradación de los componentes mayoritarios de la fracción aromática de las mezclas petrogénicas.

1.4. Comunidades Microbianas Degradadoras de HCs

La información disponible hasta el momento sugiere que en la degradación de mezclas ambientales de hidrocarburos intervienen una gran cantidad de microorganismos, muchos de los cuales todavía no han podido ser aislados, y cuya función en consecuencia sigue siendo una incógnita. Para comprender los procesos y comunidades microbianas implicados en la degradación ambiental de hidrocarburos, se hace necesario por lo tanto, el estudio de la estructura-función de dichas comunidades. En este sentido, la mejora de los métodos de cultivo tradicionales y su correlación con las nuevas metodologías independientes de cultivo basadas en el estudio de los ácidos nucleicos de las comunidades microbianas, ha de permitir establecer cual es el rol de cada una de las poblaciones microbianas implicadas, asociando cada población con su función dentro de la comunidad.

1.4.1. Microorganismos degradadores de hidrocarburos

Se han aislado numerosas cepas bacterianas que pueden degradar **alcanos** y utilizarlos como fuentes de carbono y energía. La mayoría de estas bacterias pertenecen a *Alfa-Beta*-, y *Gammaproteobacteria* y, dentro de las Gram-positivas, destaca el grupo *Actinobacteria*. Las bacterias del suelo capaces de degradar hidrocarburos del petróleo más comunes pertenecen al género *Pseudomonas* (Wongsa et al., 2004; Karamalidis et al., 2010). Otros degradadores de alcanos descritos en la literatura incluyen miembros de los géneros *Bacillus* (*Firmicutes*), *Flavobacterium* (*Bacteroidetes*), *Paracoccus*, *Serratia*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Ochrobactrum*, *Stenotrophomonas*, *Yersinia* (*Proteobacteria*), *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Mycobacterium*, *Dietzia*, *Gordonia* y *Microbacterium* (*Actinobacteria*), (Koukkou & Vandera, 2011). Recientemente, se han descrito algunas cepas bacterianas, como *Mycobacterium gilvum* AP1 (Vila & Grifoll, 2009) o *Nocardia cyriacigeorgica*, que son capaces de degradar simultáneamente tanto alcanos, lineales y ramificados, como HAPs de bajo y elevado peso molecular.

Se han aislado bacterias capaces de degradar **HAPs** de una gran variedad de entornos naturales, especialmente de suelos. Se dispone de numerosas estirpes capaces de utilizar HAPs como el naftaleno (2 anillos), fenantreno y antraceno (3), y fluoranteno y pireno (4), como única fuente de carbono y energía (tabla 1.8a y b). Sin embargo, no se conocen bacterias capaces de crecer en HAPs de 5 anillos como único sustrato. Por ejemplo, *Sphingomonas paucimobilis* EPA 505, *Mycobacterium* sp. RJGII-135,

Mycobacterium vanbaalenii PYR-1, *Mycobacterium gilvum* AP1, *Rhodococcus* sp. UW1, distintas cepas de *Burkholderia cepacia* y *Stenotrophomonas maltophilia*, y *Sphingomonas yanoikuyae* JAR02, degradan benzo(a)pireno pero para ello requieren la presencia de otras fuentes de carbono (Kanaly & Harayama, 2010; Koukkou & Vandera, 2011; Vila & Grifoll, 2009).

Tabla 1.8a. Lista de bacterias Gram-negativas aisladas de suelos y sedimentos por su capacidad de utilizar HAPs como única fuente de carbono y energía (Koukkou & Vandera, 2011).

Linaje	Genero	Organismo	HAP (fuente de carbono y energía)
Alphaproteobacteria	<i>Paracoccus</i>	<i>Paracoccus</i> sp. Ophe1	Antraceno, criseno, fluoreno, fluoranteno y pireno
	<i>Sphingomonas</i>	<i>S. paucimobilis</i> EPA 505 <i>S. paucimobilis</i> TNE12 <i>S. paucimobilis</i> BA2 <i>S. paucimobilis</i> ZX4 <i>S. yanoikuyae</i> B1 <i>S. yanoikuyae</i> R1 <i>S. yanoikuyae</i> JAR02 <i>Sphingomonas</i> sp. A4 <i>Sphingomonas</i> sp. CHY-1 <i>Sphingomonas</i> sp. GY2B <i>Sphingomonas</i> sp. KS14 <i>Sphingomonas</i> sp. LB126 <i>Sphingomonas</i> sp. P2 <i>Sphingomonas</i> sp. ZL5	Fluoranteno, fluoreno, fenantreno, naftaleno, acenafteno, acenaftileno y/o criseno
	<i>Sinorhizobium</i>	<i>Sinorhizobium</i> sp. C4	Fenantreno
Betaproteobacteria	<i>Acidovorax</i>	<i>Acidovorax</i> sp. NA3	Fenantreno
	<i>Alcaligenes</i>	<i>Alcaligenes denitrificans</i> WW1 <i>Alcaligenes faecalis</i> AFK2	Fluoranteno, Fenantreno
	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i> sp. JS150 <i>Burkholderia</i> sp. C3 <i>Burkholderia</i> sp. RP007 <i>Burkholderia</i> sp. TNFYE-5	Naftaleno, Antraceno y/o fenantreno
	<i>Comamonas</i>	<i>Comamonas testoteroni</i> GZ38A <i>Comamonas testoteroni</i> GZ39 <i>Comamonas testoteroni</i> GZ42	Antraceno, fenantreno, y/o naftaleno
	<i>Ralstonia</i>	<i>Ralstonia</i> sp. U2	Naftaleno
Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas alcaligenes</i> PA-10 <i>Pseudomonas saccharophila</i> P-15 <i>Pseudomonas stutzeri</i> P-16 <i>Pseudomonas stutzeri</i> P16 <i>Pseudomonas stutzeri</i> ZP2 <i>Pseudomonas</i> sp. Cam-1 <i>Pseudomonas</i> sp. PP2 <i>Pseudomonas</i> sp. Wphe1	Fluoranteno, Fenantreno, naftaleno y/o metilnaftalenos
	<i>Stenotrophomonas</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> VUN 10,010 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> VUN 10,003	Benzo[a]antraceno benzo[a]pireno fluoranteno, pireno

Tabla 1.8b. Lista de bacterias Gram-positivas aisladas de suelos y sedimentos por su capacidad de utilizar HAPs como única fuente de carbono y energía (Koukkou & Vandera, 2011).

Linaje	Genero	Organismo	HAP (fuente de carbono y energía)
Gram-positivos Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i>	<i>Arthrobacter phenanthrenivorans</i> <i>Arthrobacter sulphureus</i> RKJ4 <i>Arthrobacter</i> sp. F101 <i>Arthrobacter</i> sp. P1-1 <i>Arthrobacter</i> sp. RP17	Fenantreno y/o fluoreno
	<i>Brevibacterium</i>	<i>Brevibacterium</i> sp. DPO-136	Fluoreno
	<i>Gordonia</i>	<i>Gordonia</i> sp. BP9	Naftaleno, fenantreno, fluoranteno, y pireno
	<i>Janibacter</i>	<i>Janibacter anophelis</i> JY11 <i>Janibacter</i> sp. YY-1	Naftaleno antraceno, fenantreno, fluoreno, y/o pireno
	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacterium</i> sp. F10a <i>Microbacterium</i> sp.	Fenantreno
	<i>Nocardia</i>	<i>Nocardia otitidiscaviarum</i> TSH1	Antraceno, Fenantreno, naftaleno y pireno
	<i>Mycobacterium</i>	<i>M. austroafricanum</i> GTI-23 <i>M. flavescens</i> <i>M. fluoranthenvivorans</i> <i>M. frederiksbergense</i> Fan9 <i>M. gilvum</i> BBI <i>M. pyrenivorans</i> 17A3 <i>M. vanbaalenii</i> , PYR-1 <i>Mycobacterium</i> sp. BG1 <i>Mycobacterium</i> sp. cepas JLS, KMS, MCS <i>Mycobacterium</i> sp. K20 <i>Mycobacterium</i> sp. CH1 <i>Mycobacterium</i> sp. 1B <i>Mycobacterium</i> sp. MHP-1 <i>Mycobacterium</i> sp. 6PY1 <i>Mycobacterium</i> sp. LB501T <i>Mycobacterium</i> sp. LP1 <i>Mycobacterium</i> sp. RJGII-135 <i>Mycobacterium</i> sp. SNP 11 <i>Mycobacterium</i> sp. Spyr1 <i>Mycobacterium</i> sp. VF1	Naftaleno antraceno, fenantreno, fluoreno, fluoranteno, y/o pireno
	<i>Rhodococcus</i>	<i>Rhodococcus wratislaviensis</i> <i>Rhodococcus opacus</i> M213 <i>Rhodococcus</i> sp. UW1	Naftaleno antraceno, y/o fluoranteno
Firmicutes	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus cereus</i> P21 <i>Bacillus</i> sp. JF8 <i>Bacillus</i> sp.	Antraceno, fenantreno, fluoranteno y naftaleno
	<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus</i> sp. PN/Y	Fenantreno

El hecho de que la mineralización de HAPs en suelos esté dominada por cepas bacterianas pertenecientes a un número muy limitado de filos puede ser debido a que la mayoría de microorganismos de muestras ambientales no pueden ser cultivados bajo condiciones de laboratorio (Janssen et al., 2002). En efecto, aunque se conoce que la diversidad genética de bacterias en el suelo es extremadamente alta (>10.000 millones de procariotas por gramo de suelo), los métodos de cultivo actuales solo nos permiten recuperar un número de células de 100 a 1000 veces menor (Rosselló- Mora & Amann, 2001). Los métodos independientes de cultivo han revelado una información detallada de las comunidades microbianas en el medio ambiente, que demuestran que las especies no cultivadas representan la mayor parte de la diversidad microbiana (Cardenas & Tiedje, 2008; Handelsman, 2004). Los métodos de cultivo están sesgados hacia especies de crecimiento rápido que pertenecen sobre todo a *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* y *Firmicutes* (Huggenholtz, 2002).

Muchos estudios indican que ciertos grupos de bacterias están especializados en la colonización de suelos contaminados con HAPs y juegan un papel importante en los procesos de degradación, como las bacterias de los géneros *Sphingomonas* y *Mycobacterium*. La degradación inicial de HAPs se lleva a cabo por *Sphingomonas* y otras bacterias de crecimiento rápido, mientras que en etapas posteriores son sustituidas por bacterias de crecimiento lento como *Mycobacterium* (Johnsen et al., 2007), con capacidad de degradar los compuestos de mayor peso molecular.

1.4.2. Análisis de comunidades microbianas degradadoras

Los estudios publicados hasta el momento indican que en la degradación de mezclas ambientales de hidrocarburos, participan diversas poblaciones de la comunidad, que interaccionan formando redes metabólicas complejas. Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, muchos de los microorganismos implicados no han podido ser aislados y se desconoce su función. Para conocer el funcionamiento de estas comunidades, y el papel de cada una de las poblaciones en la eliminación de los contaminantes del medio ambiente, es necesario un análisis multifásico que permita correlacionar la estructura con los procesos llevados a cabo. Además de su interés básico, este conocimiento permitirá el monitoreo y optimización de las estrategias de estimulación de la actividad microbiana empleadas durante la biorremediación de emplazamientos contaminados, incluyendo el desarrollo de

aditivos específicos que favorezcan el crecimiento de poblaciones con actividades clave y minimicen riesgos potenciales, como la acumulación de metabolitos tóxicos.

Actualmente se dispone de una gran variedad de metodologías para estudiar la diversidad microbiana presente en la biosfera. Estudios basados en el cultivo y la enumeración de microorganismos apuntan que un gramo de suelo podría contener entre 10^2 y 10^7 especies distintas de microorganismos (Gans et al., 2005; Schloss & Handelsman, 2006). Sin embargo, si tenemos en cuenta que solo entre un 0,001 y un 1 % de los microorganismos viables se consideran cultivables (Torsvik et al., 2003), los estudios clásicos de diversidad microbiana solo representarían una parte mínima de la diversidad existente (Amann et al., 1995).

En general, los métodos que se emplean para determinar la función y la diversidad de una comunidad microbiana, como por ejemplo de un suelo contaminado, se clasifican en dos tipos: los dependientes de cultivo y los independientes de cultivo.

Técnicas dependientes de cultivo

Se basan en el estudio de determinadas características morfológicas, fisiológicas y metabólicas a partir de cultivos realizados en el laboratorio. Dentro de este grupo se incluye el aislamiento y el cultivo en medios sólidos o líquidos, que contengan nutrientes esenciales para el crecimiento de los microorganismos. Dentro del cultivo en medio líquido tenemos la técnica del número más probable (NMP), la cual permite llevar a cabo una estimación del número de microorganismos viables. Dicho método emplea diluciones sucesivas de la muestra hasta alcanzar un punto de extinción que se cultivan en medios apropiados para la población a estudiar (Colwell 1979). Generalmente se inoculan de 3 a 10 réplicas de cada nivel de dilución, se puntúan como positivas o negativas, y los resultados se analizan estadísticamente para obtener el número más probable de microorganismos viables.

Igualmente existen otros métodos que incluyen baterías de pruebas miniaturizadas de utilización de sustratos como el método Biolog[®], que permite estudiar comunidades microbianas en base a su perfil fisiológico (El Fantroussi et al., 1999).

Una de las ventajas del uso de este tipo de técnicas dependientes de cultivo es la posibilidad de obtener cultivos puros, los cuales nos van a permitir realizar estudios posteriores y caracterizar actividades metabólicas de interés.

Numerosos estudios llevados a cabo desde los años 60, han logrado aislar cepas bacterianas que han sido utilizadas para experimentos de degradación (Seo et al., 2007), de análisis de expresión (Kim et al., 2006) y, en algunos casos, en procesos de biorremediación (Wolicka et al., 2009).

También existen métodos de cultivo en biofilms que han mostrado ser más apropiados para el estudio de niveles de interacción en comunidades microbianas degradadoras de HAPs. En comparación con cultivos tradicionales de enriquecimiento, la comunidad del biofilm posee considerablemente mayor número de especies y diversidad de genes (Stach & Burns, 2002).

La bibliografía generada por los métodos dependientes de cultivo es extensa y los conocimientos producidos en el campo de la degradación de hidrocarburos se han resumido en el apartado anterior. Estos estudios han sido de vital importancia para establecer las bases de la biodegradación ambiental de hidrocarburos. Sin embargo, como ya se ha comentado, poseen una clara limitación por el hecho de que se considera que solamente una parte de los microorganismos ambientales son cultivables en los medios de laboratorio (Torvick et al., 2003). De igual forma, aunque se puedan cultivar, muchas veces es difícil establecer los posibles roles y la importancia que tendría una población dentro de la comunidad microbiana en la cual se integra.

Técnicas independientes de cultivo

Actualmente, en el campo de la ecología microbiana es frecuente el uso de metodologías que no requieren cultivar microorganismos (Riesenfeld et al., 2004) con el objetivo de representar la mayor proporción posible de la diversidad presente en una muestra ambiental (Aman et al., 1995; Head et al., 1998).

Los primeros métodos utilizados se basaron en la observación directa de los microorganismos metabólicamente activos, mediante la microscopía tradicional o la utilización de la microscopía de epifluorescencia acoplada al uso de colorantes como el anaranjado de acridina (AO), el 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), el isotiocianato de fluoresceína (FITC) o el INT-formizan (2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-fenil-2H-cloruro de tetrazolio).

Posteriormente se introdujeron nuevas técnicas como el análisis de los perfiles de ácidos grasos de los fosfolípidos de membrana (PLFA) presentes en una comunidad microbiana, generalmente por GC-MS. Esta técnica se utiliza para detectar cambios rápidos en la estructura de las poblaciones y se ha utilizado en estudios de biodegradación y biorremediación de vertidos de petróleo (Marguesin et al., 2007). A pesar de ello, no permite asignar afiliaciones filogenéticas, por lo que generalmente se la debe asociar a otras técnicas (Ibekwe et al., 2002), como las basadas en el análisis de ácidos nucleicos.

El desarrollo de la biología molecular, ha permitido implementar metodologías basadas en el análisis de los ácidos nucleicos de las comunidades microbianas presentes en los ambientes naturales. Estas técnicas permiten detectar poblaciones microbianas y sus actividades sin necesidad de poseer un cultivo previo. En general estos métodos se fundamentan en el estudio de genes codificantes para el ARNr 16S para el análisis de la diversidad bacteriana, el ARNr 18S y la región ITS para el análisis de la diversidad fúngica, y en la detección de genes codificantes para actividades enzimáticas de interés (genes funcionales), para el análisis de la función de la comunidad. Actualmente, esta aproximación constituye el principal medio para analizar las poblaciones microbianas en el medio ambiente (Tiedje et al., 1995), ya sea mediante la detección de microorganismos o grupos de microorganismos específicos, la presencia de genes funcionales concretos, o el análisis de la composición del conjunto de la comunidad microbiana, lo cual nos permite tener una nueva perspectiva de las comunidades microbianas naturales (Pace, 2006).

Las técnicas basadas en la amplificación de ácidos nucleicos por PCR son diversas, destacando (i) la obtención de librerías de clones, (ii) el análisis mediante electroforesis en geles de gradiente desnaturizante tanto químico como térmico (DGGE y TGGE, respectivamente), (iii) PCR acoplada al análisis de polimorfismos en la longitud del fragmento de restricción (T-RFLP), y recientemente (iv) las técnicas de secuenciación masiva. Alternativamente, se han desarrollado técnicas de hibridación *in situ* con sondas fluorescentes (FISH). Estas técnicas moleculares han sido ampliamente utilizadas en el estudio de la estructura y composición de comunidades microbianas asociadas a ambientes contaminados por crudo de petróleo (Kaplan y Kitts, 2004; Vázquez et al., 2008; Vazquez et al., 2013; Vila et al., 2010; Sutton et al., 2013), PCBs (Tu et al., 2011), y HAPs (Andreoni et al., 2004; Viñas et al., 2005; Meynet et al., 2012).

Hasta hace unos pocos años, el abordaje más común utilizado para caracterizar la comunidad microbiana de un suelo o emplazamiento contaminado consistía en la amplificación por PCR del gen codificante para el ARNr 16S en caso de las bacterias o de la región ITS para hongos, y el posterior análisis del producto de la amplificación mediante DGGE. Esta técnica permite separar fragmentos de ADN de la misma longitud (o similar) pero con secuencias diferentes (Fischer & Lerman, 1979), mediante un gradiente desnaturizante optimizado. Se asume que cada una de las bandas presentes en el gel de DGGE corresponde a una unidad taxonómica operativa (OTU), la cual se puede asociar a una especie determinada para simplificar el análisis (Hughes et al., 2001), pero también se puede dar el caso de que más de una banda corresponda al mismo OTU o que una sola banda corresponda a varios OTUs (Green, 2009).

Solo después de cortar, reamplificar y secuenciar las bandas, se puede obtener un resultado definitivo de una DGGE. Esta técnica posee limitaciones intrínsecas porque no siempre es posible obtener toda la biodiversidad presente en el gel, y por ende, en la muestra ambiental o microcosmos analizado. Por otro lado, las secuencias obtenidas son simples y de tamaño reducido (unos 400 pb) por lo que los resultados son menos representativos que los obtenidos mediante una librería de clones.

A pesar del gran avance que han supuesto las metodologías basadas en la amplificación por PCR del gen ADNr 16S, todas ellas presentan un sesgo originado por la propia metodología. Esta limitación viene determinada por la distinta eficiencia en la que se extraen los ácidos nucleicos de los diversos microorganismos de una comunidad, la amplificación selectiva del ADNr 16S por PCR, la formación de quimeras durante la PCR, o la diferencia que existe en el número de copias génicas u operones de genes codificantes para el ARNr 16S en genomas de distintos microorganismos.

Actualmente se han desarrollado nuevas técnicas para el estudio de la biodiversidad presente en suelos como son las metodologías genómicas. La **metagenómica** (análisis genómico de comunidades completas de microorganismos no cultivados) ha logrado la publicación de una gran cantidad de secuencias de diversas poblaciones microbianas naturales (Schemeisser et al., 2003; Tyson et al., 2004; Venter et al., 2004; Tringe et al., 2005). La unión del desarrollo de la PCR en emulsión y de las técnicas de secuenciación masiva, como la **pirosecuenciación**, hacen posible la generación de una gran cantidad de secuencias a precios asequibles. En ese trabajo se ha utilizado la pirosecuenciación 454 (Roche).

Pirosecuenciación 454

La pirosecuenciación es una tecnología de secuenciación de ADN novedosa que representa la primera alternativa al método convencional de secuenciación de Sanger. Se basa en la detección de la luminiscencia que se produce con la liberación de pirofosfato durante la incorporación de un dNTP a una nueva cadena de ADN, dirigida por cebadores y catalizada por una ADN polimerasa. Para llevar a cabo esta metodología el ADN, previamente aislado y fragmentado, se liga a unos adaptadores especiales, obteniendo una biblioteca de fragmentos de ADN, y se separa en hebras sencillas. A continuación se lleva a cabo una PCR en emulsión para obtener una amplificación clonal.

La PCR en emulsión consiste en la amplificación del ADN en una emulsión de aceite-agua en la que la fase acuosa contiene los reactivos de PCR y el molde de ADN a secuenciar. Además, se añaden perlas de captura que contienen uno de los cebadores de oligonucleótidos unidos a ellas. Este oligonucleótido es complementario a una de las secuencias adaptadoras utilizadas en la construcción de la biblioteca. El otro cebador de PCR se coloca en la solución. Las perlas se añaden en exceso respecto a los moldes de ADN, pero no respecto a la cantidad esperada de las gotitas que se forman en la emulsión. Después de una agitación vigorosa y controlada del sistema de aceite-agua, se provoca una emulsificación formándose millones de gotitas acuosas, dentro de cuales se lleva a cabo la amplificación por PCR. La optimización de la concentración del molde de ADN, perlas, y de las gotas de agua garantiza que en cada gota se encuentren un solo molde y una perla. De esta forma, en cada perla se forman millones de copias de un único molde de ADN, es decir una amplificación clonal por PCR.

A continuación, se rompe la emulsión, se desnaturaliza el ADN, y las perlas que llevan ADN de cadena simple se transfieren a los cientos de miles de pocillos de una placa *picotiter*, incorporando una única perla a cada pocillo. Dado que cada perla tiene una posición fija en la placa, se puede realizar el seguimiento de cada reacción de secuenciación individualmente. A continuación, se añaden a cada pocillo los reactivos necesarios para las distintas etapas de la reacción de pirosecuenciación (Mardis, 2008; Rothberg et al., 2008). Esta reacción se lleva a cabo usando una mezcla del molde de ADN de cadena sencilla, el cebador de secuenciación, y las enzimas ADN polimerasa, ATP sulfurilasa, luciferasa y apirasa (Figura 1.19).

A la reacción se añaden además los sustratos adenosina 5' fosfosulfato (APS) y luciferina. A continuación se adiciona el primero de los cuatro deoxinucleótidos (dNTPs) a la reacción, y, en el caso de que haya complementariedad, la ADN polimerasa cataliza su incorporación a la cadena de ADN. Durante cada incorporación se forma un enlace fosfodiéster entre los dNTP, liberándose pirofosfato (PPi) en una cantidad equivalente a la cantidad de nucleótido incorporado. Subsecuentemente, la enzima ATP sulfurilasa convierte PPi en ATP en presencia de APS y este ATP se utiliza en la conversión de luciferina a oxiluciferina mediada por la enzima luciferasa. Esto da lugar a la emisión de luz con una intensidad proporcional a la cantidad de ATP utilizado. La luz es detectada por una cámara con un dispositivo de carga acoplado y representada como un pico en un pirograma. La altura de cada pico es proporcional al número de nucleótidos incorporados. El sistema se regenera con la enzima apirasa que degrada ATP y los dNTPs no incorporados. A continuación, se añade el siguiente dNTP. La adición de dNTPs se realiza individualmente de forma secuencial, generando señal lumínica cada vez que un nucleótido es incorporado. Finalmente, la secuencia de nucleótidos se determina de acuerdo con los picos de señal en el pirograma. (Siqueira et al., 2012)

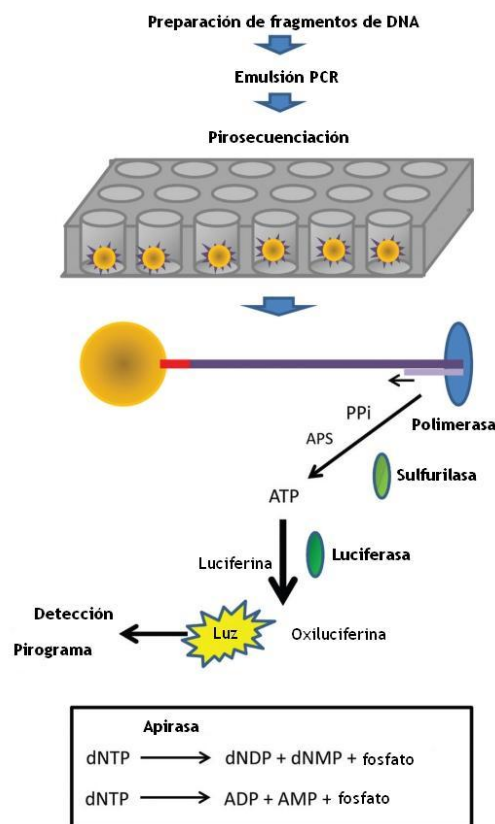


Figura 1.19. Esquema de la Pirosecuenciación 454 (Adaptado de Siqueira et al., 2012).

La tecnología de pirosecuenciación 454 ha evolucionado a lo largo de los años, con el consiguiente aumento en la longitud de las secuencias de lectura y de salida. El equipo de primera generación (GS 20) producía secuencias de lectura de 100 pb de longitud y hasta 60 Mb por análisis. El equipo de segunda generación (GS FLX) produce secuencias de lectura de 250 pb y hasta 150 Mb por análisis. La tercera generación (XLR y ahora GS FLX Titanium) produce secuencias de lectura de 400 pb y se pueden obtener alrededor de 500 Mb por análisis. Recientemente, se ha presentado el GS FLX+, el cual ofrece leer longitudes de hasta 1 kb con secuencias de lectura de 700 Mb (Roche, <http://454.com/>).

La pirosecuenciación posee varias ventajas potenciales como la precisión, flexibilidad, procesamiento en paralelo y capacidad de ser fácilmente automatizada. La **pirosecuenciación de librerías de amplicones del gen ARNr 16S** (*bar-coded pyrosequencing*) se ha convertido en un método muy usado para el estudio de la comunidad microbiana del suelo (Campbell et al., 2010), y puede ser utilizada para describir comunidades bacterianas presentes en otras muestras ambientales (Acosta et al., 2008; Texeira et al., 2010). Este enfoque es muy útil para ampliar nuestro conocimiento sobre las comunidades microbianas de distintos ecosistemas y evaluar los efectos de la contaminación sobre ellas.

Este método proporciona una información taxonómica más amplia sobre las comunidades microbianas complejas que las técnicas descritas anteriormente, permitiendo un análisis más profundo de su composición. Ahora el reto es extraer el significado biológico de la enorme cantidad de secuencias obtenidas y sus múltiples alineaciones. Instrumentos tradicionales como clustalW no son apropiados para este trabajo, por lo que se han desarrollado nuevas herramientas, como el alineador múltiple del RDP o el paquete informático Mothur, que han aumentado muy significativamente la eficiencia en el análisis computacional de los resultados obtenidos mediante estas metodologías de secuenciación masiva (Wang et al., 2007; Schloss et al., 2009; Schloss, 2010).

Para la asignación de secuencias en OTUs diferentes, se utilizan las distancias filogenéticas entre las distintas secuencias de ADN. Como es sabido, la distancia entre los genes de ARNr 16S reflejan diferentes niveles taxonómicos. En general, cuando la divergencia entre dos secuencias de ADNr 16S es inferior al 3 % típicamente son asignadas a la misma especie, cuando es inferior al 5 % se asignan al mismo género, y aquellos con una distancia inferior al 20 % típicamente son asignados al mismo filo (Schloss & Handelsman, 2005).

La herramienta BlastN del NCBI y el identificador Naive Bayes del RDP se utilizan con frecuencia para asignar la información taxonómica de las secuencias. La primera herramienta trata de encontrar las secuencias más cercanas en el GenBank. Sin embargo, debido a la incertidumbre o falta de información taxonómica de algunas secuencias, este método sólo es utilizado para un número limitado de secuencias. La segunda herramienta puede identificar secuencias a nivel de género con una mayor fiabilidad. En comparación con la herramienta BlastN, se necesita menos cálculo y por lo tanto es adecuado para grandes conjuntos de datos.

Tabla 1.9. Abundancia relativa necesaria de una especie para poder detectar su secuencia dentro de un número total de lecturas con una probabilidad especificada. Calculos basados en la distribución de Poisson (Kembel et al., 2012).

Probabilidad de detección	Abundancia mínima relativa			
	Número total de secuencias			
	10	100	1000	10000
0,1	1,0%	0,11%	0,01%	0,001%
0,3	3,5%	0,365	0,04%	0,004%
0,5	6,7%	0,69%	0,07%	0,007%
0,7	11,3%	1,20%	0,12%	0,012%
0,9	20,6%	2,28%	0,23%	0,023%
0,95	25,9%	2,95%	0,30%	0,030%
0,99	36,9%	4,50%	0,46%	0,046%

En comparación con otras técnicas como las librerías de clones o los PhyloChips, la pirosecuenciación proporciona una mayor profundidad de datos, lo que incrementa la fiabilidad del análisis de la estructura de una comunidad microbiana compleja. Sin embargo, a pesar de la enorme cantidad de datos adquiridos por pirosecuenciación, diez mil secuencias son todavía una pequeña fracción de las más de 10^9 bacterias que viven en un gramo de suelo. Por lo tanto, cabe preguntarse si este conjunto de datos refleja la diversidad real. La tabla 1.9 muestra la relación entre la abundancia relativa de una especie, el número total de secuencias analizadas y la oportunidad para detectar esta especie. Por ejemplo, en un análisis de 10000 secuencias, es necesaria una abundancia relativa de al menos el 0,03% para poder detectar una especie con una probabilidad del 95%. Esto, en un suelo con una carga de 10^9 bacterias/g, correspondería a la presencia de más de un millón de células/g de dicha especie. Sin embargo, muchas bacterias del suelo tendrán una abundancia menor, al

menos de forma temporal o localmente. Una segunda cuestión importante es que el conjunto de datos de pirosecuenciación puede representar la estructura de la comunidad mayoritaria, siendo muy difícil de predecir también de forma fiable la estructura de la comunidad con respecto a las minorías.

Microarrays de ADN

Los *microarrays* de ADN, llamados alternativamente microchips de ADN o chips de ADN, son un conjunto de cientos o miles de sondas moleculares individuales, fijadas de manera ordenada y unidas directa o indirectamente a una superficie sólida (Service, 1998). Estas sondas pueden ser clones de ADN procedentes de una genoteca, productos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), fragmentos de ADN complementario de 500 a 5000 pb de longitud o bien oligonucleótidos sintéticos.

La síntesis de los microarrays supone la impresión y fijación de sondas de ADN sobre un soporte sólido con afinidad por el ADN. Estos soportes generalmente son membranas de nitrocelulosa o nailon, o bien portaobjetos recubiertos con residuos de polilisinas u otro compuesto capaz de unir ADN (Figura 1.20).

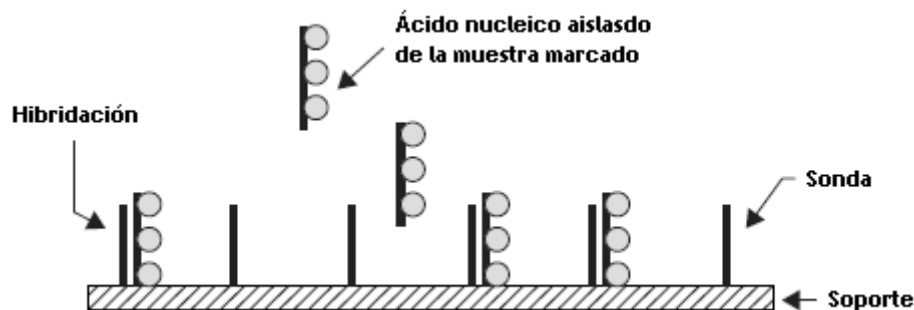


Figura 1.20. Fundamento de los microarrays de ADN

El principio básico de los microarrays es la capacidad que posee el ADN de una sola hebra o las moléculas de ARN de la muestra a analizar para hibridar con las sondas complementarias unidas al soporte sólido.

Actualmente la tecnología de los microarrays es una herramienta taxonómica y funcional muy importante, y es ampliamente utilizada para estudios de genoma, proteoma y el análisis de las comunidades microbianas mixtas.

Las muestras pueden ser ADN o ARN, según se trate de un análisis genómico (genotipificación) o bien un análisis de la expresión génica (genómica funcional).

Una vez purificado el ácido nucleico se procede a su marcado, que puede ser radiactivo o fluorescente. Este último es el más utilizado, no sólo por su menor peligrosidad sino porque además permite hibridar dos muestras simultáneamente si se utilizan dos fluorocromos distintos. En el caso del ADN, se fragmenta mediante sonicación o digestión enzimática parcial y a continuación se procede a su marcado mediante una polimerasa. En el caso del ARN el marcaje se lleva a cabo durante el proceso de transcripción inversa. Una vez marcado el ADN (o ADNc) se procede a su hibridación con el *microarray* obtenido previamente, uniéndose cada molécula a la sonda correspondiente. A continuación, el *microarray* se somete a una serie de lavados para eliminar el exceso de ADN no unido o que ha hibridado inespecíficamente, y se procede a la medición de la señal. Para las muestras marcadas fluorescentemente se utiliza un escáner provisto de un láser y una serie de filtros capaces de excitar los fluorocromos y captar la fluorescencia.

Después se genera una imagen que se somete a un proceso de digitalización, normalización y cuantificación. Tras este tratamiento se obtiene una colección de datos con las intensidades correspondientes a cada gen incluido en el *microarray*. Finalmente se procede al análisis de los datos, que en ocasiones se convierte en una tarea compleja, pues la ventaja de esta técnica es que permite obtener una enorme cantidad de información en un único experimento. Por ejemplo, si utilizamos un *microarray* con 10.000 sondas fijadas es posible incluir todos los genes de *Escherichia coli* K12 (casi 5.000) por duplicado, lo que supone que en un único experimento se obtienen 20.000 valores. Sin embargo, esta gran cantidad de información se convierte en un problema importante a la hora de analizar todos los datos manualmente. Esto supone la necesidad de análisis de tipo estadístico para poder analizar los resultados. Por esta razón, la ayuda de sistemas informáticos es clave para el análisis de todos los datos por un lado, y para evitar la subjetividad inherente del propio investigador, por el otro.

Los *microarrays* se han utilizado para diferentes estudios biológicos, especialmente en el área médica, sin embargo su aplicación en la ecología microbiana hasta el momento ha sido limitada (Zhou, 2003; Lettieri, 2006; Palmer et al., 2006). En los estudios realizados se utilizan *microarrays* para analizar fragmentos de ARNr 16S con el fin de llevar a cabo estudios filogenéticos de comunidades bacterianas (Peplies et al., 2004; Palmer et al., 2006). Para ello, se procede a la amplificación por PCR del ADNr o ARNr 16S obtenido de una comunidad, antes de su hibridación con el *microarray*.

Además, se pueden diseñar *microarrays* con más de 1500 sondas distintas obtenidas a partir de genes clave involucrados en distintos procesos funcionales microbianos, como los ciclos biogeoquímicos del carbono (C), nitrógeno (N), azufre (S) o fósforo (P), transformación de metales, la biodegradación de contaminantes ambientales, respuestas a estrés, virulencia y resistencia a los antibióticos. Este tipo de *microarrays* se denominan *microarrays* de genes funcionales (FGA, del inglés *Functional Gene Arrays*) (He et al., 2012).

En la última década, se han desarrollado una variedad de FGAs que han sido aplicados para el análisis de la diversidad funcional, las actividades y la dinámica de comunidades microbianas de diferentes hábitats. Todos los resultados demuestran que los FGA constituyen una herramienta robusta, potente y de alto rendimiento, para perfilar comunidades microbianas con gran especificidad, sensibilidad y de forma cuantitativa, permitiendo vincular su composición y estructura con factores ambientales y el funcionamiento de los ecosistemas.

Se pueden desarrollar *microarrays* específicos para conocer el metabolismo de un contaminante diana como los HAPs siempre y cuando se conozcan los genes implicados. Ya hemos visto que la degradación microbiana de los HAPs se produce mediante vías catabólicas que suponen una serie de reacciones enzimáticas sucesivas. Enzimas clave como las dioxigenasas podrían ser dianas adecuadas para estrategias de cribado genético para la detección de bacterias con potencial catabólico para HAPs (Yen et al., 1988; Moser et al., 2001). En la actualidad se han clonado y secuenciado varios genes de dioxigenasas dihidroxilantes, como la familia de genes *nah* de *Pseudomonas*. Hamann et al., 1999, investigó la detección molecular de estos genes en diferentes cepas degradadoras, confirmando la presencia de genes homólogos a *nah* (*ndoB*) en *Gordonia*, *Mycobacterium* y *Rhodococcus*.

Los *microarrays* pueden detectar y cuantificar simultáneamente numerosos genes funcionales implicados en rutas de biodegradación de hidrocarburos, lo que nos proporcionaría información más completa sobre la biodegradación de compuestos específicos en el medio ambiente. Por ejemplo, uno de los primeros *microarrays* de genes funcionales diseñado contenía 1.662 sondas de genes para la resistencia de metales y la biodegradación de contaminantes orgánicos. Este sistema detectó de forma eficiente un enriquecimiento en genes degradadores de naftaleno que seguía a la degradación del naftaleno en microcosmos de suelo contaminado con HAPs (Rhee et al., 2004). Posteriormente, Nyssönen y colaboradores (2009) emplearon un pequeño *microarray* que contenía 15 sondas de genes funcionales para investigar el

efecto de la biodegradación de hidrocarburos en un agua subterránea contaminada con creosota. La detección de genes funcionales implicados en distintas fases de la biodegradación HAPs reveló el potencial intrínseco de las poblaciones naturales para responder a una bioestimulación *in situ*.

1.5. Biorremediación

La biorremediación es una tecnología basada en la biodegradación o transformación microbiana de contaminantes para eliminarlos o transformarlos en otros productos menos peligrosos para el medio ambiente y la salud humana. Idealmente los productos son convertidos en CO₂, agua, sales inorgánicas y/o biomasa, pero a menudo una parte del contaminante se puede acumular como productos de transformación parcial.

La biodegradación es un proceso que se produce de forma natural en el medio ambiente y la biorremediación intenta potenciarlo. Se trata de una tecnología económica, aplicable en suelos y aguas, y que no requiere grandes infraestructuras.

En el sentido más amplio, la biorremediación incluye el uso de enzimas, estimulantes del crecimiento, bacterias, hongos o plantas para degradar, transformar, secuestrar o movilizar contaminantes orgánicos, inorgánicos, o metales en el suelo, agua o aire.

Los tratamientos biológicos se llevan utilizando muchos años y son importantes para el tratamiento de aguas residuales, tanto industriales como urbanas, pero ha sido en los últimos tiempos cuando han empezado a implementarse de forma habitual en tratamiento de aguas subterráneas y suelos (US-EPA, 2000; US-EPA, 1998).

Para entender las estrategias que utiliza la biorremediación deben conocerse los factores que determinan los procesos de biodegradación en suelos.

1.5.1. Factores que determinan la biodegradación de hidrocarburos en el suelo

La biodegradación de los compuestos orgánicos en el medio ambiente, en este caso el suelo, está condicionada por distintos factores que incluyen la presencia de una población microbiana degradadora potencialmente activa, la disponibilidad de nutrientes (N y P principalmente) y aceptores de electrones necesarios para llevar a cabo esta actividad, factores intrínsecos del contaminante, como son la estructura

molecular, su concentración y su biodisponibilidad, y factores ambientales como el pH, la temperatura y la humedad, que afectan la actividad metabólica en general.

La estructura química del contaminante condiciona su biodegradabilidad, de modo que cuanto mayor es el peso molecular de un compuesto y menor su solubilidad en agua más lentamente se degradará (Cerniglia 1992). De las distintas familias de hidrocarburos, los *n*-alcanos y los alcanos ramificados de cadena intermedia (C₁₀-C₂₀) son, los substratos más fácilmente degradables, mientras que los compuestos de cadena larga son más difíciles de degradar (Chaineau et al., 1995). Los cicloalcanos a su vez se degradan más lentamente que las moléculas lineales. Entre los compuestos aromáticos la biodegradabilidad disminuye a medida que aumenta el número de anillos. Las fracciones que corresponden a resinas y asfaltenos son las que presentan una menor biodegradabilidad como consecuencia de las complejas estructuras químicas y el elevado peso molecular.

La resistencia de los hidrocarburos se incrementa a medida que aumenta su coeficiente de partición octanol/agua (log K_{ow}), que determina en gran medida la accesibilidad de los microorganismos al sustrato (biodisponibilidad) (Cerniglia 1992; Shor et al., 2003).

La **biodisponibilidad** es un factor crítico para biodegradación ambiental de los hidrocarburos, es un proceso dinámico, determinado por la tasa de transferencia de masa del sustrato a las células microbianas en relación a su actividad catabólica intrínseca (Johsen et al., 2005). Para determinadas poblaciones microbianas, la biodisponibilidad de un contaminante puede estar condicionada por factores físicos, como las limitaciones para la difusión del mismo por la presencia de microporos, la distribución del contaminante, y la baja difusión a través de los agregados del suelo (Volkering et al., 1992; Efrogmson y Alexander, 1995).

La biodisponibilidad de un contaminante depende, además de sus propiedades físico-químicas (solubilidad en agua, densidad), de las propiedades físico-químicas de la matriz del suelo, como el pH, textura y materia orgánica. Otra limitación son los procesos químicos como la adsorción (sobre todo a partículas de arcilla y materia orgánica) y la presencia de fases líquidas no acuosas, que originan una baja velocidad de reparto a la fase acuosa (Weissenfels et al., 1992).

El fenómeno de **envejecimiento (aging o weathering)** o secuestro, causa un gran impacto sobre la biodisponibilidad de los contaminantes, y se produce como consecuencia de un largo tiempo de residencia del contaminante en el medio, lo que

produce una interacción física o química con componentes del suelo, subsuelo o sedimento, alterándose el comportamiento de la molécula. La formación de fracciones de hidrocarburos resistentes a la desorción, muy poco bioaccesibles, da lugar al secuestro de hidrocarburos, proceso del cual se conoce muy poco, que incluye la absorción a fracciones húmicas condensadas en partículas arcillosas (Lahlou y Oretga-Calvo, 1999), adsorción a las fracciones del carbón negro presente en sedimentos (Ortega-Calvo y Gschwend, 2006), y fenómenos de difusión dentro de los agregados del suelo (Alexander, 2000).

Las poblaciones microbianas han desarrollado una serie de adaptaciones para mejorar la accesibilidad a los contaminantes, en respuesta a biodisponibilidad reducida, entre estas adaptaciones se han descrito la producción de biotensoactivos (Kanga et al., 1997; Ron y Rosenberg, 2002; Ábalos et al., 2004), o la presencia de fenómenos de quimiotaxis (Ortega-Calvo et al., 2003).

1.5.2. Biorremediación de emplazamientos contaminados por hidrocarburos

La remediación de suelos contaminados con componentes del petróleo merece especial atención por la frecuencia de los derrames y fugas accidentales que se producen en diferentes ubicaciones en todo el mundo (Swannell et al. 1996). Durante los derrames accidentales, el retiro o recuperación de los contaminantes se debe realizar de forma inmediata, pero se ha demostrado que incluso en casos en que el proceso de descontaminación se ha llevado a cabo poco después de ocurrido el derrame, los contaminantes pueden persistir durante décadas en las costas, amenazando la especies que las habitan (Owens et al. 2008).

En el caso de estaciones de servicio, refinerías y tanques de almacenamiento, las fugas pueden ser pequeñas pero de forma continua y durante mucho tiempo, con la probabilidad de contaminar aguas subterráneas y suelo, por lo que la remediación es necesaria y debe ser eficiente.

Actualmente la biorremediación es una práctica habitual en la descontaminación de suelos afectados por hidrocarburos, por su eficiencia, bajo coste y porque si se aplica con éxito garantiza la eliminación de los contaminantes. Sin embargo, los procesos globales implicados en la recuperación de suelos, donde encontramos mezclas de contaminates y comunidades bacterianas complejas, aún son poco conocidos. Una de las limitaciones que presenta es que es difícil predecir la concentración residual en la que se alcanzará la fase asintótica de la degradación y, por tanto, a menudo persiste

una fracción residual que si bien puede hallarse por debajo de los objetivos de descontaminación, restringe la posterior utilización del suelo. Conocer los procesos y las poblaciones microbianas implicadas en muestras reales permitirá su optimización así como una evaluación del riesgo más realista, garantizando la recuperación de la salud del suelo como sistema natural.

En el apartado anterior hemos visto que la intervención debe dirigirse a los parámetros que limitan el proceso, como son la presencia de microorganismos competentes capaces de degradar el contaminante y utilizarlo como fuente de carbono, y parámetros como la disponibilidad de agua, oxígeno, y fuentes de nitrógeno y fósforo (Rosenberg et. al 1992). Por ello, antes de aplicar técnicas de biorremediación es necesario realizar una serie de ensayos de factibilidad y tratabilidad a nivel de laboratorio, que servirán para conocer si es viable la aplicación de una técnica de biorremediación en un emplazamiento concreto. Estos ensayos indicarán el abordaje necesario, que puede implicar la adición de microorganismos degradadores, **bioaumentación** o biorrefuerzo, o de nutrientes y otros agentes, **bioestimulación**, destinados a mantener las tasas de degradación (Atlas 1995; Jiménez et al. 2006; Pritchard et al. 1992).

Una alternativa a la intervención activa que está cobrando fuerza es la **atenuación natural monitorizada (MNA)**, que se basa en el seguimiento de los procesos naturales de biodegradación propios del suelo o de las aguas subterráneas, que actúan sin intervención humana para reducir la masa, la toxicidad, la movilidad, el volumen o la concentración de contaminantes en estos ambientes.

La decisión de implementar el uso de cualquiera de estas técnicas de biorremediación por separado o conjuntamente, depende en gran medida de la capacidad de degradación de los microorganismos nativos y el grado de contaminación del sitio a ser tratado. Varios estudios han demostrado con éxito la biorremediación a nivel de laboratorio, pero no necesariamente su reproductibilidad en la descontaminación *in situ* (Balba et al. 1998; Cassidy et al. 1996; El Fantroussi y Agathos 2005).

1.5.3. Estrategias de biorremediación

Bioaumentación

El bioaumentación o biofortalecimiento consiste en la adición de poblaciones microbianas especializadas (cepas individuales o consorcios), que generalmente se cultivan por separado en condiciones definidas, para realizar una tarea específica de remediación en un ambiente dado (*in situ* o en un biorreactor) (Alvarez y Illman, 2006). Es una de las estrategias más utilizadas en procesos de biorremediación. Esta técnica es la más adecuada para emplazamientos que no posean suficientes células microbianas o donde la población nativa no posea las rutas metabólicas necesarias para metabolizar los contaminantes. Los estudios de viabilidad son un pre-requisito previo para cualquier intervención planificada (Tyagi et al., 2011).

Se han desarrollado dos enfoques distintos para el biofortalecimiento. Uno se basa en la inoculación con microorganismos con el potencial catabólico deseado para complementar o sustituir a una población de microorganismos nativos. En este caso, las bacterias o consorcios seleccionados son capaces de sobrevivir y competir con los microorganismos nativos, y ocupan un nicho metabólico específico dentro del ambiente contaminado (Vogel y Walter, 2002).

El segundo enfoque consiste en la adición de una gran concentración de células que actúan momentáneamente como biocatalizadores y que degradan significativamente un contaminante objetivo antes de convertirse en inactivas o morir (Duba et al, 1996; Krumme et al, 1994). En este caso, los microorganismos inoculados no son capaces de establecerse debido al estrés abiótico y biológico encontrado en el nuevo entorno.

Los inóculos utilizados para el bioaumentación pueden ser de diferentes tipos de microorganismos, incluyendo tanto bacterias como hongos, como los hongos lignolíticos. Los inóculos más utilizados para bioaumentación incluyen:

1. Cultivos mixtos. Cultivos de bacterias nativas que han sido altamente enriquecidos utilizando el contaminante o los contaminantes de interés (Steffan et al, 1999; Ulrich y Edwards, 2003; Zheng et al, 2001). El inóculo inicial se obtiene normalmente del propio suelo o de plantas de tratamiento de aguas residuales contaminadas.

2. Cultivos puros. Inoculación con una única cepa capaz de degradar el contaminante. Muchas cepas están disponibles en las colecciones de cultivos tipo

(por ejemplo, <http://www.atcc.org>), como por ejemplo *Pseudomonas stutzeri* KC (ATCC # 55595), que puede degradar el tetracloruro de carbono.

3. Elementos genéticos. Introducción de genes mediante la utilización de vectores (por ejemplo, plásmidos) que serán incorporados por las bacterias nativas. Esta estrategia permite introducir nuevas funciones catabólicas minimizando las dificultades asociadas con la inyección, distribución y supervivencia de células bacterianas exógenas.

4. Microorganismos genéticamente modificados (OGM). Aunque existe una vasta literatura sobre el desarrollo y potencial de bacterias degradadoras obtenidas por modificación genética, muchos países han puesto barreras legales para la liberación de OMG en emplazamientos contaminados debido a los riesgos potenciales para el ecosistema y la salud pública.

Los tipos de inóculos descritos anteriormente se encuentran disponibles en el mercado y se pueden adquirir a menudo como microorganismos liofilizados que pueden ser rehidratados y activados. Desde una perspectiva aplicada es más ventajosa la utilización de un consorcio microbiano en lugar de un cultivo puro ya que proporciona una diversidad metabólica y la robustez necesaria para su aplicación en el campo.

Por otro lado, aunque los microorganismos nativos posean las funciones necesarias para la descontaminación de un suelo, a menudo la inoculación reduce significativamente el tiempo de tratamiento. Por ejemplo, en un estudio llevado a cabo por Li et al., (2009) se mostró que los microorganismos nativos podían degradar los HAPs en un suelo contaminado en un periodo largo de tiempo, pero la adición de consorcios microbianos (cinco hongos: *Phanerochaete chrysosporium*, *Cunninghamella* sp., *Alternaria alternate*, *Penicillium chrysogenum*, y *Aspergillus niger*, y tres bacterias: *Bacillus* sp., *Zoogloea* sp., y *Flavobacterium*) mejoró significativamente la tasa de degradación (41,3%).

La biomasa que va a ser utilizada como inóculo para el bioaumentación se produce en biorreactores, de modo que la transferencia de estos cultivos al emplazamiento a menudo resulta crítica. En casos reales, la población introducida comienza a disminuir poco después de su adición debido a varios tipos de estrés abiótico y biótico. La tabla 1.10 resume los factores que pueden dificultar el éxito del bioaumentación.

Tabla 1.10. Factores que influyen en los procesos de bioaumentación (Tyagi et al., 2011).

Factores	Descripción	Referencias
Pérdida de viabilidad microbiana durante la inoculación	Estrés debido a los cambios drásticos en condiciones medioambientales	vanVeen et al. (1997), Goldstein et al. (1985)
Eventual muerte celular después de la inoculación	Agotamiento de los nutrientes o toxicidad causada por contaminantes	Goldstein et al. (1985), Liu et al. (2009)
Competencia	Competencia por nutrientes con microorganismos nativos	Thompson et al. (2005), El Fantroussi y Agathos (2005)
Predación	Bioaumentación seguida por la desaparición de la población bacteriana y el crecimiento excesivo de protozoos	Bouchez et al. (2000)
pH	pH extremos inhiben los procesos de la degradación microbiana	Dibble y Bartha (1979)
Temperatura	La temperatura influye en el crecimiento y la potencial degradación microbiana, así como la naturaleza física y química composición del contaminante	Atlas (1981)
Humedad	El contenido bajo de humedad limita el crecimiento microbiano y su metabolismo, los valores más altos reducen la aireación del suelo	Dibble and Bartha (1979), Leahy and Colwell (1990)

A menudo se utilizan materiales de soporte, como subproductos agrícolas, para transferir efectivamente el consorcio bacteriano al emplazamiento. Ello proporciona un soporte físico para la biomasa microbiana, así como un mejor acceso a los nutrientes, humedad y la aireación, lo que favorece a la tasa de supervivencia de los microorganismos (Mishra et al. 2001). La encapsulación de células microbianas o su inmovilización puede ofrecer una mejor tasa de supervivencia de las células bajo condiciones de estrés ambiental, por lo general permitiendo una biodegradación más rápida y eficiente en comparación con las células libres vivas (Moslemy et al 2002).

Bioestimulación

La bioestimulación consiste en incrementar la actividad de los microorganismos nativos de un ambiente natural por medio de la adición de nutrientes, humedad, aire u otros agentes destinados a aumentar la velocidad de biodegradación de los contaminantes en un emplazamiento contaminado (Swannell et al. 1996).

Identificar las condiciones limitantes para que los microorganismos nativos puedan llevar a cabo una remediación es un paso crítico. Los parámetros que limitan la actividad microbiana generalmente son nutrientes inorgánicos y orgánicos.

De estos, los más comunes son agua, oxígeno, nitrógeno, y fósforo. En el subsuelo terrestre, el agua puede ser limitante, pero generalmente no lo es. El contaminante puede ser utilizado como una fuente de carbono y energía por los microorganismos, y si su concentración excede en gran medida la entrada de **oxígeno** necesario por los microorganismos, este se puede convertir en limitante. La introducción de aire, oxígeno o peróxido de hidrógeno a través de galerías de infiltración, arado, burbujeo o volteo ha demostrado ser extremadamente eficaz la en bioremediación de contaminantes derivados del petróleo y una variedad de otros compuestos orgánicos que no son particularmente recalcitrantes (Thomas y Ward, 1992).

Está claramente demostrado que la degradación de hidrocarburos por la población microbiana nativa se puede producir favoreciendo la presencia de nutrientes requeridos en un emplazamiento contaminado (Delille et al. 2004). En un ambiente que ha sido anaerobio por largos periodos de tiempo, el contaminante tiene un alto contenido de carbono, y es probable que la desnitrificación haya reducido el contenido total de nitrógeno del medio ambiente haciendo de este un nutriente limitante. **El nitrógeno** se ha introducido con éxito en el subsuelo terrestre para bioestimulación usando amonio, nitrato, urea, y óxido nitroso (USEPA, 1989).

Naturalmente **el fósforo** es muy bajo en la mayoría de entornos, como el subsuelo terrestre; incluso si hay concentraciones altas de fósforo este podría estar en una forma mineral no disponible biológicamente, por ejemplo, la apatita. En ambientes contaminados se han utilizado con éxito varias formas inorgánicas y orgánicas de fosfato como biostimulantes (USEPA, 1989).

En entornos donde el contaminante no es una buena fuente de carbono o de energía y no existen fuentes alternativas, será necesario añadir una **fuentes adicional de carbono** (Horvath, 1972), pero ello no suele ser necesario en casos de contaminación por hidrocarburos.

Algunas plantas, como por ejemplo los álamos, también se han utilizado como agentes biostimulantes para la remediación de subsuelos (Schnoor et al., 1995). En este caso las plantas actúan como bombas de nutrientes y energía solar que estimulan los microorganismos de la rizosfera para degradar contaminantes (Anderson et al., 1993).

La **permeabilidad** en el emplazamiento en el que se lleva a cabo la biorremediación debe ser suficiente para permitir la perfusión de los nutrientes y el oxígeno. La conductividad hidráulica mínima promedio para una biorremediación se considera generalmente que es de 10^{-4} cm seg^{-1} (Thomas y Ward, 1989).

Por otro lado, los estimulantes deben ser compatibles con el medio ambiente. Por ejemplo, el peróxido de hidrógeno es una excelente fuente de oxígeno, pero puede causar la precipitación de los metales en los suelos y afectar al crecimiento microbiano. También es tóxico para las bacterias a concentraciones mayores de 100 ppm (Ward y Thomas, 1989). El amoníaco también puede ser un problema, porque se adsorbe rápidamente a las arcillas, provocando cambios de pH en ambientes mal tamponados.

En general se acepta que las bacterias del suelo necesitan una proporción de C:N:P de 30:5:1 para un crecimiento balanceado (Paul & Clark, 1989). Sin embargo, a nivel aplicado, las proporciones molares óptimas de C:N:P descritas en la bibliografía respecto al carbono a degradar son muy distintas. La EPA recomienda utilizar proporciones C:N que oscilan entre 100:10 y 1000:10 para la remediación de suelos contaminados por hidrocarburos (US EPA, 1995), mientras que en la bibliografía las proporciones más habitualmente utilizadas oscilan entre 100:10:1 y 300:10:1 (Bossert & Bartha, 1984; Litchfield, 1993, Atagana et al., 2003). La estimulación de las bacterias del suelo generalmente se produce cuando se logra esta proporción de nutrientes después de la adición de los mismos.

Debe tenerse en cuenta que aunque la adición de nutrientes es beneficiosa para estimular los procesos de degradación, existen casos en donde se ha descrito un efecto inhibitorio como consecuencia de la adición de un exceso de nutrientes orgánicos (Morgan & Watkinson, 1992).

Las condiciones ambientales, como por ejemplo el pH o el contenido de humedad, también pueden ser mejoradas para conseguir condiciones óptimas para la degradación microbiana (Atlas 1981).

Otro parámetro importante que afecta a la biodegradación es la **temperatura**, que a parte de su influencia directa en el metabolismo, puede tener también un efecto sobre la viscosidad, solubilidad en agua y a la composición química de crudos de petróleo y derivados.

La insuficiente biodisponibilidad de los hidrocarburos puede ser mejorada con el uso de biosurfactantes. **Los biosurfactantes** son un grupo diverso de sustancias tensioactivas producidas por microorganismos. Todos los biotensioactivos son anfífilicos, presentando una parte polar (hidrófila) y un grupo no polar (hidrófobo). El grupo hidrófilo se compone de mono, oligo o polisacáridos, péptidos o proteínas y el residuo hidrófobo por lo general contiene ácidos grasos saturados, insaturados e hidroxilados o alcoholes grasos (Lang, 2002).

Debido a su estructura anfifílica, los biotensioactivos aumentan el área de superficie de sustancias hidrófobas insolubles en agua, aumentando su biodisponibilidad a la célula bacteriana. Su actividad superficial los hace excelentes emulsionantes y agentes dispersantes, con la formación de espuma (Desai & Banat, 1997). En comparación con sus equivalentes de síntesis química tienen muchas ventajas. Son más amigables con el medio ambiente, siendo biodegradables, menos tóxicos y no peligrosos.

Uno de los biosurfactantes más estudiados son los ramnolípidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa*, que, por ejemplo, han sido utilizados satisfactoriamente para mejorar la solubilidad y la posterior degradación de fenantreno por cepas de *Sphingomonas* (Pei et al., 2010). Otro producto muy bien caracterizado son los trealolípidos producidos por *Mycobacterium tuberculosis*, *Rhodococcus erythropolis*, *Arthrobacter*, *Nocardia*, *Gordonia* y *Corynebacterium* (Franzetti et al., 2010).

La combinación de bioaumentación, bioestimulación, y la adición de biotensioactivos, dependiendo de las características del emplazamiento contaminado, podría ser una estrategia prometedora para acelerar la biorremediación (Baek et al. 2007).

Cualquier intervención que se realice, debe ir acompañada por estudios de ecotoxicidad y calidad de los emplazamientos contaminados para asegurarse de que se ha recuperado su actividad biológica de forma natural. Estos estudios proporcionan una mejor idea de la evaluación ecológica de la biorremediación en emplazamientos contaminados y puede ayudar a tomar decisiones para realizar con éxito una biorremediación (Hankard et al. 2004).

Atenuación natural monitorizada (MNA)

En la década de los 1990s el uso de estrategias de atenuación natural monitorizada para la gestión de emplazamientos contaminados comenzó a ganar interés,

especialmente en los Estados Unidos de América. En los años siguientes, otros países comenzaron también a explorar este concepto. Hoy en día, la atenuación natural monitorizada (MNA) es reconocida como una tecnología de remediación tanto en USA como en estados europeos.

La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US EPA) publicó definiciones para el concepto de atenuación natural en la 1999 OSWER (Oficina de Desechos Sólidos y Respuesta de Emergencia), directiva encargada del uso de la atenuación natural monitoreada (MNA) para la remediación de suelos contaminados y aguas subterráneas en emplazamientos regulados bajo todos los programas de la OSWER. Las definiciones de (M)NA de esta directiva son consideradas como base para numerosos trabajos (Declercq et al., 2012; EPA, 1999).

En general, los procesos de atenuación natural incluyen una variedad de mecanismos físicos, químicos o biológicos tales como la biodegradación, dispersión, dilución, adsorción, volatilización, de manera favorable y sin intervención humana, con el fin de reducir la masa, la toxicidad, movilidad, volumen, o la concentración de contaminantes en el suelo y las aguas subterráneas, llegando incluso a la completa mineralización de un contaminante. De esta lista de procesos, la biodegradación es el mecanismo principal para la atenuación de los contaminantes, como por ejemplo hidrocarburos de petróleo (Declercq et al., 2012).

Es importante subrayar la diferencia entre la atenuación natural (NA) o la atenuación natural monitorizada (MNA). La MNA se refiere a la utilización de NA como una opción de remediación de emplazamientos contaminados. La MNA gestiona los procesos de NA para lograr los objetivos de remediación específicos de un emplazamiento en un plazo razonable y bien fundamentado.

La MNA debe incluir dos aspectos esenciales: control de las fuentes y control del rendimiento del proceso a largo plazo. La MNA solo se debe utilizar como una técnica de remediación cuando cumpla con los criterios pertinentes de selección y objetivos de la remediación. Generalmente la MNA se utiliza en combinación con otros métodos de biorremediación.

La US EPA fue la primera en proponer tres líneas de evidencia que se deben cumplir para demostrar que la atenuación natural se lleva a cabo: (i) disminución documentada de las concentraciones de contaminantes en el emplazamiento (datos históricos), (ii) presencia y distribución de indicadores geoquímicos y bioquímicos de biodegradación (evidencia indirecta), (iii) evidencia microbiológica directa.

Estos principios han sido adoptados por muchos países para la regulación de la atenuación natural monitorizada como estrategia de biorremediación (EPA, 1999).

Los métodos de biología molecular son una herramienta que nos permite monitorear una MNA, porque nos proporcionan una demostración de las actividades de degradación (Jørgensen, 2007). Sin embargo, es de vital importancia su validación en ensayos de laboratorio que incluyan análisis químicos y de la actividad microbiana para que su uso pueda normalizarse en el monitoreo de la biorremediación.

1.5.4. Tecnologías de Biorremediación

Las técnicas de biorremediación se pueden clasificar en *in situ* o *ex situ* (Hatzinger et al. 2002; Talley & Sleeper 2006). En los tratamientos *ex situ* el suelo es excavado y transportado hasta la localización donde se implementará la tecnología. Esto implica la eliminación física de la contaminación en otra zona (que puede estar ubicada dentro del emplazamiento: *on site*). En contraste, las técnicas *in situ* implican el tratamiento del material contaminado en su emplazamiento natural. En general, el proceso de excavación y transporte conlleva mayores costes pero las tecnologías asociadas pueden ser más efectivas en relación a contaminantes de elevada persistencia en el medio ambiente.

La selección de la tecnología de biorremediación más adecuada depende de tres principios básicos: la susceptibilidad del contaminante a la transformación biológica, la accesibilidad de los contaminantes a los microorganismos (biodisponibilidad) y la capacidad de optimizar la actividad biológica.

Los tratamientos *in situ* más comunes son:

Bioventeo (bioventing) aeróbico: Se aplica en suelos con bajos niveles de oxígeno insuflando aire u oxígeno, para facilitar la biodegradación aeróbica de los contaminantes. En caso que se considere necesario se pueden añadir otros aditivos, como nutrientes o surfactantes. Esta tecnología está diseñada principalmente para tratar la contaminación del suelo por los combustibles, compuestos orgánicos volátiles (COV) y compuestos orgánicos semi-volátiles (SVOCs), pesticidas y herbicidas no halogenados (Juwarkar et al., 2010).

Tecnologías combinadas: El bioventing se puede combinar con otras tecnologías de remediación de suelos, como la extracción física SVE (*soil vapor extraction*), porque son tecnologías muy similares en el equipo utilizado, siendo la principal diferencia el flujo de aire. Por ejemplo, en un emplazamiento geológicamente complicado contaminado con 18000 litros de una mezcla de gasolina y aceites minerales, Dasch y colaboradores (1997), utilizaron una combinación de un método de bombeo y tratamiento, eliminación de productos, extracción de vapor y bioventing. En 21 meses se eliminaron aproximadamente 16600 litros de contaminante, 59% por extracción de vapores, 28 % por bioventing y 13 % por el método de bombeo y tratamiento.

Biosparging: Consiste en inyectar aire (u oxígeno) y nutrientes (si es necesario) en la zona saturada para aumentar la actividad biológica de los microorganismos nativos. El proceso de biosparging es similar al burbujeo de aire. Sin embargo, mientras que el burbujeo de aire elimina contaminantes principalmente a través de la volatilización, el biosparging promueve su biodegradación. En la práctica, cuando se utiliza cualquiera de las dos técnicas siempre se produce un cierto grado de volatilización y biodegradación. Para que predomine la segunda es necesario ajustar el flujo a la tasa de degradación. El biosparging depende de dos factores primordiales, la permeabilidad del suelo, que determina la tasa de transferencia de oxígeno desde la fase gaseosa a la fase acuosa y a los microorganismos, y la biodegradabilidad de los contaminantes.

Barreras permeables reactivas (*Permeable reactive barriers, PRB*). Se utilizan para el tratamiento de aguas subterráneas. Consisten en interceptar la trayectoria de flujo del agua mediante una pared construida con materiales porosos que permiten el paso de agua pero que impiden el paso de los contaminantes. Los contaminantes bien son degradados dentro de la pared o retenidos en una forma concentrada. Existen varios tipos de materiales para las paredes, siendo los más utilizados metales de valencia cero (principalmente Fe (0)), quelantes, absorbentes o compost. Si con la barrera se potencian procesos de biodegradación, por ejemplo por colonización de la superficie del material poroso por microorganismos, se denominan barreras pasivas bioreactivas (Kalim, 2004).

Bioslurping: Es una combinación de varias tecnologías para hacer frente a uno de los grandes retos de la remediación *in situ*, la presencia de productos libres específicamente LNAPLs (*Light Nonaqueous Phase Liquid*). El bioslurping combina la recuperación de LNAPLs asistida por vacío con bioventing y SVE (Place et al., 2003).

Por lo tanto, los sistemas de bioslurping recuperan simultáneamente productos libres y remedian las zonas vadosa, capilar y saturada.

Fitorremediación: Es un concepto relativamente nuevo y la tecnología aún no se ha demostrado ampliamente en el mercado. Es el uso de plantas para la recuperación de suelos y aguas subterráneas. La información que se posee acerca de la fitorremediación proviene principalmente de investigaciones de campo y de laboratorio. Sin embargo, posee un gran potencial y genera un gran interés por su bajo coste, su simplicidad y la rapidez de recuperación de suelos y aguas subterráneas.

Se puede usar para la remediación de suelos y aguas subterráneas contaminadas con metales pesados tóxicos, radionúclidos, contaminantes orgánicos, tales como disolventes clorados, compuestos BTEX, hidrocarburos de petróleo, y exceso de nutrientes (Schnoor et al., 1995). Otras aplicaciones de la fitorremediación incluyen zonas de amortiguamiento de la escorrentía agrícola y tratamiento de aguas urbanas y residuales industriales. También se puede emplear como un paso de final de biorremediación, en conjunción con otras técnicas de tratamiento. A pesar de todo, su aplicabilidad está limitada por varios factores.

La fitorremediación es práctica sólo en situaciones donde la contaminación es poco profunda (menos de 5 m), aunque en algunas situaciones de contaminación más profunda puede ser usada en conjunción con otras tecnologías. Las plantas facilitan la remediación a través de varios mecanismos: (i) captación directa e incorporación de contaminantes en la biomasa vegetal, (ii) inmovilización, o fitoestabilización de contaminantes en el subsuelo, (iii) secreción de enzimas de la planta en la rizosfera para que actúen directamente sobre los contaminantes y (iv) la estimulación de la degradación mediada por microorganismos en la **rizosfera**.

Los tratamientos *ex situ* se pueden clasificar según si se implementan en la zona contaminada (*on site*) o en un emplazamiento más o menos alejado (*off site*). Los tratamientos más comunes son:

Landfarming: Esta tecnología consiste en la aplicación de material contaminado que ha sido excavado sobre una zona de suelo delimitada formando una capa que se ara periódicamente para mezclar y airear el material. Los contaminantes se degradan, transforman y se inmovilizan por medio de reacciones bióticas y abióticas (Rubinos et al. 2007). A veces, en casos de contaminación muy poco profunda, la capa superior

del emplazamiento puede ser simplemente labrada sin requerir ninguna excavación. Se utilizan revestimientos u otros métodos para controlar los lixiviados.

Los suelos se airean periódicamente y se añade agua para controlar la humedad cuando sea necesario. En algunos casos, se pueden suplementar nutrientes o incluso manipular el pH del suelo.

Esta tecnología se utiliza principalmente para tratar la contaminación del suelo por combustibles, PAHs, VOCs no halogenados, SVOCs, pesticidas y herbicidas. Aunque es una tecnología muy simple y de bajo coste, requiere gran espacio, y la reducción en las concentraciones de contaminantes puede ser a veces debida a la volatilización en lugar de a biodegradación (Sanscartier et al 2010; Souza et al 2009).

Compostaje: Proceso biológicamente controlado que trata contaminantes orgánicos usando microorganismos en condiciones aeróbicas y termófilas (40-50°C). El suelo se excava y se mezcla con compuestos ricos en materia orgánica que aumentan su porosidad. La degradación de estos compuestos añadidos, genera las condiciones termófilas. Esta técnica ha sido utilizada con éxito para la descontaminación de suelos contaminados con petróleo (Al-Daher et al., 2001), y en la biodegradación de los 16 HAPs prioritarios de la EPA de un suelo contaminado procedente de un complejo industrial en el que se manufacturaba gas a partir de carbón utilizándose reactores de compostaje a nivel de laboratorio durante 8 semanas (Antizar-Ladislao et al., 2005).

Biorreactores en “slurry”: Es una tecnología muy costosa que se puede aplicar a suelos contaminados con compuestos persistentes y altamente recalcitrantes. Consiste en el tratamiento de los suelos excavados en el ambiente controlado de un biorreactor. Se añaden al reactor aceptores de electrones y nutrientes, y se controlan parámetros tales como el pH y la temperatura para optimizar los procesos biológicos. Además, el reactor puede ser inoculado con organismos especializados, si no está presente una población adecuada para la degradación.

La suspensión y la agitación del suelo promueven la transferencia de masa del contaminante e incrementan su contacto con la microbiota del suelo. Se pueden utilizar reacciones aerobias y anaerobias. Entre los contaminantes usados para esta técnica incluyen compuestos petroquímicos, disolventes, pesticidas, conservantes de la madera, explosivos, hidrocarburos de petróleo y otros productos químicos orgánicos.

Biopilas: Consiste en la formación de pilas con el suelo a tratar y la adición de nutrientes e inyección de aire. Estas biopilas usualmente poseen un tamaño de 2 a 4 metros de altura (Jørgensen et al., 2000) y pueden llegar a tener un tamaño que va desde metros cúbicos a escala piloto hasta 10000 m³ a escala real (Kodres, 1998). Esta tecnología ha sido utilizada a gran escala especialmente para hidrocarburos del petróleo (Filauro et al., 1998; Koning et al., 1998), y HAPs de origen pirolítico como los residuos del carbón y la creosota (Dubourguier et al., 1995; Porta et al., 1997).

Se pueden construir biopilas estáticas, como las utilizadas en este trabajo y que se discuten con más detalle en el apartado siguiente, o las denominadas biopilas dinámicas, sujetas a un volteo mecánico y que obviamente se utilizan para volúmenes de suelo más pequeños.

1.5.5. Bioremediación de suelos contaminados por hidrocarburos del petróleo mediante biopilas aeróbicas estáticas

Para realizar una biorremediación a gran escala en biopilas se deben tener en cuenta varios factores como: (i) conocer la concentración más baja del contaminante que se puede obtener (biodisponibilidad, actividad microbiana), (ii) el destino de los contaminantes (mineralización, biotransformación, evaporación, la acumulación de la biomasa microbiana, la cota de residuos, etc), (iii) el tiempo necesario para alcanzar el objetivo establecido (tasa de degradación) y, por último y muy importante, (iv) conocer los costos. Para todo ello son de gran utilidad los ensayos de tratabilidad en laboratorio.

El diseño de la biopila es fundamental para lograr un rendimiento óptimo, por esta razón las empresas de remediación poseen sus propios diseños y especificaciones para la ingeniería de las biopilas. Las biopilas pueden ser temporales o estar en instalaciones permanentes como en Estados Unidos donde, a diferencia de lo que ocurre en Europa, son muy populares. Las biopilas en instalaciones permanentes usualmente poseen una base de cemento, mientras que las biopilas temporales usan diferentes tipos de revestimientos de plástico. Pueden ser construidas en una gran variedad de tamaños y de formas, no existiendo pautas o límites de altura o anchura. A pesar de ello, para evitar la compactación del suelo, es conveniente construirlas de manera que su altura no exceda la altura máxima que pueda alcanzar la pala mecánica que se utiliza para formarlas.

Además, el tamaño y la forma de las biopilas deben ser tenidos en cuenta para poder proporcionar condiciones de aireación homogénea a lo largo de toda la pila. Unos lados con poca pendiente pueden dar lugar a una sobreaireación de la parte periférica respecto al núcleo, con la consecuente pérdida de eficiencia energética y pudiendo originar emisiones de compuestos volátiles (COVs) y aerosoles, así como el secado preferencial del suelo periférico, si la pila no se encuentra cubierta.

La altura está también condicionada por la aireación. Por ejemplo, una biopila pequeña no necesita mucha aeración, basta con la convección creada por el gradiente de temperatura para impulsar la circulación de aire a través de tuberías ranuradas. En biopilas de mayor tamaño, la aeración forzada se puede suministrar ya sea mediante soplantes o con bombas de vacío. La experiencia demuestra que una sola capa de tubería cerca de la base de la pila es suficiente para biopilas de hasta 3 m de altura (Von Fahnestock et al., 1996).

La anchura y la longitud de una biopila vienen determinadas por el volumen total de suelo a tratar y el espacio disponible en el emplazamiento. Para emplazamientos grandes, es común construir múltiples biopilas. Todas ellas pueden ser idénticas o tratar suelos con distintos grados de contaminación.

Componentes y construcción de una biopila

Como se puede observar en la figura 1.21, una biopila es un apilamiento de suelo de forma trapezoidal, al que se ha añadido los aditivos necesarios, se ha cubierto con un material impermeable, y que se asienta en un sistema también impermeable que permite recoger los lixiviados si los hubiera. El diseño incluye también un sistema de tuberías para la aireación, y puede incluir un sistema de irrigación.

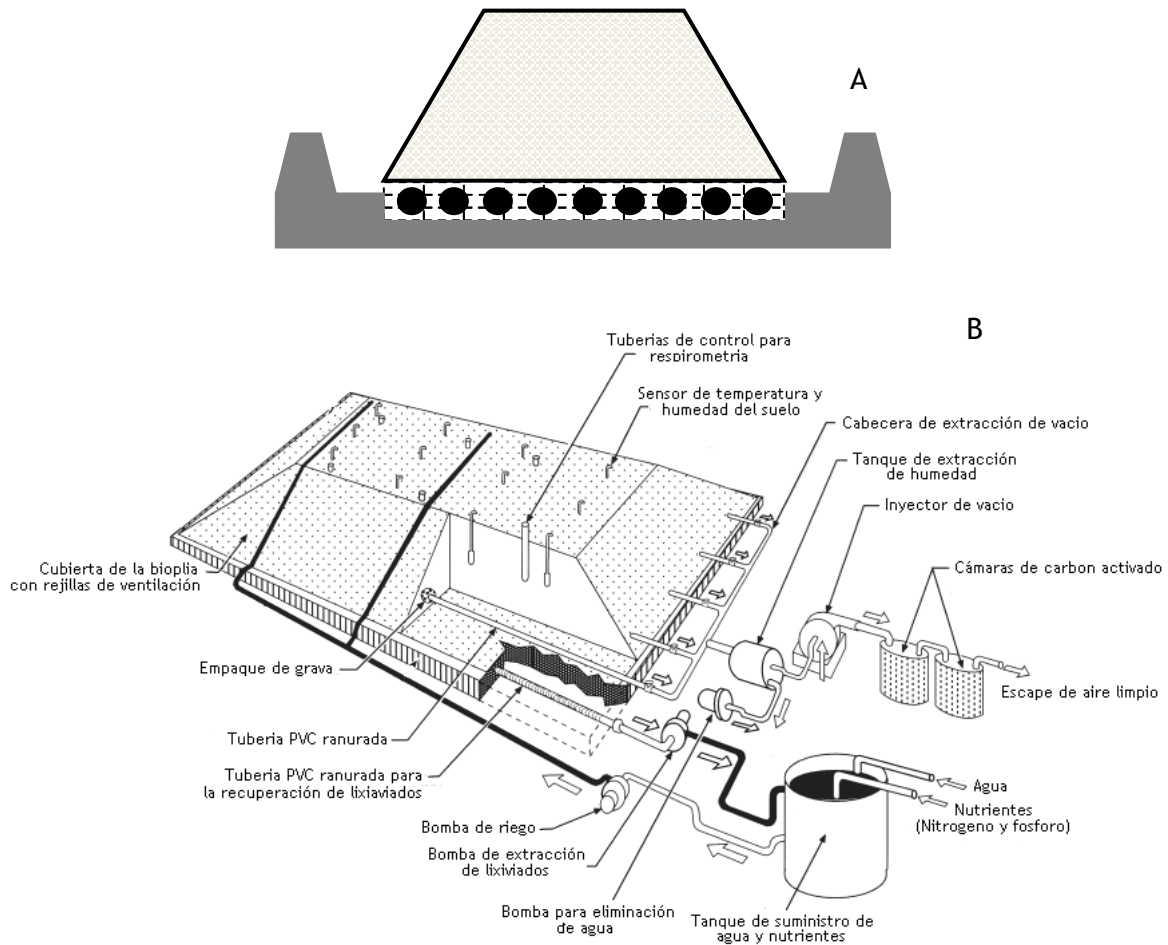


Figura 1.21. Elementos de una biopila. (A) Esquema. (B) Diagrama detallado. Modificado de Kodres, (1999).

La base de la biopila debe ser construida en una superficie relativamente sólida. En las más sofisticadas la base consiste en una capa de suelo o arcilla compactada (hasta 25 cm), un revestimiento impermeable, y un reborde para contener los lixiviados. La base de la biopila debe poseer una ligera inclinación de 1 a 2° para permitir el drenaje de lixiviados a un sumidero de recolección situado en una esquina de la biopila. El revestimiento impermeable generalmente es una capa de arcilla o un material sintético como el polietileno de alta densidad (HDPE) con costuras soldadas al calor, que es ideal para este propósito.

Una vez construida la base de la biopila, se instala el sistema de aireación sobre el revestimiento. Como principal elemento del sistema de aireación se dispone de una variedad de tubos de plástico ranurados de diversos espesores y materiales, siendo los de cloruro de polivinilo (PVC) de 2 a 4 pulgadas los más utilizados. Los tubos se embeben en una matriz altamente permeable, como virutas de madera o grava, que

actúa como un distribuidor de aire, ya sea operado con un soplante o una bomba de vacío. Si se usan varias tuberías, cada una dispone de una válvula que permite variar el flujo de aire, lo que permite equilibrar la aireación en las distintas partes de la biopila según sea necesario. En este sentido, son de gran utilidad también los soplantes de flujo regulable, ya que, por ejemplo, las necesidades de aireación al principio del proceso son mucho mayores que en etapas más avanzadas. Para evitar la emisión de vapores, el efluente gaseoso resultado de la aireación a veces es canalizado hacia filtros de carbono activado.

Se han llevado a cabo muchos proyectos de biorremediación con biopilas descubiertas, pero las **cubiertas** ofrecen claras ventajas. La primera es que evitan la formación de lixiviados, y otra es que minimizan la pérdida de agua. Una biorremediación *ex situ* para la limpieza de hidrocarburos de petróleo típica puede durar de 3 a 4 meses, durante los que una biopila cubierta pierde únicamente entre el 1 y el 2% del contenido inicial de agua. Por tanto no es necesario el ajuste de agua. Si la alternativa es instalar un sistema de aspersion o de riego por goteo, está claro que la utilización de coberturas es la opción más simple. De todos modos, el contenido en humedad de una biopila deber ser siempre monitoreado.

Las cubiertas son a menudo láminas de plástico resistente al agua, Visqueen, o un revestimiento fino de HDPE.

En cuanto a los **sistemas de irrigación**, si se requiere añadir agua es preferible hacerlo en la etapa de formación de la biopila. En caso de que fuera necesario el riego, se recomienda un sistema de goteo. La manera estándar para formar una biopila estática es adicionar todas las enmiendas necesarias al suelo tamizado y homogeneizado, y luego comenzar el apilado del sobre la base y el sistema aireación mediante una pala mecánica frontal.

La práctica habitual es realizar un cribaje del mediante equipos mecánicos para eliminar piedras, de modo que el tamaño medio de partícula en general es de 30 a 50 mm. Si existen grandes cantidades de arcilla es necesaria una trituración posterior. Tras del cribaje y trituración, existe una variedad de equipos disponibles para mezclar la tierra, y este es el momento óptimo para la adición de enmiendas. Para ello se realizan lotes de un volumen determinado de suelo y se mezclan con las cantidades necesarias de enmiendas líquidas y sólidas, con lo que a su vez se consigue una buena aireación y se esponja el suelo. Usualmente la biopila se forma desde atrás hacia delante, siendo la parte trasera la que aloja el la cabeza de la aireación.

Esta tesis doctoral se ha centrado en el estudio de las poblaciones y los procesos microbianos implicados en la biodegradación ambiental de hidrocarburos en suelos contaminados con mezclas petrogénicas sometidas a biorremediación, especialmente sobre aquellos relacionados con los HAPs y sus derivados metilados. Para ello, se ha utilizado como modelo el suelo procedente de un emplazamiento contaminado con gasoil y aceites hidráulicos pesados de la comunidad de Madrid sometido a biorremediación mediante tratamiento en biopilas aerobias estáticas. De esta forma, se ha analizado el destino de los HAPs y la estructura de las comunidades bacterianas naturales implicadas a largo del tratamiento, y en incubaciones de este suelo a nivel de laboratorio, se han analizado, a nivel filogenético y funcional, las poblaciones implicadas en la degradación de las distintas fracciones de hidrocarburos del crudo de petróleo, y las posibles interacciones entre ellas.

Para dar respuesta a este objetivo general, se han concretado los siguientes **objetivos específicos**:

- Determinar la concentración de los HAPs y, especialmente, de sus distintas familias de derivados metilados, a lo largo del tratamiento en biopila. Evaluar su destino, y los mecanismos implicados, en base a la identificación de metabolitos resultantes de su oxidación.
- Vincular la degradación de los distintos componentes de la matriz contaminante con la evolución de las comunidades microbianas implicadas, que se analizaran mediante técnicas dependientes de cultivo y de ecología microbiana molecular.
- Evaluar *in vitro* la biodegradabilidad de la fracción alifática, aromática y de ambas en conjunto por parte de la microbiota nativa del suelo de la biopila. Conocer si la presencia de la fracción alifática, más abundante, condiciona la degradación de la fracción poliaromática.
- Analizar la estructura y función de las comunidades microbianas implicadas en la degradación de las fracciones de hidrocarburos del crudo de petróleo, y determinar el rol que pueden desempeñar cada una de ellas durante la biorremediación de suelos contaminados.

3.1. Diseño experimental

Los trabajos se dividen en dos bloques experimentales. En el primero se estudian los procesos de biodegradación y las poblaciones implicadas durante la bioremediación de un suelo afectado de contaminación con hidrocarburos del petróleo. En el segundo se utiliza este mismo suelo después del tratamiento, como inóculo para investigar la influencia de la fracción alifática en los procesos de degradación de la fracción aromática de un crudo envejecido. Las muestras han sido suministradas por la empresa Geotecnia 2000 SL, que lleva a cabo la descontaminación del emplazamiento.

3.1.1. Suelo de estudio y proceso de bioremediación

El suelo de estudio procede de un emplazamiento ubicado en un polígono de la Comunidad de Madrid, donde se había llevado a cabo una actividad industrial durante más de 50 años. Como consecuencia de esta actividad, se produjeron fugas importantes de mezclas de hidrocarburos desde varios tanques de almacenaje subterráneos afectados de corrosión. Cada uno de los tanques tenía una capacidad de almacenamiento de 40.000 litros y el derrame afectaba suelo y, en menor proporción, aguas subterráneas. Los análisis preliminares revelaron que la mezcla contaminante correspondía a una combinación de aceites hidráulicos y gasoil en proporciones variables dependiendo de la zona.

Las labores de caracterización ambiental del subsuelo para establecer la tipología de los contaminantes, grado de afección y su extensión espacial, fueron realizadas por la propia empresa gestora del suelo, Geotecnia 2000 SL. Con los datos obtenidos, procedió a la elaboración de un estudio de evaluación de riesgos que sirvió de base para establecer los objetivos de limpieza del suelo del emplazamiento para su uso industrial, fijados en una concentración de TPHs inferior a 8000 ppm. Tras evaluar las distintas alternativas de remediación del emplazamiento, en base a criterios de coste y tiempo necesario para alcanzar los objetivos, la empresa optó por la excavación selectiva de los suelos y su posterior tratamiento mediante biopilas activas. El tratamiento se realizó en varias etapas en cada una de las cuales se contruían tres biopilas. En cada etapa el suelo excavado era transportado en camiones hasta zonas de 30 x 60 metros, previamente impermeabilizadas, habilitadas *on site* como áreas de **homogeneización**.

En la primera etapa, a la que corresponde este estudio se realizaron trabajos de demolición de estructuras subterráneas y de excavación selectiva de 5.470 m³ de suelo, correspondientes a dos zonas de 525 m² y 1.250 m², respectivamente. Durante la excavación de estas zonas se detectaron importantes estructuras de hormigón y ladrillo alcanzado algunas de ellas una profundidad aproximada de 4-5 m. El suelo acopiado, se sometía a un proceso de aireación mecánica y desterronado, retirándose los fragmentos de escombros. Esta tarea, fundamental para una correcta oxigenación y homogeneización de los mismos, se realizaba mediante volteo, ayudado por una retroexcavadora dotada de un cazo de 80 cm. Los suelos eran cargados con el cazo y dejados caer al suelo desde una altura de 5 metros, favoreciendo su disgregación, mezcla y adecuada aireación.

Tras la homogeneización, se tomaron 4 muestras de suelo, para determinar su contenido en TPHs (19799 mg/kg \pm 8899), nitrógeno y fósforo total, humedad, capacidad de campo y pH (7,02). En base a estos resultados, se ajustó la concentración de nutrientes a una relación molar C: N: P: K de 100:10:1:1, mediante la adición de urea (46% N), fosfato bicálcico (CaHPO₄·2H₂O, 17,5% P) y sulfato potásico (K₂SO₄, 50% K). La adición de nutrientes se realizó mediante riego ajustando al 40% de capacidad de campo. Posteriormente, se verificó *in situ* la humedad del suelo y se corrigió en caso necesario. Tras esta fase de homogeneización, se procedió a la carga y transporte de los suelos contaminados hasta la base de cada una de las biopilas. La geometría de las biopilas correspondía a una pirámide truncada de base rectangular de 37 m de largo por 28 m de ancho y 2 metros de altura, capaz de contener un total de 1.800 m³ de suelo. En la base de cada una de estas biopilas, se ubicó un sistema de aireación formado por cinco tuberías de inyección ranuradas, con sus correspondientes válvulas y un soplante por biopila.

La colocación de los suelos en cada una de ellas se realizó mediante la utilización de un camión basculante evitando al máximo la compactación de los mismos. Simultáneamente fueron instalándose los captadores de vapor y los respiraderos. A medida que se iban depositando los montones de suelo, una máquina retroexcavadora se encargaba de configurar la geometría definitiva de la biopila. Una vez finalizada su construcción, se procedía a cubrirla mediante una lámina continua de PEAD (Polietileno de alta densidad) y a la instalación del sistema de fijación de la cubierta, compuesto por bordillos de hormigón y cordadas de nylon.

En el trabajo realizado a lo largo de esta Tesis, se utilizaron muestras procedentes exclusivamente de una de las tres biopilas (biopila 1), seleccionada en base al tipo de contaminación del suelo utilizado para su construcción. Como ya se ha comentado previamente, el emplazamiento presentaba una contaminación heterogénea, procedente de una mezcla de aceites minerales y gasoil, que dio lugar a que en cada una de las biopilas la matriz contaminante del suelo fuera significativamente distinta. Por este motivo, y en base al objetivo de este trabajo, centrado en el estudio de los procesos implicados en la eliminación de los HAPs del suelo, se seleccionó la biopila 1 por su mayor grado de contaminación y por presentar una mayor concentración de compuestos poliaromáticos.

3.1.2. Estudio de los procesos bacterianos implicados en la biodegradación de HAPs en biopilas de suelo contaminado con hidrocarburos del petróleo

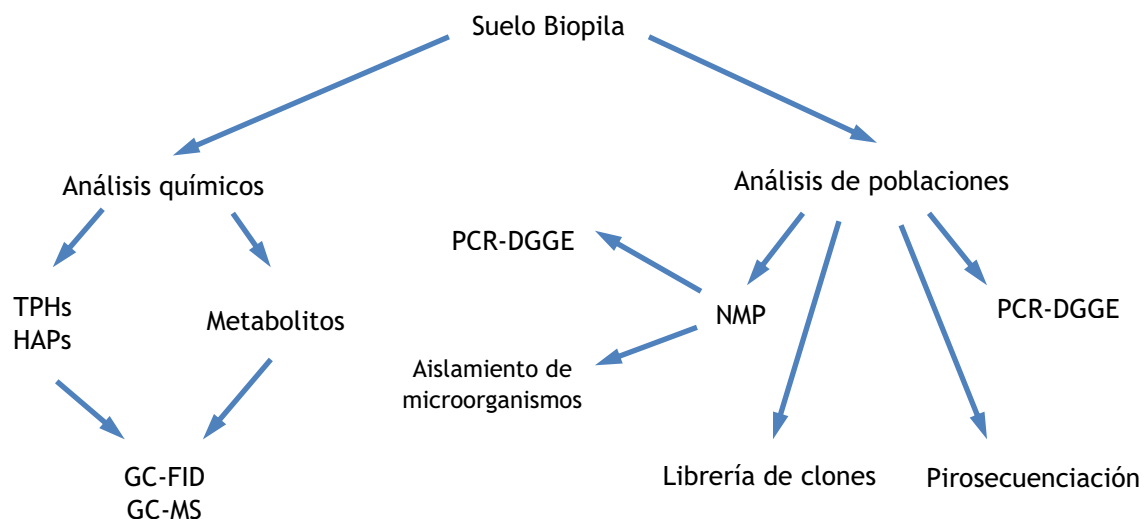
Con el objetivo de investigar los procesos de biodegradación implicados en la eliminación de los hidrocarburos contaminantes durante el tratamiento con biopilas y las poblaciones microbianas implicadas, se realizó un seguimiento de la evolución de la concentración de HAPs y de la estructura de la comunidad bacteriana presente, mediante un muestreo mensual a lo largo de los 120 días de tratamiento (Tabla 3.1). Dichos muestreos se realizaron siguiendo las recomendaciones de la US EPA (1989). Previamente a la construcción de la biopila, la empresa diseñó una red de 35 puntos de muestreo, asignando siete para cada tiempo, distribuidos homogéneamente a lo largo de la biopila. La recogida de muestras se realizó mediante la utilización de un toma muestras manual (Hand Auger), desde la parte superior de la biopila, y alcanzando una profundidad de 2 metros.

Se tomaba una cantidad representativa de suelo (5 Kg), que posteriormente se homogeneizaba, tamizaba (20 mm) y cuarteaba. Alícuotas de 500 g, aproximadamente, se introducían en botes de cristal de 400 ml de capacidad, y se enviaban refrigeradas a nuestro laboratorio para su posterior análisis.

Tabla 3.1. Número de muestras de suelo de la biopila 1 y tiempos de recolección.

Tiempos	Nº muestras	Fecha
Homogenización	4	03,07/02/2011
Tiempo 0 días	6	09,10/02/2011
Tiempo 30 días	7	10/03/2011
Tiempo 60 días	7	11/04/2011
Tiempo 90 días	7	11/05/2011
Tiempo 120 días	7	14/06/2011

Inmediatamente a la llegada al laboratorio, máximo 24 horas después de su obtención, las muestras se homogeneizaban y tamizaban (2 mm), y se procedía a la determinación de la humedad, la enumeración de poblaciones heterótrofas y degradadoras mediante la técnica del número más probable (NMP), y a la obtención de extractos de DNA para los análisis de la estructura de la comunidad bacteriana mediante métodos moleculares. Por otro lado, se guardaban muestras a -20°C para su posterior procesamiento para el análisis químico (TPHs, HAPs y metabolitos). El protocolo analítico aplicado para la caracterización de estas muestras se resume en la figura 3.1.

**Figura 3.1.** Esquema del protocolo experimental

La cuantificación de **TPHs** y **HAPs** se llevó a cabo a partir de la extracción en Soxhlet de muestras de 10 g de suelo. De los extractos orgánicos obtenidos se separaba la fracción de TPHs mediante fraccionamiento en columnas de alúmina, siguiendo el

protocolo 3611b de la US EPA miniaturizado en columnas de SPE (Vila & Grifoll, 2009), y se analizaba mediante GC-FID y GC-MS (apartado 3.2.4).

El análisis de **metabolitos** se realizó sólo de las muestras correspondientes al momento en que se observó la máxima degradación de HAPs. Para ello se obtuvo una muestra compuesta de las siete réplicas de dicho punto a la que se aplicó un protocolo analítico descrito previamente por el grupo de investigación (Arias, 2008). Para el análisis de los metabolitos neutros se obtuvo un extracto orgánico total de la muestra de suelo y se fraccionó en columna de sílice-alúmina (apartado 3.2.1) (Vila & Grifoll, 2009). Para detectar posibles metabolitos ácidos se obtuvo un lixiviado ácido del suelo (pH 2) y se sometió a extracción líquido-líquido. Las distintas fracciones del extracto del suelo, correspondientes a las distintas familias de metabolitos neutros, y el extracto ácido de los lixiviados, previamente derivatizado con diazometano, se analizaron mediante GC-MS.

En todas las muestras de suelo se analizaron las **poblaciones microbianas** utilizando tanto técnicas moleculares como dependientes de cultivo. En el momento de la recepción de las muestras en el laboratorio, se realizaron recuentos de poblaciones heterótrofas, y degradadoras de hexadecano, pireno y fenantreno mediante la técnica del número más probable (NMP), y se llevó a cabo la extracción del ADN total para el análisis de la estructura de la comunidad microbiana.

Para identificar los principales componentes de la comunidad implicados en la degradación de los HAPs **fenantreno** y **pireno**, de los recuentos a 120 días se seleccionaron cuatro pocillos correspondientes a las diluciones menos concentradas con crecimiento positivo para cada uno de los dos HAPs. Se realizaron **aislamientos** tanto en medio mineral (BMTM) con el HAP (0,1 g/L) correspondiente, como en medio rico (LB 1/10). Las cepas aisladas se identificaron por secuenciación de su ADNr 16S y se comprobó su capacidad de degradación en cultivos líquidos con fenantreno o pireno (apartado 3.3.3). Por otro lado, se analizó la comunidad bacteriana presente en estos pocillos mediante el análisis por PCR-DGGE del ADNr 16S (apartado 3.4.3) y secuenciación de las bandas detectadas.

La evolución de la **estructura de la comunidad bacteriana** a lo largo del tiempo de tratamiento se siguió mediante perfilado en geles de DGGE de amplicones de las regiones hipervariables V1-V3 (apartado 3.4.3). El estudio de su composición se abordó inicialmente mediante la obtención de una librería de clones de fragmentos prácticamente completos del ADNr 16S (apartado 3.4.4) a partir de una muestra compuesta de los extractos de DNA obtenidos a 120 días.

Dada la elevada diversidad detectada y la creciente disponibilidad de métodos de alto rendimiento, se estimó necesario realizar un estudio más completo mediante **pirosecuenciación** con código de barras del 16S rDNA. Esta técnica permite obtener un elevado número de secuencias a partir de un producto de amplificación, y por lo tanto, abarcar una mayor diversidad en este tipo de muestras complejas. Para ello, se amplificó el ADNr 16S a partir de muestras compuestas de tiempos de incubación representativos (homogeneización, 0, 30 y 120 días después de la construcción de la biopila) utilizando cebadores universales para las regiones hipervariables V1-V3, obteniéndose más de 4000 lecturas por muestra.

3.1.3. Biodegradación de fracciones del petróleo en microcosmos inoculados con suelo de las biopilas

Para profundizar en el rol de los distintos grupos bacterianos presentes en el suelo tratado mediante biopila en la degradación de las distintas familias de hidrocarburos, Se diseñó un experimento en el que se establecían microcosmos con medio mineral y distintas combinaciones de las fracciones alifática (F1) y aromática (F3) de un crudo Casablanca envejecido (apartado 3.2.2), que se inoculaban con una muestra de suelo tomada al finalizar el tratamiento de biorremediación en biopilas. Con este experimento, a la vez, se pretendía establecer si la presencia de la fracción alifática, más abundante, condiciona las rutas de degradación de la aromática, favoreciendo reacciones de cometabolismo. Ello podría implicar la existencia de un grupo de poblaciones, que actuarían como degradadoras secundarias, y serían las responsables de la mineralización de productos cometabólicos.

Los cultivos se realizaron en viales de centelleo de cristal de 20 ml, a los que se adicionaron las distintas combinaciones de fracciones (F1, F3 y F1+F3) como única fuente de carbono y energía. Dichas fracciones se añadieron disueltas en diclorometano a los viales vacíos previamente esterilizados, manteniendo una proporción F1:F3 de 4:1, tal y como se encontraban en el crudo original. Concretamente, cuando fue necesario, se añadieron 40 mg de F1 y/o 10 mg de F3. Finalmente, tras la evaporación del disolvente, se añadieron 10 ml de medio mineral BMTM estéril. El inóculo se preparó mediante suspensión de 20 gramos de suelo en 180 ml de solución Ringer seguida de agitación en agitador magnético (30 minutos). Tras un reposo de 30 minutos para favorecer la sedimentación de las partículas del suelo, se utilizaron 500 µl del sobrenadante de cómo inóculo para cada uno de los distintos microcosmos.

A diferentes tiempos de incubación (0, 3, 7, 15 y 30 días) se sacrificaban seis réplicas de cada tratamiento que se utilizaban para llevar a cabo los análisis químicos y microbiológicos, cada uno de ellos realizados por triplicado. Paralelamente, se incubaron, también por triplicado, controles abióticos y sin fuente de carbono. Todos los cultivos y controles se incubaron a 25°C y en agitación a 200 rpms.

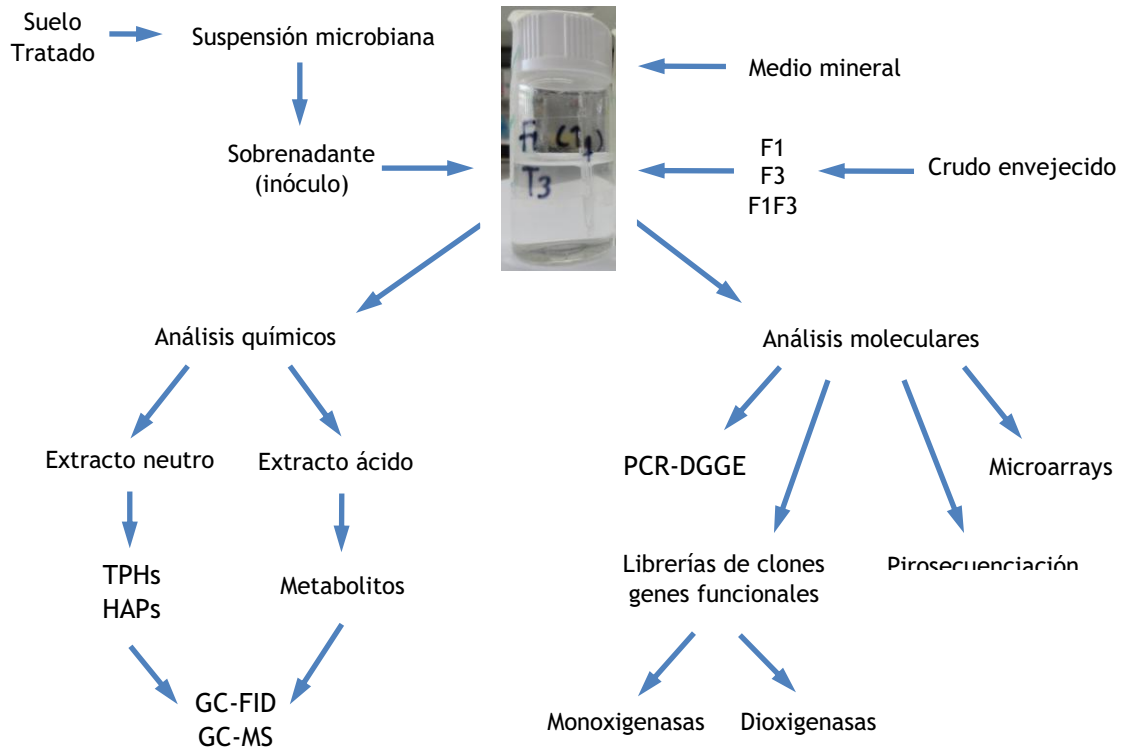


Figura 3.2. Esquema del protocolo experimental empleado para la preparación y análisis de las incubaciones de suspensiones bacterianas de suelo tratado en biopila en presencia de las fracciones alifática y aromática de crudo de petróleo.

Transcurrido el tiempo de incubación, se analizaron los **hidrocarburos residuales** y **metabolitos** a partir de la extracción líquido-líquido del contenido de cada uno de los microcosmos. Se llevaron a cabo cinco extracciones en condiciones neutras utilizando 1 volumen de diclorometano en cada una de ellas (extracto neutro), y cinco extracciones con acetato de etilo tras la acidificación del medio de cultivo (pH 2) con HCl 1M (extracto ácido). La concentración de alcanos y HAPs se determinó a partir de fragmentogramas de iones reconstruidos para cada familia de analitos tras el análisis de los extractos neutros por GC-MS. La posible presencia de metabolitos se determinó mediante análisis por GC-MS de los extractos ácidos derivatizados de los cultivos.

Los cambios en la **estructura de la comunidad bacteriana** a lo largo del tiempo de incubación, y en función de las fracciones del crudo de petróleo utilizadas como sustrato, se siguieron a partir de la extracción del ADN total de la comunidad, y el análisis de amplicones de las regiones hipervariables V1-V3 del ADNr 16S mediante perfilado en geles de DGGE (apartado 3.4.3).

Los análisis de ecología microbiana molecular de estos cultivos se completaron durante una estancia doctoral de 3 meses en el grupo de investigación del Dr. Pierre Peyret y la Dra. Corinne Petit en el Laboratory Microorganisms, Genome and Environment (LMGE) - UMR CNRS 6023, Clermont-Ferrand, Francia. Durante esta estancia, se utilizó el ADN extraído previamente para analizar la estructura de la comunidad bacteriana mediante **pirosecuenciación** del ADNr 16S (apartado 3.4.6), y para llevar a cabo la detección de **genes funcionales** vinculados a la degradación de hidrocarburos. Esta aproximación se realizó siguiendo dos abordajes: 1) la amplificación por PCR y análisis por librería de clones de genes diana seleccionados, incluyendo 3 tipos de **monooxigenasas** (*Cyp153A*, *AlkB*, *AlmA*) y de **dioxigenasas dihidroxilanes** (**bifenil 2,3-dioxigenasa**, **naftaleno dioxigenasa de Gram-negativos**, y **HAP-dioxigenasas de Gram-positivos**) (apartado 3.4.4); y 2) la utilización de **microarrays** desarrollados por el grupo del Dr. Peyret para la detección de rutas metabólicas de distintos contaminantes, entre ellos HAPs (apartado 3.4.7).

Los análisis por pirosecuenciación y *microarrays* de genes funcionales se llevaron a cabo con muestras compuestas obtenidas de la mezcla del ADN total obtenido de las distintas réplicas de los microcosmos para cada tiempo y condición.

3.2. Análisis químico

3.2.1. Obtención de las fracciones de TPHs y metabolitos de muestras de suelo

Preparación de las muestras

Tras la recepción de las muestras de suelo en el laboratorio, se procedió a realizar una homogenización manual y un tamizado de las mismas a través de una malla de 2 mm de diámetro. El contenido en humedad se determinó mediante el diferencial de gravimetría de una alícuota de 10 g de suelo tras su desecación en una estufa a 125°C durante 24 horas.

Las muestras de suelo de las que sólo se analizaron TPHs se extrajeron directamente en soxhlet. Aquellas en que se analizaron metabolitos, previamente a la extracción se obtuvo un lixiviado ácido en donde se esperaba detectar los metabolitos ácidos (Arias 2006) que se separó de la fase sólida mediante filtración. A continuación se extrajo la fase sólida en soxhlet para el análisis de hidrocarburos y metabolitos neutros.

Extractos orgánicos y de TPHs de muestras de suelo

Los extractos neutros de las muestras de suelo de la biopila se realizaron mediante Soxhlet de acuerdo con el método 3540C de la US EPA (1996a). Para cada una de las muestras, se tomaron 10 g de suelo a los que se añadieron 200 µg de *orto*-terfenilo (OTF) como estándar interno de tipo *surrogate*. A continuación, el suelo se secó mediante su mezcla con una cantidad igual de sulfato sódico anhidro y se sometió a un proceso de extracción mediante Soxhlet durante 6 horas, empleando como solvente una mezcla de diclorometano:acetona en una relación 2:1 (v/v).

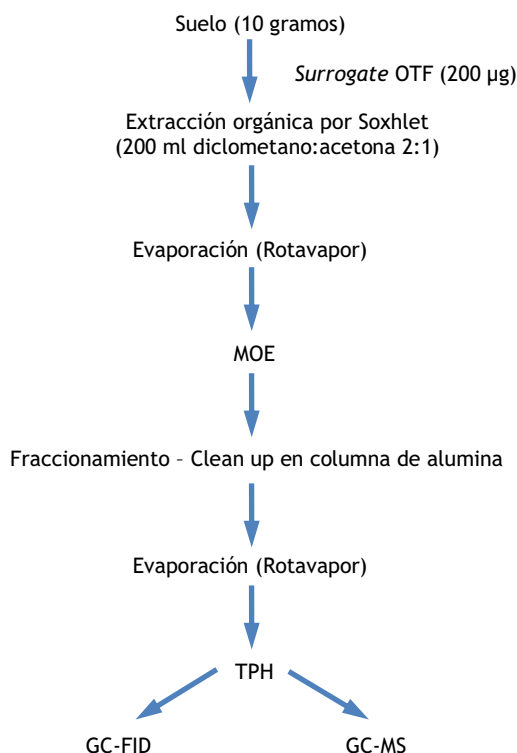


Figura 3.3. Esquema del protocolo analítico empleado para la determinación del contenido de TPHs y HAPs en las muestras de suelo de la biopila.

Los extractos orgánicos así obtenidos se concentraban en un rotavapor (Büchi), y se llevaban a un volumen final de 5 ml en matraz aforado. Una alícuota de 1 ml se utilizaba para determinar la materia orgánica extraíble (MOE) total mediante gravimetría, para lo cual se determinaba el peso del residuo seco después de su evaporación a temperatura ambiente durante 24 horas en un desecador.

Los **hidrocarburos totales del petróleo** (TPHs) se obtenían mediante fraccionamiento o *clean up* de una alícuota del extracto neutro en columnas de extracción en fase sólida (SPE) de vidrio BakerBond® (JT Baker), de 1 cm de diámetro interno, empaquetadas con 2,5 g de alúmina (70-230 mesh, Merck) previamente activada a 125°C durante 24 horas, siguiendo el protocolo EPA 3611b modificado (Vila & Grifoll, 2009). En función de la gravimetría, se cargaban 0,5 o 1 ml del extracto y se eluían empleando 25 ml de diclorometano. La fracción de TPHs obtenida se concentraba en un rotavapor y se llevaba a un volumen final de 1 ml en matraz aforado con diclorometano.

Metabolitos de muestras de suelo

Obtención de lixiviados

La detección de metabolitos en las muestras de suelo de la biopila se llevó a cabo a partir de una muestra compuesta (25 g) obtenida de la mezcla a partes iguales de material procedente de las siete réplicas obtenidas a los 30 días de tratamiento, correspondientes al momento de máxima degradación de HAPs. El análisis de los metabolitos se realizó según el protocolo descrito previamente por el grupo de investigación (Arias, 2008).

Este método incluye la obtención de lixiviados del suelo para facilitar la detección de metabolitos ácidos, y el análisis de la fase sólida residual para la detección de los metabolitos neutros. Los lixiviados se obtuvieron mediante la resuspensión de los 25 g de muestra en 100 ml de agua milliQ. Esta mezcla se introdujo en un matraz Erlenmeyer de 250 ml y se sometió a un proceso de sonicación durante 30 minutos en un baño de ultrasonidos (Selecta).

Detección de metabolitos ácidos en lixiviados

La separación del lixiviado del suelo se realizó por filtración utilizando un sistema de filtrado compuesto por un embudo Büchner de porcelana, de 10 cm de diámetro, recubierto con papel filtro Whatman® (125 mm de diámetro) y adaptado a un matraz

Kitasato de vidrio (Pyrex®), conectado a su vez a una fuente de vacío. El contenido total del Erlenmeyer se pasó cuidadosamente a través del sistema, utilizando un vacío moderado. Con la fase acuosa recuperada (lixiviado) se obtuvo un extracto neutro y ácido. El extracto neutro se obtuvo mediante cinco extracciones líquido-líquido sucesivas empleando 20 ml de diclorometano. A continuación se ajustó el pH a 2,0 con HCl (1M), y se llevó a cabo un nuevo proceso de cinco extracciones utilizando 20 ml de acetato de etilo en cada una de ellas. Ambos extractos (neutro y ácido) se evaporaron bajo corriente suave de nitrógeno y se resuspendieron en 1 ml de diclorometano.

Para detectar posibles metabolitos ácidos, ambos extractos se derivatizaron con diazometano y se analizaron por GC y GC-MS (apartado 3.2.4).

Metabolitos neutros

La detección de metabolitos neutros se realizó a partir del análisis del extracto orgánico de la fase sólida. El papel de filtro utilizado para la separación del suelo se recuperó del embudo con la ayuda de pinzas y se introdujo de nuevo en el Erlenmeyer inicial. Para disminuir la humedad del suelo se añadieron 10 g de Na₂SO₄, y se mezclaron fuertemente con una espátula para mejorar el contacto entre la fase sólida y la sal. La extracción se realizó mediante sonicación de acuerdo con el protocolo utilizado anteriormente en nuestro grupo para la extracción de contaminantes orgánicos en sedimentos (Grifoll et al., 1900; Fernández et al., 1992). Como solvente se utilizó una mezcla de diclorometano/acetona (2:1 v/v) y la mezcla se sometió a un proceso de extracción mediante 5 sonicaciones sucesivas de 20 minutos en un baño de ultrasonidos. El extracto se secó a través de Na₂SO₄, y se concentró en un rotavapor hasta un volumen final de 2,5 ml.

Para detectar la acumulación de posibles metabolitos neutros, los extractos se fraccionaron por cromatografía en columna. El extracto se aplicó a una columna de vidrio (20 x 1 cm) empaquetada con 8 g de óxido de aluminio (arriba) y 8 g de sílica (parte inferior), previamente activados a 320°C y 125°C, respectivamente, e inactivados con agua (5%).

La elución de las diferentes fracciones se realizó con el siguiente sistema de disolventes: *n*-hexano (20 ml; FI), diclorometano:*n*-hexano (9:1) (20 ml; FII), diclorometano:*n*-hexano (8:2) (40 ml; F III), diclorometano:*n*-hexano (1:1) (20 ml; FIV), diclorometano (20 ml; FV), diclorometano-metanol (8:2) (20 ml; FVI), metanol (40 ml; FVII), y metanol acidificado (0,05 N HCl) (40 ml; FVIII). Todas las fracciones

se concentraron hasta un volumen final de 1 ml y se analizaron por GC-FID y GC-MS. Las fracciones VI a VIII fueron derivatizadas con diazometano antes de su análisis.

3.2.2. Obtención de las fracciones saturada y aromática de un crudo de petróleo envejecido

Las fracciones saturada (F1) y aromática (F3), utilizadas como fuentes de carbono y energía en el experimento de biodegradación en microcosmos, se obtuvieron por cromatografía en columna a partir de un crudo de petróleo Casablanca previamente envejecido mediante un tratamiento de una hora a 40°C en rotavapor. Tras su envejecimiento, el crudo se fraccionó por cromatografía en columnas de vidrio (20 x 1 cm) que estaban empaquetadas con 8 g de alúmina (arriba) y 8 g de silica (parte inferior), previamente activadas a 320 °C y 125 °C, respectivamente, e inactivadas con un 5% de agua. En cada columna se introdujeron 250 mg de crudo que se eluyeron con las siguientes combinaciones de disolventes: F1 (fracción alifática, 20 ml de hexano); F2 (alquil bencenos, 20 ml hexano:diclorometano 9:1); F3 (fracción aromática, 40 ml hexano:diclorometano 8:2); y F4 (cetonas y quinonas, 40 ml diclorometano). Las fracciones obtenidas se evaporaron y se analizaron por gravimetría para determinar su abundancia en el crudo original.

3.2.3. Extracción orgánica de microcosmos en medio líquido

La extracción de los hidrocarburos residuales y de los metabolitos acumulados en las incubaciones de la suspensión bacteriana del suelo con distintas fracciones del crudo de petróleo se realizó mediante extracción líquido-líquido. Transcurrido el tiempo de incubación, se sacrificaron cultivos por triplicado a los que se les añadieron 10 ml de DCM directamente en el vial de centelleo utilizado para su incubación. Se realizó una agitación manual del vial, y se recuperó la fase orgánica con la ayuda de pipetas Pasteur. El extracto se recuperó en un balón tras su secado a través de sulfato de sodio. Este proceso se repitió 5 veces (extracto neutro). A continuación, el cultivo se acidificó a pH 2 con HCl 1M, y se repitió el proceso de extracción utilizando 5x10 ml de acetato de etilo (extracto ácido). Ambos extractos se concentraron en un rotavapor hasta un volumen final de 1 ml. Los extractos orgánicos obtenidos se analizaron directamente (extracto neutro) o tras su derivatización con diazometano (extracto ácido) mediante GC-FID y GC-MS.

3.2.4. Análisis por GC y GC-MS

Los análisis por GC-FID se realizaron en un cromatógrafo Trace 2000 (Thermoquest, Milan, Italia) acoplado a un detector de ionización de llama (FID). Los análisis por GC-MS se realizaron en los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Barcelona utilizando un cromatógrafo de gases Agilent 6890 (Agilent Technologies) acoplado a un espectrómetro de masas Agilent 5975 MS (Agilent Technologies) (MS). En ambos casos, el cromatógrafo se equipó con una columna capilar DB-5 (J W Scientific, GmbH, Köln, Germany) de 30 m de longitud, un diámetro interno de 0,25 mm y un tamaño de partícula de 0,25 μm . La temperatura del horno se mantenía a 50°C durante 1 minuto, y se programaba un incremento de 5°C/min hasta una temperatura final de 320°C, que se mantenía durante 10 minutos. La temperatura del inyector y el detector se fijaron a 290°C y 320°C, respectivamente. Las muestras se inyectaron (1 μl) en modo *splitless* (1 min), utilizando helio como gas portador a un flujo constante de 1,1 ml/min.

La detección de **HAPs** y **alcanos** se realizó mediante GC-MS a partir de fragmentogramas de iones reconstruidos, utilizando su ión molecular en el caso de los HAPs y sus derivados metilados, y el ión m/z 85 en el caso de los alcanos. Su concentración se determinó interpolando los valores de las áreas de los picos obtenidos en los respectivos fragmentogramas en rectas de calibración de cinco puntos. En el caso de los HAPs se utilizó un patrón de referencia comercial (PAH-mix 9, Dr- Ehrenstorfer, Alemania), y sus derivados alquilados se cuantificaron utilizando como referencia el correspondiente HAP no alquilado, tal y como se ha descrito previamente. En el caso de los alcanos, se utilizó un patrón obtenido de la mezcla de hexadecano, tetrametil-pentadecano y hexacosano (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemania).

Para confirmar o descartar la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en la concentración de HAPs entre muestras, se realizaron tests de ANOVA de comparación de medias con el test post-hoc de Tuckey, utilizando el programa informático SPSS 17.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)

3.3. Análisis microbiológicos dependientes de cultivo

3.3.1. Medios de cultivo

Se utilizaron tres medios de cultivo que se prepararon en forma líquida y/o en agar (1,5%)

- Medio Mineral Basal con Metales Traza (BMTM) (Hareland, 1975) **Solución A:** $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 42,5g/L; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 10g/L; NH_4Cl , 20g/L. **Solución B:** $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2g/L; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,12g/L; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,03g/L; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,03 g/L, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,01g/L; $\text{C}_6\text{H}_7\text{NO}_6$, 1,23g/L). Un litro de medio se prepara con 100 ml A y B y 800 ml de agua milliQ.
- Medio LB 1/10: 1g/L de peptona; 0,5g de extracto de levadura; 1g/L de NaCl.
- Medio TSB: 30g/L de TSB (Panreac).
- LB agar: 10g/L de peptona; 5g/L de extracto de levadura; 10 g/L de NaCl; 15 g/L agar.
- LB agar ampicilina: LB agar + 0,1 g/L ampicilina (Roche Molecular Biochemicals)
- LB AXI agar: LB agar ampicilina + 0,1 g/L Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG, Merck), 40 mg/L 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-gal, Merck)

3.3.2. Recuentos de microorganismos del suelo

En cada una de las muestras de suelo de la biopila se determinaron las poblaciones de microorganismos heterótrofos aerobios totales y degradadores de hexadecano, pireno y fenantreno mediante la técnica del número más probable (NMP) miniaturizada (Wrenn y Venosa, 1996). Se utilizaron placas de microtitulación en las que se inocularon 8 diluciones (10^{-1} - 10^{-8}) y 4 réplicas por dilución. La preparación de la muestra se llevó a cabo a partir de la resuspensión de 10 gramos de suelo en 90 ml de solución Ringer, utilizando un agitador magnético (30 minutos), y su posterior sedimentación durante 30 minutos para favorecer la precipitación de las partículas del suelo.

Los microorganismos heterótrofos totales fueron cuantificados mediante el crecimiento en medio LB 1:10, y los degradadores de los distintos hidrocarburos en medio mineral BMTM con 5 μ l de hexadecano, o 10 μ l de una solución de pireno o fenantreno en pentano (10 mg/ml). Todas las placas se incubaron durante 30 días a temperatura ambiente y protegidas de la luz.

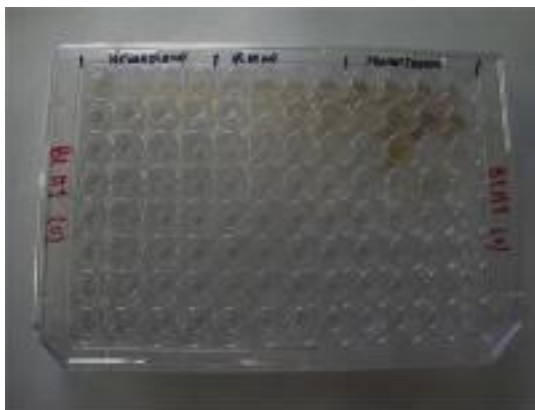


Figura 3.4. Placas de microtitulación empleadas para el recuento de poblaciones degradadoras de hexadecano, pireno y fenantreno.

3.3.3. Aislamiento y caracterización catabólica de microorganismos degradadores de HAPs

En base al criterio de dilución hasta la extinción, se procedió al aislamiento de cepas degradadoras de fenantreno y pireno a partir de pocillos con crecimiento positivo para ambos HAPs. Concretamente, de una de las muestras de 120 días de tratamiento en biopilas, se seleccionaron ocho pocillos, cuatro para cada HAP, correspondientes a las diluciones menos concentradas que presentaron crecimiento positivo. Tras la correcta homogenización del contenido de cada uno de los pocillos mediante pipeteo, la mitad del volumen total de cultivo (100 μ l), se utilizó de inóculo para un banco de diluciones que se sembró en placas de medio LB 1:10 y de medio BMTM suplementado con fenantreno o pireno, según el sustrato de recuento. Los 100 μ l restantes se conservaron a -20°C para su posterior extracción de DNA y análisis mediante PCR-DGGE.

Los distintos aislados detectados se seleccionaron en base a su morfología colonial y se purificaron utilizando placas de medio LB 1:10. La identificación y agrupación de las distintas estirpes aisladas se realizó en base a la secuenciación de su ADNr 16S.

La capacidad de los aislados de **utilizar HAPs** como única fuente de carbono y energía se confirmó a partir del incremento en proteína de cultivos en medio mineral líquido suplementado (0,1 g/L) con fenantreno o pireno. Dichos cultivos se realizaron en matraces Erlenmeyer de 100 ml, que contenían 20 ml de medio, y que se inocularon con 200 µl de un cultivo en fase exponencial ($A_{600} = 0,7$) de los aislados en medio TSB. Paralelamente, se incubaron controles sin fuente de carbono. Los cultivos y controles se incubaron a 25°C en agitación a 200 rpms durante 30 días.

La proteína presente en los cultivos al final del periodo de incubación se determinó mediante el método de Lowry modificado (Daniels et al., 1994). Brevemente, el contenido total de los cultivos se centrifugó a 3000 rpms durante 15 minutos, y el pellet se resuspendió en NaOH 1M. Tras la ebullición de la muestra durante 10 minutos, se añadió 1 ml de solución C (Tabla 3.2) y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos.

Transcurrido este tiempo, se añadieron 0,1 ml de una dilución 1:1 en agua del reactivo de Folin-Ciocalteu y se incubó nuevamente a temperatura ambiente durante 20 minutos. Finalmente, se realizó la medida de la absorbancia a 750 nm. La concentración de proteína se determinó por interpolación de la absorbancia obtenida con una recta patrón de Albúmina Sérica Bovina (BSA, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemania) de 5 puntos tratada de la misma forma.

Se consideró crecimiento positivo cuando la concentración de proteína presente en los cultivos era tres veces superior a la detectada en los controles sin fuente de carbono.

Tabla 3.2. Soluciones empleadas para la determinación de proteína mediante el método de Lowry.

Solución A	Na ₂ CO ₃ 0,1N
Solución B	CuSO ₄ al 1%
Solución B`	Potasio Sodio Tartrato 4 hidrato al 2%
Solución C	50 ml Sol A + 0,5 ml Sol B + 0,5 ml Sol B`
Solución D	Reactivo de Folin-Ciocalteu, dilución 1:1 en agua

3.4. Análisis microbiológicos mediante técnicas moleculares

3.4.1. Extracción de DNA

Las extracciones de DNA total de las muestras de suelo, microcosmos y pocillos del NMP se realizaron mediante la utilización de kit comercial PowerSoil DNA isolation kit (MoBioLaboratories, Loker Ave West, Carlsbad), el cual no requiere la ulterior purificación del DNA para aplicaciones posteriores, siguiendo las instrucciones del fabricante. En el caso de las muestras de suelo se utilizaron 250 mg de muestra previamente homogeneizada y tamizada a 2mm, mientras que para los pocillos de NMP se utilizaron 100 µl de cultivo.

La extracción de DNA total de los microcosmos de suspensiones de suelo en medio líquido y las distintas fracciones del crudo de petróleo, se llevó a cabo a partir de cultivos por duplicado que se sacrificaron a cada uno de los tiempos de incubación. El contenido completo de los cultivos se filtró a través de una membrana de filtración de 0,45 µm (Millipore). Para evitar la pérdida de biomasa de tamaño inferior a 0,45 µm, el filtrado resultante se centrifugó durante 1 min a 13200 rpm recuperándose el pellet. Tanto el pellet como el filtro se utilizaron para la extracción de ADN utilizando el kit descrito anteriormente.

La extracción del ADN de los aislados se llevó a cabo mediante la utilización de la resina Chelex Instagene Matrix (BioRad). Brevemente, se resuspendían 1 o 2 colonias de un cultivo reciente en 100 µl de agua destilada (grado PCR), y se adicionaban 30 µl de la resina Chelex. Tras homogeneizar la muestra mediante vórtex, se colocaban los tubos a baño maría a 100°C durante 25 minutos. Transcurrido este tiempo, se centrifugaban los tubos durante 5 minutos a 10000 rpm, y se recuperaba el sobrenadante (100 µl) para ser utilizado como molde de la PCR.

3.4.2. Amplificación por PCR

Amplificación del ADNr 16S

La amplificación por PCR del gen codificante para el ARNr 16S de los diferentes tipos de muestras (suelo de las biopilas, incubaciones de suspensiones de suelo, aislados bacterianos o pocillos de NMP), se llevó a cabo utilizando la premix de PCR Illustra® puReTaq Ready-To-Go PCR beads (GE Healthcare, Little Chalfont, UK).

A cada reacción, se añadieron 1 µl de extracto de ADN como molde, y 0,25 pmol de cada primer en un volumen final de 25 µl. Las distintas combinaciones de primers y sus respectivos programas térmicos se muestran en las tablas 3.3 y 3.4.

Tabla 3.3. Cebadores utilizados para la amplificación de ARNr 16S

Cebador	Técnica	Referencia	Secuencia 5' - 3'	Bases
GC63f	PCR-DGGE (ARNr 16S)	El Frantroussi et al., 1999	CGCCCCGCGCGCGGGCGGGCGGGGCGGGG GCACGGGGGGCAGGCCAACACATGCAAGTC	61
63f	PCR (ARNr 16S)	El Frantroussi et al., 1999	CAGGCCTAACACATGCAAGTC	21
518r	PCR-DGGE (ARNr 16S)	El Frantroussi et al., 1999	ATTACCGCGGCTGCTGG	17
27f	PCR (ARNr 16S)	Weisburg et al, 1991	AGAGTTTGATCCTGGCTAG	20
1492r	PCR (ARNr 16S)	Weisburg et al, 1991	ACGGYTACCTTGTACGACTT	21
27f	PCR (ARNr 16S) Pirosecuenciación	Lane et al, 1991	AGATTTGATYMTGGCTCAG	19
519r	PCR (ARN r16S) Pirosecuenciación	Lane et al, 1991	GTNTTACNGCGGCKGCTG	18

Y = C ó T; K = G ó T; M = A ó C; N = A ó C ó G ó T

Los amplicones obtenidos, se verificaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,2%, y se utilizaron directamente para su posterior aplicación en distintas técnicas de análisis de la estructura de la comunidad microbiana (DGGE, librería de clones, pirosecuenciación), o tras su purificación (ExoSAP-IT®, Affymetrix) para su secuenciación mediante el método de Sanger.

Tabla 3.4. Descripción de los programas térmicos empleados para la amplificación por PCR

Programa	Temperaturas (tiempo)						
	Desnaturalización inicial	Ciclos	Desnaturalización	Hibridación	Elongación	Elongación final	Final
PCR-DGGE (ARNr 16S)	95 °C (5 min)	20	95 °C (1 min)	55 °C (1 min)	65 °C (1 min)	65 °C (10 min)	4 °C
PCR (ADNr 16S)	95 °C (10 min)	30	95 °C (30 seg)	55 °C (30 seg)	72 °C (2 min)	72 °C (10 min)	4 °C
Liberia de clones	94 °C (10 min)	30	94 °C (30 seg)	56 °C (30 seg)	72 °C (2 min)	72 °C (10 min)	4 °C
PCR (ARNr 16S) Pirosecuenciación	94 °C (4 min)	35	94 °C (40 seg)	56 °C (40 seg)	68 °C (40 seg)	68 °C (7 min)	4 °C

Amplificación por PCR de genes funcionales en los microcosmos

A partir del ADN total de las incubaciones de suspensiones de suelo con fracciones del crudo de petróleo, durante la estancia en el laboratorio del Dr. Pierre Peyret y la Dra. Corinne Petit (Laboratory Microorganisms, Genome and Environment (LMGE) - UMR CNRS 6023, Clermont-Ferrand, France), se llevó a cabo la detección mediante PCR de genes involucrados en la degradación de hidrocarburos.

Entre los genes seleccionados para estos análisis se incluyeron tres correspondientes a monooxigenas, *AlmA*, *AlkB* y *Cyp153A*; y tres codificantes para subunidades α de dioxigenasas dihidroxilantes, tolueno/bifenil dioxigenasa, naftaleno dioxigenasa de Gram-negativos y HAP-dioxigenasas de Gram-positivos. Para estos últimos se utilizo cebadores sugeridos en un trabajo donde compararon la eficacia de cebadores para genes de dioxigenasa (Iwai et al., 2011). La amplificación de estos genes se llevó a cabo utilizando una mix de PCR que contenía 5 μ l de GoTaq buffer 5x (Promega), 1,5 μ l de MgCl₂ 50 mM (Promega), 1 μ l dNTPs mix (10 μ M cada uno, Invitrogen), 1-3 μ l de cada primer (10 μ M), 0,2 μ l de DNA GoTag Taq polimerasa 5U/ μ l (Promega) y 1 μ l de ADN genómico como molde, en un volumen final de 25 μ l. Los cebadores y las condiciones utilizadas para la amplificación de cada uno de los genes analizados se describen en las tablas 3.5 y 3.6, respectivamente.

Tabla 3.5. Cebadores utilizados para la amplificación de genes funcionales

Gen	Cebadores	Referencia	Secuencia	Tamaño del fragmento
<i>AlmA</i>	AlmAdf AlmAdr	Wang & Shao, 2012	GGNGGNACNTGGGAYCTNTT ATRTCNGCYTTNAGNGTCC	1100 pb
<i>AlkB</i>	alkB-for alkB-rev	Whyte et al., 2002	TGCCCGGCTACTCCGATGATCGGAATCTGG CGCGTGGTGATCCGAGTGCCGCTGAAGGTG	870 pb
	alkBwf alkBwr	Kloos et al., 2006	AAYACNGCNAYGARCTNGGVCAYAA GCRTGRTGRTCHGARTGNCGYTG	550 pb
	monf monr	Liu & Shao, 2005	TCAAYACMGSNAYGARCT CCGTARTGYTCNAYRTARTT	420 pb
<i>Cyp153A</i>	P450F P450R	van Beilen et al., 2006	GTSGGCGGCAACGACACSAC GCASCGGTGGATGCCGAAGCCRAA	339 pb
Naftaleno dioxigenasa (Gram-negativos)	Ac596F NAPH-2R	Wilson et al., 1999 Gomes et al., 2007	CAACTGGAAGRCACCYG ATSTCTTTTTCBAC	400 pb
Bifenil 2,3-dioxigenasa	adoB1F BPHD-r1	Taylor et al., 2002 Iwai et al., 2010	GAGCAGTTYTGACAGYACATGTACCA ACCCAGTTYTCICCRCTCGTC	500 pb
HAP-dioxigenasa (Gram-positivos)	NidA-forward pdo1-r	DeBruyn et al., 2007 Johnsen et al., 2006	TTCCCGAGTACGAGGGATAC CTGACCCATGTATTCCAGCC	500 pb

Y = C ó T; K = G ó T; M = A ó C; R = A ó G; V = A ó C ó G; N = A ó C ó G ó T;

Tabla 3.6. Descripción de los programas térmicos de PCR empleados para la amplificación de genes funcionales

Gen	Cebadores	Temperaturas (tiempo)						
		Desnat. inicial	Ciclos	Desnat.	Hibridación	Elongación	Elongación final	Final
<i>AlmA</i>	AlmAdf AlmAdr	95 °C (2 min)	40	95 °C (40 seg)	50 °C (40 seg)	72 °C (1 min)	72 °C (7 min)	4 °C
	alkB-for alkB-rev	95 °C (2 min)	40	95 °C (40 seg)	60 °C (40 seg)	72 °C (1 min)	72 °C (7 min)	4 °C
<i>AlkB</i>	alkBwf alkBwr	95 °C (2 min)	40	95 °C (40 seg)	50 °C (40 seg)	72 °C (40 seg)	72 °C (7 min)	4 °C
	monf monr	95 °C (2 min)	40	95 °C (40 seg)	55 °C (40 seg)	72 °C (30 seg)	72 °C (7 min)	4 °C
<i>Cyp153A</i>	P450F P450R	95 °C (2 min)	40	95 °C (40 seg)	58 °C (40 seg)	72 °C (30 seg)	72 °C (7 min)	4 °C
Naftaleno dioxigenasa (Gram-negativos)	Ac596F NAPH-2R	95 °C (2 min)	40	95 °C (40 seg)	50 °C (40 seg)	72 °C (30 seg)	72 °C (7 min)	4 °C
Bifenil 2,3-dioxigenasa	adoB1F BPHD-r1	95 °C (2 min)	40	95 °C (40 seg)	55 °C (40 seg)	72 °C (30 seg)	72 °C (7 min)	4 °C
HAPs dioxigenases (Gram-positivos)	NidA-forward pdo1-r	95 °C (2 min)	40	95 °C (40 seg)	60 °C (40 seg)	72 °C (30 seg)	72 °C (7 min)	4 °C

3.4.3. Análisis de comunidades microbianas mediante DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*)

Los cambios en la estructura de la comunidad microbiana del suelo de las biopilas y de los microcosmos con fracciones del crudo de petróleo, se determinaron a partir del análisis mediante DGGE de amplicones de la región V1-V3 del ADNr 16S. Los productos de amplificación obtenidos con los cebadores GC63f y 518r se analizaron por migración electroforética en geles de un 6% de poliacrilamida con un gradiente desnaturante del 40% al 70% (el 100% de agente desnaturante correspondía a una solución de urea 7M con un 40% de formamida). Las electroforesis se llevaron a cabo en un equipo DGGE-2001 (CBS Scientific, Del Mar, CA, USA) utilizando un voltaje constante de 100V durante 16 horas en tampón TAE 1X a 60 °C. Una vez terminada la electroforesis, los geles se teñían durante 30 minutos con una solución 1X de SYBR Gold (Molecular Probe Europe BV, Leiden, Holanda) en TAE, y se fotografiaban bajo luz UV utilizando un equipo Chemidoc XRS (Biorad, EUA) con el software QuantityOne.

Las bandas predominantes o más significativas de los perfiles de DGGE se escindían del gel con la ayuda de un bisturí estéril, y el DNA se recuperaba tras la incubación de la banda en agua milliQ estéril a 4°C durante toda la noche. Su secuenciación se llevaba a cabo tras su reamplificación por PCR utilizando una dilución 1:50 como molde, y los cebadores 63F y 518R.

Las imágenes se han procesado con el programa Quantity One 4.5.1. (Bio Rad Laboratories), corrigiendo los carriles y bandas manualmente. Los perfiles de DGGE obtenidos se han sometido a un análisis estadístico con el programa SPSS (versión 17, Windows, SPPS Inc. Chicago). El índice de diversidad de Shannon-Wiener (H'), se calculo a partir de la intensidad relativa (P_i) de cada una de las bandas dentro de cada carril, utilizando la siguiente formula:

$$H' = -\sum P_i \times \ln(P_i)$$

3.4.4. Análisis de comunidades microbianas mediante librerías de clones

Librería de clones del gen ARNr 16S de muestras de suelo de las biopilas

Los extractos de ADN de las muestras correspondientes a los 120 días de tratamiento en biopilas se combinaron, y se utilizaron de molde para su amplificación por PCR utilizando los cebadores 27f y 1492r.

Tras su comprobación en un gel de agarosa al 1,2%, el producto de amplificación se purificó con el kit Wizard PCR Clean-Up System (Promega) y se clonó utilizando el kit comercial pGEM-T Easy (Promega), siguiendo el protocolo de la casa comercial.

Brevemente, el producto de la purificación se ligó al plásmido pGEM-T y se transformó en la cepa JM109 proporcionada por la casa comercial. El producto de la transformación, se sembró en placas de medio LB suplementadas con ampicilina, X-gal e IPTG, y los clones positivos se seleccionaron mediante el método de colonias azules/blancas. La selección de los distintos fragmentos clonados se realizó en base a su análisis por restricción con la enzima *MspI* (Promega). Para ello, los insertos se amplificaron por PCR empleando una mezcla de reacción (50 μ l) que contenía 2,5 U de Taq polimerasa (Biotools), 5 nmol de cada dNTP (Fermentas), tampón de PCR a una concentración de 1X (Biotools) y 50 pmol de cebadores propios del plásmido. A continuación, se llevó a cabo la reacción de restricción utilizando 0,25 μ l (10 U/ μ l) de la enzima, 2 μ l de tampón, 0,2 μ l de BSA y 10 μ l de producto de PCR, previamente purificado, en un volumen final de 20 μ l. La mezcla se incubó durante 2 horas a 37°C, y se analizó en un gel de agarosa al 2%, a 120V durante una 1 hora. La selección y agrupación de los distintos fragmentos clonados se llevó a cabo a partir de la comparación de los patrones de restricción obtenidos para cada inserto. La identificación de las distintas unidades taxonómicas operativas (OTU) detectadas se llevó a cabo por secuenciación de un representante de cada patrón de restricción.

Librería de clones de genes funcionales de microcosmos

Las librerías de clones de los genes Cyp153A citocromo P450 (Cyp153, AlkB alcano monooxigenasa, bifenil 2,3-dioxigenasa, naftaleno dioxigenasa y 18S rRNA se llevaron a cabo a partir de las muestras de los microcosmos a los 3, 7 y 15 días. Estos genes, se amplificaron tal y como se ha descrito previamente, y los productos resultantes se purificaron por escisión de banda a partir del gel de agarosa (1,2%) utilizando el kit MinElute Gel® Extraction Kit (QIAGEN).

Los amplicones purificados se clonaron empleando el kit pPCR® II-TOPO® (Invitrogen), y los transformantes se seleccionaron por el método de colonias azules/blancas en placas de LB AXI. La presencia de inserto en los clones seleccionados se confirmó a partir de la purificación del plásmido mediante miniprep (QIAprep Spin Miniprep Kit, QIAGEN), y su posterior análisis de restricción utilizando la enzima *EcoRI* (Invitrogen). La reacción se realizó con 0,5 μ l de la enzima (12 U/ μ l), 2 μ l de tampón 10X y 10 μ l

de producto de la miniprep, en un volumen final de 20 μ l. La mezcla se incubó durante 1 hora a 37°C, y el producto de la reacción se analizó en un gel de agarosa al 1,5 %. Los clones positivos se agruparon a partir de su patrón de restricción, y un representante de cada tipo se secuenció.

3.4.5. Secuenciación

La secuenciación de los clones de ADNr 16S, bandas de DGGE y aislados seleccionados se llevó a cabo mediante el método de Sanger, utilizando el kit ABI PRISM BigDye Terminator cycle-sequencing reaction versión 3.1 (Perkin Elmer), y los cebadores empleados previamente para la amplificación. Las secuencias se obtuvieron en un secuenciador ABI 3730XL DNA Analyzer (Applied Biosystems) en MacroGen (MacroGen Europe, Amsterdam, Holanda). Las librerías de clones de genes funcionales y ARNr 18S se secuenciaron por el mismo método en MWG DNA sequencing services (Alemania).

Las secuencias obtenidas se editaron con el programa BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall et al., 1999), y se compararon con las bases de datos del GenBank, mediante el uso de la herramienta bioinformática BLAST (Altschul et al., 1997), y del Ribosomal Data Project II (<http://rdp.cme.msu.edu/>) (Maidak et al., 2001; Cole et al., 2003).

3.4.6. Análisis de comunidades bacterianas mediante pirosecuenciación de librerías del gen ARNr 16S (*bar-coded pyrosequencing*)

Para obtener una mayor información de la estructura de la comunidad microbiana presente en los suelos de las biopilas y en las incubaciones con fracciones, se utilizaron técnicas de secuenciación masiva (pirosecuenciación) de librerías del gen ARNr 16S. Estos análisis se llevaron a cabo para las muestras de las biopilas correspondientes a la fase de homogeneización, y los tiempos 0, 30 y 120 días de tratamiento, y para todos los tiempos de incubación de las suspensiones de suelo con las distintas fracciones del crudo de petróleo. En todos los casos, los análisis se realizaron para muestras compuestas obtenidas de la mezcla a concentraciones iguales, determinadas mediante un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo SCIENTIFIC), de los extractos de DNA de las distintas réplicas de cada tiempo.

Los extractos compuestos resultantes se utilizaron como molde (1 μ l) para reacciones de amplificación mediante PCR de las regiones V1-V3 del gen ARNr 16S, utilizando los cebadores 27f y 519r, tal y como se ha descrito anteriormente (apartado 3.4.2). Los amplicones se comprobaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5%, y se purificaron con el kit MinElute Gel® Extraction Kit (QIAGEN) a partir de la escisión de las bandas de interés con un bisturí estéril. Los productos purificados se cuantificaron mediante NanoDrop para garantizar una concentración mínima de 20 ng/ μ l, y se enviaron a secuenciar a Molecular Research DNA Lab (Shallowater, TX, USA). Previamente a su secuenciación, las muestras se reamplificaron con los mismos cebadores pero incluyendo una modificación o MID (*unique multiple identifier*) de 8 pb en el extremo 5' del primer 27f, única para cada muestra, y que permitió asignar la muestra de origen de cada una de las secuencias detectadas. Esta reamplificación se llevó a cabo utilizando el kit HotStarTaq Plus Master Mix (Qiagen, Valencia, CA) bajo las siguientes condiciones: 94 °C durante 3 minutos; seguido por 28 ciclos de 94 °C durante 30 segundos; 53 °C durante 40 segundos y 72 °C durante 1 minuto; después de lo cual se realizó una etapa de elongación final a 72°C durante 5 minutos. Tras la PCR, los productos amplificados de las diferentes muestras se purificaron usando Agencourt Ampure beads (Agencourt Bioscience Corporation, MA, USA), se cuantificaron y se mezclaron en concentraciones iguales. Las muestras fueron secuenciadas utilizando un secuenciador Roche 454 GS-FLX Titanium Platform (Roche, Branford, CT, USA).

La selección de secuencias de elevada calidad (Q25) a partir de los datos derivados del proceso de secuenciación se llevó a cabo mediante un *pipeline* de análisis propiedad de Molecular Research DNA Lab (www.mrdnalab.com,). De esta forma, se eliminaron los códigos de barras y los cebadores, se descartaron las secuencias con asignaciones de bases ambiguas y homopolímeros de más de 6 pb, y se seleccionaron únicamente aquellas secuencias con una longitud mínima de 200 pb.

Las secuencias obtenidas se analizaron para detectar la presencia de quimeras, y las unidades taxonómicas operativas (OTUs) fueron definidas por agrupación a un 3% de divergencia (97% similitud) (Dowd, Callaway et al., 2008; Dowd, Sun et al., 2008; Edgar 2010, Capone, Dowd et al., 2011; Dowd, Delton Hanson et al., 2011; Eren, Zozaya et al., 2011; Swanson, Dowd et al., 2011). La clasificación taxonómica de las distintas OTUs se llevó a cabo mediante BLASTn frente a la base de datos Greengenes (DeSantis, Hugenholtz et al. 2006) que compila secuencias curadas de ADNr 16S. La asignación de las secuencias a los distintos niveles filogenéticos se llevó a cabo en base a su similitud a la secuencia de referencia de la siguiente forma: especie

(>97%), género (95-97%), familia (90-95%), orden (85-90%) y *phylum* (80-85%). Por debajo del 80% se consideraron como no clasificadas. Para el análisis de diversidad y riqueza, se utilizó los datos obtenidos de la pirosecuenciación, y el programa informático Quiime (Quantitative Insights Into Microbial Ecology).

3.4.7. Análisis de genes funcionales mediante *microarrays*

El *microarray* utilizado en este estudio fue diseñado por el grupo de investigación del Dr. Pierre Peyret y la Dra. Corinne Petit en el Laboratory Microorganisms, Genome and Environment (LMGE) - UMR CNRS 6023, Clermont-Ferrand, Francia, para la detección de genes involucrados en la degradación de contaminantes orgánicos, entre ellos para HAPs. Al no encontrarse publicado, se incluye un apartado inicial que resume la metodología utilizada por este grupo para su desarrollo.

Diseño de las sondas de oligonucleótidos y construcción del *microarray*

Las sondas incorporadas en el *array* fueron diseñadas a partir de unas 1.500 secuencias nucleotídicas correspondientes a más de 600 genes codificantes para enzimas implicadas en rutas de biodegradación aerobias y anaerobias de contaminantes orgánicos (HAPs, bifenilos policlorados (PCBs), disolventes clorados, etc). Todas las secuencias fueron obtenidas a partir de la base de datos del NCBI. Con el fin de conseguir sondas con la capacidad de detectar distintos genes de una misma familia, para cada una de ellas se seleccionaron múltiples secuencias y se alinearon utilizando el programa ClustalW2 (Thompson et al., 1994), con el objetivo de obtener secuencias consenso degeneradas. Finalmente, estas sondas consenso, de unos 50 pb de longitud, se diseñaron con el programa HiSpOD (Dugat-Bony et al., 2011) con los siguientes parámetros: rango de Tm (57-86 °C), longitud de extensión de un nucleótido simple (complejidad: 10), un número máximo de 32 nucleótidos degenerados, un máximo de 18 coincidencias consecutivas con secuencias no diana y una similitud máxima con secuencias no diana del 80%. En base a los criterios de especificidad (pocas o ninguna hibridación cruzada) y ubicación de la sonda a lo largo de la secuencia diana, se seleccionaron las cinco mejores sondas para cada uno de los genes. En total, se diseñaron 11.396 sondas que fueron empleadas para la elaboración de un *microarray* de ADN funcional.

Los *microarrays* fueron elaborados en un formato de 12 plex (12x135k) utilizando la tecnología de síntesis de *array* de alta densidad NimbleGen (Roche NimbleGen, Madison, Wisconsin, EE.UU.). Cada oligonucleótido se sintetizó *in situ* con 11 réplicas. Las sondas fueron distribuidas al azar a través del *array* para minimizar el efecto espacial. Además de las sondas para la detección de genes funcionales, también se incorporaron 15.316 sondas aleatorias para evaluar el ruido de fondo, y 5.427 sondas control, positivo y negativo, para garantizar la calidad del proceso de síntesis de oligonucleótidos y de las condiciones de hibridación.

Preparación y etiquetaje de muestras

Los análisis mediante *microarrays* de genes funcionales se llevaron a cabo para las muestras correspondientes a los microcosmos de suspensiones de suelo en medio mineral con distintas fracciones del crudo de petróleo. Los extractos de ADN de las distintas réplicas de los cultivos se combinaron y concentraron en un SpeedVac hasta obtener una concentración final de 1 µg en 17,6 µl de agua MilliQ filtrada, determinada mediante un espectrofotómetro NanoDrop (ND-1000, NanoDrop Technologies). El ADN genómico de las muestras se marcó con los colorantes fluorescentes Alexa Fluor 3 o 5 empleando el sistema Bio[®]Prime Total Genomic Labeling (Invitrogen, Carlsbad, California, USA). Las reacciones se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante, utilizando 1 g de ADNg como molde que se incrementó un mínimo de seis veces. La eficacia del método de marcaje se evaluó mediante la determinación de la cantidad de nucleótidos marcados utilizando un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies).

Hibridación del microarray

Para cada una de las muestras, alícuotas de 2 µg de ADNg diana marcado y purificado se secaron en un SpeedVac (Thermo Fisher Scientific, Villebon-sur-Yvette, Francia) y se resuspendieron en el tampón de hibridación NimbleGen (Roche NimbleGen, Madison, Wisconsin, EE.UU.). Los ADN diana así preparados se hibridaron en el *microarray* a 42 °C durante 72 horas utilizando el sistema de hibridación 4-bay NimbleGen (Roche NimbleGen, Madison, Wisconsin, EE.UU.). Los lavados del *array* se realizaron según lo recomendado por NimbleGen y los soportes de los *microarrays* fueron escaneados con una resolución de 2 µm utilizando un equipo InnoScan[®] 900 con el software MAPIX[®] (Innopsys, Carbonne, Francia). Por último, las intensidades de

los píxeles se cuantificaron mediante NimbleScan™ software v2.5 (Roche NimbleGen, Madison, Wisconsin, EE.UU.), y se obtuvieron informes de las intensidades de señal para cada punto del *array* vinculadas a su identificador de sonda correspondiente.

Normalización de datos y análisis estadístico

El ruido de fondo se determinó usando sondas al azar presentes en los microarrays y se definió en base a dos parámetros: la intensidad media del ruido de fondo ($B_{\text{posición}}$) y su dispersión ($B_{\text{dispersión}}$). Para descartar los efectos del ruido de fondo, los resultados para cada sonda se normalizaron en base a una proporción señal/ruido modificada, denominada SNR' , y que se determinó a partir de la siguiente fórmula:

$$SNR' = (\text{intensidad de la señal de la sonda} - B_{\text{posición}}) / B_{\text{dispersión}}$$

Tal y como ha sido descrito previamente (He & Zhou, 2008), una hibridación positiva se consideró significativa cuando presentaba un $SNR' > 5$.

Método de evaluación del ruido de fondo

El ruido de fondo se determinó de acuerdo a la respuesta de las sondas al AZAR de los *microarrays* Nimblegen. Estas sondas son secuencias de oligonucleótidos aleatorios de entre 20 y 56 pb que se distribuyen al azar por toda la superficie de los *microarrays* y pueden servir como una medida del ruido de fondo (hibridación inespecífica y fluorescencia de fondo). Este método tiene en cuenta el ruido de fondo (B) que se caracteriza por dos componentes: su posición ($B_{\text{posición}}$) (1) y su dispersión ($B_{\text{dispersión}}$) (2). Por otra parte, existe un efecto espacial que altera la señal a lo largo de la superficie del *array* y que debe ser eliminado antes de cualquier otro procedimiento de normalización (Wang et al., 2006). Es por este motivo que, en todas las imágenes de *array* obtenidas en este trabajo, la superficie se segmentó en 16 sub-cuadrados según la posición de la sonda (X, Y). De esta forma, el ruido de fondo se determinó como se describe a continuación:

(1) $B_{\text{posición}}$ es la intensidad media de todas las sondas al AZAR consideradas (en toda la imagen o en un sub-cuadrado).

(2) $B_{\text{dispersión}}$ indica la variación observada en los valores de intensidad de las sondas al AZAR. $B_{\text{dispersión}}$ es más difícil de determinar que $B_{\text{posición}}$ ya que depende en gran medida de la "limpieza de la imagen".

Por lo tanto, se determina la "limpieza de imagen", y la $B_{\text{dispersión}}$ se calcula de acuerdo con el coeficiente de variación (V) observado en todas las sondas al AZAR consideradas:

- Si $V > 33.33\%$: la imagen se considera "sucia" y ($B_{\text{dispersión}} = B_{\text{posición}} - Q3$), donde Q3 es el tercer cuartil calculado a partir de todas las intensidades de las sondas al AZAR consideradas.
- Si $V < 33.33\%$: la imagen se considera "limpia" y ($B_{\text{dispersión}} = B_{\text{posición}} - D8$), donde D8 es el octavo decil calculado a partir de todas las intensidades de las sondas AZAR consideradas.

4.1. Antecedentes

Con el objetivo de identificar las poblaciones y los procesos bacterianos implicados en la biodegradación de HAPs durante la biorremediación de un suelo contaminado con derivados del crudo de petróleo, se estableció una colaboración con la empresa Geotecnia 2000 SL. Esta empresa acababa de iniciar los trabajos para la implantación de una estrategia de biorremediación del suelo de un emplazamiento situado en un polígono industrial de la Comunidad de Madrid, basada en la construcción de biopilas estáticas. El suelo se hallaba afectado de contaminación por una mezcla heterogénea de gasoil y aceites minerales pesados (aceite hidráulico). En cada fase de tratamiento se construían tres biopilas con una estructura de pirámide truncada de 37 m de largo por 20 m de ancho y 2 m de altura, conteniendo unos 1800 m³ de suelo. A partir de los datos analíticos obtenidos antes de la construcción de las biopilas, se seleccionó una de ellas, la biopila 1, por presentar una mayor concentración de HAPs. En este trabajo se analiza la evolución en la concentración de HAPs, la producción y acumulación de productos de su oxidación microbiana, y los cambios en la estructura de la comunidad bacteriana a través del proceso de biorremediación. Para ello se llevó a cabo un muestreo periódico de la biopila durante la fase de homogenización (-10 días), en el momento de finalizar su construcción (0 días), y a los 30, 60, 90 y 120 días de tratamiento.

4.2. Biodegradación de hidrocarburos en el suelo durante el tratamiento en biopila

4.2.1. Evolución del contenido de materia orgánica total (MOE) del suelo

Durante la obtención de los extractos orgánicos totales de las muestras de suelo se observó una elevada heterogeneidad entre réplicas, lo cual es fácilmente explicable si se tiene en cuenta el gran tamaño de las biopilas, y la naturaleza de las muestras, con presencia de rocas y materiales rugosos que complicaron la homogenización y tamizado de las muestras, y propiciaron la adsorción de los contaminantes (Jørgensen et al., 2000). A menudo, sobre todo en los primeros muestreos, las distintas réplicas tomadas en un mismo tiempo presentaron textura, consistencia y colores diferentes, lo cual se pudo observar también tras la obtención de los extractos orgánicos mediante Soxhlet (Figura 4.1).

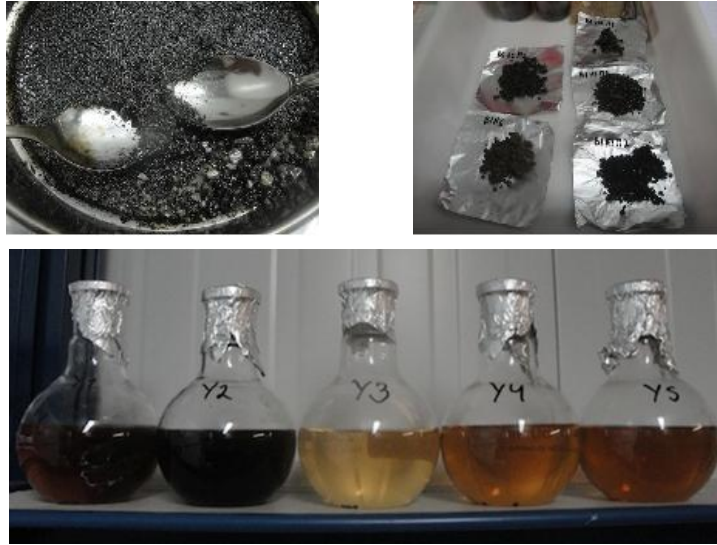


Figura 4.1. Tamizado, preparación de las muestras para su extracción y aspecto de los extractos orgánicos totales de distintas réplicas de muestras de suelo de la biopila correspondientes a 30 días.

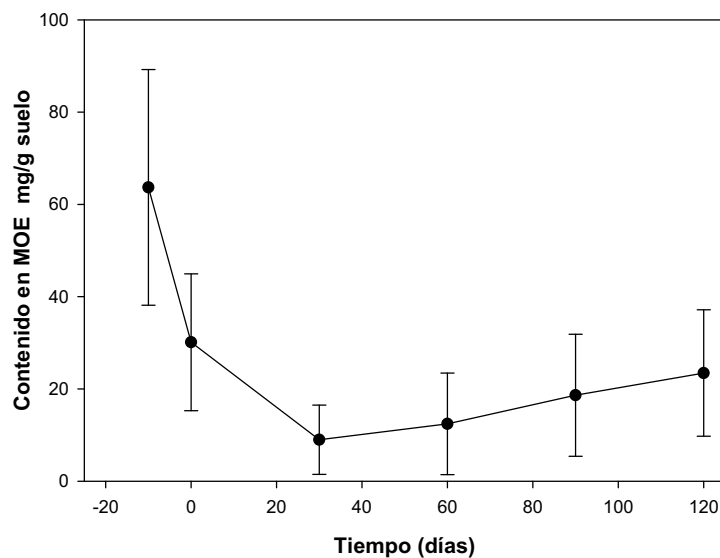


Figura 4.2. Evolución de la concentración de materia orgánica extraíble (MOE) en las muestras obtenidas a lo largo del tratamiento del suelo en la biopila. Cada punto corresponde a la media de los valores obtenidos para 7 réplicas tomadas en distintas zonas y profundidad de la biopila.

El análisis gravimétrico de la materia orgánica extraíble (Figura 4.2) mostró una drástica reducción de la concentración de MOE tras la homogenización y durante los 30 primeros días de tratamiento en biopila, pasando de 64 $\mu\text{g/g}$ de suelo seco en la fase de homogenización (-10 días) a 23 $\mu\text{g/g}$ (63% de biodegradación).

Después de los primeros 30 días de tratamiento se observó una detención en la eliminación del contaminante, que dio lugar a la acumulación de un residuo de difícil degradación en las condiciones de la biopila. Esta cinética, comúnmente conocida como en forma de palo de hockey, es observada habitualmente durante la bioremediación de emplazamientos contaminados por hidrocarburos, y se atribuye a la reducida biodisponibilidad y al enriquecimiento en las fracciones más recalcitrantes del residuo final.

4.2.2. Análisis del contenido en TPHs

Los análisis por cromatografía de gases (GC-FID) de los TPHs de las muestras correspondientes a la fase de homogenización mostraron un perfil bimodal con máximos en C15 y C28, compuesto por una serie de picos resueltos sobre una matriz no resuelta (UCM) predominante. Este perfil bimodal era consistente con una mezcla de al menos dos productos de origen petrogénico, uno más volátil y rico en HAPs, que correspondería a un diésel envejecido, y otro más pesado, típico de un aceite hidráulico, rico en alcanos lineales de elevado peso molecular (figura 4.3a). La baja proporción de picos resueltos correspondientes a *n*-alcanos, sobre todo entre C11 y C22 sugería un importante grado de envejecimiento del contaminante previo al inicio del tratamiento.

Por otro lado, de los perfiles cromatográficos obtenidos a los distintos tiempos de incubación se desprende el elevado grado de degradación sufrido por el contaminante durante el tratamiento, observándose una elevada reducción de los picos resueltos e incluso de la UCM durante los primeros 30 días. De hecho, como ya se había deducido de los análisis gravimétricos de la MOE, en el tiempo 0 ya se detectó un importante grado de degradación atribuible a la estimulación de la biodegradación microbiana como consecuencia del esponjamiento y aireación del suelo durante la homogeneización por volteo así como de la adición de nutrientes en esta fase (Figura 4.3).

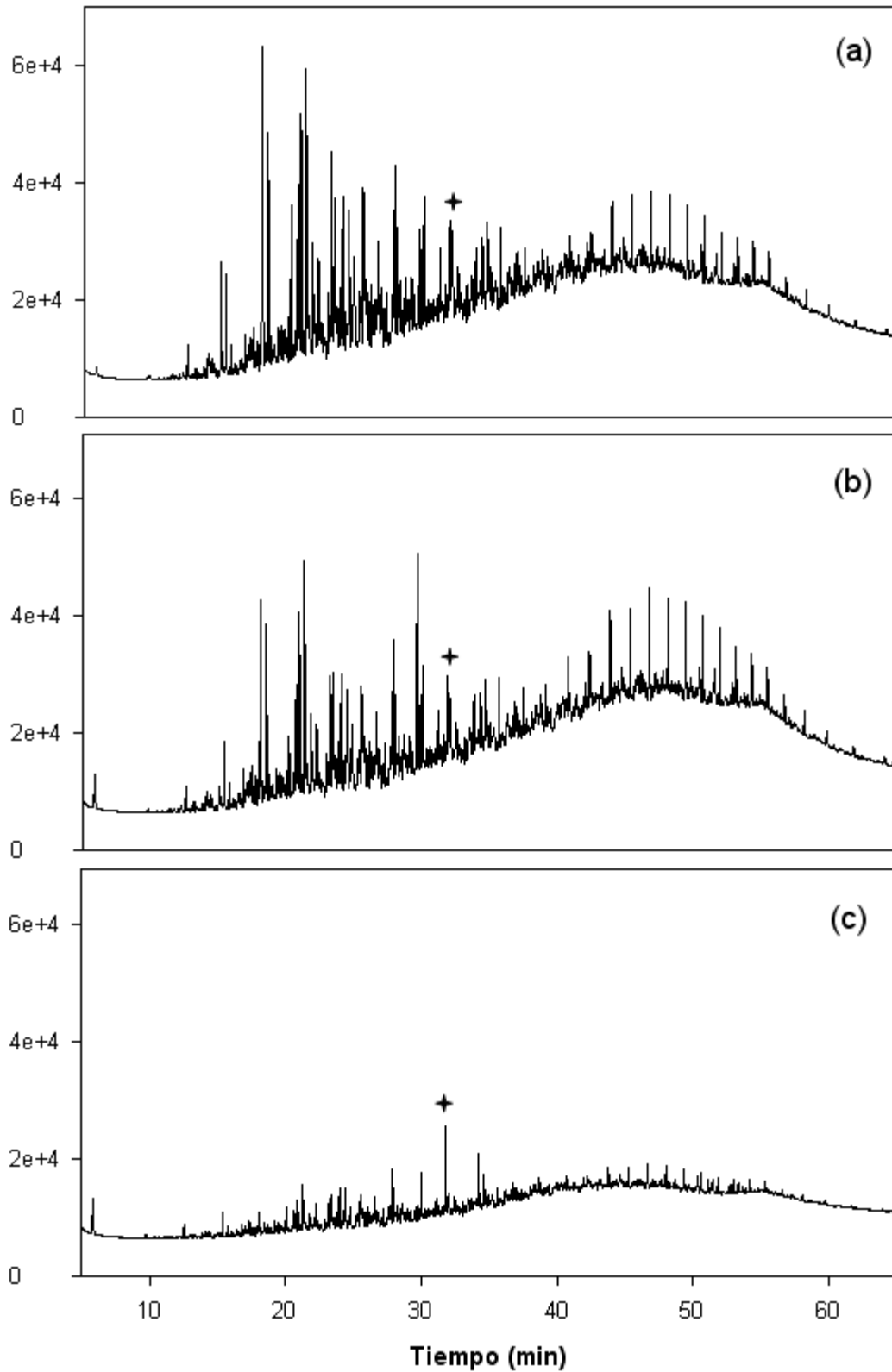


Figura 4.3. Perfiles cromatográficos (GC-FID) del contenido en TPHs a diferentes tiempos de tratamiento. (a) Homogenización, (b) 0 días y (c) 30 días. + Señala el pico de *orto*-terfenilo, utilizado como estándar interno.

Los resultados de la cuantificación de la MOE y los perfiles cromatográficos obtenidos del análisis de los TPHs son consistentes con los resultados cuantitativos de TPHs obtenidos por la empresa GEOTECNIA 2000 (Figura 4.4 y Tabla 4.1), que determinó su concentración por GC-FID utilizando un patrón de referencia comercial siguiendo un procedimiento interno basado en las normas *ISO 16703:2004 Soil quality - "Determination of content of hydrocarbon in the range C10 to C40 by gas chromatography"* y *8015D "Nonhalogenated organics using GC/FID"*. Nótese la importante reducción en la concentración de TPHs durante el periodo entre la toma de muestras de la homogenización y el tiempo 0 de la biopila (43%). A los 30 días se detecta un 90% de degradación, sin embargo este porcentaje sufre oscilaciones a los tiempos posteriores variando entre el 65% y 88%, atribuibles a la propia heterogeneidad del sistema. Se puede observar también que a partir de los 30 días la concentración de TPHs está por debajo del objetivo de descontaminación fijado por la empresa de 8000 mg/Kg.

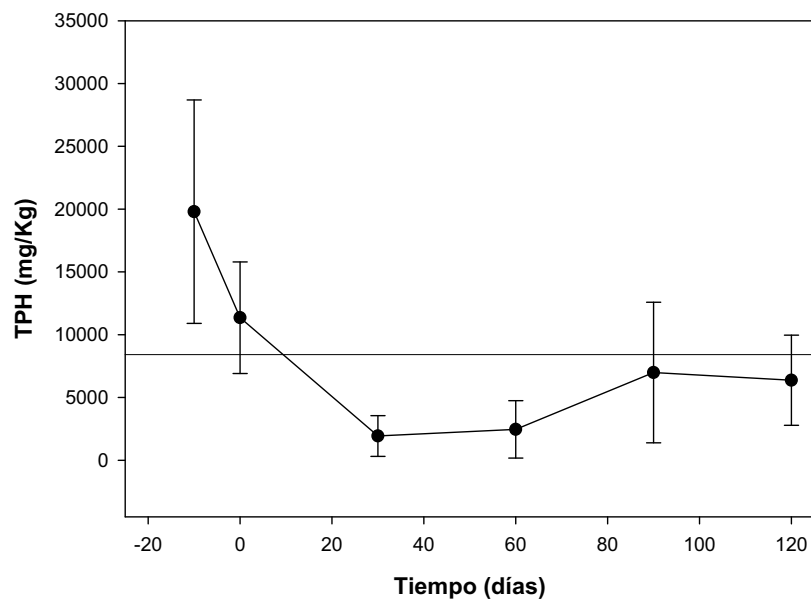


Figura 4.4. Evolución de concentración de TPHs en suelos de la biopila (—●—), y objetivo de descontaminación (—), establecido en 8000 mg/Kg. Resultados proporcionados por la Empresa Geotecnia 2000.

4.2.3. Análisis del contenido en HAPs

Uno de los objetivos de este trabajo, era determinar el destino de los HAPs durante el tratamiento del suelo mediante biopilas. Por este motivo, se determinaron las concentraciones de los 16 HAPs incluidos en la lista de contaminantes prioritarios de

la EPA y de sus derivados alquilados, a lo largo del tiempo. La cuantificación de los HAPs residuales se llevó a cabo a partir de fragmentogramas de iones reconstruidos obtenidos a partir del análisis mediante GC-MS de la fracción de TPHs (tabla 4.1 y figura 4.5).

Tabla 4.1. Concentración de HAPs en muestras de suelos de la biopila, en la fase de homogenización, 0, 30 y 120 días.

Compuesto ^c	Concentración (mg/kg)				% Degradación ^e
	Homogenización	0 días	30 días	120 días	
TPH	19799,0 ± 8898,7 A ^a	11354,3 ± 4439,6 B	1933,7 ± 1622,6 C	6373,7 ± 3588,5 C	67,8
N	46,4 ± 57,4 A	2,7 ± 4,3 B	0,5 ± 0,9 B	1,7 ± 3,3 B	96,3
N1	120,0 ± 102,4 A	34,2 ± 21,5 B	4,3 ± 7,2 B	6,5 ± 13,6 B	94,6
N2	221,4 ± 131,8 A	105,2 ± 37,6 B	17,5 ± 17,8 C	4,9 ± 5,4 C	97,8
N3	209,1 ± 113,7 A	112,5 ± 39,1 B	25,5 ± 22,3 C	7,2 ± 7,1 C	96,6
Fl	19,3 ± 15,3 A	9,6 ± 2,9 B	2,0 ± 1,7 C	0,9 ± 1,3 C	95,1
Fl1	25,2 ± 15,7 A	12,9 ± 5,0 B	3,0 ± 2,5 C	1,4 ± 2,0 C	94,5
Phe	47,9 ± 32,3 A	34,9 ± 35,9 A	4,7 ± 3,7 B	1,8 ± 2,7 B	96,3
Ant	6,9 ± 4,8 A	3,8 ± 1,6 B	0,9 ± 0,6 C	0,5 ± 0,4 C	93,3
Phe1	90,4 ± 50,2 A	49,9 ± 17,2 B	13,0 ± 10,5 C	4,5 ± 6,6 C	95,0
Phe2	125,9 ± 64,8 A	76,6 ± 28,8 B	21,0 ± 16,1 C	8,1 ± 8,9 C	93,6
Phe3	109,8 ± 53,0 A	77,8 ± 34,6 A	19,9 ± 14,5 B	10,7 ± 8,8 B	90,3
Ft	4,0 ± 2,8 A	2,2 ± 0,6 B	0,6 ± 0,4 C	0,4 ± 0,3 C	90,5
Py	12,9 ± 6,8 A	8,9 ± 4,8 A	1,9 ± 1,3 B	1,7 ± 1,1 B	86,5
Ft/Py1	43,7 ± 22,6 A	49,1 ± 26,6 A	6,6 ± 4,8 B	6,5 ± 4,5 B	85,2
Ft/Py2	71,1 ± 36,7 A	66,5 ± 39,4 A	9,1 ± 7,0 B	10,0 ± 7,3 B	85,9
Ft/Py3	75,7 ± 39,8 A	69,0 ± 43,8 A	10,4 ± 11,5 B	10,7 ± 7,9 B	85,9
B(a)ANT	5,3 ± 3,1 A	2,8 ± 1,4 B	0,7 ± 0,6 C	0,8 ± 0,6 C	85,2
C	7,0 ± 4,2 A	3,7 ± 1,7 B	0,6 ± 0,4 C	0,8 ± 0,8 C	89,3
C1	47,8 ± 26,3 A	31,8 ± 20,6 A	4,2 ± 3,4 B	5,0 ± 4,2 B	89,6
C2	70,5 ± 38,9 A	48,1 ± 34,3 A	5,1 ± 4,0 B	7,2 ± 5,6 B	89,8
C3	57,2 ± 31,4 A	39,3 ± 30,8 A	3,4 ± 2,6 B	5,2 ± 3,9 B	91,0
B(b+k)Ft	3,7 ± 2,4 A	2,2 ± 1,6 B	0,2 ± 0,1 C	0,3 ± 0,2 C	92,7
B(e)Py	4,8 ± 2,6 A	3,0 ± 2,4 B	0,3 ± 0,2 C	0,4 ± 0,3 C	92,5
B(a)Py	4,8 ± 2,7 A	2,9 ± 2,8 B	0,2 ± 0,2 C	0,2 ± 0,2 C	95,4
DbA	0,6 ± 0,6 A	0,1 ± 0,1 B	0,0 ± 0,0 B	0,2 ± 0,1 B	73,4
BP	1,2 ± 0,6 A	0,4 ± 0,3 B	0,0 ± 0,0 C	0,1 ± 0,0 C	94,8
IN	1,6 ± 1,1 A	0,9 ± 0,9 B	0,1 ± 0,0 C	0,1 ± 0,0 C	96,2
Total HAPs ^b	1434,3 ± 863,9 A	851,1 ± 440,4 B	155,9 ± 134,4 C	97,3 ± 97,2 C	93,2

^a Cambios de las letras dentro de la misma fila indican diferencias significativas ($P < 0.05$) a lo largo del tiempo.

^b Concentración de HAPs determinada a partir de la cuantificación de cada uno de los compuestos analizados.

^c N, Naftaleno ; F, Fluoreno ; Phe, Fenantreno; Ant, Antraceno; Ft, Fluoranteno; Py, Pireno; B(a)ANT, benzo(a)antraceno; C, criseno; B(b+k)Ft, benzo(b+k)fluoranteno; B(e)Py, benzo(e)pireno; B(a)Py, benzo(a)pireno; DbA, dibenzo(a,h)antraceno; BP, dibenzo(g,h,i)perileno; IN, indeno 1,2,3-cd pireno; 1,2,3 indican el número de grupos metilo.

^e % de degradación determinado a los 120 días.

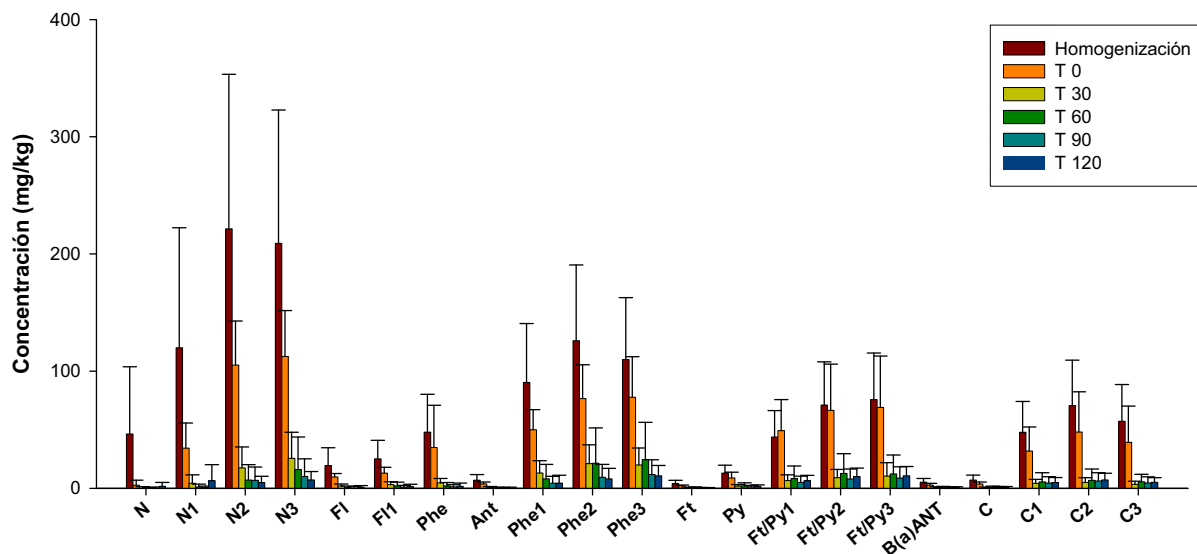


Figura 4.5. Evolución de la concentración de las distintas familias de HAPs en muestras de suelo durante su tratamiento en biopila. N, Naftaleno; F, Fluoreno; Phe, Fenantreno, Ant, Antraceno; Ft, Fluoranteno; Py, Pireno; B(a)ANT, benzo(a)antraceno; C, criseno; Los números 1, 2 y 3 indican el número de grupos metilo. Cada barra representa la media de las diferentes muestras de cada tiempo (4-7 réplicas).

Para solventar las limitaciones derivadas de la heterogeneidad propia de las muestras ambientales, cuando se llevan a cabo ensayos de biorremediación *in situ*, la eficiencia de los procesos de biodegradación se estima utilizando las concentraciones normalizadas respecto a un marcador interno, siendo el 17 α (H),21 β (H)-hopano el más habitual cuando se analizan derivados del crudo de petróleo (Prince et al., 1994). Sin embargo, en este caso, cuando se aplicó esta normalización, presentó resultados anómalos debidos probablemente a que el origen de la contaminación en este emplazamiento no era único, sino el resultado de la mezcla de dos productos que se combinaban en proporciones variables. Además la mezcla había sido expuesta a distintas condiciones desde que se produjeron los derrames y su nivel de degradación no era uniforme al iniciar el tratamiento. Por esta razón, se desestimó la normalización respecto al hopano y los niveles de biodegradación se determinaron directamente por comparación de las concentraciones de cada uno de los HAPs respecto a su concentración inicial, en este caso, en la fase de homogenización.

Los análisis de las muestras de la biopila revelaron que al final del tratamiento la concentración de todos los productos analizados (alquilados y no alquilados) se había reducido de forma significativa ($p < 0,05$), con porcentajes que oscilaron entre el 73% y el 98%.

Tal y como se ha observado previamente en las cinéticas de degradación de la MOE y los TPHs, la degradación de HAPs y sus derivados metilados se llevó a cabo siguiendo una cinética típica en forma de palo de Hockey. En general, se observó una fase inicial de degradación rápida que se extendió durante los primeros 30 días, y que pasado este tiempo, se atenuó drásticamente. Como consecuencia, se generó una fracción residual de HAPs, que osciló entre el 2% y el 27% del compuesto original, que se mantuvo prácticamente constante a lo largo del resto de tratamiento.

Entre los HAPs no metilados, como era de esperar, la degradación más rápida y más extensa se observó para los HAPs de dos y tres anillos, siendo el naftaleno y fenantreno (96%) los que sufrieron un mayor grado de degradación, seguidos de fluoreno (95%) y antraceno (93%), que debido a su menor solubilidad en agua, presentó una mayor recalcitrancia. En cuanto a los compuestos de cuatro anillos, sus porcentajes de biodegradación fueron ligeramente inferiores, oscilando entre un 91% y 86%, para fluoranteno y benzo(*a*)antraceno, respectivamente. Los HAPs de cinco anillos (benzo(*b+k*)fluoranteno, benzo(*e*)pireno, benzo(*a*)pireno, dibenzo(*a,h*)antraceno, dibenzo(*g,h,i*)perileno e indeno 1,2,3-cd pireno) fueron degradados entre un 73% y un 96%.

Tal y como ya se ha comentado previamente, en los crudo de petróleo y sus derivados los HAPs metilados son más abundantes que sus contrapartes no alquilados. En general, a partir de observaciones realizadas en el laboratorio y estudios de campo, se ha descrito que los compuestos alquilados son más resistentes a la degradación que sus contrapartes sin alquilar, disminuyendo su biodegradabilidad con el incremento de sustituyentes metilo en la molécula (Wang *et al.*, 1995, 1998; Venosa *et al.*, 1996; Vila & Grifoll, 2009). En cambio, en nuestro caso, cuando se compararon los porcentajes de biodegradación observados para las distintas familias de HAPs alquilados de dos (naftalenos), tres (fenantrenos y fluorantenos/pirenos) y cuatro anillos (crisenos) al final del tratamiento en biopilas, se observó que, en la mayoría de los casos, sus porcentajes de degradación fueron similares a los observados para sus contrapartes sin alquilar.

Si atendemos a las cinéticas de degradación de las distintas familias, se observó un comportamiento sorprendentemente similar para la mayoría de ellas, aunque hubo una preferencia por los compuestos de menor peso molecular, como los derivados de naftaleno y fenantreno, sobre los compuestos de mayor peso molecular y menor solubilidad en agua, como los derivados de fluoranteno/pireno y los metil-crisenos (Figura 4.6).

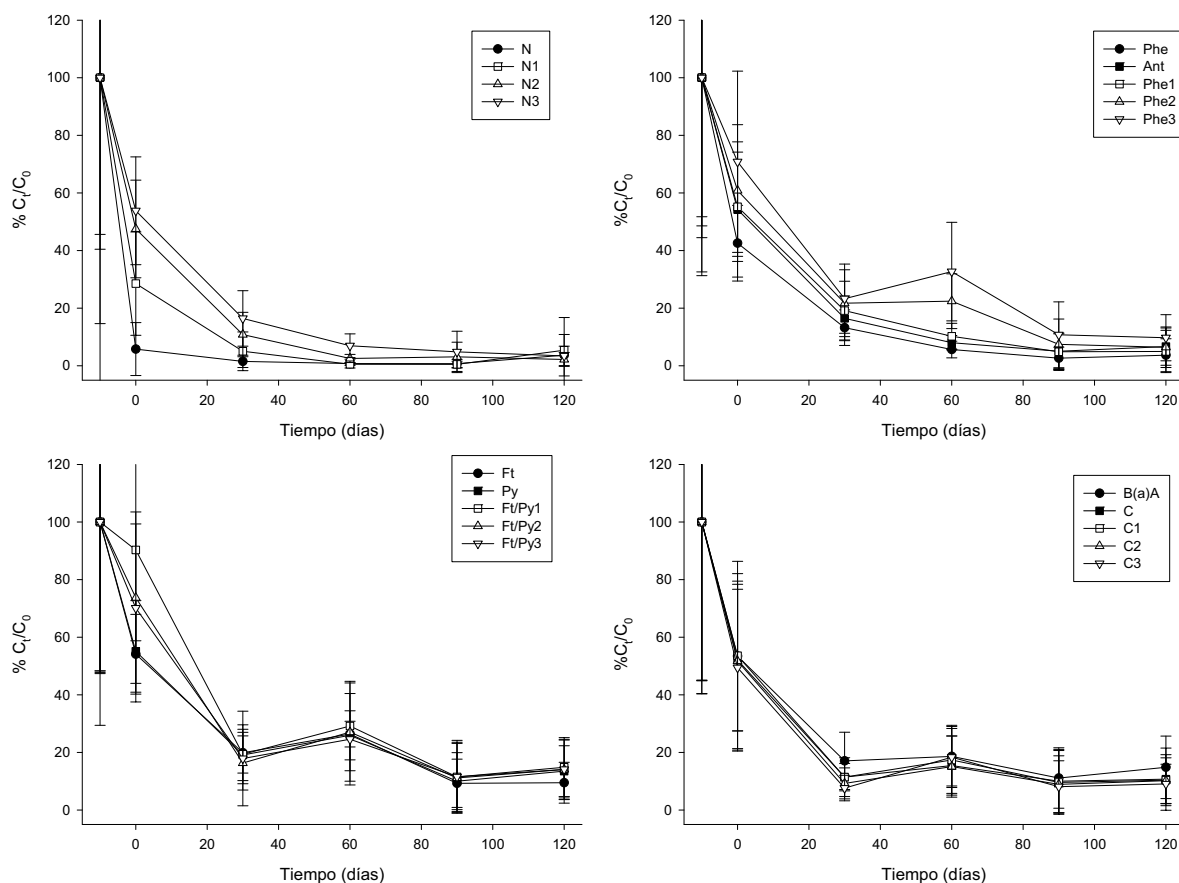


Figura 4.6. Cinéticas de degradación de los HAPs a lo largo del tratamiento en biopila. La concentración relativa de cada analito a lo largo del tiempo (C_t/C_0) se determinó en relación a su concentración inicial (homogenización). N, Naftaleno; Phe, Fenantreno; Ant, Antraceno; Ft, Fluoranteno; Py, Pireno; BaA, benzo(a)antraceno; C, criseno, 1, 2, y 3 indican el número de grupos metilo. Cada punto representa la media de las diferentes réplicas de cada tiempo.

Como ya se ha comentado, este tipo de cinética es habitual en ensayos de bioremediación *in situ* de contaminantes orgánicos, y en el caso concreto de los HAPs se ha demostrado que se debe a la reducida biodisponibilidad de estas fracciones residuales como consecuencia de su adsorción a la matriz de suelo, su inclusión en microporos de difícil acceso a los microorganismos, o a su presencia en forma de fases líquidas no acuosas (NAPL) (Ortega-Calvo et al., 1995).

4.2.4. Detección de metabolitos de HAPs

Considerando que la degradación más significativa de HAPs se observó durante el primer mes de tratamiento, la presencia de productos intermedios de su oxidación se determinó en una muestra compuesta obtenida combinando las distintas muestras

obtenidas en este punto, empleando el protocolo analítico descrito previamente en el grupo (Arias, 2008). Este protocolo implica la obtención de lixiviados del suelo y su extracción en condiciones ácidas para detectar ácidos aromáticos carboxílicos, y la posterior obtención de extractos orgánicos de la matriz sólida para la detección de metabolitos neutros (fenoles, cetonas y quinonas). Debido a la elevada complejidad de la matriz contaminante, el análisis de los extractos neutros se llevó a cabo tras su fraccionamiento en columnas de cromatografía.

El análisis de los extractos del lixiviado y de las distintas fracciones obtenidas se llevó a cabo mediante GC-MS, obteniéndose en todos los casos unos perfiles altamente complejos, con la presencia de picos correspondientes a la matriz contaminante original. Por este motivo, se diseñó un método selectivo para la detección de los productos de oxidación acumulados basado en la obtención de fragmentogramas de iones reconstruidos. Para esta aproximación, fue esencial la información disponible en la base de datos del grupo, recopilada a partir del análisis de patrones comerciales y de estudios previos de metabolismo de cultivos bacterianos con sustratos individuales. Para asegurar la identidad de los productos detectados, para cada familia de compuestos se seleccionaron, y detectaron de forma simultánea, los tres iones mayoritarios de su patrón de fragmentación.

Considerando que normalmente en los suelos contaminados por HAPs los productos de oxidación parcial más abundantes detectados acostumbran a ser cetonas y quinonas aromáticas (Lundstedt et al., 2003), los esfuerzos analíticos en la detección de metabolitos neutros se focalizaron en la detección de estos productos.

A partir del protocolo analítico utilizado, se esperaba detectar estos productos en la fracción V del extracto orgánico de la fase sólida (Vila & Grifoll, 2009, Arias, 2008), eluida con 20 ml de diclorometano. A modo de ejemplo, en la figura 4.7 se muestra la detección de antraquinona/fenantrenona y sus derivados metilados, unos de los productos más abundantes detectados en esta fracción.

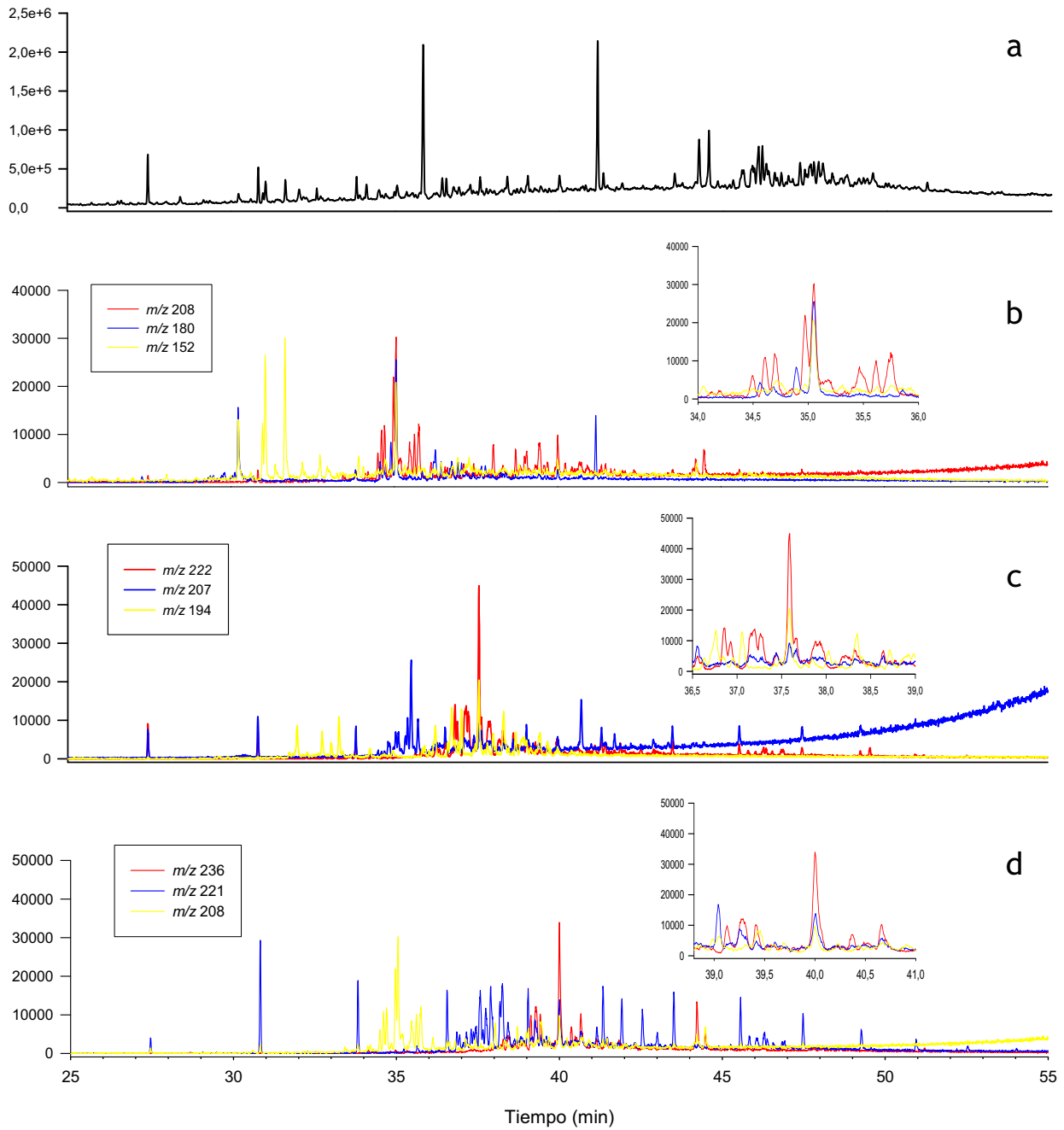


Figura 4.7. Perfil cromatografico total (TIC, GC-MS) de la fracción FV del extracto neutro del suelo obtenido tras 30 días de tratamiento en biopila (a) y fragmentogramas reconstruidos utilizando iones diagnóstico de fenantrenona/antraquinona (b), metil-fenantrenona/antraquinona (c) y dimetil-fenantrenona/antraquinona (d).

La detección de metabolitos ácidos se llevó a cabo a partir del análisis mediante GC-MS de los extractos ácidos de lixiviados. Mediante este análisis se detectaron una gran cantidad de compuestos, agrupados muchas veces en familias, correspondientes en su mayoría a ácidos mono- y dicarboxílicos derivados de la oxidación del carbono metílico de metilnaftalenos y metilfenantrenos con distinto grado de metilación.

A modo de ejemplo, en la figura 4.8 se muestran los fragmentogramas obtenidos para la detección de ácidos carboxílicos resultantes de la oxidación de di- y trimetilnaftalenos.

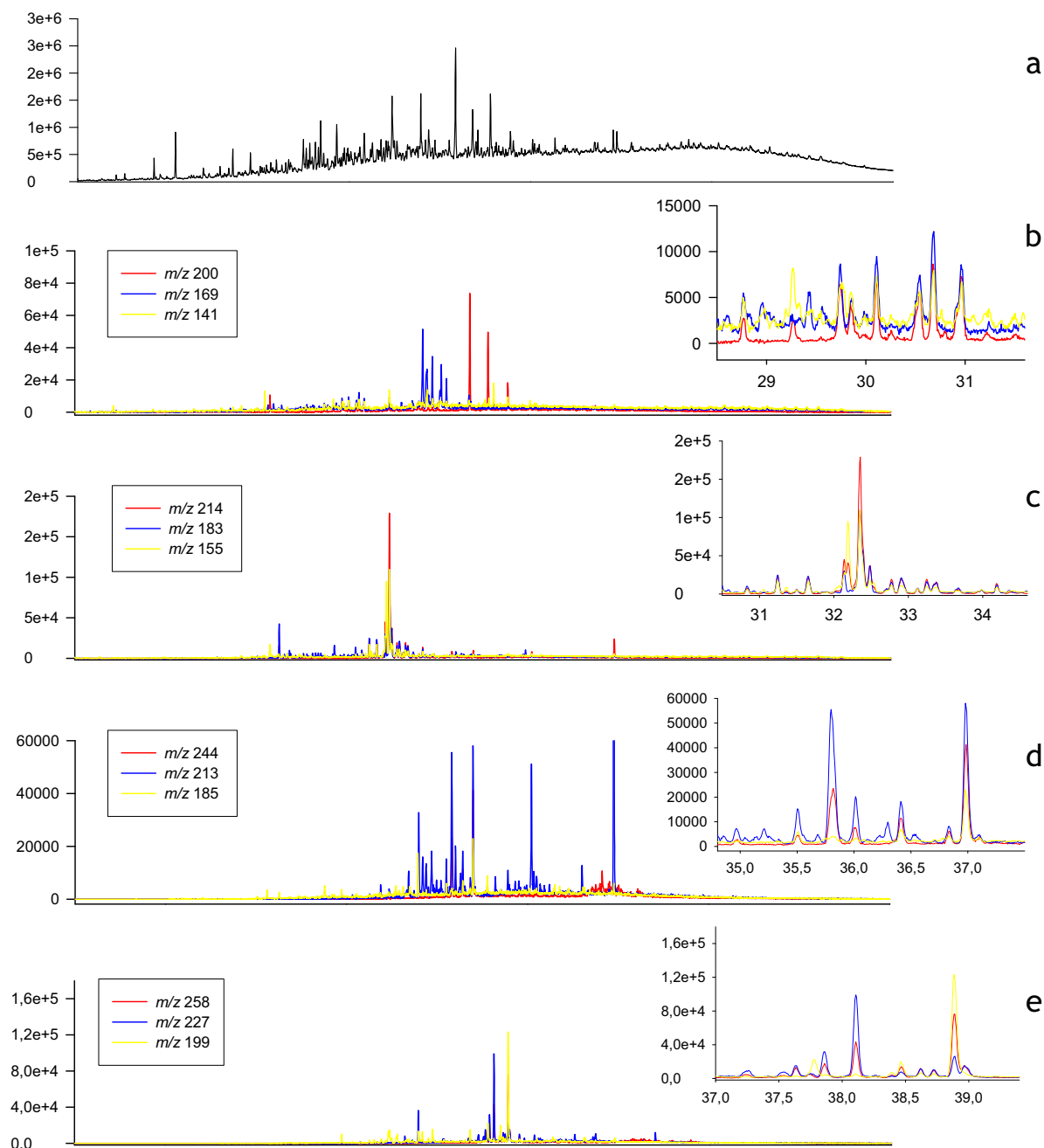


Figura 4.8. Perfil cromatografico total (TIC, GC-MS) del extracto ácido de los lixiviados del suelo obtenido tras 30 días de tratamiento en biopila (a) y fragmentogramas reconstruidos utilizando iones diagnóstico de los ácidos metilnaftaleno carboxílico (b), dimetilnaftaleno carboxílico (c), naftaleno dicarboxílico (d) y metilnaftaleno dicarboxílico (e).

4.3. Estudio de la comunidad microbiana

4.3.1. Recuento de las poblaciones microbianas heterótrofas y degradadoras de hidrocarburos mediante la técnica del NMP

A lo largo de todo el periodo de tratamiento en biopilas, se llevaron a cabo recuentos de las poblaciones total heterótrofa, degradadora de *n*-alcanos (hexadecano) y degradadora de HAPs, utilizando fenantreno y pireno como modelos de compuestos de bajo y elevado peso molecular, respectivamente (Tabla 4.2). Antes de iniciarse el tratamiento (fase de homogeneización), se observó una población heterótrofa de $7,88 \times 10^5$ NMP/g, encontrándose las poblaciones degradadoras de hexadecano, fenantreno y pireno en valores de $3,51 \times 10^5$ NMP/g, $3,84 \times 10^6$ NMP/g y $3,76 \times 10^5$ NMP/g, respectivamente. Estos resultados indican la existencia en el emplazamiento de una población degradadora de hidrocarburos autóctona en valores relativamente elevados, superando incluso la población heterótrofa, lo que explicaría el importante grado de degradación inicial de la mezcla contaminante. Este resultado, además, sugiere que en este suelo, la velocidad de degradación de hidrocarburos se encontraría limitada básicamente por la disponibilidad de nutrientes y oxígeno.

Tabla 4.2. Resultados de los recuentos a lo largo del tiempo de poblaciones heterótrofas y degradadoras

Tiempo	Heterótrofos	Degradadores		
	NMP/g suelo	NMP/g suelo		
	LB 1/10	Hexadecano	Fenantreno	Pireno
Homogeneización	$7,88 \times 10^5$	$3,51 \times 10^5$	$3,84 \times 10^6$	$3,76 \times 10^5$
0 Días	$5,12 \times 10^6$	$3,23 \times 10^5$	$2,27 \times 10^6$	$2,09 \times 10^5$
30 Días	$3,86 \times 10^6$	$5,24 \times 10^5$	$5,54 \times 10^5$	$2,10 \times 10^5$
60 Días	$1,01 \times 10^8$	$6,71 \times 10^6$	$2,79 \times 10^6$	$4,89 \times 10^5$
90 Días	$1,75 \times 10^7$	$1,45 \times 10^6$	$3,55 \times 10^6$	$1,88 \times 10^6$
120 Días	$4,80 \times 10^6$	$1,66 \times 10^5$	$1,09 \times 10^5$	$3,92 \times 10^4$

Los recuentos de microorganismos degradadores de fenantreno y pireno se mantienen elevados desde la fase de homogeneización, lo que explica la rápida degradación de estos compuestos, cuyas tasas son máximas entre la homogeneización y los 30 días. En todos los recuentos se producen máximos a los 60-90 días, cuando las tasas de degradación ya han declinado (Figura 4.9). A los 120 días decrecen notablemente todas las poblaciones. Dado que las cinéticas de degradación de los compuestos alquilados son similares a los de correspondientes HAPs no metilados, estos resultados pueden indicar que el incremento de las poblaciones degradadoras de pireno y fenantreno no iría asociado exclusivamente a la degradación de estos compuestos.

Por otro lado, el hecho de que las poblaciones degradadoras de fenantreno (3 anillos) presenten en todos los momentos valores superiores a las de pireno (4 anillos), es consistente con la mayor biodegradabilidad y concentración del primero en el suelo, 47,9 mg/kg y 12,9 mg/Kg, respectivamente. Estos resultados permiten confirmar el potencial degradador de los microorganismos presentes en el suelo.

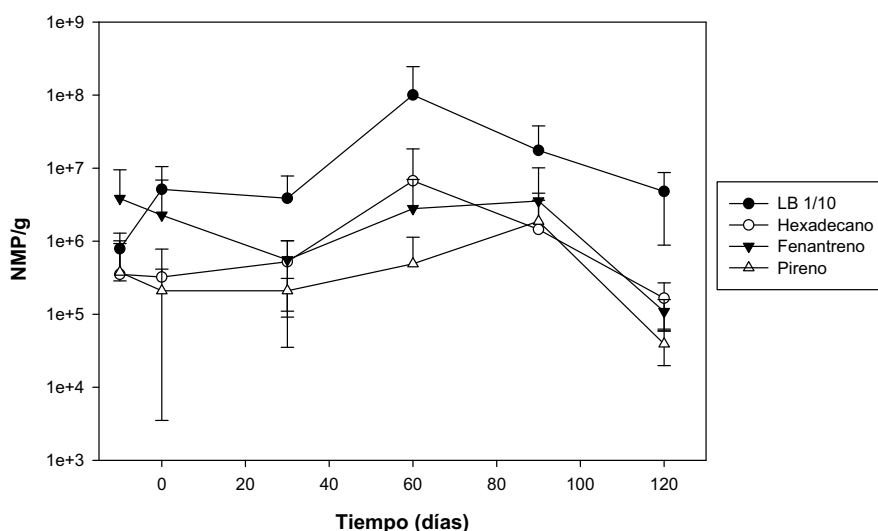


Figura 4.9. Evolución de las poblaciones heterótrofa total y degradadoras de hexadecano, fenantreno y pireno, determinadas mediante la técnica del NMP, a lo largo del tratamiento.

4.3.2. Dinámica de las poblaciones bacterianas mediante análisis por DGGE

Mediante perfilado en geles de DGGE de las regiones hipervariables V1-V3 del gen ARNr 16S, se determinó la evolución de la estructura de la comunidad microbiana a lo largo del tiempo de tratamiento en la biopila. Para ello, se amplificaron los extractos totales de todas las réplicas con los cebadores universales GC-63F y 518R (Figura 4.10).

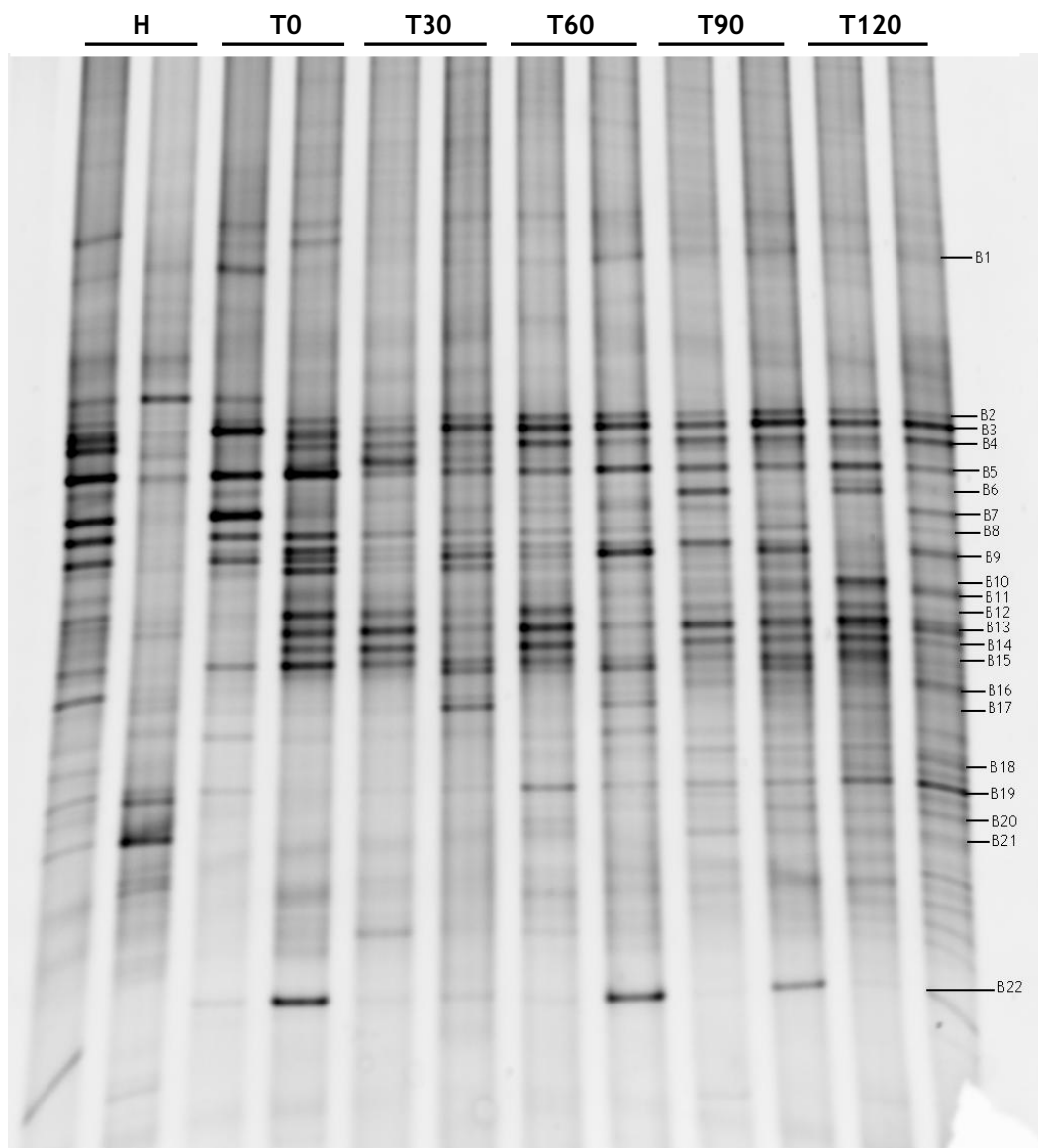


Figura 4.10. Perfiles de DGGE de los fragmentos del ADN 16S amplificados por PCR, obtenidos a partir del análisis de muestras representativas de los distintos tiempos: homogeneización, 0, 30, 60, 90 y 120 días.

En general, las bandas B2, B3, B4, B5, B12, B13, B14 y B15, se presentaron en la mayoría de los perfiles de DGGE obtenidos, especialmente en las muestras tomadas a partir de los 30 días de incubación, siendo, en muchos de ellos, las bandas predominantes. Por otro lado, con el paso del tiempo se observó un claro incremento de otras bandas, B6, B11, B16, B19, B20 o B21, que aparecieron en su mayoría a partir de los 60 días de incubación. Por el contrario, bandas como B1, B7 o B8, claramente predominantes en las fases iniciales (homogeneización y tiempo 0), prácticamente desaparecieron tras un mes de tratamiento en la biopila.

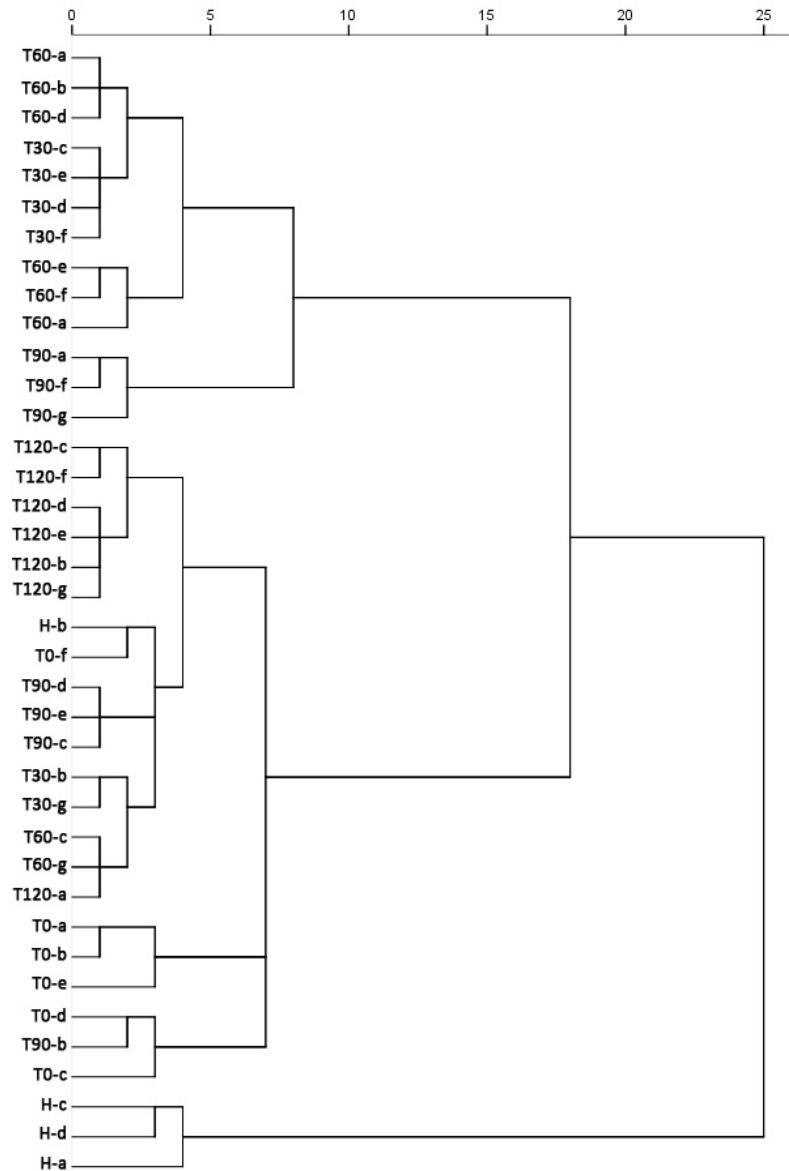


Figura 4.11. Dendrograma mostrando el análisis de clústeres de los perfiles de DGGE obtenidos a partir del análisis de las muestras correspondientes a la fase de homogenización (H), y tras 0 (T0), 30 (T30), 60 (T60), 90 (T90) y 120 (T120) días de tratamiento en biopilas. Las letras (a-g) identifican las distintas réplicas de cada tiempo.

Para analizar de forma más detallada las diferencias entre réplicas y entre los distintos tiempos, se llevó a cabo un análisis mediante clústeres de todos los perfiles de DGGE obtenidos. De esta forma se observó la presencia de tres clústeres claramente diferenciados. El primero de ellos, que agrupaba únicamente a las muestras de homogeneización (H) y que, a pesar de aparecer agrupadas, presentaban una elevada heterogeneidad (Figura 4.11). El resto de muestras, se agruparon formando otros dos clústeres, mucho más próximos entre ellos, uno incluyendo

principalmente las muestras de 30, 60 y 90 días, y el otro donde aparecían mayoritariamente las muestras de 120 y 0 días, aunque mostrando una clara separación entre ellas. Esto sugería que, tras la construcción de la biopila, y a medida que progresó el tratamiento, los patrones de bandeo se hicieron cada vez más homogéneos tanto entre las distintas réplicas como entre los distintos tiempos (Figura 4.10). De hecho, a los 120 días se observaron unos perfiles muy similares en todas las réplicas, la mayoría de las cuales, excepto una, agruparon formando un único grupo muy homogéneo, indicando un elevado grado de madurez y homogeneización de las poblaciones bacterianas en la biopila (Figura 4.11).

Tabla 4.3. Índice de Shannon-Wiener (H') de la diversidad bacteriana estimada, basada en los perfiles de geles de DGGE de muestras de suelo de la biopilas a lo largo del tiempo

	H	T0	T30	T60	T90	T120
H'	1,67 ± 0,52	1,97 ± 0,18	2,53 ± 0,30	2,52 ± 0,29	2,38 ± 0,37	2,72 ± 0,18

La evolución de la diversidad en las muestras correspondientes a la biopila se estimó mediante el cálculo del índice de Shannon-Wiener a partir de los perfiles de DGGE obtenidos (Tabla 4.3). Hay que tener en cuenta que la baja sensibilidad, ya comentada, de esta metodología no permite llevar a cabo una determinación exhaustiva de la biodiversidad, con lo que estos resultados se utilizaron simplemente como una estima de la variación de esta diversidad, más que como una medida fiable de la misma en valores absolutos. De esta forma, se observó que a medida que avanzó el tratamiento en biopilas la diversidad se incrementó, pasando de un valor de 1,67 en la fase de homogeneización a 2,72 a la conclusión del tratamiento. Además, la clara diferencia entre las desviaciones estándar de ambas medidas (0,52 y 0,18, respectivamente), claramente más bajas al final del tratamiento, dan una idea de la mayor homogeneidad de la población en este punto.

4.3.3. Librería de clones del 16S rARN

Considerando el elevado grado de homogeneización observado en las poblaciones bacterianas en el análisis en geles de DGGE, se procedió a determinar la composición de la comunidad microbiana mediante la obtención de una librería de clones del ADNr 16S al final del tratamiento. Para ello, se partió de una muestra combinada de los extractos de ADN correspondientes a las distintas réplicas de 120 días, que se

amplificó con los cebadores 27F y 1492R para obtener fragmentos prácticamente completos del gen ARNr 16S. Se obtuvieron un total de 96 clones que fueron analizados y secuenciados en su totalidad. Mediante su análisis por RFLP utilizando la enzima MsPI se seleccionaron 52 clones distintos que se identificaron a partir de su secuenciación completa con los cebadores de amplificación (Tabla 4.4 y Figura 4.12).

Tabla 4.4. Microorganismos identificados en la librería de clones a 120 días

Clon	Frec (%)	Sim (%) ^a	Organismo más próximo (accession no.) ^a	Aislado más cercano	Sim (%)	Grupo filogenético ^b
C1	4	99	<i>Uncultured soil bacterium</i> (HM596270)	<i>Altererythrobacter aestuarii</i> strain KYW147 (FJ997597)	95	<i>Erythrobacteraceae</i> (α)
C2	1	99	<i>Sphingomonas</i> sp. ED8 (AB214867)	<i>Sphingomonas</i> sp. A1-13 (AY512602)		<i>Sphingomonadaceae</i> (α)
C3	2	99	<i>Uncultured bacterium</i> (HM267221)	<i>Sphingomonas</i> sp. A1-13 (AY512602)	99	
C4	2	100	<i>Sphingomonas</i> sp. F15 (EU072021)	<i>Sphingomonas</i> sp. A1-13 (AY512602)		
C5	3	100	<i>Uncultured Sphingobium</i> sp. (HM438584.1)	<i>Sphingobium cloacae</i> strain S-3 (NR_027233)	98	
C6	2	99	<i>Uncultured Novosphingobium</i> sp. (FJ444668.1)	<i>Novosphingobium</i> sp. F2 16S (EU697074)	98	
C7	1	99	<i>Uncultured Sphingomonas</i> sp. (AM934922.1)	<i>Sphingosinicella</i> sp. OC55 (AB429069)	97	
C8	1	99	<i>Uncultured Caulobacteraceae</i> (AM934942.1)	<i>Phenyllobacterium</i> sp. B-RO9-3 (JN571321)	99	<i>Caulobacteraceae</i> (α)
C9	4	98	<i>Uncultured bacterium</i> (HQ393154.1)	<i>Azospirillum</i> sp. T2-YC6788 (GQ369056)	93	<i>Rhodospirillaceae</i> (α)
C10	1	99	<i>Uncultured Rhodospirillaceae</i> (EU276561.1)	<i>Azospirillum</i> sp. T2-YC6788 (GQ369056)	96	<i>Rhodospirillaceae</i> (α)
C11	1	99	<i>Uncultured Rhodospirillaceae</i> (AM936166.1)	<i>Rhodospirillaceae bacterium</i> (FJ459988)	93	<i>Proteobacteria</i> (α)
C12	1	100	<i>Uncultured Rhodospirillaceae</i> (EF018478.1)	<i>Rhodospirillaceae bacterium</i> (FJ459988)	94	<i>Rhodospirillaceae</i> (α)
C13	1	97	<i>Uncultured alpha proteobacterium</i> (JF508343.1)	<i>Hyphomicrobium</i> sp. 16-60 (HM124367)	93	<i>Proteobacteria</i> (α)
C14	1	96	<i>Uncultured soil bacterium</i> (DQ123778.1)	<i>Rhodoplanes piscinae</i> (AM712913)	93	<i>Hyphomicrobiaceae</i> (α)
C15	1	99	<i>Rhizobium</i> sp. SL-1 (EU556969.3)			<i>Rhizobiaceae</i> (α)
C16	1	98	<i>Uncultured bacterium</i> (AB186822.1)	<i>Parvibaculum</i> sp. MBNA2 (FN430653)	97	<i>Proteobacteria</i> (α)
C17	1	98	<i>Uncultured bacterium</i> (AB487824.1)	<i>Herbaspirillum</i> sp. TSA30 (AB542421)	97	<i>Oxalobacteraceae</i> (β)
C18	1	98	<i>Uncultured bacterium</i> (EU368397.1)	<i>Herbaspirillum</i> sp. Ba222 (JN692285)	97	
C19	1	99	<i>Uncultured bacterium</i> (EF157142.1)	<i>Pseudorhodoferax</i> sp. NAFc-7 (GU721026)	97	<i>Comamonadaceae</i> (β)
C20	1	99	<i>Hydrogenophaga</i> sp. KC-IT-SS2 (FJ711213.1)			
C21	1	99	<i>Uncultured bacterium</i> (HM228859.1)	<i>Achromobacter xylosoxidans</i> subsp. <i>xylosoxidans</i> (AF225979)	99	<i>Alcaligenaceae</i> (β)
C22	1	99	<i>Uncultured bacterium</i> (AB659852.1)	<i>Rubrivivax</i> sp. SNRB4-8 (AB299681)	98	<i>Proteobacteria</i> (β)
C23	1	99	<i>Uncultured soil bacterium</i> (DQ123713.1)	<i>Thiobacillus denitrificans</i> strain ME16 (EU546130)	99	
C24	1	99	<i>Uncultured soil bacterium</i> (DQ123804.1)	<i>Thiobacillus thioparus</i> strain THI 11 1 (HM535226)	99	
C25	1	98	<i>Uncultured Beta proteobacterium</i> (AM935408.1)	<i>Denitratisoma oestradiolicum</i> strain AcBE2-1 (NR_043249)	91	

Tabla 4.4. Microorganismos identificados en la librería de clones a 120 días

Clon	Frec (%)	Sim (%) ^a	Organismo más próximo (accession no.) ^a	Aislado más cercano	Sim (%)	Grupo filogenético ^b
C26	2	99	<i>Uncultured gamma proteobacterium</i> (JN409014.1)	<i>Lysobacter yangpyeongensis</i> strain GH 19-3 (NR_043625)	98	Xanthomonadaceae (γ)
C27	1	95	<i>Uncultured Lysobacter sp</i> (EU440728.1)	<i>Lysobacter daecheongensis</i> (AB249682)	92	
C28	1	99	<i>Uncultured Lysobacter sp.</i> (EU440728.1)	<i>Lysobacter brunescens</i> strain F2 (GQ859167)	96	
C29	3	99	<i>Pseudoxanthomonas spadix</i> BD-a59 (CP003093.2)			
C30	1	98	<i>Pseudoxanthomonas mexicana</i> strain L2 (GQ480839.1)			
C31	1	99	<i>Uncultured Xanthomonas</i> (AY571839.1)	<i>Xanthomonas sp.</i> (AY571841)	99	
C32	1	99	<i>Uncultured Xanthomonas sp.</i> (AM936549.1)	<i>Lysobacter pocheonensis</i> strain Gsoil 193 (EU273938)	97	
C33	1	99	<i>Uncultured Gamma proteobacterium</i> (AM936447.1)	<i>Steroidobacter sp.</i> ZUMI 37 (AB548216)	92	Proteobacteria (γ)
C34	1	98	<i>Uncultured gamma proteobacterium</i> (FM209119.1)	<i>Ectothiorhodospiraceae bacterium</i> Su4 (EU837269)	91	
C35	18	99	<i>Uncultured sulfur-oxidizing symbiont bacterium</i> (AM936363.1)	<i>Thioalkalivibrio sp.</i> ALN1 (EU709866)	90	
C36	1	96	<i>Uncultured sulfur-oxidizing</i> (AM936363.1)	<i>Pseudomonas sp.</i> hp7 (JN637314)	91	Pseudomonadaceae (γ)
C37	3	100	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> strain KOPRI 25689 (HQ824922.1)			
C38	1	92	<i>Uncultured Legionella sp.</i> (JF968484.1)	<i>Legionella sp.</i> FA-3a 16S (JN381001)	92	Legionellaceae (γ)
C39	1	100	<i>Uncultured gamma proteobacterium</i> (FM209111.1)	<i>Microbulbifer sp.</i> (JN088732)	92	Proteobacteria (γ)
C40	4	100	<i>Uncultured bacterium</i> (FQ659721.1)		91	
C41	2	100	<i>Uncultured bacterium</i> (JN217209.1)		89	
C42	1	92	<i>Uncultured bacterium</i> (GU133260.1)	<i>Actinomycetales bacterium</i> (AB461704)	91	Microbacteriaceae (Actinobacteria)
C43	2	99	<i>Uncultured Agromyces sp.</i> (AM934705.1)	<i>Agromyces sp.</i> BZ41 (FJ972171)	99	
C44	1	99	<i>Uncultured bacterium</i> (EF157143.1)	<i>Microbacterium sp.</i> AMP-15 (HM104381)	99	
C45	1	99	<i>Uncultured Microbacteriaceae bacterium</i> (JF703420.1)	<i>Leifsonia kribbensis</i> strain MSL-13 (NR_044240)	99	
C46	1	100	<i>Uncultured bacterium</i> (GU133260.1)	<i>Microbacteriaceae bacterium</i> (AB537176)	98	
C47	1	97	<i>Uncultured bacterium</i> (GQ067397.1)	<i>Mycobacterium sp.</i> RI16 (DQ530132)	97	
C48	1	99	<i>Actinobacterium</i> ZXY024 (JN049473.1)	<i>Nocardia cyriacigeorgica</i> (AB635474)	99	Nocardiaceae (Actinobacteria)
C49	4	99	<i>Uncultured Acidobacteriaceae</i> (AM936332.1)	<i>Acidobacteria bacterium</i> KBS 96 (FJ870384)	94	Acidobacteria
C50	1	99	<i>Uncultured bacterium</i> (AB486232.1)	<i>Bacterium</i> Ellin371 (AF498753)	95	Acidobacteria
C51	1	99	<i>Uncultured bacterium</i> (EF515667.1)	<i>Caldisericum exile</i> AZM16c01 (NR_041680)	79	Caldisericia
C52	1	94	<i>Uncultured Planctomycetacia</i> (EF665610.1)	<i>Isosphaera-like str.</i> OJF2 (GU123163)	93	Planctomycetes

^a Organismo más próximo según la base de datos GenBank.

^b Clasificación según Ribosomal Database Project (Maidak et al., 2000). α, β y γ representan Alfa-, Beta- y Gammaproteobacteria.

De esta forma, se identificó una población formada mayoritariamente por miembros del filo *Proteobacteria* (84%), con una clara predominancia de los miembros de *Gammaproteobacteria* (44%), sobre *Alfaproteobacteria* (30%) y *Betaproteobacteria* (10%). Por otro lado, se detectaron miembros de los filos *Actinobacteria*, *Acidobacteria*, *Caldiseriaceae* y *Planctomycetes* (Figura 4.12). Este predominio de *Gammaproteobacteria* concuerda con los resultados obtenidos por otros autores, que han descrito la predominancia de miembros de este grupo en suelos alterados por la presencia de hidrocarburos (Mills *et al.*, 2003; Popp *et al.*, 2006).

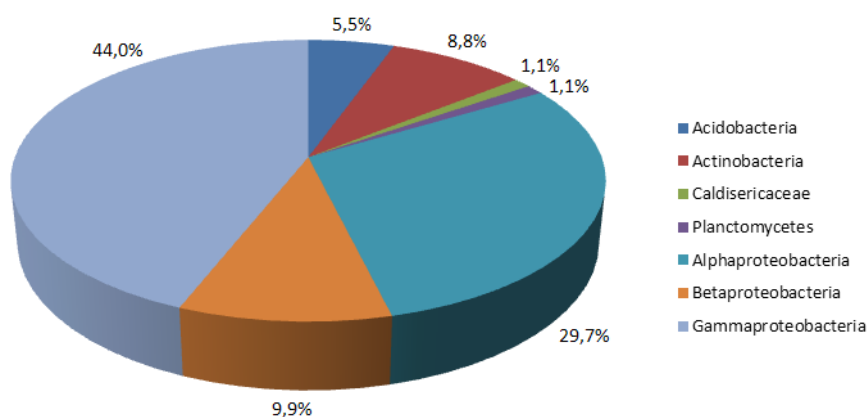


Figura 4.12. Composición en filos de la población microbiana de la librería de clones

La diversidad de bacterias en el suelo se ha investigado ampliamente con técnicas independientes de cultivo basadas en el análisis molecular de gen ARNr 16S (Youssef & Elshahed, 2009). De esta forma, se ha observado que la mayoría de secuencias obtenidas pertenecen a nueve filos bacterianos principales, *Proteobacteria* (con sus subdivisiones *Alfa*, *Beta*, *Delta*) siendo generalmente el más abundante, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Acidobacteria*, *Chloroflexi*, *Firmicutes*, *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia* y *Gemmatimonadetes* (Janssen, 2006).

Esta elevada predominancia de *Proteobacteria*, y especialmente de *Gammaproteobacteria*, podría sugerir que en este suelo, como consecuencia de la exposición a hidrocarburos, se habían enriquecido un número limitado de poblaciones concretas. Sin embargo, un análisis más detallado de las secuencias de los clones obtenidos mostró que, considerando como límite para su agrupación un 97% de similitud, dentro de este filo existían una gran diversidad de OTUs distintos (tabla 4.4).

De hecho, dejando aparte a los miembros de grupos próximos a *Thioalkalivibrio* (*Chromatiales* o antiguas bacterias rojas del azufre), que suponían aproximadamente un 20% de las secuencias detectadas, la frecuencia más elevada observada no superó en ningún caso el 5%, detectándose, en la mayoría de los casos, un único representante de cada OTU, y haciendo imposible obtener una rarefacción satisfactoria. De esta forma, se detectaron 16 representantes de *Alfaproteobacteria* pertenecientes a las familias *Sphingomonadaceae* (*Sphingomonas*, *Sphingobium*, *Novosphingobium*), *Rhodospirillaceae*, *Hyphomicrobiaceae*, *Caulobacteraceae* y *Rhizobiaceae*; 9 representantes de *Betaproteobacteria* clasificados dentro de *Oxalobacteraceae*, *Comamonadaceae*, *Alcaligenaceae*, y *Hydrogenophilaceae* (género *Thiobacillus*). Es destacable que dos de estas secuencias (C23 y C24), relacionadas con *Thiobacillus*, presentaron su máxima homología con dos *Proteobacterias* no cultivadas asociadas a la degradación de pireno en suelo contaminado con HAP en un bioreactor (Singleton et al., 2006).

Se detectaron 16 representantes de *Gammaproteobacteria* estrechamente relacionados con miembros de *Xantomonadaceae* (*Lysobacter*, *Xanthomonas*, *Pseudoxanthomonas*), *Pseudomonadaceae*, *Legionellaceae*, y a bacterias no cultivadas de este grupo, entre ellas el miembro más abundante de la comunidad, que como ya se ha comentado, se ubicaba relativamente próximo a representantes del género *Thioalkalivibrio*. Curiosamente, la secuencia correspondiente a este OTU (C35), presentaba su mayor similitud (99%) con un componente de la comunidad bacteriana presente en un suelo contaminado por hidrocarburos alifáticos sometido a biorremediación (Milton et al., 2010). Además, otros representantes de *Gammaproteobacteria* detectados aquí, *Lysobacter*, *Xanthomonas* y *Steroidobacter*, también fueron detectados en ese trabajo.

Por otro lado, también cabe destacar la presencia de un número relativamente elevado de actinobacterias (7) que representaban casi un 9% de la diversidad detectada mediante la librería de clones. Entre ellas, se detectaron diversos miembros de la familia *Microbacteriaceae* y representantes de los géneros *Mycobacterium* y *Nocardia*, todos ellos, grupos que se han asociado en algún momento a ambientes contaminados con hidrocarburos, o que han demostrado su capacidad para utilizarlos.

Mediante la comparación de los perfiles de DGGE obtenidos para las distintas muestras, con la migración de las bandas obtenidas para cada uno de los clones, se analizó la evolución de los distintos miembros de la comunidad detectados en la

librería de clones a lo largo del tiempo de incubación. De esta forma, las bandas B2, B3 y B4 se asociaron a miembros de *Pseudomonas*, las bandas B5, B7, B8, B9, B12 y B13 a miembros de *Thioalkalivibrio*, B14 a *Lysobacter*, B15 a *Altererythrobacter*, *Novosphingobium* y *Rhizobium*, y B19 a *Uncultured Gammaproteobacteria*. Todas ellas aparecían en los perfiles de DGGE desde el tiempo 0 hasta el final del tratamiento, aunque sus intensidades oscilaban en las distintas réplicas, estando ausentes en algunas de las muestras correspondientes a las fases iniciales del tratamiento, y ganando relevancia durante las fases finales (Figura 4.13).

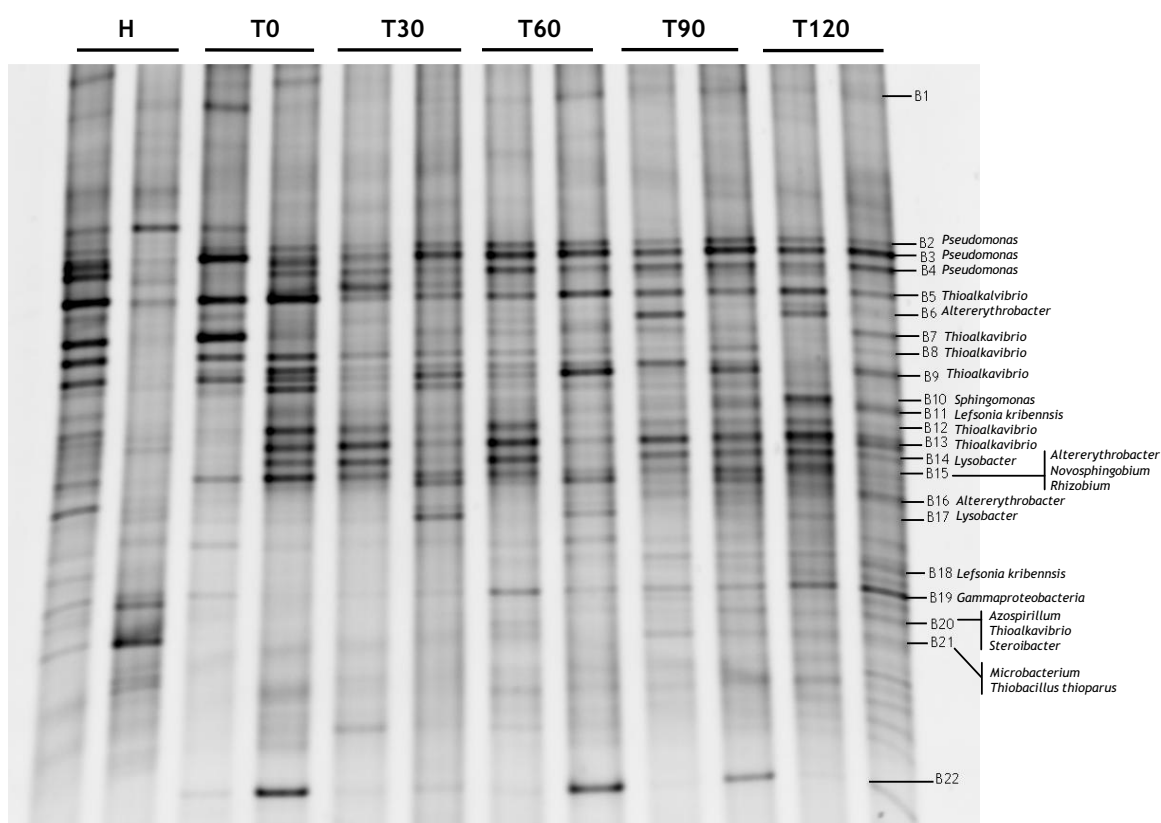


Figura 4.13. Perfiles de DGGE de los fragmentos del ADN 16S amplificados en muestras seleccionadas. Se muestra la identificación de las bandas a partir de los clones para seguir su evolución a lo largo del tiempo. Se repite la figura para facilitar la comprensión de los resultados.

Las bandas B6 y B16 (*Altererythrobacter*), B20 (*Azospirillum* sp., *Thioalkalivibrio* sp., *Steroidobacter* sp.), B21 (*Microbacterium* sp., *Thiobacillus thioeparus*) y B17 (*Lysobacter*) no estaban presentes en los perfiles correspondientes a los tiempos iniciales (homogeneización y 0 días), siendo notables en los perfiles correspondientes a las muestras de 30 a 120 días. Las bandas B10 (*Sphingomonas* sp.), B11 y B18 (*Leifsonia kribbensis*) se observaron exclusivamente a los 120 días.

4.3.4. Análisis de la composición de la comunidad microbiana mediante pirosecuenciación

Para obtener información más precisa sobre la estructura de la comunidad bacteriana presente en las muestras de suelo de la biopila, se llevó a cabo un análisis mediante pirosecuenciación de librerías de ADNr 16S. Se emplearon los extractos de ADN total de cada una de las réplicas de tiempos de incubación representativos, y se las mezcló en un solo pool de ADN para cada tiempo. Así tenemos homogenización (4 réplicas), 0 días (6 réplicas), 30 días (7 réplicas) y 120 días (7 réplicas). Se amplificó el ADNr 16S utilizando cebadores universales para eubacterias (27F-519R), y los amplicones purificados se analizaron en un secuenciador Roche 454. Esta técnica nos permite obtener un mayor número de secuencias y por lo tanto, abarcar una mayor diversidad en este tipo de muestras complejas. Las secuencias obtenidas de la pirosecuenciación se clasificaron en unidades taxonómicas operativas (OTUs) usando un umbral de similitud del 97%. Las OTUs de alta calidad y no quiméricas representaron un total de 16591 lecturas, con una longitud media de 400 pb, distribuidas en 4 librerías: Homogenización (4660), 0 días (4704), 30 días (3450) y 120 días (3777).

El análisis de la comunidad bacteriana mediante pirosecuenciación del ARNr 16S, mostró un gran predominio de *Proteobacteria* a lo largo de todo en tratamiento en la biopila, representando alrededor del 90% de las secuencias obtenidas (figura 4.14). Si atendemos a las distintas clases dentro de este filo, se detectaron miembros de *Alfa-*, *Beta-*, *Delta-* y *Epsilonproteobacteria*, siendo las tres primeras las predominantes a lo largo de todo el tratamiento. Durante las fases iniciales, la comunidad estaba claramente dominada por miembros de *Betaproteobacteria*, con más del 60% de las secuencias detectadas en la fase de homogenización, y manteniendo más del 50% de la abundancia tras el primer mes de tratamiento. Sin embargo, los miembros de las *Alfaproteobacteria* fueron aumentando a lo largo del tiempo (7%, homogenización, 9%, 0 días, 18%, 30 días), hasta llegar a reemplazar a *Betaproteobacteria* como población predominante (77%) al final del tratamiento (120 días).

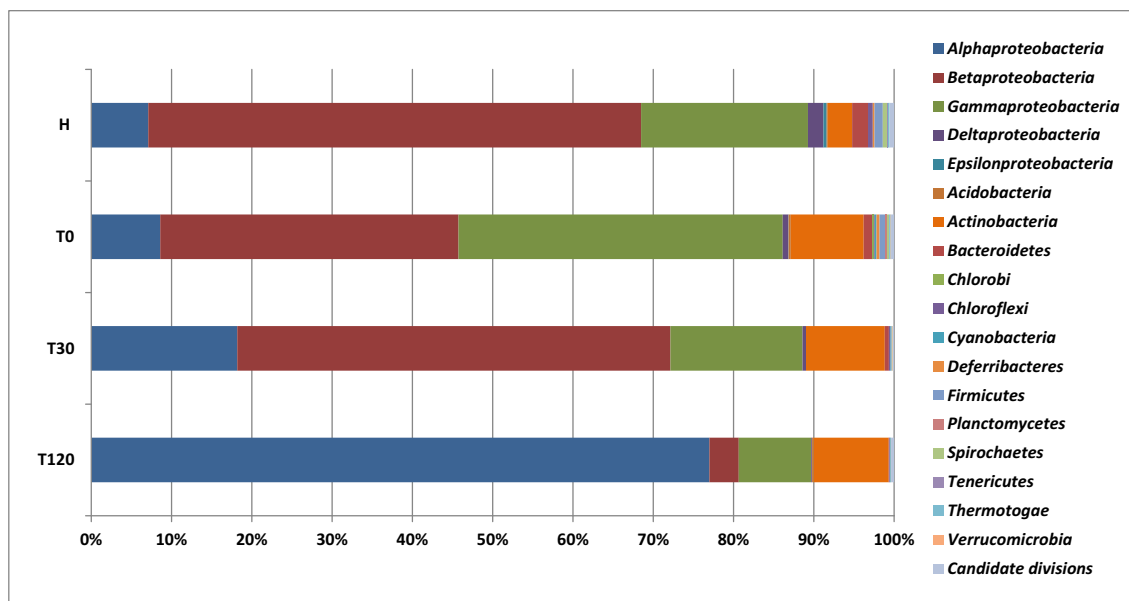


Figura 4.14. Abundancia relativa de los filos dominantes y distribución de las clases de *Proteobacteria*.

En el caso de las *Gammaproteobacteria*, su abundancia fue oscilando a lo largo del tiempo, presentando un pico máximo de abundancia tras la construcción de las biopilas (0 días), cuando alcanzaron valores parecidos a los de las *Betaproteobacteria*, pero reduciéndose a partir de entonces (Figura 4.14). En relación a los otros grupos de proteobacterias, los miembros de *Deltaproteobacteria* estuvieron presentes en todos los tiempos, pero en concentraciones muy bajas que oscilaron entre casi el 2% (homogenización) y el 0,1% (120 días). Las *Epsilonproteobacteria* solo se detectaron en la fase de homogenización con un 0,4% de abundancia.

Aunque se han descrito una gran variedad de microorganismos como degradadores de hidrocarburos en la literatura, la mayoría de cepas degradadoras descritas pertenecen a las clases α , β , y γ -proteobacteria (Gram negativas) y *Actinomycetales*. La abundancia de *Actinobacterias* fue relativamente elevada, aproximadamente del 10%, y muy constante, no observándose cambios dramáticos en su abundancia a lo largo del tratamiento, 3% (homogenización), 9% (0 días), 9% (30 días) y 9% (120 días). El filo *Actinobacteria* se ha detectado tanto en suelos contaminados (Saul et al., 2005) como no contaminados (Nacke et al., 2011).

Otros filos representativos que pudieron ser detectados gracias a la utilización de esta técnica fueron *Firmicutes* y *Bacteroidetes*, cuya abundancia relativa fue disminuyendo a través del tratamiento (entre el 1 y el 2%, respectivamente, a tiempo 0, hasta 0,1% para ambos a los 120 días).

La presencia de estos filos en ambientes contaminados ya ha sido descrita previamente (Mortazavi et al., 2012; Suttom et al., 2013). Además se pudieron detectar miembros de una serie de filos que se presentaron de forma muy minoritaria a lo largo de todo el tratamiento, como *Acidobacteria*, *Cyanobacteria*, *Chloroflexi*, *Planctomycetes*, *Thermotogae*, *Deferribacteres*, *Spirochaetes*, *Tenericutes*, *Chlorobi*, *Verrucomicrobia* y Candidate divisions (op3, op8, op9, tm7, ws3, spam, tg3,), cuyas abundancias relativas no superaron en ningún caso el 0,4%.

Géneros principales

Los resultados de la pirosecuenciación se analizaron también a nivel de género con aquellos representantes que presentaron más de 100 lecturas en cualquier tiempo. De esta forma, se observó como para cada uno de los principales grupos detectados dentro de *Proteobacteria* y *Actinobacteria*, las abundancias relativas observadas respondían a la presencia de distintos géneros, excepto en el caso de *Gammaproteobacteria*, donde todos los miembros detectados pertenecían a *Pseudomonas*. Se observaron cuatro géneros principales de *Alfaproteobacteria* (*Sphingomonas*, *Sphingobium*, *Novosphingobium* y *Porphyrobacter*), seis de *Betaproteobacteria* (*Comamonas*, *Rhodoferrax*, *Hydrogenophaga*, *Acidovorax*, *Methyloversatilis*, *Massilia* y *Thiobacillus*), y cuatro de *Actinobacteria* (*Microbacterium*, *Agrococcus*, *Mycobacterium* y *Dietzia*) (Figura 4.15).

En general, los distintos géneros siguieron una evolución similar a la descrita previamente para sus respectivos grupos filogenéticos (figura 4.14). Sin embargo, dentro de *Betaproteobacteria* se ve una cierta sucesión. *Methyloversatili*, claramente predominante en la homogenización (29%) se mantiene importante a los 30 días (15%) pero otros géneros como *Rhodoferrax* (inicialmente 10%), y *Thiobacillus* (7%) son desplazados a los 30 días por máximos de *Hydrogenophaga* (20%) y *Massilia* (10%). El máximo a tiempo 0 de *Gammaproteobacteria* es atribuible al correspondiente incremento de *Pseudomonas* (37%), y el aumento progresivo de *Alfaproteobacteria* a través del tratamiento, al de los géneros *Porphyrobacter*, *Sphingobium*, *Sphingomonas* y *Novosphingobium* (30%, 23%, 7% y 3% a los 120 días, respectivamente). Dentro de *Actinobacteria*, aunque como filo no presenta grandes variaciones, *Dietzia* predomina a tiempo 0 (4%) pero es paulatinamente desplazada por *Microbacterium*, *Agrococcus* y *Mycobacterium* (1%, 1% y 2%, respectivamente a 120 días).

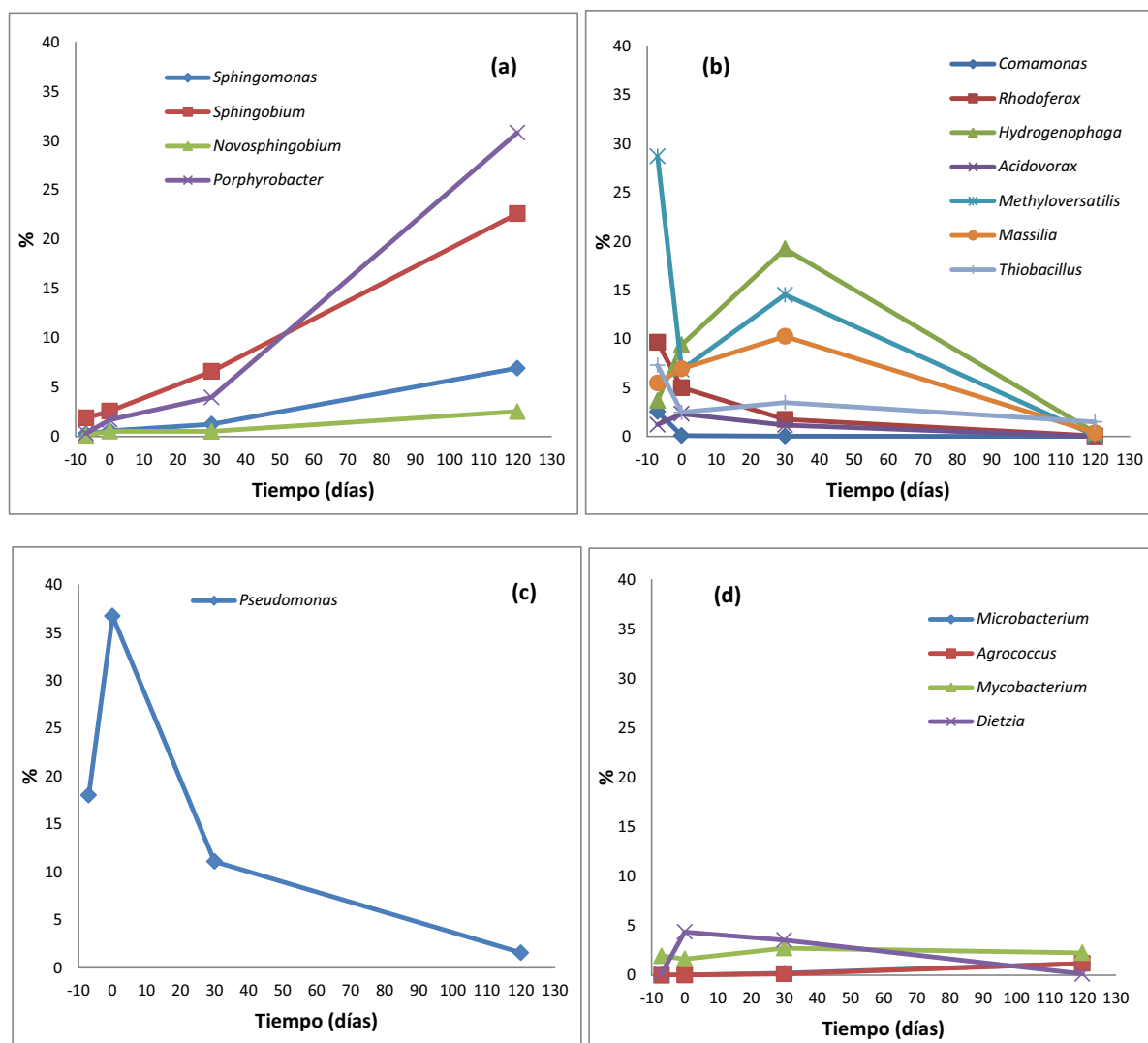


Figura 4.15. Evolución de la abundancia relativa de los distintos géneros detectados. Se encuentran representados en los gráficos los géneros con más de 100 secuencias en algún punto del tratamiento. (a) *Alfarproteobacteria*, (b) *Betaproteobacteria*, (c) *Gammaproteobacteria* y (d) *Actinobacteria*.

Tras la construcción de las biopilas (0 días), se observó un pico de los miembros de *Pseudomonas*, únicos representantes de *Gammaproteobacteria* detectados, que presentaron una clara predominancia sobre el resto de componentes de la comunidad, siendo su abundancia relativa (36%) el triple de la del siguiente género detectado (*Hydrogenophaga*, 10%). Hay que destacar, que en el análisis a nivel de filós no se había observado esta sucesión de poblaciones, ya que la abundancia total de los miembros de *Betaproteobacteria* alcanzó niveles similares a los de *Gammaproteobacteria* (37% y 40%, respectivamente). Esta predominancia de *Pseudomonas* fue únicamente puntual, ya que a los 30 días las poblaciones de este género alcanzaron niveles inferiores a los detectados en la fase de homogeneización,

siendo nuevamente reemplazados como componentes mayoritarios de la comunidad por miembros de las β -proteobacterias. Estos resultados sugieren que los niveles absolutos de los miembros de este grupo posiblemente se mantuvieron constantes a lo largo de toda esta fase inicial, pero que presentaron un descenso en niveles relativos como consecuencia del incremento puntual de los miembros de *Pseudomonas*. A pesar de esta relativa estabilidad, hay que destacar que dentro de los miembros de β -proteobacterias hubo un claro reemplazo de poblaciones, pasando de estar dominado por los miembros de *Methyloversatilis*, *Thiobacillus*, y *Rhodofera* a tiempo 0, a ser dominado por los géneros *Hydrogenophaga*, *Massilia* y *Methyloversatilis*, aunque este último en inferiores proporciones, a los 30 días.

Por su parte, las α -proteobacterias, que en la fase de homogeneización presentaron niveles relativos muy bajos (<2%), fueron incrementando su abundancia relativa a lo largo del tiempo de forma prácticamente lineal, especialmente tras la construcción de la biopila. De esta forma, los miembros mayoritarios de este grupo detectados, *Porphyrobacter* y *Sphingobium* empezaron a mostrar abundancias relativamente elevadas a partir de los 30 días de incubación, 4 y 6%, respectivamente, hasta pasar a dominar claramente la población, reemplazando a los otros grupos de *Proteobacteria*, en las fases finales del tratamiento 31% y 23%, respectivamente. Hay que destacar, que al final de la incubación los miembros de β - y γ -proteobacterias presentaron, en todos los casos, abundancias relativas inferiores al 3%.

Tal y como se ha comentado anteriormente, los niveles de *Actinobacteria* se mantuvieron relativamente constantes a lo largo de todo el tratamiento. Dentro de este grupo, se observó la presencia, en valores constantes próximos al 2% de abundancia de los miembros de *Mycobacterium*. Por otro lado, algunos representantes de este grupo que mostraron mayores oscilaciones fueron los miembros de *Dietzia*, que tras la construcción de la biopila (0 días) presentaron un pico de abundancia (5%) que se sostuvo hasta los 30 días, pero que al inicio y al final del tratamiento, mostraron niveles cercanos al límite de detección de la técnica de pirosecuenciación.

Especies principales

De igual manera, se trabajó a nivel de especie con aquellos representantes que presentaron más de 100 lecturas en cualquier tiempo. Este análisis aporta, más que una información taxonómica, una idea de la diversidad existente dentro de cada

género, ya que la identificación a nivel de especie a partir del análisis de las secuencias obtenidas mediante pirosecuenciación debe tomarse con cautela.

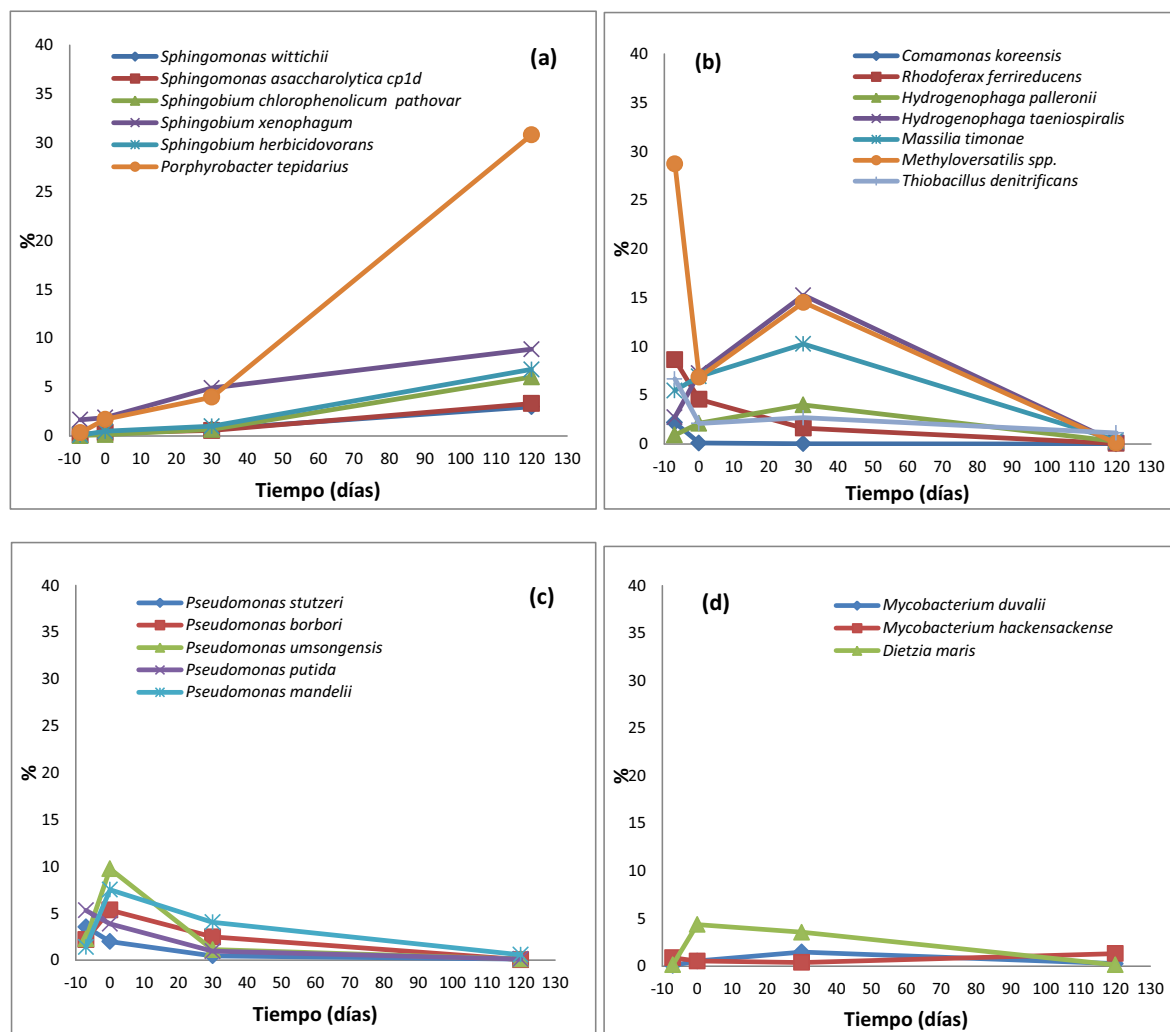


Figura 4.16. Abundancia relativa de especies en las diferentes muestras. Se encuentran representadas en los gráficos las especies con más de 100 secuencias en algún punto del tratamiento. (a) *Alfaproteobacteria*, (b) *Betaproteobacteria*, (c) *Gammaproteobacteria* y (d) *Actinobacteria*.

En general, excepto en el caso de *Betaproteobacteria*, la mayoría de los géneros detectados presentaban un cierto grado de diversidad, observándose más de un representante de cada género. Como ya hemos dicho, en el caso de las betaproteobacterias, esta heterogeneidad intergrupo no se observó, atribuyéndose la mayoría de los OTUs detectados en cada género a la misma especie, excepto en el caso de *Hydrogenophaga*, donde se detectaron dos especies distintas, *H. palleronii* y *H. taeniospirallis*. Dentro de *Alfaproteobacteria*, destaca la predominancia de *Porphyrobacter tepidarius*, único representante de este género, y que al final del tratamiento en biopilas es el miembro más abundante de la comunidad (30,8%).

El segundo género más abundante dentro de esta clase, *Sphingobium*, sí que mostró una mayor heterogeneidad, observándose la presencia de representantes próximos a 3 especies distintas, *S. xenophagum* (la más abundante), *S. herbicidovorans* y *S. chlorophenolicum*. Un resultado similar se observó dentro de *Sphingomonas*, género que como *Sphingobium* se ha relacionado habitualmente a la utilización de HAPs, y dentro del cual se detectaron representantes próximos a dos especies distintas *S. asaccharolytica* y *S. wittichii*.

El género que presentó una mayor heterogeneidad fue el de la γ -proteobacteria *Pseudomonas*, dentro del cual sus representantes se mostraron próximos a cinco especies distintas, siendo *P. umsongensis* las más predominante, seguida de *P. mandelii*, *P. borbori*, *P. putida* y *P. stutzeri*. De hecho, los representantes de las tres primeras fueron los que mostraron una mayor contribución al pico de este género observado en el momento de la construcción de la biopila.

Dentro de *Actinobacteria*, los representantes de *Dietzia* mostraron todos su mayor similitud con *D. maris*, especie predominante de este filo, seguida de los representantes de *Mycobacterium duvalii* y *Mycobacterium hackensackense*.

Análisis de la diversidad

La estimación de la diversidad mediante el cálculo del índice de Shannon-Wiener del análisis por pirosecuenciación muestra una reducción de la diversidad microbiana a lo largo del tratamiento en biopila en los diferentes tiempos (tabla 4.5). De hecho, tras un ligero incremento entre la fase de homogeneización (4,30) y el inicio del tratamiento (4,54), se observa como esta se va reduciendo de forma gradual hasta alcanzar valores de 3,90 a los 120 días, lo que sugiere un enriquecimiento en determinadas poblaciones, posiblemente vinculadas a la utilización de hidrocarburos, habitual en los procesos de biorremediación. Es interesante destacar que el incremento de diversidad coincide con el periodo de máxima degradación de los TPHs y HAPs, por lo que se podría asumir que las poblaciones bacterianas están implicadas en la degradación de estos compuestos, y a la de fuentes de carbono durante estos primeros 30 días. Estos resultados muestran una contradicción con lo observado previamente del análisis de DGGE, donde los valores más elevados del índice de Shannon-Wiener se observaban a 120 días. De todas formas, como hemos dicho anteriormente, los resultados con esta técnica de perfilado muestran una menor resolución y no pueden utilizarse como una medida real de la diversidad.

De hecho, posiblemente son un reflejo del mayor enriquecimiento en una fracción concreta de la biodiversidad bacteriana del suelo, que al ganar mayor abundancia, dan lugar a la aparición de un mayor número de bandas definidas en el perfil de DGGE.

Tabla 4.5. Índice de diversidad Shannon-Wiener (H'), de la diversidad bacteriana estimada, en muestras de suelo de la biopilas a lo largo del tiempo

Muestra	OTUs ^a	H'
H	343	4,30
T0	409	4,54
T30	321	4,44
T120	300	3,94

^a Numero de OTUs totales en cada muestra, obtenidos en la pirosecuenciación

4.3.5. Estudio de las comunidades bacterianas degradadoras de fenantreno y pireno.

Con el objetivo de identificar poblaciones específicas asociadas a la utilización de HAPs concretos, a partir de las placas de microtitulación (120 días) empleadas para los recuentos de degradadores de fenantreno y pireno (NMP), se seleccionaron cuatro pocillos con crecimiento positivo para cada HAP, correspondientes a las diluciones menos concentradas que presentaron crecimiento positivo. El contenido de dichos pocillos se utilizó para analizar la comunidad bacteriana degradadora de ambos compuestos tanto mediante PCR-DGGE como mediante el aislamiento en medio sólido. En el caso del fenantreno se escogieron 4 pocillos, uno pertenecían la dilución 10^{-2} y tres pertenecían a la dilución 10^{-3} , mientras que en el caso del pireno, tres correspondían a la dilución 10^{-3} y uno a la dilución 10^{-4} .

A partir de cada uno de los pocillos escogidos, se extrajo el DNA total, se amplificó con cebadores universales para las regiones hipervariables V1-V3 del gen ARNr 16S y se analizó la estructura de la comunidad bacteriana degradadora de ambos HAPs mediante perfilado en geles de DGGE (Figura 4.17). De esta forma, en base al principio de dilución hasta la extinción, se esperaba observar la población de menor complejidad posible con la capacidad de utilizar estos compuestos. En general los patrones de bandeo observados para las cuatro réplicas de cada HAP presentaron unos perfiles muy similares, excepto en uno de los pocillos estudiados para cada uno de ellos, PheB y PyrA.

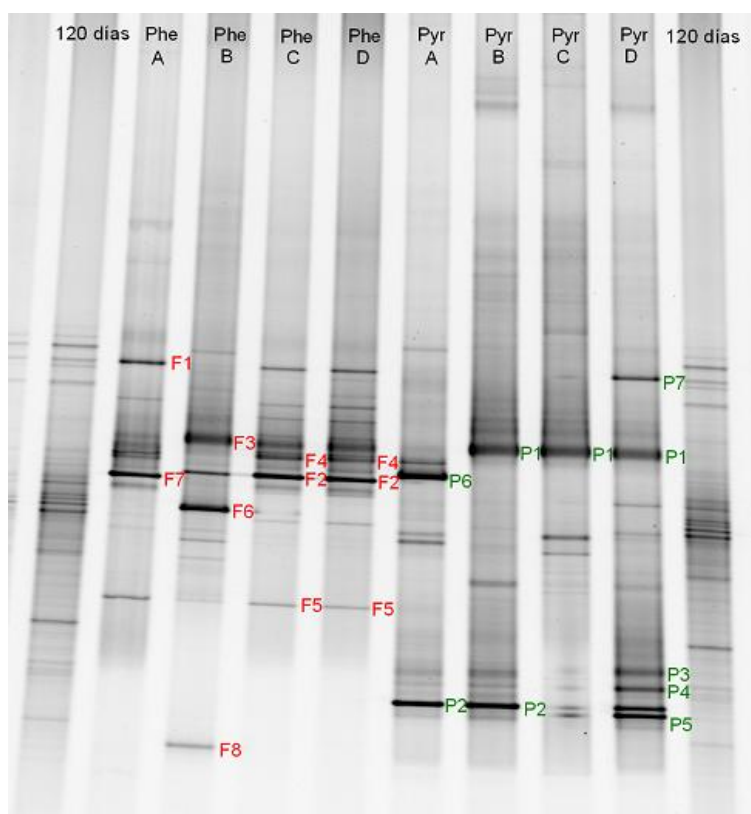


Figura 4.17. Perfil de DGGE de los fragmentos del ADNr 16S amplificados por PCR de pocillos de fenantreno (Phe) y pireno (Pyr) a los 120 días.

Tabla 4.6. Propiedades de las bandas de DGGE secuenciadas

Bandas	Longitud pb	Sim (%) ^a	Organismo más próximo (accession no.) ^a	Aislado más cercano	Sim (%)	Grupo filogenético ^b
BP1, BF3	371	100	<i>Sphingopyxis</i> sp. DSM 25229 (HE648058.1)			<i>Sphingomonadaceae</i> (α)
BF2, BF7 BF4, BF5	377	100	Uncultured bacterium clone COB21(KC211843.1)	<i>Sphingobium herbicidovorans</i> (AB681063.1)	100	<i>Sphingomonadaceae</i> (α)
BF6	362	97	<i>Xanthomonadales</i> bacterium SP2-18II (KF170817.1)	<i>Xanthomonas</i> sp. SBR18 (KC853653.1)	97	<i>Xanthomonadaceae</i> (γ)
BP6	415	100	Uncultured bacterium clone 4-71(KC522003.1)	<i>Pseudoxanthomonas sacheonensis</i> (HF585486.1)	99	<i>Xanthomonadaceae</i> (γ)
BF8	394	100	<i>Dietzia maris</i> strain OAct412 (KC514120.1)			<i>Dietziaceae</i> (Actinobacteria)
BP2, BP4 BP5	398	100	Uncultured actinobacterium clone MS063A1_B03 (EF706343.1)	<i>Nocardioides</i> sp. 10-30-2E (JQ782937.1)	99	<i>Nocardioideaceae</i> (Actinobacteria)
BP3	393	96	Uncultured actinobacterium clone MS063A1_B03 (EF706343.1)	<i>Nocardioides</i> sp. 10-30-2E (JQ782937.1)	96	<i>Nocardioideaceae</i> (Actinobacteria)

^a Organismo más próximo a la base de datos GenBank

^b Clasificación según Ribosomal Database Project (Maidak et al., 2001). α y γ representan *Alfa*- y *Gamma*proteobacteria respectivamente.

En el caso de la población de fenantreno, se observó la predominancia de 5 bandas BF1-BF5, presentes en la mayoría de perfiles, y que, a partir de su escisión y posterior secuenciación (tabla 4.6), 4 de ellas se identificaron como correspondientes a *Sphingobium herbicidovorans* (BF2, BF4 y BF5) y *Sphingopyxis* (BF3), mientras que la banda BF1 no se pudo secuenciar correctamente. Por otro lado, las bandas BF6 (*Xanthomonadaceae*) y BF8 (*Dietzia maris*) solo se observaron en la réplica PheB, donde eran bandas mayoritarias del perfil.

En el caso del pireno, se observó la predominancia de 2 bandas mayoritarias, BP1 (*Sphingopyxis*) y BP3 (*Nocardiodes*). Otras tres bandas (BP2, BP4 y BP5), presentes en mayor o menor intensidad en todos los perfiles, correspondieron todas ellas a miembros del género *Nocardiodes*.

Es destacable la presencia de una banda mayoritaria común para ambos sustratos, identificada como BP1 o BF3, que correspondía a un mismo miembro del género *Shingopyxis*, lo que sugiere su posible importancia en la utilización de ambos hidrocarburos, y que se podría relacionar con la convergencia que presenta la ruta de degradación del pireno hacia la del fenantreno.

Por otro lado, también es notable la predominancia de *Nocardiodes* (*Actinobacteria*) en la degradación del pireno, y de *Sphingobium* (*Alfaproteobacteria*) en la degradación del fenantreno. Estas cepas también fueron detectadas en el análisis de la pirosecuenciación. De hecho, los miembros de *Sphingobium* eran uno de los grupos mayoritarios en la comunidad bacteriana de la biopila detectada mediante esta técnica al final del tratamiento.

Es de destacar también que los miembros de *Pseudoxanthomonas*, *Sphingobium* y *Xanthomonas* detectados aquí, ya se habían detectado previamente en el análisis de la librería de clones de ADNr 16S de la comunidad bacteriana del suelo tras 120 días de tratamiento y a lo largo del tratamiento de la biopila en la pirosecuenciación, lo que indica su presencia en proporciones relativamente elevadas en el suelo.

Los mismos pocillos utilizados para el análisis de PCR-DGGE se utilizaron también para sembrar (por extensión y estrías) placas de LB 1:10 y de medio mineral suplementadas con pireno o fenantreno. De cada uno de los cultivos se seleccionaron colonias con morfología distintiva y se obtuvieron cultivos puros en el medio de aislamiento, que se confirmaron mediante su resiembra en placas de LB1:10. Los distintos aislados así obtenidos se identificaron en función de la secuenciación parcial de su ADNr 16S (Tabla 4.7).

De esta forma, se obtuvieron un total de 22 cepas distintas, 16 aisladas de fenantreno y 6 aisladas de pireno, la mayoría de las cuales (13) pertenecían al grupo *Actinobacteria* (tabla 4.7).

Tabla 4.7. Propiedades de los aislados secuenciados

Nombre	Secuencia pb	Sim (%) ^a	Organismo más próximo (accession no.) ^a	Grupo filogenético ^b	Crecimiento ^c	
					Phe	Pyr
Py1	1327	99	<i>Nocardioides</i> sp. NS/27 (AJ549286.1)	<i>Nocardioideaceae</i> (<i>Actinobacteria</i>)	-	±
Phe1	1343	98	<i>Brevibacterium casei</i> strain DY40-62 (KC493995.1)	<i>Brevibacteriaceae</i> (<i>Actinobacteria</i>)	-	+
Py2	1338	99	<i>Promicromonospora</i> sp. (JN896618.1)	<i>Promicromonosporaceae</i> (<i>Actinobacteria</i>)	±	±
Phe2	1344	99	<i>Kocuria palustris</i> strain IARI-ABL-32 (KC581675.1)	<i>Micrococcaceae</i> (<i>Actinobacteria</i>)	-	-
Phe3	1336	99	<i>Micrococcus</i> sp. Y25 (KC708572.1)			
Phe4	1358	94	<i>Arthrobacter</i> sp. TC1 (KC294126.1)			
Phe5	1360	94	<i>Arthrobacter</i> sp. X4(2013) (KC763970.1)			
Phe6	1374	95	<i>Arthrobacter</i> sp. X4(2013) (KC763970.1)		-	-
Phe7	790	83	<i>Arthrobacter</i> sp. DHXJ01 (JN244971.1)		-	-
Phe8	1151	90	<i>Arthrobacter oxydans</i> strain H78 (KC934846.1)			
Phe9	1370	95	<i>Arthrobacter</i> sp. TC1 (KC294126.1)		-	-
Phe10	1349	95	<i>Arthrobacter</i> sp. X4(2013) (KC763970.1)			
Phe11	1356	95	<i>Arthrobacter</i> sp. X4(2013) (KC763970.1)			
Py3	1273	90	<i>Rhizobium</i> sp. MK15 (EF173319.1)		<i>Rhizobiaceae</i> (α)	+
Py4	1306	99	<i>Rhizobium</i> sp. MK15 (EF173319.1)			
Py5	1348	99	Uncultured bacterium clone 57 (JX143801.1)	<i>Alcaligenaceae</i> (β)	±	+
Phe12	1341	100	Uncultured bacterium clone CN2-90 (HQ218848.1)		+	±
Phe13	1341	99	<i>Pseudorhodoferax</i> sp. KJ016 (JF904879.1)	<i>Comamonadaceae</i> (β)	±	+
Phe14	1346	98	Uncultured <i>Variovorax</i> sp. clone BC095 (KC166723.1)		-	-
Phe15	1347	100	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> (AB680101.1)	<i>Pseudomonadaceae</i> (γ)	-	+
Phe16	1369	99	Uncultured bacterium clone Reactor1_64 (JQ629525.1)	<i>Xanthomonadaceae</i> (γ)	+	-
Py6	1365	99	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> (KC934809.1)	<i>Staphylococcaceae</i> (Firmicutes)	+	-

^a Organismo más próximo según la base de datos GenBank

^b Clasificación según Ribosomal Database Project (Maidak et al., 2000). α, β y γ representan alfa, beta y gamma Proteobacteria respectivamente

^c Crecimiento representado como incremento de proteína celular en cultivos en medio mineral con pireno (Pyr) o fenantreno (Phe) como única fuente de carbono y energía. Se considera crecimiento positivo una concentración tres veces superior a la de controles inoculados sin fuente de carbono.

Además de los miembros de *Actinobacteria*, también se recuperaron cepas pertenecientes a *Alfa*-, *Beta*- y *Gammaproteobacteria* (2, 4 y 2 representantes, respectivamente), y un miembro del filo *Firmicutes* muy próximo al género *Staphylococcus*. Es interesante destacar que este filo no se detectó ni en el análisis mediante librería de clones ni por pirosecuenciación, pero que recientemente miembros de *Staphylococcus* también han sido relacionados con la degradación de HAPs por otros autores (Mallick et al., 2007; Chang et al., 2011). Hay que destacar que únicamente tres de estos aislados, pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Pseudoxanthomonas* y *Rhizobium*, coincidieron con componentes de la comunidad detectados mediante el análisis por librería de clones. En cambio, mediante pirosecuenciación se pudieron detectar 18 de los 22 aislados obtenidos.

La capacidad de estos aislados para utilizar HAPs como sustrato de crecimiento se comprobó mediante la cuantificación del incremento de su proteína celular en cultivos en medio mineral con cada uno de los dos HAPs de aislamiento como única fuente de carbono y energía. El contenido en proteína se determinó mediante el método de Folin-Lowry ligeramente modificado (Daniels, et al 1994), y se consideró que existía crecimiento positivo cuando la concentración de proteína en los cultivos fue tres veces superior a la de controles inoculados sin fuente de carbono (tabla 4.7). De esta forma se detectaron dos cepas, una *Xanthomonadaceae* (AF18) y un *Staphylococcus* (AP22), con la capacidad de utilizar fenantreno como sustrato de crecimiento. Otras tres cepas, dos actinobacterias próximas a los géneros *Nocardioides* y *Brevibacterium* (AP1 y AP2), y una Gammaproteobacteria perteneciente al género *Pseudomonas* (AF21), presentaron la capacidad de utilizar pireno. Finalmente, un miembro de *Promicromonospora* (*Actinobacteria*, AP3), tres betaproteobacterias pertenecientes a las *Alcaligenaceas* (AF14, AF15) y *Comamonadaceas* (AF16), y una *Rhizobiaceae* (*Alfaproteobacteria*, AF19), presentaron la capacidad de utilizar ambos sustratos.

La mayoría de estas cepas degradadoras fueron detectadas en la pirosecuenciación durante el tratamiento de la biopila como *Xanthomonadaceae*, *Pseudomonas*, *Alcaligenaceas*, *Comamonadaceas*, *Rhizobiaceae*, *Nocardioides* y *Promicromonospora*.

Finalmente, los miembros de *Pseudoxanthomonas* (banda BP6), fueron los únicos que se pudieron detectar mediante las tres aproximaciones, librería de clones, aislados y PCR-DGGE de pocillos.

4.3.6. Comparación metodológica de la comunidad microbiana mediante diferentes técnicas

En la tabla 4.8., se puede observar un resumen de la comparación entre los diversos métodos utilizados para analizar la estructura de la comunidad microbiana, comparando los géneros detectados en las muestras de suelo y de los pocillos de las placas de microtitulación (120 días) utilizadas para los diferentes análisis. Se han empleado los resultados de los aislamientos, de la DGGE de los pocillos, y los resultados de la pirosecuenciación.

Se puede observar que solamente un género fue detectado por todas las técnicas utilizadas, *Pseudoxanthomonas*, mientras que la mayoría de géneros detectados en la librería de clones, fueron detectados en la pirosecuenciación. De hecho, la mayoría de cepas detectadas en los aislamientos, en las bandas de DGGE y librería de clones, también fueron detectadas en la pirosecuenciación, lo que da una idea de la mayor profundidad del análisis obtenido mediante esta técnica.

Los aislamientos presentaron una diversidad poblacional muy baja respecto a la población real *in situ*, puesto que solo usamos poblaciones expuestas a pireno y fenantreno de los pocillos de las placas de microtitulación. En cambio, para los análisis moleculares como la librería de clones y la pirosecuenciación, se utilizó ADN extraído directamente de las muestras de suelo. A pesar de ello, los resultados derivados de las técnicas dependientes de cultivo son necesarios para identificar los componentes de la comunidad implicados en la utilización de hidrocarburos, y a partir de su aislamiento, comprobar su actividad degradadora, llevar a cabo su caracterización y evaluar su potencial para su uso en biorremediación.

Por otro lado, el análisis de comunidades microbianas mediante técnicas basadas en la amplificación de PCR presenta también sesgos conocidos, asociados ya sea a la extracción de ADN (Feinstein & Sul et al., 2009), a la selección de cebadores (Engelbrektson & Kunin et al., 2010) o a la propia reacción de PCR. Se ha utilizado el gen ARNr 16S, empleado en la mayoría de estudios, por ser una herramienta que aporta información filogenética que se encuentra universalmente distribuida en procariotas. Sin embargo algunos grupos de bacterias, como las actinobacterias, presentan dificultades en la extracción de su ADN y la amplificación del mismo. Estos sesgos de la PCR pueden ser minimizados seleccionando protocolos adecuados.

Tabla 4.8. Comparación de las secuencias obtenidas a partir de muestras de suelo de biopilas y de pocillos de la placa de microtitulación (120 días) con los diferentes métodos

Filo	Clase	Orden	Familia	Género	H	0d	30d	120d	Libería de clones	Aislados	DGGE pocillos		
Proteobacteria	Alfaproteobacteria	Caulobacterales	Caulobacteraceae	<i>Brevundimonas</i>	0,45	0,02	0,06	0,13					
				<i>Phenylbacterium</i>	0,04	0,19	0,23	1,11	X				
		Rhizobiales	Beijerinckiaceae	Beijerinckia	<i>Beijerinckia</i>	0,04	0,21	0,12	0,11				
					<i>Bradyrhizobium</i>	0,19		0,06	1,64				
			Hyphomicrobiaceae	Blastochloris	<i>Blastochloris</i>			0,12					
					<i>Hyphomicrobium</i>				0,26	X			
					<i>Pedomicrobium</i>	0,28	0,17	0,32	2,01				
					<i>Rhodoplans</i>			0,20	0,05	X			
			Methylobacteriaceae	Methylobacterium	<i>Methylobacterium</i>		0,02		0,16				
					<i>Methylosinus</i>	0,69	0,02	0,35	0,53				
			Methylocystaceae	Pleomorphomonas	<i>Pleomorphomonas</i>	0,11	0,02		0,40				
					<i>Aminobacter</i>	0,43	0,28	0,78	0,11				
			Phyllobacteriaceae	Agrobacterium	<i>Agrobacterium</i>	0,49	0,45	0,75	0,03				
					<i>Ensifer</i>	0,11	0,51	0,35	0,50				
			Rhizobiaceae	Rhizobium	<i>Rhizobium</i>	0,04	0,09	0,26	0,08	X	X		
					<i>Shinella</i>	0,11	0,04	0,14	0,16				
					<i>Xanthobacter</i>	0,26	0,02	0,06	0,16				
					<i>Rhodobacter</i>			0,03	0,32				
		Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	<i>Rhodobacter</i>			0,03	0,32					
		Rhodospirillales	Acetobacteraceae	Acidomonas	<i>Acidomonas</i>	0,09		0,03					
					<i>Roseomonas</i>		0,09	0,09	0,42				
			Rhodospirillaceae	Azospirillum	<i>Azospirillum</i>	0,06	0,13	0,14	0,29	X			
					<i>Nisaea</i>	0,04	0,06	0,03	0,58				
					<i>Phaeospirillum</i>	0,11	0,13	0,03	0,16				
					<i>Skermanella</i>	0,06	0,17		0,16				
					<i>Erythrobacter</i>	0,04			1,59				
					<i>Porphyrobacter</i>	0,32	1,70	3,97	30,82				
		Sphingomonadales	Erythrobacteraceae	Kaistobacter	<i>Kaistobacter</i>	0,04	0,09	0,43	1,30				
					<i>Novosphingobium</i>	0,13	0,53	0,52	2,54	X			
			Sphingomonadaceae	Sphingobium	<i>Sphingobium</i>	1,89	2,57	6,61	22,61	X		X	
					<i>Sphingomonas</i>	0,28	0,60	1,25	6,94	X			
					<i>Sphingopyxis</i>	0,34	0,21	0,46	1,03			X	
					<i>Sphingosinicella</i>	0,17	0,19	0,35	0,53	X			
					<i>Achromobacter</i>	0,36	0,23	0,12	0,19	X			
					<i>Burkholderia</i>	0,43	0,28	1,36	0,34				
		Betaproteobacteria	Burkholderiales	Alcaligenaceae	Burkholderiaceae	<i>Burkholderia</i>	0,13		0,20				
						<i>Poly nucleobacter</i>	0,34	0,02					
						<i>Acidovorax</i>	1,20	2,32	1,16				
						<i>Comamonas</i>	2,55	0,09	0,03				
			Comamonadaceae	Hydrogenophaga	<i>Hydrogenophaga</i>	3,67	9,40	19,25	0,40	X			
	<i>Limnhabitans</i>				0,30								
	<i>Rhodoferax</i>				9,66	5,00	1,74	0,05					
	<i>Thiomonas</i>					0,04	0,20						
	<i>Variovorax</i>				0,17	0,98	0,38	0,66					
	<i>Herbaspirillum</i>				0,36	1,00	0,52	0,11	X				
	<i>Herminiimonas</i>				0,13	0,30	0,38	0,05					
	<i>Janthinobacterium</i>				0,19	0,72	0,43	0,03					
	Oxalobacteraceae	Massilia	<i>Massilia</i>	5,47	6,93	10,26	0,37						
			<i>Ralstonia</i>			0,13							
	Methylobacteriales	Methylobacterium	<i>Methylobacterium</i>			0,17	0,03						
			<i>Thiobacillus</i>	7,30	2,47	3,48	1,48	X					
	Rhodocyclales	Rhodocyclaceae	Aromatoleum	<i>Aromatoleum</i>	0,04		0,41						
				<i>Azoarcus</i>	0,26								
				<i>Methyloversatilis</i>	28,73	6,85	14,52	0,08					
				<i>Zoogloea</i>	0,04	0,11	0,09						
	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Alteromonadaceae	Marinobacter	<i>Marinobacter</i>			0,06	0,11				
					<i>Microbulbifer</i>		0,19	0,32	0,21	X			
		Chromatiales	Chromatiaceae	Thiorhodovibrio	<i>Thiorhodovibrio</i>	0,11		0,06	0,00				
					<i>Alkallimnicola</i>	0,17			0,03				
			Ectothiorhodospiraceae	Ectothiorhodospira	<i>Ectothiorhodospira</i>	0,06	0,11	0,23	0,26				
					<i>Thioalkalivibrio</i>		0,04	0,09	0,29	X			
		Legionellales	Legionellaceae	Legionella				0,19	X				
		Methylococcales	Methylococcaceae	Methylocaldum	0,06	0,43	1,91	3,20					
		Oceanospirillales	Halomonadaceae	Halomonas	0,02	0,06		0,26					
		Pseudomonadales	Moraxellaceae	Acinetobacter	<i>Acinetobacter</i>	0,88	1,17	0,61					
					<i>Alkanindiges</i>	0,21	0,04	0,03					
			Pseudomonadaceae	Pseudomonas	<i>Pseudomonas</i>	18,03	36,76	11,10	1,56	X	X		
					<i>Aquamonas</i>	0,58	0,40	0,14	0,13				
					<i>Lysobacter</i>		0,13	0,29	1,11				
					<i>Pseudoxanthomonas</i>	0,28	0,32	0,05	0,05	X	X	X	
					<i>Stenotrophomonas</i>	0,15	0,19	0,35	1,03				
	<i>Thermomonas</i>				0,06	0,09	0,20	0,13					
	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Xanthomonas	<i>Xanthomonas</i>		0,04		0,21	X		X		
				<i>Reinekea</i>	0,02	0,11							
	Desulfobacteriales	Desulfobacteraceae	Thiohalomonas	<i>Thiohalomonas</i>	0,41	0,28		0,03					
				<i>Desulfatibacillum</i>	1,03	0,15							
	Desulfuromonadales	Desulfuromonadaceae	Desulfuromonas	<i>Desulfuromonas</i>			0,20						
				<i>Kofleriaceae</i>			0,15						
		Myxococcales	Myxococcaceae	Anaeromyxobacter	<i>Anaeromyxobacter</i>			0,14					
					<i>Syntrophaceae</i>		0,82	0,21					
	Syntrophobacteriales	Syntrophobacteraceae	Syntrophobacter	<i>Syntrophobacter</i>	0,06	0,19		0,03					
				<i>Sulfuricurvum</i>	0,39	0,04							
	Epsilonproteobacteria	Campylobacteriales	Helicobacteraceae	<i>Sulfuricurvum</i>	0,39	0,04							

Continuación Tabla 4.8.

Filo	Clase	Orden	Familia	Género	H	0d	30d	120d	Liberia de clones	Aislados	DGGE pocillos		
Actinobacteria	Actinobacteria	Acidimicrobiales	Acidimicrobiaceae	Acidimicrobium	0,09		0,06	0,05					
			Cellulomonadaceae	Actinotalea		0,04		0,16					
		Actinomycetales	Dietziaceae	Dietzia	0,15	4,38	3,57	0,13				X	
			Gordoniaceae	Gordonia	0,11	0,68	0,17	0,05					
			Microbacteriaceae	Agrococcus	0,00	0,02	0,14	1,19					
				Agromyces	0,02			0,34	X				
				Microbacterium	0,02	0,02	0,20	1,19	X				
			Yonghaparkia	0,24	0,20	1,51							
			Micrococcaceae	Arthrobacter	0,02	0,06	0,12				X		
			Mycobacteriaceae	Mycobacterium	1,97	1,64	2,75	2,28	X				
			Nocardiaceae	Nocardia		0,19	0,17	0,26	X				
				Rhodococcus		0,57	0,06	0,13					
			Nocardioideales	Aeromicrobium				0,19					
				Marmoricola		0,02	0,17	0,23	0,21			X	X
			Promicromonosporaceae	Cellulosimicrobium			0,04	0,03	0,11				
				Promicromonospora					0,05			X	
			Pseudonocardiaceae	Lentzea			0,13	0,03					
			Streptomycetaceae	Streptacidiphilus		0,11	0,21	0,29					
				Streptomyces		0,09	0,26	0,26					
			Thermomonosporaceae	Actinomadura					0,32				
Tsukamurellaceae	Tsukamurella					0,11							
Williamsiaceae	Williamsia			0,06	0,35	0,03							
Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Dysgonomonas	0,39	0,28		0,05					
				Parabacteroides	0,13	0,02							
	Tannerella	0,15	0,00										
	Flavobacteria	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Flavobacterium	0,88	0,26	0,03						
Sphingobacteria	Sphingobacteriales	Cyclobacteriaceae	Algoriphagus	0,06	0,15	0,41	0,03						
		Sphingobacteriaceae	Sphingobacterium	0,06	0,26								
Rhodothermaceae	Rhodothermus	0,15	0,06										
Chlorobi	Chlorobia	Chlorobiales	Chlorobiaceae	Chlorobium		0,13							
Chloroflexi	Dehalococcoidia	Dehalococcoidales	Dehalococcoidaceae	Dehalococcoides	0,60	0,13	0,09	0,08					
Cyanobacteria	Gloeobacteria	Gloeobacteriales	Gloeobacteraceae	Gloeobacter		0,21		0,08					
Deferribacteres	Deferribacteres	Deferribacterales	Deferribacteraceae	Deferribacter	0,21	0,38							
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae	Clostridium	0,49	0,40	0,09						
			Thermoanaerobacteriales	Thermoanaerobacteriaceae	Thermoanaerobacterium	0,13	0,11		0,03				
Planctomycetes	Planctomycetia	Planctomycetales	Planctomycetaceae	Pirellula		0,13							
Spirochaetes	Spirochaetes	Spirochaetales	Leptospiraceae	Leptospira	0,15								
			Spirochaetaceae	Treponema	0,43	0,28		0,03					
Thermotogae	Thermotogae	Thermotogales	Thermotogaceae	Fervidobacterium	0,15	0,02	0,03						
				Kosmotoga	0,06	0,17							
				Candidatus aquiluna				0,11					
				Candidatus koribacter	0,15	0,28		0,00					
				Candidatus microthrix	0,13	0,19	0,64	0,77					
				Candidatus solibacter				0,21					
				Op8 (candidate division)	0,21	0,02							
				Spam (candidate division)	0,26	0,26	0,06	0,29					

Los números significan el porcentaje en la pirosecuenciación respecto al número total de secuencias en cada tiempo, géneros marcados de color amarillo, que presentaron más de 100 secuencias en algún punto en la pirosecuenciación.

Las técnicas de *fingerprinting*, como la DGGE, presentan limitaciones añadidas, como la baja resolución y problemas de migración de las bandas en la electroforesis. La técnica de DGGE es una técnica económica, que nos permite la observación de la dinámica y cambio de la comunidad microbiana a lo largo del tiempo. No obstante, es necesario realizar análisis complementarios para lograr un conocimiento exhaustivo sobre la composición de las comunidades complejas, sobre todo en cuanto a la biodiversidad rara, que a pesar de encontrarse en proporciones minoritarias, pueden jugar un papel esencial en la transformación de contaminantes.

La pirosecuenciación es un método de alta resolución, que nos permite obtener y secuenciar miles de secuencias por muestra, proporcionando mucha información de la comunidad microbiana real, presente en el suelo.

Pero al estar basada en una amplificación por PCR, se encuentra sometida a sus sesgos (van Elsas & Boersma 2011). Los métodos basados en la extracción directa de ADN a partir de muestras de suelo, presentan también otro problema, de que el ADN extraído no tiene por qué corresponder a las poblaciones metabólicamente activas. Para analizar la biomasa *in situ*, y obtener datos de las poblaciones microbianas activas con más precisión, es esencial un muestreo representativo del suelo de las biopilas y el uso de dispositivos adecuados de muestreo.

Las comunidades microbianas llevan a cabo multitud de procesos a pequeña escala que sustentan muchas funciones ambientalmente importantes, como en nuestro caso, la biodegradación de los HAPs en suelo. No obstante, los roles ecológicos y funcionales de cada taxón específico quedan sin determinar, ya que la mayor parte de los microorganismos no son cultivables. Las metodologías utilizadas en este capítulo han demostrado un gran avance en el análisis de la biodiversidad microbiana, sobre todo las técnicas de secuenciación masiva como la pirosecuenciación.

Los resultados de la pirosecuenciación son difíciles de interpretar debido a la gran cantidad de secuencias, y tener la seguridad en la asignación de OTUs es un punto clave, por esta razón la clasificación taxonómica de los distintas OTUs se llevó a cabo mediante BLASTn frente a la base de datos Greengenes (DeSantis et al., 2006) que compila secuencias curadas de ADNr 16S, y permite asignaciones seguras a nivel de familia y géneros presentes en las muestras, lo cual es de vital importancia.

En comparación con otras técnicas como librería de clones y PhyloChips, la pirosecuenciación proporciona datos en profundidad y más confiables sobre la estructura de una comunidad microbiana compleja. Sin embargo, a pesar de la enorme cantidad de datos adquiridos por pirosecuenciación, diez mil secuencias son todavía una muy pequeña fracción de las más de 10^9 bacterias que viven en un gramo de suelo.

También es necesario encontrar la relación entre la presencia de taxones específicos y las funciones metabólicas que estos llevan a cabo en un ecosistema (Gray & Head 2001; Riesenfeld & Scholoss 2004). Una de estas aproximaciones es estudiar genes que intervengan en rutas metabólicas de interés, como genes que intervengan en la degradación de HAPs, mediante varias técnicas, como librería de clones y microarrays funcionales de ADN.

Los ensayos de biodegradación a escala de laboratorio (*in vitro*), como los microcosmos, nos permiten trabajar en ambientes reducidos, controlados y fáciles de manejar, y, aunque pueden diferir de los resultados en campo, sus resultados son útiles para determinar de una forma estandarizada cómo las poblaciones microbianas naturales actúan en la degradación de hidrocarburos.

En este capítulo se pretende profundizar en el papel que juegan las distintas poblaciones microbianas detectadas en el capítulo anterior en la degradación de las fracciones alifática y de HAPs durante la degradación de crudos del petróleo y derivados en suelos. Para ello se trabaja con microcosmos de medio mineral inoculados con la comunidad microbiana del suelo tratado con biopilas del capítulo anterior y se suministran como fuente de carbono las fracciones alifática (F1) y de HAPs (F3) obtenidas a partir de un crudo Casablanca envejecido, tanto por separado como combinadas en la misma proporción en la que se encuentran en el crudo.

El objetivo específico es determinar cómo influye en los procesos de degradación de los HAPs el hallarse inmersos en una matriz mayoritariamente alifática, es decir, cómo condiciona este hecho la composición de la comunidad microbiana expuesta y determina las funciones disponibles y las redes metabólicas que conducen a la eliminación de los compuestos. Se enfatiza en procesos cometabólicos y en las interacciones entre poblaciones.

Los microcosmos, constituidos por frascos aeróbicos con 10 ml de medio, se incubaron un total de 30 días, sacrificándose tres réplicas de cada condición a distintos tiempos. Se llevó a cabo un seguimiento de la degradación de los componentes de las fracciones alifática y de HAPs (GC-MS), de la producción de metabolitos (GC-MS), y de la evolución de las comunidades microbianas determinando su diversidad (DGGE y pirosecuenciación) y la presencia de genes funcionales (librerías de clones y *microarrays*). Se incluyeron controles sin inocular para discriminar el efecto de la biodegradación respecto a posibles pérdidas abióticas, y sin fuente de carbono para el análisis de las poblaciones en esas condiciones.

5.1. Biodegradación de las fracciones alifática y de HAPs

El crudo de petróleo utilizado como fuente de carbono fue un crudo Casablanca que se envejeció para que su composición se enriqueciera en compuestos de mayor peso molecular, y así aproximarse más al tipo de vertidos que se encuentra en suelos. El

crudo (9 g) se sometió a cromatografía en columna para obtener las fracciones deseadas. Se eluyó en primer lugar la fracción alifática (F1, 4,29 g), a continuación la de alquilbencenos (F2) (1,17g), que se descartó, después la de HAPs (F3, 0,92 g) y finalmente la de polares (F4, 0,55 g) que fue también descartada. La F1 y la F3 se suministraron a los microcosmos en una proporción de 4:1, similar a la que había en el crudo original, y a la concentración en que se encontrarían en aproximadamente 1 g de crudo por litro.

5.1.1. Análisis del contenido en TPHs

Los perfiles cromatográficos obtenidos de los microcosmos con la fracción alifática (F1) mostraron una reducción moderada de la mayoría de los *n*-alcanos lineales durante los primeros 7 días (20% de degradación aproximadamente). Fue a partir de este punto cuando se produjo una drástica reducción de todos los picos resueltos, alcanzándose una degradación casi completa a los 30 días (Figura 5.1).

En los perfiles cromatográficos de los microcosmos con fracción aromática (F3), no se observó una reducción clara de los picos resueltos a los 7 días, produciéndose sólo un 10% de degradación de los componentes de dicha fracción. A partir de este punto, y hasta los 30 días, se observó una reducción importante de los picos resueltos, llegando a un 70% de degradación aproximadamente al final de la incubación. A pesar de todo, la degradación de esta fracción no fue tan notoria como en los microcosmos con F1 y no se degradó por completo.

Los cromatogramas de los microcosmos con fracción alifática y aromática (F1F3), muestran esencialmente alcanos, ya que los aromáticos, menos concentrados que enmascarados. Aquí el comportamiento de los alcanos es muy similar a los de los microcosmos con F1, observándose una degradación de aproximadamente el 30% de los compuestos lineales a los 7 días, que posteriormente se hizo más extensiva, alcanzando hasta un 95% de degradación aproximadamente a los 30 días de incubación. Por lo tanto, la fracción alifática aquí también se degradó casi por completo a los 30 días (Figura 5.1).

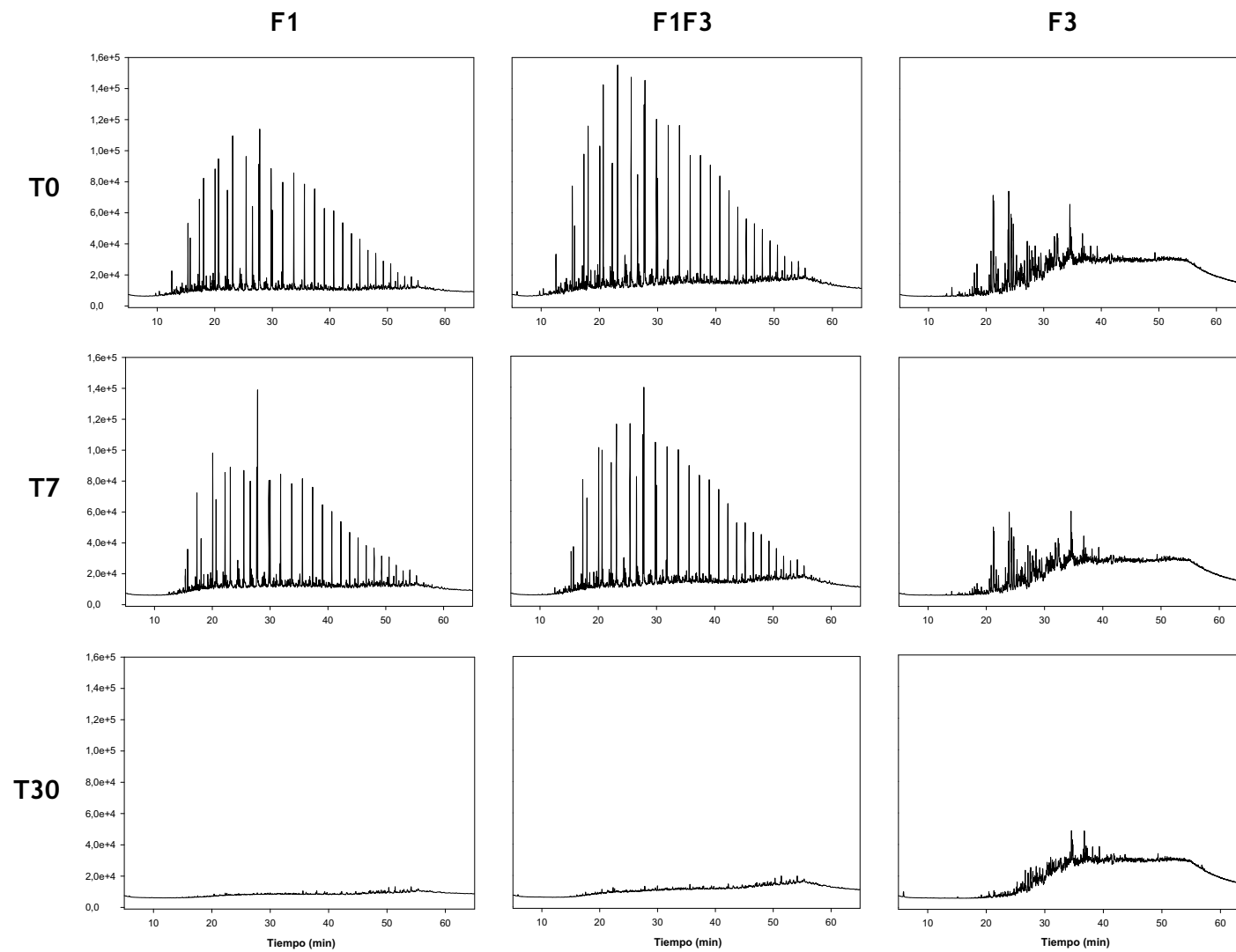


Figura 5.1. Perfiles cromatográficos (GC-FID) de contenido en TPHs durante diferentes tiempos de tratamiento con las diferentes fracciones.

5.1.2. Degradación de alifáticos

Para determinar las cinéticas de degradación de los alcanos, los extractos orgánicos neutros de los microcosmos incubados a distintos tiempos con F1 o con F1 y F3, se analizaron mediante GC-MS y se cuantificaron los picos resueltos, correspondientes a la serie de alcanos lineales C_{12} - C_{35} , así como los isoprenoides pristano y fitano. La cuantificación se realizó mediante rectas de calibración de patrones comerciales. Los resultados se muestran en la figura 5.2. Para facilitar la interpretación de los resultados y poder comparar los dos tipos de cultivo, los datos de cuantificación obtenidos se sometieron a un análisis estadístico (ANOVA, $p \leq 0.1$) que reveló que, de acuerdo con su cinética de degradación con respecto al control abiótico, los alcanos podrían agruparse en cuatro grupos: alcanos lineales de bajo peso molecular (C_{12} - C_{14}), que representaban un 10,7% de la F1; alcanos de tamaño medio (C_{15} - C_{31}), representando la mayor parte de la masa de la F1, un 77%; alcanos de elevado peso molecular (C_{32} - C_{35}), 0,7% de la F1; y los isoprenoides pristano y fitano, con un porcentaje de 11,7%, pero sin embargo importantes por su elevada recalcitrancia dentro de los alcanos.

Microcosmos incubados con fracción alifática (F1)

Todos los alcanos presentaron una degradación significativa respecto a los controles abióticos. Como se muestra en las figura 5.2 y 5.3, y tal como se esperaba, los alcanos de bajo peso molecular (C_{12} - C_{14}) son el grupo que se degrada antes, con una tasa máxima entre los 3-7 días (80% de degradación). Después, su concentración decrece más lentamente hasta su completa desaparición a los 15 días (99% de degradación). El grupo mayoritario de los alcanos (C_{15} - C_{31}) se degrada de forma lineal y completamente entre los 3 y 15 días (98% de degradación). Como se esperaba también, los alcanos de cadena larga (C_{32} - C_{35}) se degradan más lentamente, con tasa máxima entre los 7-15 días para alcanzar un 75% de reducción al final de este periodo y ser eliminados completamente antes de los 30 días (92% de degradación). Los isoprenoides pristano y fitano, no son degradados durante los primeros 7 días (2% de degradación), pero a continuación muestran un comportamiento similar a los de elevado peso molecular con una desaparición del 81% a los 15 días, para no ser detectados al final de la incubación (99% de degradación). En resumen, los 4 grupos de la fracción alifática, desaparecen casi completamente al final de la incubación.

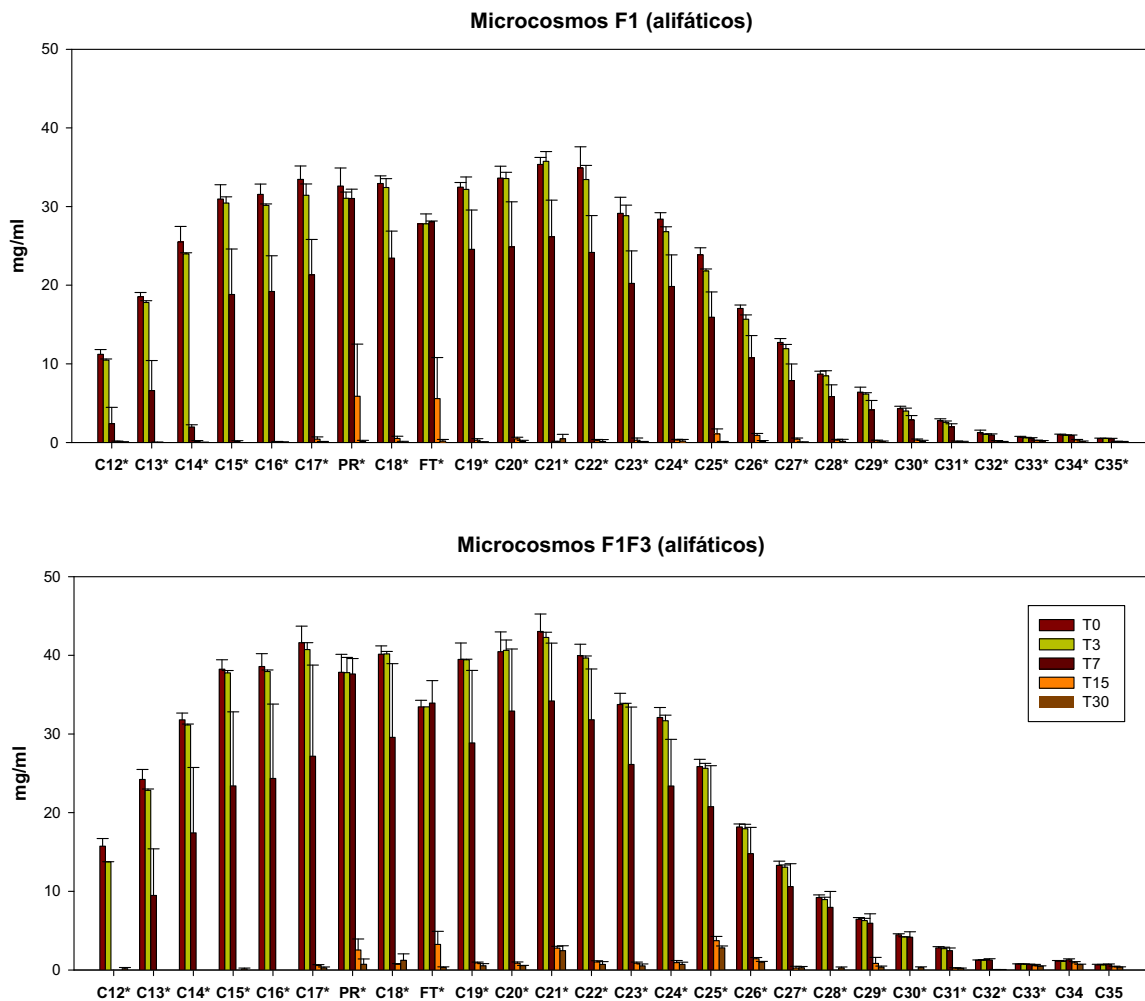


Figura 5.2. Evolución de la concentración de los distintos hidrocarburos alifáticos en los diferentes microcosmos, los números indican el número de átomos de carbono. * indica diferencias significativas ($P < 0.05$) respecto al control abiótico. Cada barra representa la media de las diferentes réplicas de cada tiempo (3 réplicas).

Microcosmos incubados con fracciones alifática y de HAPs combinadas (F1F3)

Al igual que en los cultivos con F1, la mayoría de alcanos analizados fueron degradados significativamente (Figura 5.2), excepto C_{34} y C_{35} . Cuando se comparan las cinéticas de los distintos grupos de alcanos de los cultivos F1F3 con las descritas para los microcosmos con F1 (Figura 5.3), se observa que, en general, la cinética de cada grupo en ambas condiciones es muy similar (ambas fracciones contienen la misma concentración de F1). A pesar de que la presencia de la fracción de HAPs, F3, ralentiza la degradación de alguno de los grupos de alcanos en los días iniciales, transcurridos 15 días el porcentaje de degradación de los mayoritarios C_{15} - C_{31} (97% de degradación) y de los isoprenoides (92% de degradación) es similar o más alto en presencia de F3, ambos grupos alcanzando un 97% y 99% de degradación

respectivamente a los 30 días. El pequeño retraso inicial podría explicarse por un efecto ligeramente tóxico derivado de la presencia de los HAPs al inicio de la incubación. Sólo el grupo de los alcanos de elevado peso molecular C₃₂-C₃₅ se degrada más lentamente en presencia de F3, 58% a los 30 días respecto al 92% de los microcosmos con sólo F1. Sin embargo, para comprender la relevancia de este resultado hay que tener en cuenta que este grupo de alcanos representa únicamente un 0,7% de la F1.

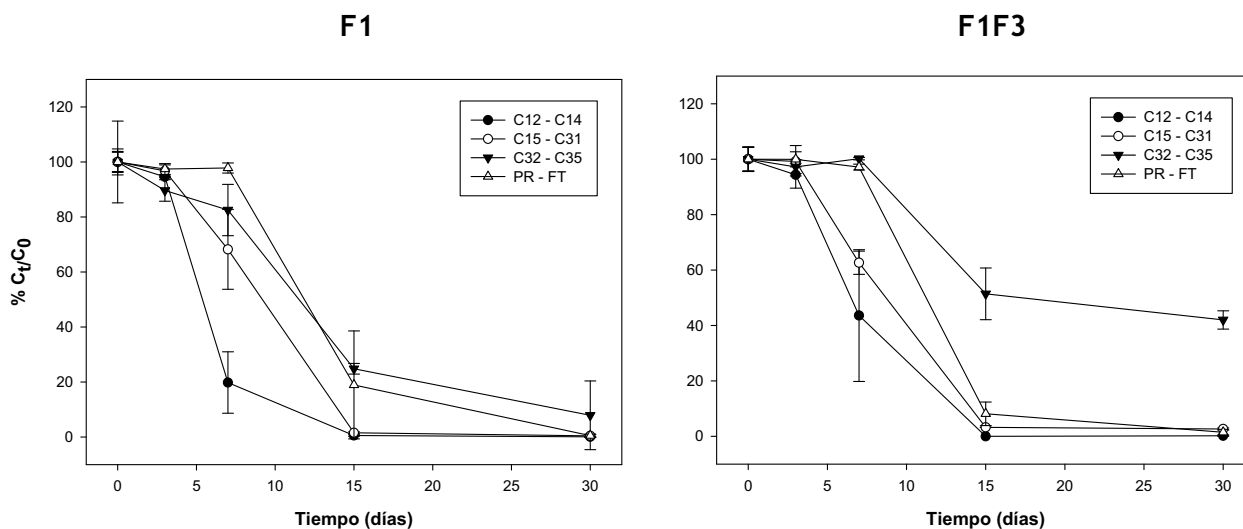


Figura 5.3. Cinéticas de degradación de la fracción alifática en los microcosmos F1 y F1F3, a lo largo del tiempo. La concentración relativa de cada analito a lo largo del tiempo (C_t/C_0) se determinó en relación a su concentración inicial (0 días). Los números indican el número de átomos de carbono.

5.1.3. Degradación de la fracción de HAPs

Al igual que en el caso de los alcanos, los extractos orgánicos neutros de los microcosmos incubados con F3 o con F1 y F3, a distintos tiempos, se analizaron mediante GC-MS para cuantificar la degradación de las distintas familias de HAPs y derivados alquilados. Concretamente se cuantificaron la serie de los 16 HAPs presentes en la lista de contaminantes prioritarios de la US EPA; el dibenzotiofeno (DBT), que a pesar de no ser un hidrocarburo eluye con los TPHs y tiene una abundancia significativa en crudos y derivados; y los derivados alquilados de estos compuestos detectables en las condiciones analíticas utilizadas, que según los casos comprendían desde monometil- a tetrametil HAPs. Los compuestos se identificaron mediante los iones diagnóstico correspondientes y se cuantificaron mediante rectas de calibración obtenidas con patrones comerciales, tal como se indica en materiales y métodos. Los resultados se muestran en las figura 5.4.

Tal y como puede observarse, las familias más importantes en el crudo envejecido utilizado como sustrato son las de los naftalenos (42% de los HAPs) y los fenantrenos (38%). En una proporción inferior siguen los DBT (9%), y los HAPs de 4 anillos, que incluyen los fluorantenos y pirenos (4%) y los crisenos (5%). Por último, ya muy minoritarios, tenemos a los HAPs de 5 anillos (0,5%). Los resultados de biodegradación se analizaron respecto a los controles abióticos mediante a un análisis estadístico (ANOVA, $p < 0.05$).

Microcosmos incubados con fracción de HAPs (F3)

En general, la fracción de HAPs mostró una rápida e importante degradación (figura 5.4), con tasas máximas entre los 3 y los 15 días, momento en que había sido reducida en un 47% y habiéndose eliminado prácticamente la totalidad de los naftalenos, a excepción de los N4, así como todos los compuestos de tres anillos y sus derivados monometilados. El resto de compuestos siguieron cinéticas más lentas o no fueron atacados, persistiendo al final del experimento un 41% de los HAPs iniciales en forma de un residuo enriquecido sobre todo en N4, Phe2, Phe3, DBT2, DBT3 y HAPs de 4 y 5 anillos.

En las figuras 5.5 y 5.6 se puede observar en detalle la evolución de la concentración de HAPs por familias. Entre 0 y 7 días se degradan de forma lineal y casi completa el N y N1 (96% y 83% de degradación respectivamente), siendo seguidos por N2, N3 y Fl, con cinéticas lineales entre los 3 y 15 días (100%, 89% y 98% de degradación respectivamente), cuando prácticamente desaparecen. A continuación se degradan los Fl1, Phe, Phe1, DBT y DBT1, con tasas máximas entre 7 y 15 días, cuando se reducen entre el 59-92%, para no detectarse a los 30 días. N4, Phe2, y DBT2 siguen cinéticas más lentas, con un 50%, 40% y 37% de degradación respectivamente, al final de la incubación. Finalmente, los Phe3, DBT3, C y C1 apenas son atacados, con un 2-11% al final del experimento. Aunque en las cinéticas se observa una ligera degradación de pireno y sus derivados alquilados en la segunda parte del experimento (aproximadamente 18% para el pireno), estas no fueron estadísticamente significativas respecto a los controles abióticos, lo que podría atribuirse a la variabilidad entre réplicas.

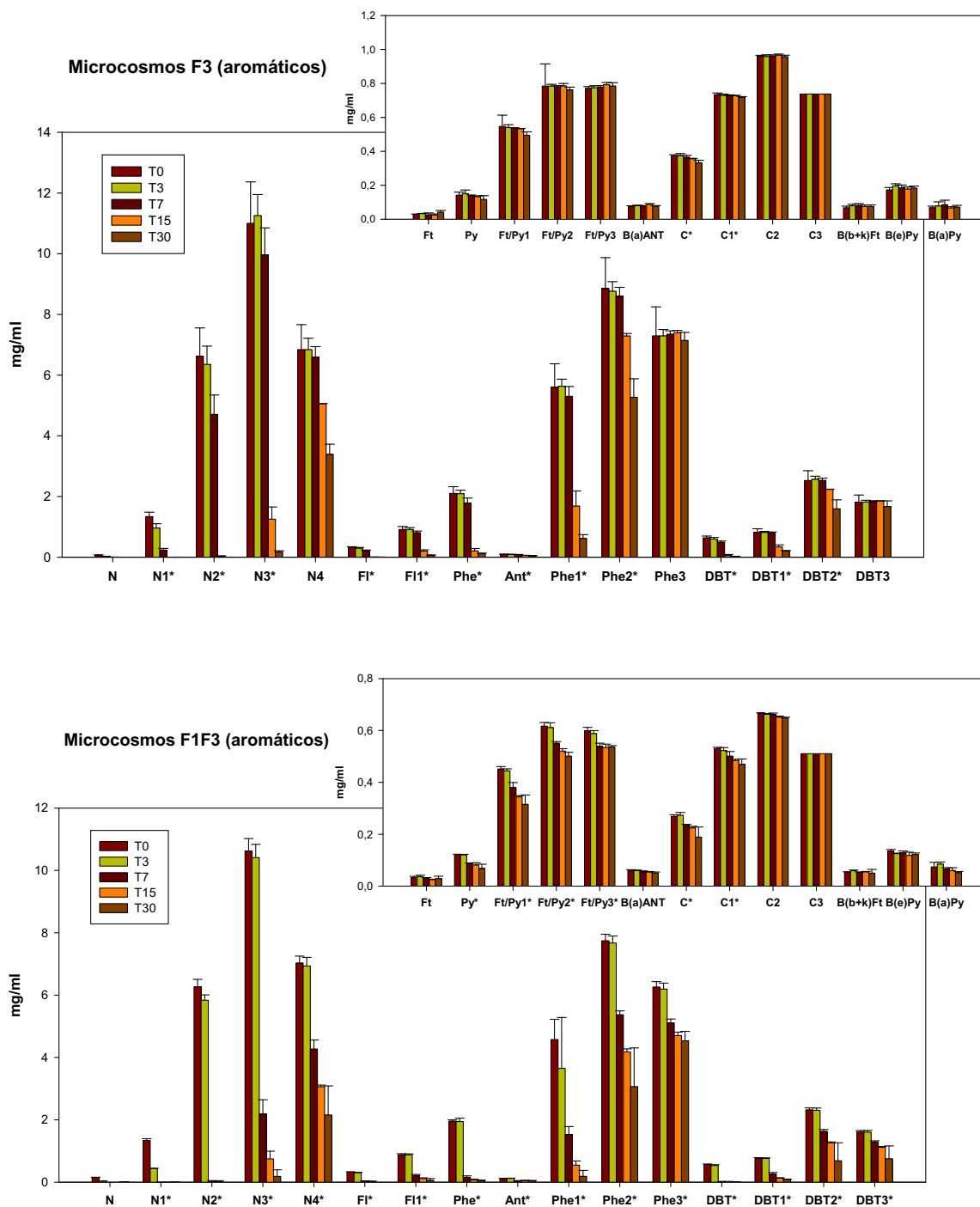


Figura 5.4. Evolución de la concentración de las distintas familias de HAPs en los diferentes microcosmos. N, Naftaleno; Fl, Fluoreno; Phe, Fenantreno, Ant, Antraceno; DBT, Dibenzotiofeno; Ft, Fluoranteno; Py, Pireno; B(a)ANT, benzo(a)antraceno; C, criseno; B(a)ANT, benzo(a)antraceno; C, criseno; B(b+k)Ft, benzo(b+k)fluorantenos; B(e)Py, benzo(e)pireno; B(a)Py, benzo(a)pireno. Los números 1, 2 y 3 indican el número de grupos metilo. * indica diferencias significativas ($P < 0.05$) respecto al control abiótico. Cada barra representa la media de los triplicados de cada tiempo.

Microcosmos incubados con fracciones alifática y de HAPs combinadas (F1F3)

En general, la presencia de la fracción alifática F1, acelera la degradación de todas las familias de HAPs (Figuras 5.5 y 5.6). En comparación con los microcosmos con solo fracción F3, donde las tasas máximas de degradación de HAPs y sus derivados alquilados se encontraron entre los 3 y 15 días, en presencia de F1 estos máximos se detectaron entre los 3 y 7 días, excepto para N y N1, que presentaron tasas de degradación máximas entre 0 y 3 días. De este modo, a los 7 días ya se había alcanzado un 54% de degradación de HAPs. A partir de este momento continúa la degradación de todos los compuestos de manera que el residuo de HAPs al final del experimento, aunque está enriquecido en los mismos HAPs que el de los microcosmos con F1, es de sólo un 27% de los HAPs iniciales (73% de degradación). Además, las cinéticas indican que la degradación de todos los compuestos podría continuar si se hubiera prolongado la incubación.

Las figuras 5.5 y 5.6 muestran que el N, N1, N2, Phe y DBT fueron removidos casi por completo a los 7 días. El resto de compuestos sufrieron una disminución en las tasas de degradación después de este tiempo pero siguieron degradándose. N3, Fl1, Phe1 y DBT1 fueron degradados más rápidamente en los microcosmos con F1, pero al final de la incubación alcanzaron una concentración residual similar (22-2% de residuo, 88-98% de degradación). N4, Phe2, Phe3, DBT2 y DBT3 fueron degradados entre un 28-70% al final de la incubación en presencia de F1, lo que supone un incremento de entre un 19% y 45% en relación a los cultivos en ausencia de alifáticos.

En el caso de pireno y criseno, sorprendentemente, se pueden observar también unas tasas máximas de degradación entre los 3 y 7 días (29% y 12% respectivamente), siendo ambos degradados significativamente al final de la incubación (44% y 30% respectivamente); lo mismo sucede con algunos de sus derivados metilados como Py1, Py2 y Py3 (30%, 19% y 10% de degradación respectivamente). Por lo tanto, los compuestos de 4 anillos son degradados en mayor extensión que en los microcosmos con solo F3.

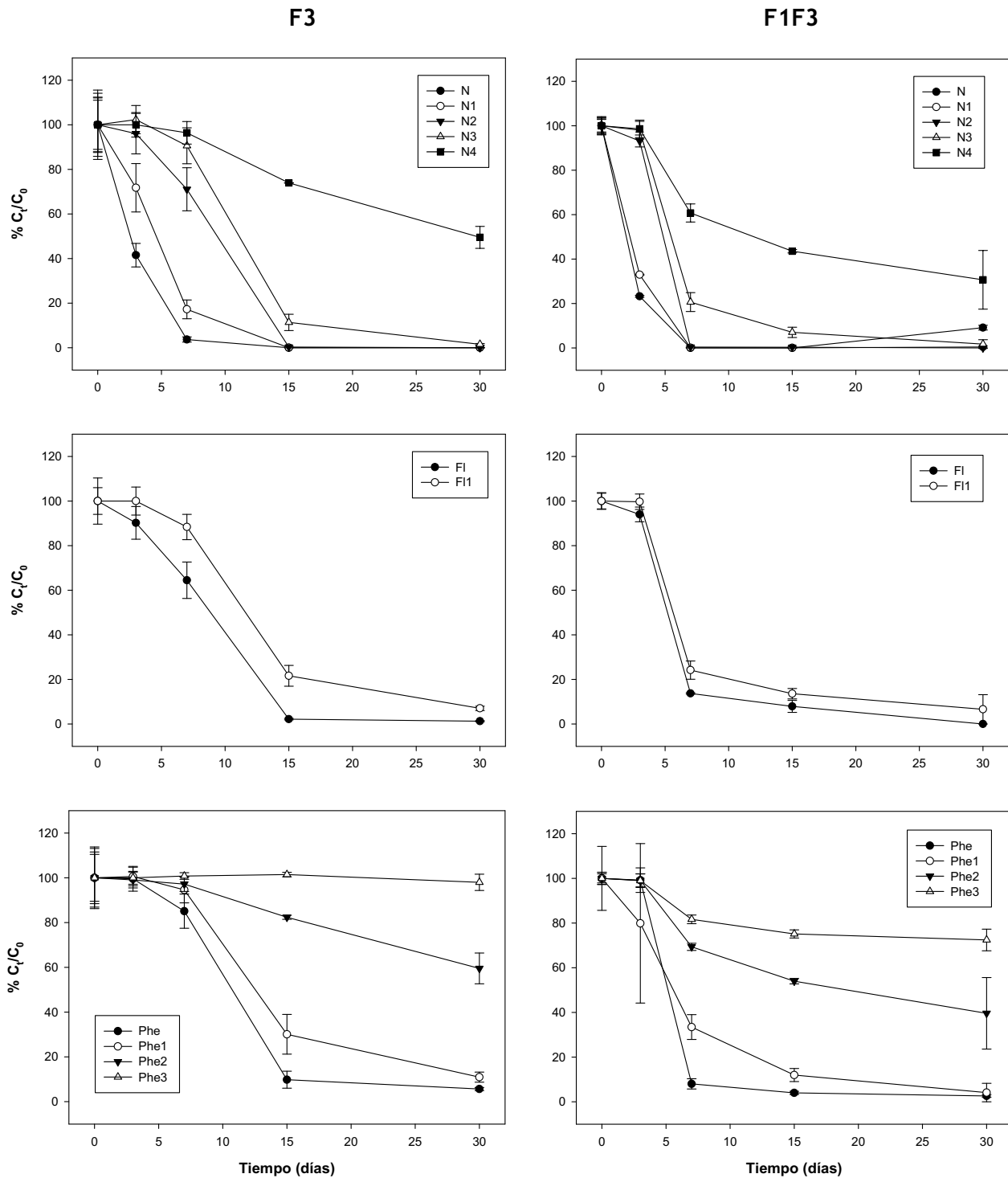


Figura 5.5. Cinéticas de degradación de la fracción aromática en los microcosmos F3 y F1F3, a lo largo del tiempo. La concentración relativa de cada analito a lo largo del tiempo (C_t/C_0) se determinó en relación a su concentración inicial (0 días). N, Naftaleno; Fl, Fluoreno; Phe, Fenantreno. Los números 1, 2 y 3 indican el número de grupos metilos. Cada punto representa la media de los triplicados de cada tiempo.

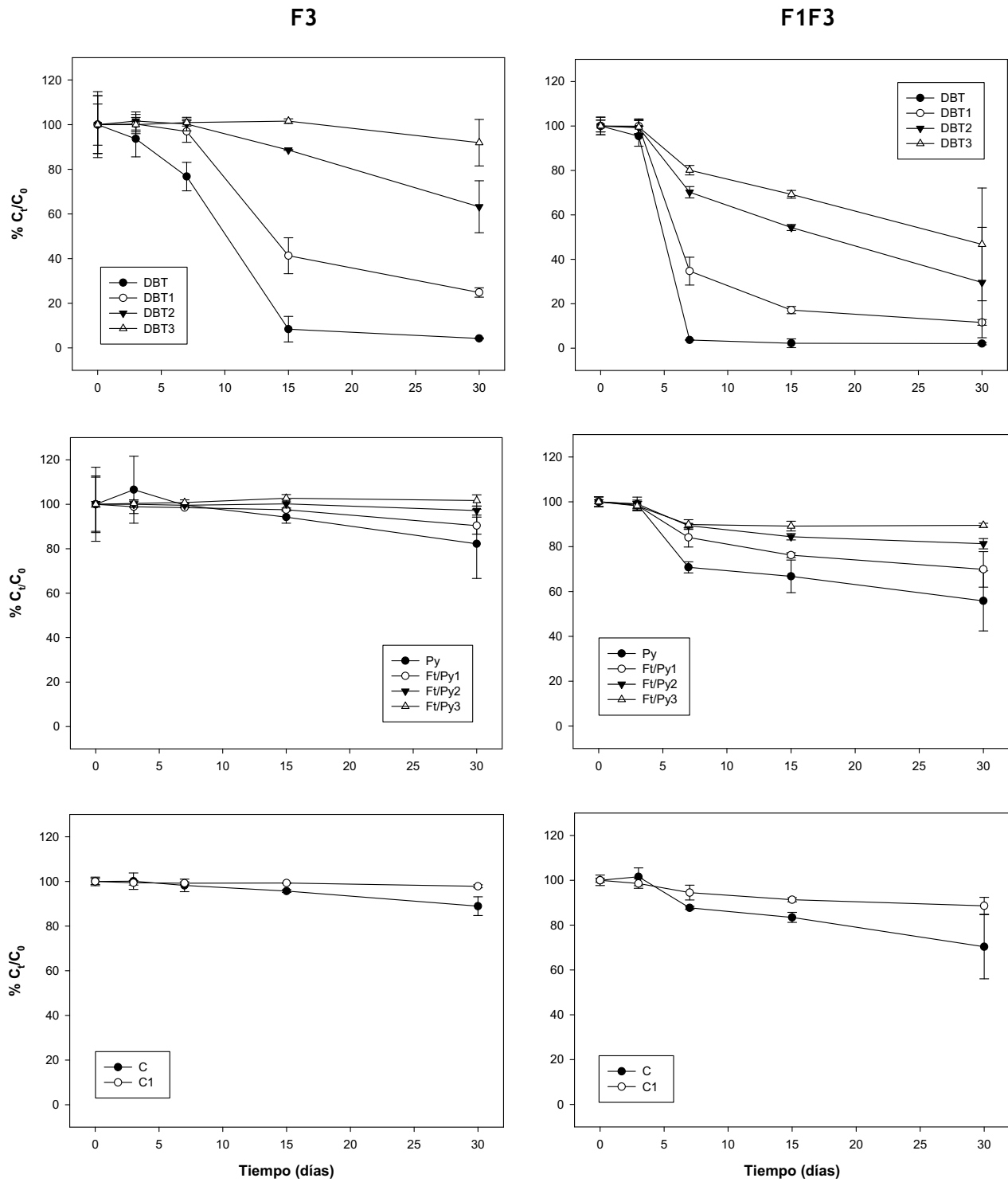


Figura 5.6. Cinéticas de degradación de la fracción aromática en los microcosmos F3 y F1F3, a lo largo del tiempo. La concentración relativa de cada analito a lo largo del tiempo (C_t/C_0) se determinó en relación a su concentración inicial (0 días). DBT, Dibenzotiofeno; Py, Pireno; Ft/Py1, Metil-fluorantenos/pirenos; C, Criseno. Los números 1, 2 y 3 indican el número de grupos metilos. Cada punto representa la media de los triplicados de cada tiempo.

5.2. Estudio de la comunidad microbiana

5.2.1. Dinámica de las poblaciones bacterianas mediante análisis por DGGE

Se determinó la evolución de la estructura de la comunidad microbiana a lo largo del tiempo mediante perfilado en geles de DGGE de las regiones hipervariables V1-V3 del gen ARNr 16S. Se amplificaron los extractos de ADN de los microcosmos con las diferentes fracciones de crudo de petróleo, empleando los cebadores universales GC-63F y 518R. Los resultados se muestran en la figura 5.7.

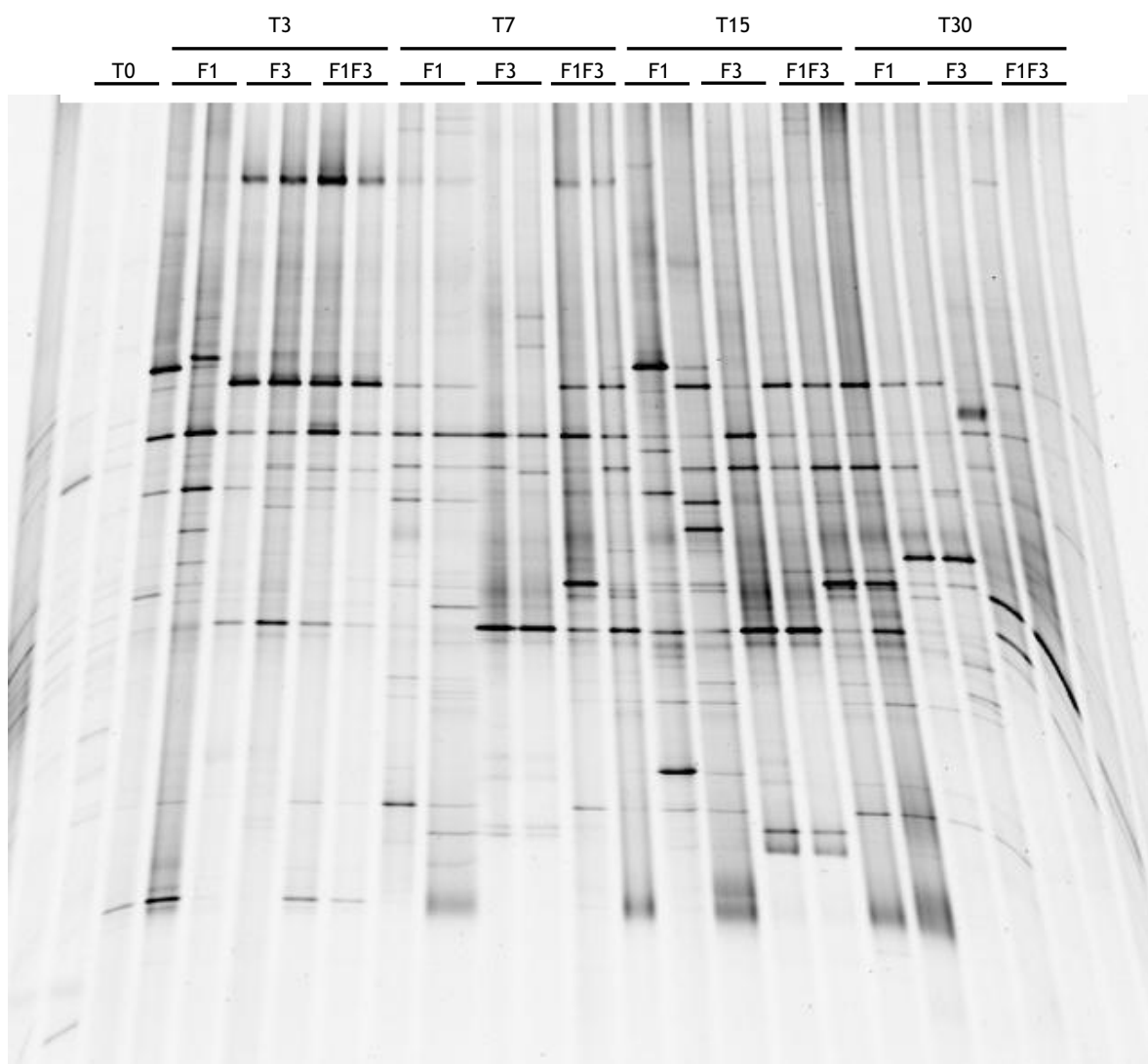


Figura 5.7. Perfil de DGGE de los fragmentos del ADNr 16S amplificados por PCR, en los diferentes tiempos y con las diferentes fracciones de crudo. F1 (fracción alifática), F3 (fracción aromática) y F1F3 (fracción alifática y aromática).

A partir de los tres días de incubación ya se produce una divergencia notable en el patrón de bandas mayoritarias detectado de los microcosmos con F1 en relación con los que contienen F3, que se ve intensificada en el periodo de máxima degradación 7-15 días. Las bandas detectadas en los cultivos con ambas fracciones combinan en gran parte los patrones observados para las fracciones individuales, pero aparecen algunas bandas con gran intensidad que no se habían detectado o eran muy débiles en los cultivos con fracciones individuales. Estos resultados sugerían una investigación más profunda de los cambios en la estructura de las comunidades microbianas que se abordaron en los apartados siguientes.

5.2.2. Dinámica de la estructura de la comunidad microbiana mediante pirosecuenciación

Para obtener información sobre los taxones presentes en los microcosmos con las diferentes fracciones de crudo y de su evolución a medida que avanzaba la degradación, se llevó a cabo una amplificación del ARNr 16S en muestras compuestas de todos los tiempos de incubación utilizando cebadores universales para eubacterias (27F-519R). Los amplicones purificados se enviaron a un laboratorio especializado para su pirosecuenciación. De esta forma, tras la eliminación de secuencias de baja calidad y quiméricas, se obtuvieron un total de 105109 lecturas con un mínimo de 400 pb correspondientes a las 16 muestras analizadas (0 días, 3 días, 7 días, 15 días y 30 días). El elevado número de secuencias obtenidas para cada uno de los microcosmos analizados (entre 2535 y 13231), permitió llevar a cabo un análisis exhaustivo de la diversidad presente en los microcosmos. Las secuencias obtenidas se clasificaron en unidades taxonómicas operativas (OTUs) usando un umbral de similitud del 97%.

Los resultados del análisis de la muestra utilizada como inóculo, que correspondería al tiempo 0, se muestran en la figura 5.8. Como se puede observar, en esta muestra, que como se ha indicado correspondía a suelo tratado de la biopila, existe un predominio de *Actinobacteria* (76%) y *Proteobacteria* (19%), sobre todo *Alpha-* y *Gammaproteobacteria*, con menor representación de *Beta-* y *Deltaproteobacteria*. Sólo un 5% pertenece a otros filos. Esta estructura, que es muy distinta de la que aparece ya a los tres días de incubación incluso en controles sin fuente de carbono, no se discutirá más a fondo por que corresponde a grandes trazos a la encontrada para las muestras de suelo de la biopila a 120 días del capítulo anterior.

La pequeña variación en las proporciones se debe sin duda al tiempo transcurrido desde la toma de la muestra y el inicio de este experimento, durante el cual el suelo se conservó a 4°C.

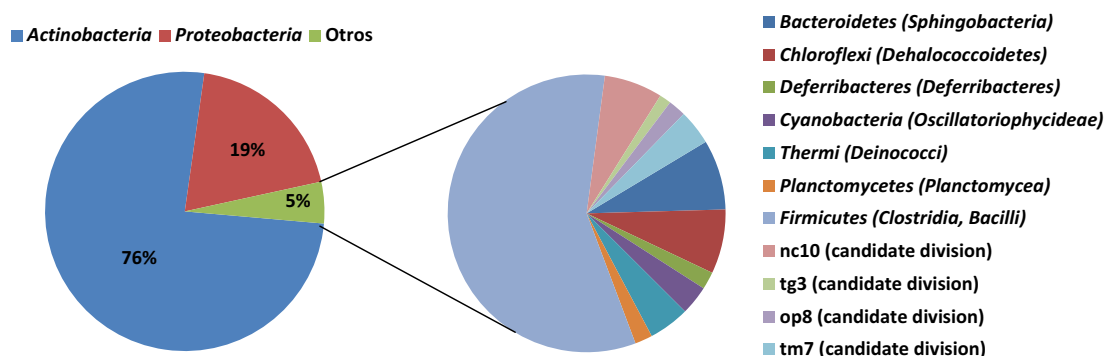


Figura 5.8. Abundancia relativa de filos y clases a los 0 días (T0), entre paréntesis las clases presentes en cada filo.

Para facilitar la visualización de los cambios en la estructura de las comunidades microbianas como respuesta a la incubación con cada una de las fracciones, y comparar las distintas condiciones entre sí, en la tabla 5.1 se recoge la lista de especies cuyas secuencias fueron detectadas con más de 100 lecturas en al menos uno de los puntos durante la incubación (3-30 días). No se muestran especies que pudiendo ser importantes a tiempo T0 (0 días) no aparecieron con al menos 100 lecturas en algún punto la incubación. En las figuras 5.9 y 5.10 se representan estos resultados de forma gráfica.

Tabla 5.1. Microorganismos identificados en la pirosecuenciación. Se incluyen sólo los microorganismos que en algún momento de la incubación (T3-T30) presentaron un número de lecturas >100.

Filo	Clase	Orden	Familia	Genero	Especie	Control				F1				F3				F1F3						
						T0	T3	T15	T30	T3	T7	T15	T30	T3	T7	T15	T30	T3	T7	T15	T30			
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rizobiales	Rhizobiaceae	<i>Ensifer</i>	<i>Ensifer mexicanus</i>	2	10	53	13	7	10	111	204	16	6	11	37	9	26	31	14			
				<i>Sinorhizobium</i>	<i>Ensifer xinjiangense</i>	0	48	356	87	26	12	33	70	34	2	1	8	15	9	5	0			
				<i>Rhizobium</i>	<i>Rhizobium huautlense</i>	0	24	35	24	12	26	38	213	5	0	6	6	6	18	10	1			
				<i>Agrobacterium</i>	<i>Agrobacterium vitis</i>	0	1	245	2	3	4	0	5	11	0	3	0	1	4	3	2			
		Phyllobacteriaceae	<i>Aminobacter</i>	<i>Aminobacter aminovorans</i>	0	0	85	30	1	0	25	132	0	1	6	16	0	1	9	7				
			<i>Sphingopyxis</i>	<i>Sphingopyxis chilensis</i>	0	7	60	18	0	22	169	811	1	8	11	55	4	223	106	43				
	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	<i>Sphingobium</i>	<i>Sphingobium herbicidovorans</i>	1	1	35	2	0	0	1	0	2374	12992	12125	2148	879	5557	878	3541				
			<i>Sphingomonas</i>	<i>Sphingomonas asaccharolytica cp1d</i>	8	0	0	0	0	0	0	5	12	32	21	23	15	129	14	73				
			<i>Cupriavidus</i>	<i>Cupriavidus necator</i>	3	17	9	7	575	5	2	52	12	0	1	7	1	11	21	2				
	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	<i>Hydrogenophaga</i>	<i>Hydrogenophaga taeniospiralis</i>	8	4	4	5	0	157	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
				<i>Hydrogenophaga</i>	<i>Hydrogenophaga palleronii</i>	8	64	154	245	29	120	165	670	5	5	9	13	15	148	121	11			
				<i>Rhodoferax</i>	<i>Rhodoferax ferrireducens</i>	1	0	0	0	0	10	111	0	0	0	1	0	0	0	0	0			
				<i>Variovorax</i>	<i>Variovorax paradoxus</i>	0	67	703	604	22	40	68	164	7	11	23	9	27	59	215	8			
			Oxalobacteraceae	<i>Massilia</i>	<i>Massilia timonae</i>	9	4014	792	438	2551	44	95	191	803	9	5	105	1001	190	28	8			
	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	3	5271	3981	3964	216	9	6	16	777	9	8	94	1323	33	10	1			
<i>Pseudomonas</i>				<i>Pseudomonas trivialis</i>	0	152	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
<i>Pseudoxanthomonas</i>				<i>Pseudoxanthomonas mexicana</i>	1	0	19	2	3	21	4	1590	0	1	0	12	0	0	5	9				
<i>Aquamonas</i>				<i>Aquamonas fontana</i>	3	7	28	37	1	53	59	119	2	3	2	3	0	28	29	0				
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Nocardiaceae	<i>Nocardia</i>	<i>Nocardia caishijiensis</i>	4	0	8	2	1	28	4	43	0	0	1	96	34	21	349	46			
					<i>Nocardia otitidiscaviarum</i>	0	0	4	4	3	43	51	44	0	0	0	78	35	22	448	74			
					<i>Nocardia cyriacigeorgica</i>	0	0	12	7	2	19	17	41	0	0	2	191	9	15	415	126			
					<i>Nocardia asteroides</i>	0	0	30	8	3	63	22	310	1	0	2	210	102	67	1538	194			
					<i>Nocardia tenerifensis</i>	0	1	4	0	1	17	212	50	0	0	0	1	5	1	4	1			
			Nocardioideaceae	<i>Marmoricola</i>	<i>Marmoricola</i> spp.	175	81	39	104	6376	4	6	4	5	0	0	195	2378	24	3	0			
			Gordoniaceae	<i>Gordonia</i>	<i>Gordonia amicalis</i>	9	3	13	5	0	1710	1682	7	0	3	43	144	1	2019	1903	114			
			N° total de secuencias analizadas*						3056	9949	6833	5829	10058	2535	3209	5043	4150	13231	12343	3568	5953	8669	6310	4373

* Representa el número total de secuencias en cada muestra y no la suma de valores de cada columna

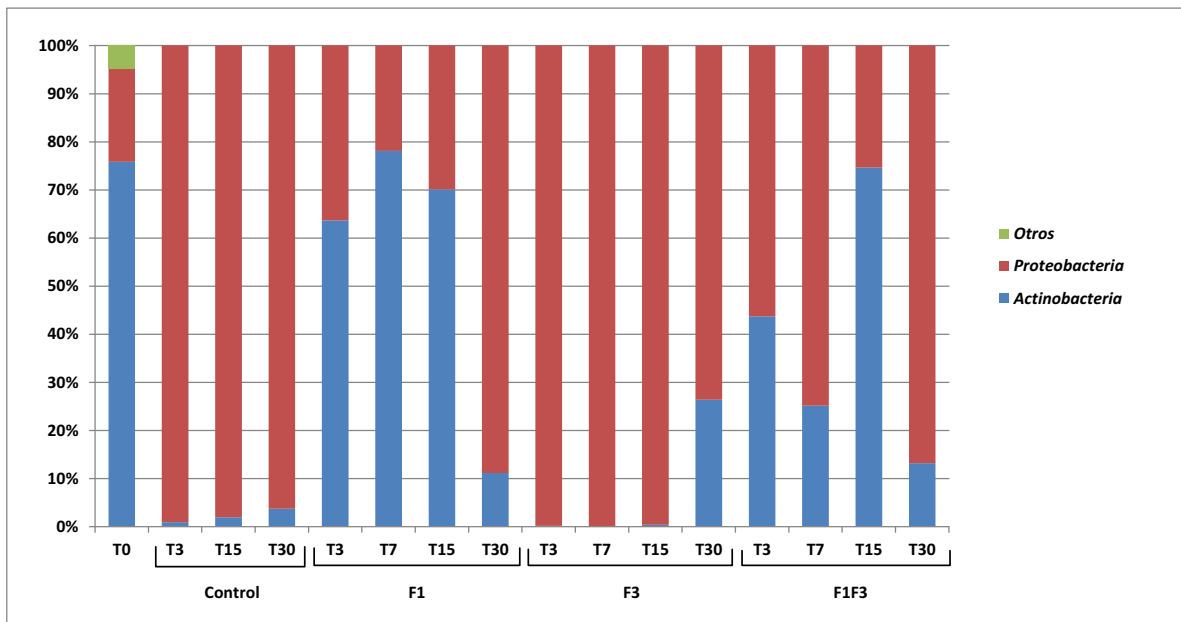


Figura 5.9. Abundancia relativa de los filos dominantes en los microcosmos con las diferentes fracciones y a través del tiempo de incubación.

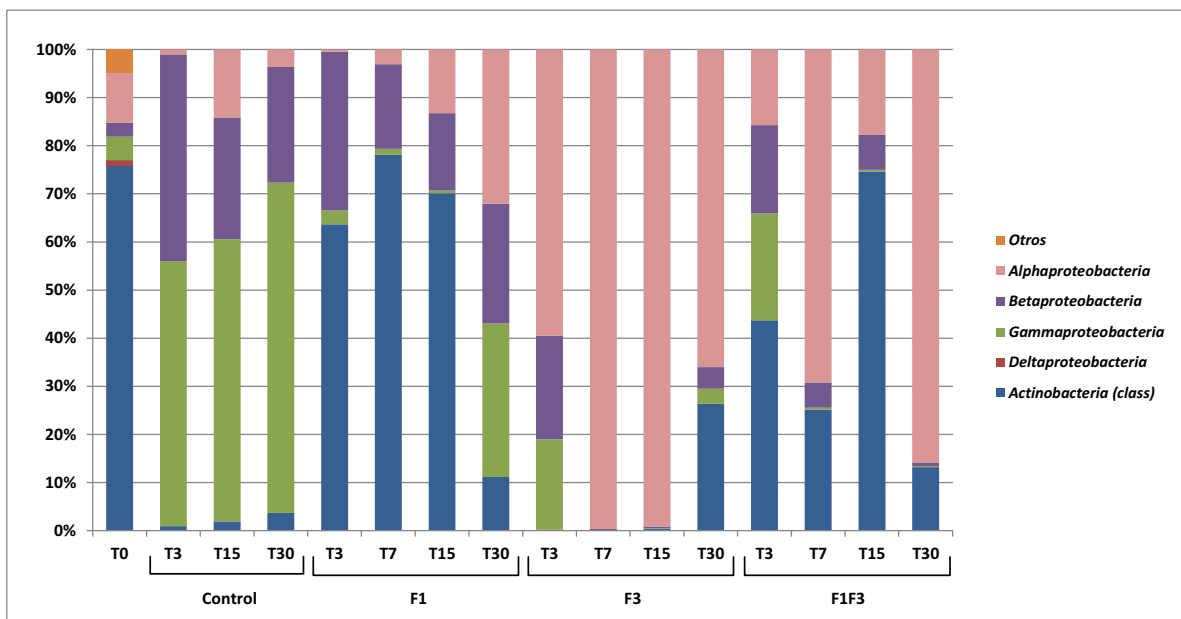


Figura 5.10. Abundancia relativa de clases en los diferentes tiempos y con las diferentes fracciones

En general, el análisis mediante pirosecuenciación del ADNr 16S de la comunidad microbiana de los microcosmos a través del tiempo, muestra un gran predominio de 2 filos *Actinobacteria* y *Proteobacteria*, en todos los tiempos y fracciones, excepto el T0 que, como se ha visto, presentó una mayor diversidad de filos.

En la figura 5.9 se ve de forma muy clara que en controles sin fuente de carbono el filo *Proteobacteria* desplaza casi completamente a *Actinobacteria*. En microcosmos con F1 los tiempos de mayor degradación, entre 3 y 15 días, coinciden con predominancia de *Actinobacteria* (entre un 65-75%), mientras que en microcosmos con F3 la situación es completamente inversa, con predominancia de *Proteobacteria*, que llegan a ser prácticamente los únicos miembros de la comunidad detectados. El patrón de barras de los cultivos con F1F3 difiere de ambos, observándose una alternancia de estos dos filos mayoritarios. A pesar de la mayor cantidad de F1 en estos cultivos (F1:F3, aprox 4:1), se observa una predominancia de *Proteobacteria* en las primeras fases (3 y 7 días), y al final de la incubación. A pesar de ello, los miembros de *Actinobacteria* presentan dos máximos de abundancia, uno a T3 (45%) y otro a T15 (75%), cuando pasan a ser la población mayoritaria.

A lo largo de la incubación, dentro del filo *Proteobacteria*, se detectaron miembros de las clases *Alpha-*, *Beta-*, *Gamma-*, *Delta-*, y *Epsilonproteobacteria*. La evolución de cada una (Figura 5.10) y de sus componentes, se considera por separado en los párrafos siguientes.

Microcosmos control sin fuente de carbono

A lo largo de todo el tratamiento en los controles sin fuente de carbono predominan *Gamma-* y *Betaproteobacteria*, que, por lo tanto, desplazan a *Actinobacteria*, el filo predominante en el suelo utilizado como inóculo. La diversidad relativamente baja dentro de cada clase nos permite considerar los cambios a nivel de especie (Figura 5.11). De 0 a 3 días, se produce un incremento importante en dos especies, *Pseudomonas stutzeri* (γ) (58%) y *Massilia timonae* (β) (40%).

La primera mantiene su elevada proporción hasta final de la incubación (68%), mientras que la segunda disminuye a lo largo del tiempo siendo desplazada por otras especies como por ejemplo *Variovorax paradoxus* (β), que llega a representar un 10%. La proliferación de estas bacterias se debe posiblemente a su capacidad de almacenar materiales de reserva (Lalucat et al., 2006), persistir en condiciones oligotróficas y su rápido crecimiento.

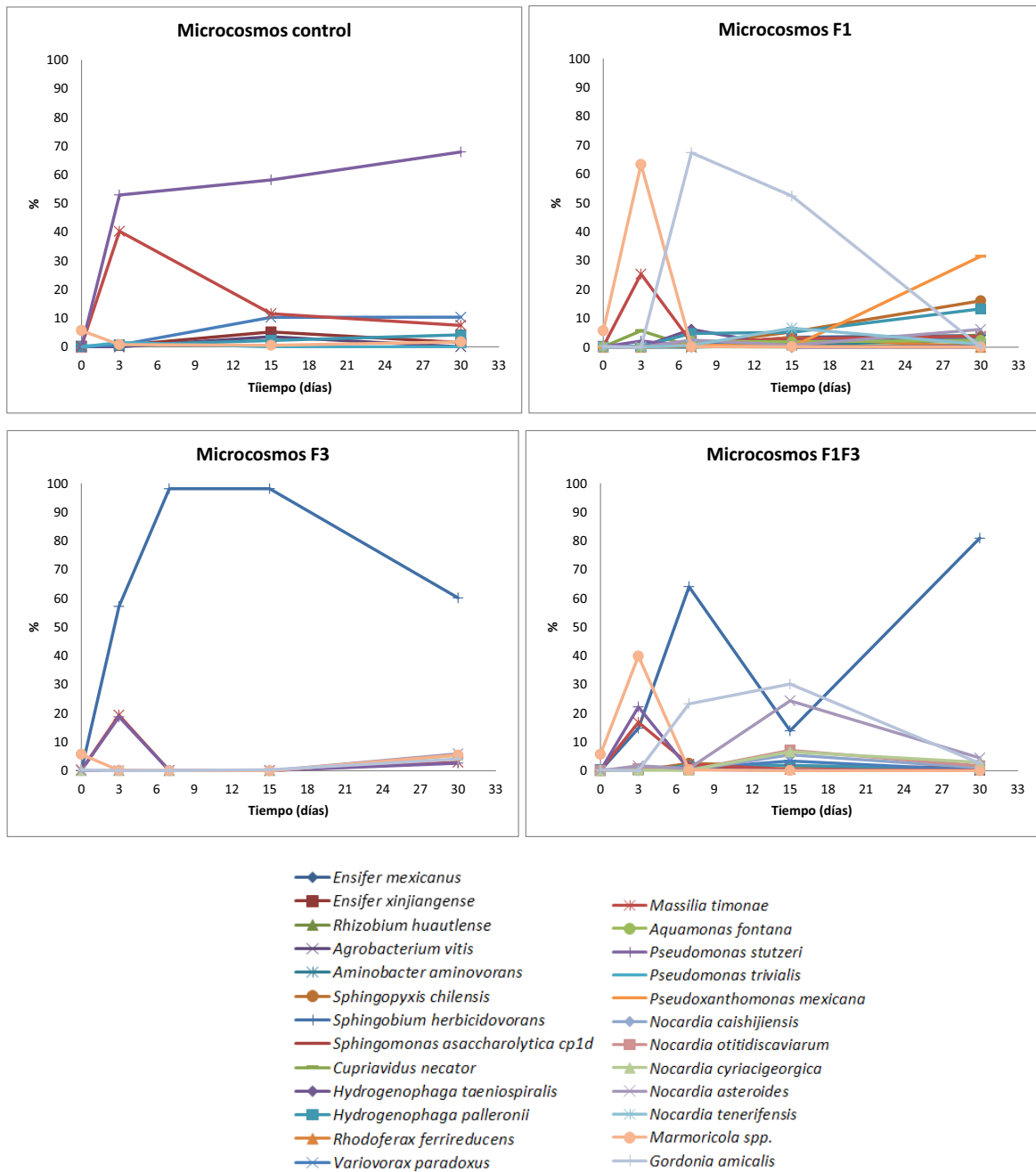


Figura 5.11. Evolución de la abundancia relativa de las distintas especies bacterianas detectadas. Se encuentran representados en los gráficos los microorganismos con más de 100 secuencias en algún punto de la incubación (T3-T30).

Microcosmos incubados con fracción alifática (F1)

Como se ha comentado, en los microcosmos con fracción alifática (F1) hay un claro predominio de la clase *Actinobacteria* desde los 3 a los 15 días, en que se reduce su proporción a favor de *Alfa-* y *Gammaproteobacteria* (figura 5.10). A tiempo 3 *Actinobacteria* está seguida de *Betaproteobacteria*, que mantienen su proporción sin

grandes cambios hasta el final. Dentro de *Actinobacteria* el incremento inicial a T3 se debe a *Marmorícola* (63%), que rápidamente, entre los 7 y 15 días es desplazada por *Gordonia amicalis* (68% y 52% a 7 y 15 días). Estos resultados indicarían un papel clave de la primera en la degradación de alcanos de cadena corta y de la segunda en la de alcanos de cadena media, que son los mayoritarios. Más tarde *Gordonia* casi desaparece y aumenta la diversidad, siendo desplazada a los 30 días por distintas proteobacterias y, en menor proporción, por 2 representantes de *Nocardia*, *Nocardia cyriacigeorgica* (5%) y *Nocardia asteroides* (6%), que ya fueron detectadas a los 15 días. Este género participaría pues también en la degradación de alcanos de cadena larga o isoprenoides, que son los que persisten en la segunda mitad de la incubación. Entre las Proteobacterias que aumentan a partir de 15 días encontramos miembros de *Pseudoxanthomonas mexicana*, *Sphingopyxis chilensis* y *Hidrogenophaga palleroni*. No puede descartarse la participación de proteobacterias en la degradación de alcanos de elevado peso molecular, sin embargo, el aumento de diversidad podría deberse también a una disponibilidad de productos fácilmente asimilables y puestos a disposición por las actinobacterias tras el ataque a los alcanos. El aumento de la *Betaproteobacteria*, *Massilia timonae* (25%) a los 3 días no puede considerarse asociado a degradación, ya que es una de las bacterias que incrementa su proporción en los controles sin fuente de carbono (Figura 5.11).

Microcosmos incubados con fracción de HAPs (F3)

En incubaciones con fracción aromática como único sustrato, las proteobacterias desplazan completamente al resto de los filos excepto al final de la incubación (T30) donde ganan importancia las actinobacterias (26%). Dentro del primer filo, la clase *Alfaproteobacteria* es la mayoritaria aumentando ya de forma significativa a los 3 días (59% a T3) y llegando a suponer casi el 100% a los 7 y 15 días, para decrecer ligeramente a los 30 (66%). Esta clase está representada prácticamente por una sola especie, *Sphingobium herbicidovorans*, demostrándose su clara implicación primero en la degradación de N y N1 y después en la de los compuestos de 3 anillos y los derivados alquilados de todos ellos.

En las fases iniciales (T3) tienen importancia también *Pseudomonas stutzeri* (19%) (*Gammaproteobacteria*) y *Massilia timonae* (19%) (*Betaproteobacteria*), que como hemos comentado aumentan también en cultivos sin fuente de carbono. La disminución de *Sphingobium* de 15 a 30 días va acompañada del incremento de otras poblaciones cuya abundancia relativa era pequeña hasta entonces. Estas poblaciones incluyen miembros de *Actinobacteria*, como *Nocardia cyriacigeorgica* (5%), *Nocardia*

asteroides (6%), *Gordonia amicalis* (4%), y *Marmoricola* sp. (5%), y *Pseudomonas stutzeri* (3%). El incremento de estas poblaciones bien puede deberse a la disminución de *Sphingobium* o a su rol activo en el ataque sobre la fracción más recalcitrante de HAPs, como los compuestos alquilados con 3 o 4 grupos metilos o los de 4 anillos aromáticos (pireno, criseno). En general, es sorprendente la baja diversidad observada.

Microcosmos incubados con fracciones alifática y de HAPs combinados (F1F3)

A primera vista, los resultados del análisis de la pirosecuenciación muestran una diversidad de poblaciones que corresponde a la combinación de los observados en los microcosmos con F1 y con F3, individualmente. Sin embargo, las abundancias relativas evolucionan de forma distinta, con dos máximos de *Actinobacteria* a tiempo 3 y 15 días (44% y 75% respectivamente). Inicialmente, a tiempo 3 días, se sobreponen los gráficos obtenidos para los cultivos con F1 y F3 por separado. Dejando de lado a *Massilia* y *Pseudomonas stutzeri*, se observan picos de la actinobacteria *Marmoricola* (40%), tal como se había visto en los microcosmos con F1 y que había sido atribuido a la degradación de alcanos de cadena corta, y un incremento en *Sphingobium* (*Alphaproteobacteria*), fruto del inicio en la degradación de aromáticos. A los 7 días continúa el incremento de *Sphingobium herbicidovorans* (64%) y se produce un incremento notable de *Gordonia amicalis* (23%) actores principales en la degradación de HAPs y alcanos, respectivamente. A los 15 días *Gordonia amicalis* (30%) continúa aumentando, pero *Sphingobium herbicidovorans* (14%) es desplazado por una variedad de especies que aparecieron al final de la incubación con la F3, pero que aquí presentan un máximo en este punto.

La mayoría pertenecen al género *Nocardia*, lo que explica el segundo pico que presentan las actinobacterias en este tiempo con representantes de *Nocardia asteroides* (24%), *Nocardia cyriacigeorgica* (7%), *Nocardia otidiscaviarum* (7%), y *Nocardia caeshijiensis* (6%). Entre las Proteobacterias, aparte de *Sphingobium*, y con una abundancia relativa bastante menor, encontramos a las betaproteobacterias *Variovorax* (3%) e *Hydrogenophaga* (2%) y a la alfa proteobacteria *Sphingopyxis* (2%). Sin embargo, a los 30 días el dramático decrecimiento en todas estas bacterias permite aumentar de nuevo a *Sphingobium herbicidovorans* (81%), confirmando su rol clave en la degradación de HAPs. Las actinobacterias *Gordonia amicalis* y *Nocardia asteroides* están presentes pero con abundancias muy bajas (3% y 4% respectivamente).

Dado que las cinéticas de degradación de HAPs son más rápidas aquí en presencia de la fracción F1, el máximo de *Actinobacteria* a los 15 días es consistente con la degradación de los compuestos de mayor peso molecular y/o de HAPs con mayor número de alquilaciones. Aunque otra posible explicación sería que estas actinobacterias, junto a las proteobacterias con máximos también a 15 días, estuvieran degradando metabolitos acumulados durante la rápida degradación de la mayor parte de los HAPs.

Análisis de la diversidad

A partir de los OTUs definidos en el análisis de pirosecuenciación, se estimó la diversidad y riqueza de la población bacteriana presente en cada uno de los microcosmos utilizando los índices de Shannon y el índice de Chao1 (Tabla 5.2), determinados con el programa informático Quiime (Quantitative Insights Into Microbial Ecology).

Tabla 5.2. Riqueza y diversidad estimadas mediante los índices de Chao1 y de Shannon (H').
ACE: Abundance Coverage-based Estimator.

Muestra	Secuencias	OTUs	Chao1	H'	ACE	Cobertura
T3	11308	193	287.67	2.62	300.70	99.36
T15	8024	222	319.68	2.51	316.34	98.98
T30	7131	225	321.83	2.46	324.55	98.82
F1T3	11816	227	388.89	2.50	378.76	99.20
F1T7	3701	147	218.29	2.36	234.24	98.41
F1T15	5665	451	769.04	3.49	770.76	96.29
F1T30	7228	451	711.04	3.78	735.55	97.26
F3T3	4325	82	141.50	1.81	135.28	99.19
F3T7	13134	63	90.60	0.46	95.88	99.82
F3T15	12333	95	156.50	2.54	155.26	99.66
F3T30	4009	132	263.62	2.65	233.39	98.53
F1F3T3	7730	215	330.71	3.29	334.60	98.95
F1F3T7	10519	190	295.33	3.02	321.91	99.24
F1F3T15	8434	246	305.38	3.00	323.75	99.10
F1F3T30	5069	147	235.77	2.19	246.57	98.76

En los microcosmos control no se observan cambios importantes en ninguno de los dos índices, aunque la diversidad tiende a disminuir a lo largo del tiempo (H' 2,62 a 2,46). En cambio, en los cultivos con fracciones sí que se observan comportamientos muy distintos entre ellos. En presencia de fracción alifática (F1), la riqueza y diversidad disminuyen inicialmente hasta los 7 días (H' 2,36), para luego volver a

aumentar de forma muy importante a los 15 y 30 días, cuando ya se han degradado la mayoría de los alcanos, alcanzando los valores más altos de diversidad y riqueza de todas las muestras (H' 3,87; Chao1 711). En los microcosmos con fracción aromática (F3), también se observa como la diversidad disminuye en las fases de máxima degradación de HAPs, alcanzando los valores más bajos de todos los microcosmos entre los 3 y 7 días (H' 0,46), para luego volver a aumentar hasta cierto punto a los 15 y 30 días (2,65). Este resultado da una idea de la clara predominancia de *Sphingobium* en los cultivos con fracción de HAPs. Finalmente, en los microcosmos con fracción alifática y de HAPs (F1F3), a pesar de que son los que muestran los valores de diversidad más elevados a los 3 días (H' 3,29), ésta va disminuyendo a lo largo del tiempo (H' 2,19, a los 30 días).

5.3. Análisis de genes funcionales

Los trabajos de laboratorio de esta parte de la Tesis fueron realizados durante una estancia doctoral en el laboratorio del Dr. Pierre Peyret y la Dra. Corinne Petit (Laboratory Microorganisms, Genome and Environment (LMGE) - UMR CNRS 6023, Clermont-Ferrand, France). Una vez conocida la población microbiana presente en cada uno de los diferentes microcosmos y tiempos de incubación, se pretendían identificar también los genes implicados en la degradación de los hidrocarburos alifáticos y aromáticos, mediante distintas técnicas moleculares. Una de ellas fue la amplificación por PCR de algunos de estos genes y la posterior construcción de librería de clones. Para llevar a cabo esta aproximación, se seleccionaron 3 genes codificantes para monooxigenasas relacionados con la degradación de hidrocarburos alifáticos y 3 genes codificantes para dioxigenasas dihidroxilantes, que inician el ataque a los hidrocarburos aromáticos. Posteriormente, se realizó un análisis más exhaustivo utilizando microarrays de genes funcionales desarrollados por el grupo del Dr. Peyret. En esta fase de la investigación se trabajó con los mismos extractos de ADN obtenidos de cada uno de los diferentes microcosmos en los laboratorios de la UB.

5.3.1. Librería de clones de genes funcionales

La identificación de los genes implicados en la degradación de las distintas fracciones del crudo en microcosmos se abordó en primer lugar mediante la construcción de librerías de clones. Para ello, se seleccionaron seis genes diana a detectar y se llevó

a cabo su amplificación mediante el uso de cebadores degenerados previamente descritos. Se eligieron tres genes correspondientes a monooxigenasas cuyo papel clave en rutas de degradación de alcanos ha sido probado, y tres genes de dioxigenasas dihidroxilantes de HAPs bien caracterizadas. Los genes de alcano hidroxilasas seleccionados fueron *AlmA*, asociado al ataque a alcanos de cadena larga (C20-C30), *AlkB*, que actúa en la degradación de alcanos de cadena corta y media (C5-C11 o C13-C20), y *Cyp153A*, una citocromo P450 oxigenasa bacteriana que ataca alcanos de cadena media (C5-C12). Los genes *AlmA* se han encontrado hasta ahora únicamente en Gram-negativos, mientras que para *AlkB* y *Cyp153A* se han descrito una variedad de homólogos tanto en Gram-negativos como en Gram-positivos. En cuando a la detección de dioxigenasas, de acuerdo con Iwai et al (2011), se eligieron cebadores para detectar genes codificantes para subunidades α de tres familias distintas: HAP dioxigenasas de Gram-negativos (cebadores Clase B), Tolueno/bifenil dioxigenasas (cebadores Clase D), y HAP-dioxigenasas de Gram-positivos (cebadores Clase F).

La primera fase del análisis mediante librerías de clones, correspondía a la detección de estos genes mediante su amplificación (PCR) a partir de extractos de ADN procedentes de cada uno de los microcosmos incubados a los distintos tiempos, utilizando los cebadores específicos seleccionados. Se obtuvo amplificación para todos los genes excepto para *AlmA* y para HAP-dioxigenasas de Gram-positivos. *AlmA* amplificó en algunos casos, pero no pudo obtenerse un resultado repetitivo. Por lo tanto, estos dos genes se descartaron para la construcción de librerías de clones.

5.3.1.1. AlkB (Alcano monooxigenasa)

Como era de esperar, en los microcosmos con fracción aromática (F3) no hubo amplificación, por lo que la librería sólo incluye secuencias de los microcosmos con F1 o con F1F3. En concreto se trabajó con amplicones de 5 muestras correspondientes a los tiempos 3, 7 y 15 días de los microcosmos con F1 (F1T3, F1T7 y F1T15), y a los tiempos 3 y 15 días de los microcosmos con F1F3 (F1F3T3, F1F3T15). Se obtuvieron un total de 55 clones y, una vez secuenciados, se trabajó con sus secuencias de aminoácidos. Tras la agrupación con un umbral de similitud del 97% se obtuvieron un total de 14 secuencias distintas, cuya frecuencia de detección en los microcosmos y los resultados de su comparación con la base de datos se muestran en la tabla 5.3 y en la figura 5.12.

Tabla 5.3. Propiedades de las secuencias de aminoácidos de los genes detectados en la librería de clones de *AlkB*

Nombre	Enzima más próxima	Accession number ^a	Sim (%) ^a	F1			F1F3		Nº total de clones
				T3	T7	T15	T3	T15	
alkB seq1	alkane 1-monooxygenase [<i>Nocardia asteroides</i>]	WP_019046745	97				2	2	2
alkB seq2	alkane rubredoxin-dependent monooxygenase [uncultured <i>Nocardia</i>]	ACZ64708	90	3	5		1		9
alkB seq3	putative alkane-1 monooxygenase, partial [<i>Nocardia</i> sp. SoB]	ABO21865	96				3		3
alkB seq4	putative alkane 1-monooxygenase, partial [<i>Gordonia</i> sp. CC-JL2-2]	ACZ17534	96				1		1
alkB seq5	putative alkane 1-monooxygenase, partial [<i>Gordonia</i> sp. CC-KS2]	ACZ17536	100	6			3		9
alkB seq6	putative alkane-1 monooxygenase, partial [<i>Nocardia</i> sp. SoB]	ABO21867	96				3		3
alkB seq7	putative alkane monooxygenase [uncultured <i>Nocardia</i>]	ABB92361	92	1					1
alkB seq8	putative alkane monooxygenase [uncultured <i>Nocardia</i>]	ABB92361	93	2	2				4
alkB seq9	putative alkane monooxygenase [uncultured <i>Nocardia</i>]	ABB92361	93				3		3
alkB seq10	alkane-1-monooxygenase, partial [<i>Agrobacterium</i> sp. MS189b]	AEY77872	75	3			2		5
alkB seq11	alkane-1-monooxygenase, partial [<i>Agrobacterium</i> sp. MS189b]	AEY77872	73	2			5		7
alkB seq12	alkane-1-monooxygenase, partial [<i>Pedobacter</i> sp. MS245e]	AEY77890	76	3			1	2	6
alkB seq13	alkane-1-monooxygenase, partial [<i>Pedobacter</i> sp. MS245e]	AEY77890	74	1					1
alkB seq14	alkane-hydroxylase, partial [uncultured <i>Pedobacter</i>]	AFQ37249	82	1					1
Total de clones				6	16	7	8	18	55

a Enzima más próxima según la base de datos GenBank

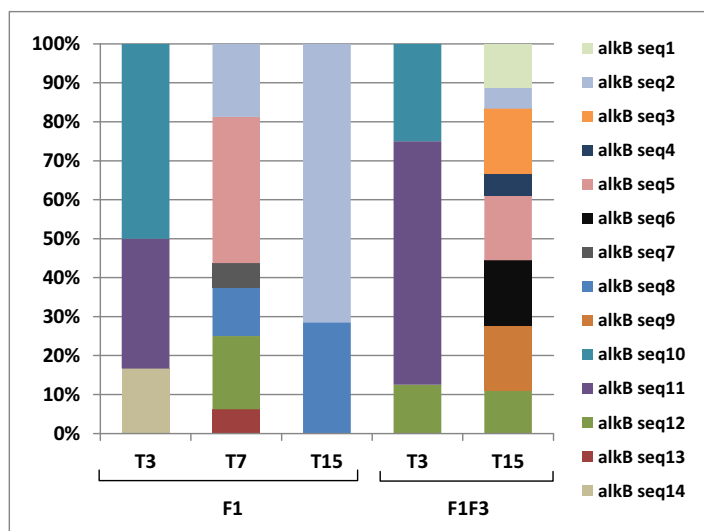


Figura 5.12. Abundancia relativa de los clones obtenidos de los microcosmos con F1 y F1F3 a los distintos tiempos de incubación

Se puede observar que la mayoría de secuencias detectadas (35), presentan una elevada similitud con alcano hidroxilasas de *Actinobacteria* (*Nocardia* y *Gordonia*), ambas relacionadas con la degradación de alcanos (Kloos et al, 2006; Shen et al., 2010), seguidas por secuencias encontradas en miembros de *Alphaproteobacteria* (*Agrobacterium*) (12) y *Bacteroidetes* (*Pedobacter*) (8).

A pesar del bajo número de clones estudiado por microcosmos, casi la mitad de las secuencias (6 de 14) se han encontrado en ambos tipos de microcosmos. Esta coincidencia se da sobre todo a los 3 días, cuando apenas se observa degradación. Sin embargo, a los 15 días existe una divergencia clara sugiriendo que en la degradación de alcanos participan poblaciones distintas. En cultivos con sólo F1 se detectan únicamente las secuencias *alkB seq2* y *alkB seq 8* de *Nocardia*, mientras que en los microcosmos con F1F3 hay mayor diversidad y se detectan además de la *alkB2*, las secuencias *alkB seq1*, *alkB seq 3*, *alkB seq4*, *alkB seq5* y, *alkB seq6*, *alkB seq9* y *alkB seq12*, correspondientes a *Gordonia*, *Nocardia*, y *Pedobacter*.

En general, las secuencias atribuidas a Gram negativos, *Agrobacterium* y *Pedobacter*, se detectan únicamente a los 3-7 días en ambas condiciones, mientras que a los 15 días predominan las correspondientes a actinobacterias. De hecho, es interesante destacar la elevada similitud en las secuencias encontradas a T3 en ambas condiciones, con una clara predominancia de *alkB 10* y *alkB11* cuya mayor similitud correspondía a alcano hidroxilasas de *Agrobacterium*.

Para poder relacionar nuestras secuencias AlkB con las encontradas por otros autores, se hizo una búsqueda bibliográfica. En un trabajo reciente, Pérez-de-Mora et al (2011), estudiaron la abundancia y diversidad de bacterias degradadoras de *n*-alcanos en un suelo de bosque contaminado con hidrocarburos y metales, analizando la diversidad de genes homólogos de *AlkB* y obteniendo un árbol filogenético que incluía las secuencias encontradas y una variedad de secuencias tomadas de la literatura. Al introducir nuestras secuencias y obtener un árbol conjunto, se comprobó que todas las secuencias AlkB encontradas aquí encajaban en uno solo de los clusters definidos por estos autores. Curiosamente se trataba del Cluster IIB_2c2, en el que se hallaban las secuencias que estos autores encontraron en la zona control no contaminada. Este cluster contenía sobre todo secuencias de *Actinobacteria*, principalmente *Mycobacterium* y *Nocardia*, pero también de *Pedobacter* y *Agrobacterium* (entre 70% y 80% de identidad de aminoácidos) (Figura 5.13). Ello coincide con nuestros resultados, que como hemos visto incluyen 9 secuencias de *alkB* pertenecientes a *Actinobacteria* (*Nocardia* y *Gordonia*), 3 de *Pedobacter* y 2 de *Agrobacterium*.

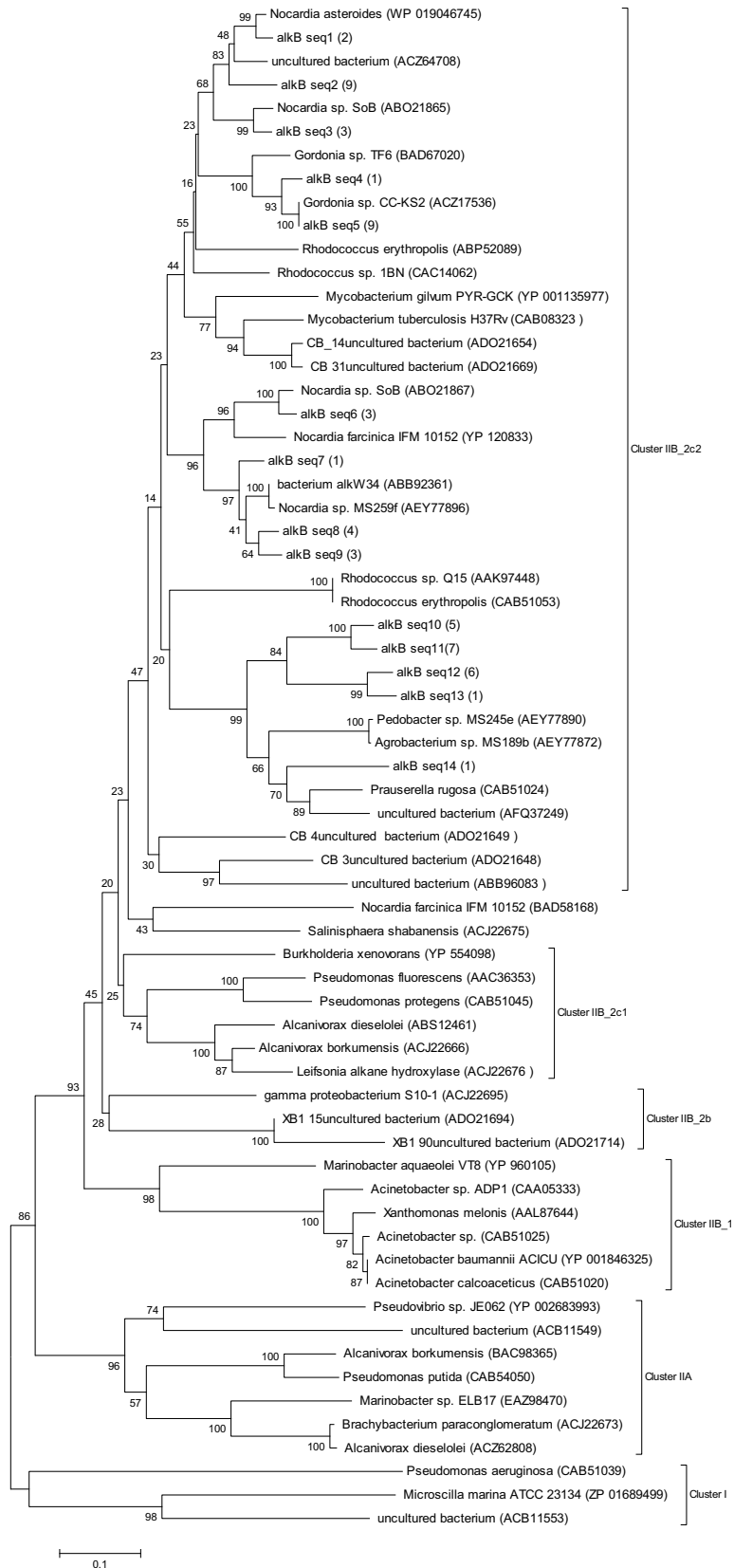


Figura 5.13. Árbol filogenético realizado con secuencias de aminoácidos de *alkB* obtenidas de la librería de clones y secuencias de referencia. La distancia generada mediante Muscle, se utilizó para construir el árbol mediante el método *Neighbour joining* utilizando Bootstrap con el software MEGA 5.10. El número entre paréntesis indica la cantidad de clones detectados.

5.3.1.2. Citocromo P450 monooxigenasa

Aunque las citocromo P450 son monooxigenasas, enzimas generalmente relacionadas con la degradación de alcanos, se logró amplificación en todos los microcosmos analizados, inclusive en aquellos con fracción de HAPs (F3). Para obtener la librería se decidió trabajar con tiempos representativos, incluyendo microcosmos control sin fuente de carbono (T3 y T15), microcosmos con fracción alifática (F1T3, F1T7 y F1T15), con fracción de HAPs (F3T3, F3T15) y con la combinación de ambas (F1F3T3 y F1F3T15). Se obtuvieron un total de 88 clones, de los cuales se analizó su secuencia. Igual que en el caso de *alkB*, una vez obtenidas las secuencias de nucleótidos se trabajó con sus secuencias de aminoácidos, que se agruparon utilizando un umbral de similitud del 97%, obteniéndose un total de 25 secuencias diferentes (Tabla 5.4, Figura 5.14).

Se detectaron secuencias de citocromo P450 a lo largo de toda la incubación. La mayoría de secuencias (15), presentaron máxima similitud con citocromos P450 de *Actinobacteria* [*Dietzia* (7), *Rhodococcus* (3), *Gordonia* (2), *Mycobacterium* (2) y *Patulibacter* (1)], mientras que el resto (10) correspondieron a secuencias de *Alphaproteobacteria* [*Sphingopyxis* (5), *Parvibaculum* (1), *Bradyrhizobium* (1) y *Rhizobiales* incultivables(3)].

Las secuencias relacionadas con *Dietzia* sp. se encontraron tanto en los microcosmos sin fuente de carbono, como en los microcosmos con F1, F3 y F1F3, pero en estos se detectan casi exclusivamente al inicio de la incubación (T3). Una secuencia idéntica a la del P450 de *Gordonia amicalis* (seq2) se encontró a los 15 días en los tres tipos de microcosmos, aunque en aquellos con F1 se detectó también a los 7d. Destaca también una secuencia 100% similar a un P450 de *Mycobacterium austroafricanum*, conocido por su capacidad de degradar HAPs, pero que se detectó en los tres tipos de microcosmos a la mitad de la incubación, siendo relativamente más frecuente en las muestras de microcosmos con F1. El resto de secuencias se presentaron bien en los microcosmos con F1, CYP450 seq2, seq11, seq12, seq15, seq18, seq20 y seq25 relacionadas con *Gordonia terrae*, *Patulibacter* sp, *Rhodococcus*, *Sphingopyxis*, *Parvibaculum*, uncultured *Rhizobiales* y *Mycobacterium xenopi*, respectivamente; o sólo con F3, como P450 seq13, seq14, seq16, y seq19, relacionadas con *Sphingopyxis* (3 de ellas) y *Bradyrhizobium*, se encontraron sólo en microcosmos con F3. Aparte de las ya mencionadas de *Dietzia*, *Gordonia* y *Mycobacterium austroafricanum*, en microcosmos con F1F3 no se detectaron otras P450 monooxigenasas.

Tabla 5.4. Propiedades de las secuencias aminoácidos de clones detectados en la librería de clones para Citocromo P450

Nombre	Enzima más proxima	Accession number ^a	Sim (%) ^b	MM		F1			F3		F1F3		Nº total de clones
				T3	T15	T3	T7	15	T3	T15	T3	T15	
CYP450 seq1	putative cytochrome P450 [<i>Gordonia amicalis</i>]	WP_006437590	100				2	2		3		2	9
CYP450 seq2	cytochrome P450 [<i>Gordonia terrae</i>]	ACP39683	93				1						1
CYP450 seq3	putative cytochrome P450 alkane hydroxylase [<i>Rhodococcus erythropolis</i>]	CAH56116	91						2				2
CYP450 seq4	cytochrome P450 CYP153, partial [<i>Dietzia</i> sp. H0B]	ACR56759	93	5	4	8			5		7		29
CYP450 seq5	cytochrome P450 CYP153, partial [<i>Dietzia</i> sp. H0B]	ACR56759	94								1		1
CYP450 seq6	cytochrome P450 CYP153, partial [<i>Dietzia</i> sp. H0B]	ACR56759	91	1			1		1			1	4
CYP450 seq7	cytochrome P450 CYP153, partial [<i>Dietzia</i> sp. H0B]	ACR56759	93								2		2
CYP450 seq8	cytochrome P450 CYP153, partial [<i>Dietzia</i> sp. H0B]	ACR56759	96	3	2						2		7
CYP450 seq9	cytochrome P450 CYP153, partial [<i>Dietzia</i> sp. H0B]	ACR56759	88		1	1							2
CYP450 seq10	cytochrome P450 CYP153, partial [<i>Dietzia</i> sp. H0B]	ACR56758	91	1									1
CYP450 seq11	cytochrome P450 [<i>Patulibacter</i> sp. 111]	WP_007578590	95					1					1
CYP450 seq12	putative cytochrome P450 alkane hydroxylase [<i>Rhodococcus opacus</i>]	CAH58710	85	1		1							2
CYP450 seq13	cytochrome P450 [<i>Sphingopyxis</i> sp. S16-14]	ACP39693	82	1									1
CYP450 seq14	cytochrome P450 [<i>Sphingopyxis</i> sp. S16-14]	ACP39693	87		1					1			2
CYP450 seq15	cytochrome P450 [<i>Sphingopyxis</i> sp. S16-14]	ACP39693	97					1					1
CYP450 seq16	cytochrome P450 alkane hydroxylase [<i>Sphingopyxis</i> sp. ITRI4]	ACH99206	87							1			1
CYP450 seq17	cytochrome P450 alkane monooxygenase [<i>Mycobacterium austroafricanum</i>]	ACJ06772	100			4	1		2		5		12
CYP450 seq18	cytochrome P450 [<i>Parvibaculum</i> sp. S18-4]	ACP39701	79					1					1
CYP450 seq19	cytochrome P450 [<i>Bradyrhizobium</i> sp. S23321]	YP_005453169	98						2				2
CYP450 seq20	cytochrome P450 [uncultured <i>Rhizobiales</i> bacterium]	ADF27267	99					1					1
CYP450 seq21	cytochrome P450 CYP153B7, partial [<i>Rhodococcus</i> sp. MOP100]	ABI14020	86		1								1
CYP450 seq22	cytochrome P450 [uncultured <i>Rhizobiales</i> bacterium]	ADF27267	83						1				1
CYP450 seq23	cytochrome P450 [uncultured <i>Rhizobiales</i> bacterium]	ADF27246	87		1								1
CYP450 seq24	cytochrome P450 alkane hydroxylase [<i>Sphingopyxis</i> sp. ITRI4]	ACH99206	87							1			1
CYP450 seq25	cytochrome P450 [<i>Mycobacterium xenopi</i>]	WP_003922646	77						2				2
Total de clones				12	10	10	8	9	9	10	12	8	88

a Enzima más próxima según la base de datos GenBank

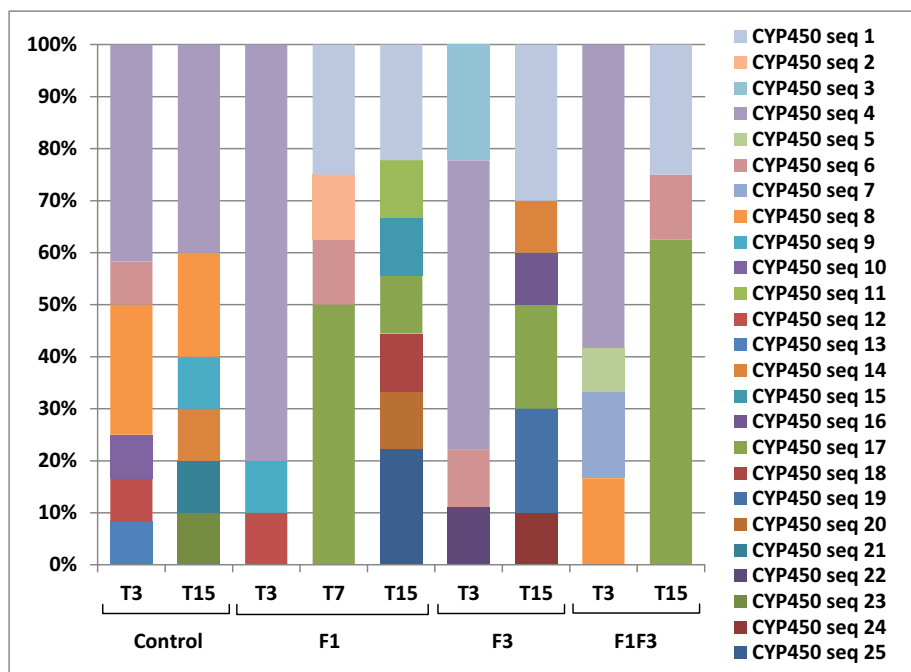


Figura 5.14. Abundancia relativa de clones en los diferentes tiempos y con las diferentes fracciones

De igual manera se realizó una búsqueda de secuencias de CYP450 en la bibliografía. Uno de los trabajos más recientes, realizado por Alonso-Gutiérrez et al (2011), que estudia el papel de *Dietzia* sp. H0B en la degradación de alcanos en una playa afectada por el derrame de fuel oil del Prestige. Se obtuvo un árbol utilizando nuestras secuencias y las secuencias utilizadas en su trabajo, se observó que nuestras secuencias se encontraban en 4 de los Clusters descritos por ellos y Kubota et al., (2005) mediante análisis filogenéticos (Figura 5.15): 12 secuencias se encontraban en el Cluster CYP153A, 11 secuencias en el Cluster CYP153B, 1 secuencia en el Cluster CYP153 C,D y 1 secuencia en el cluster fuera de grupo.

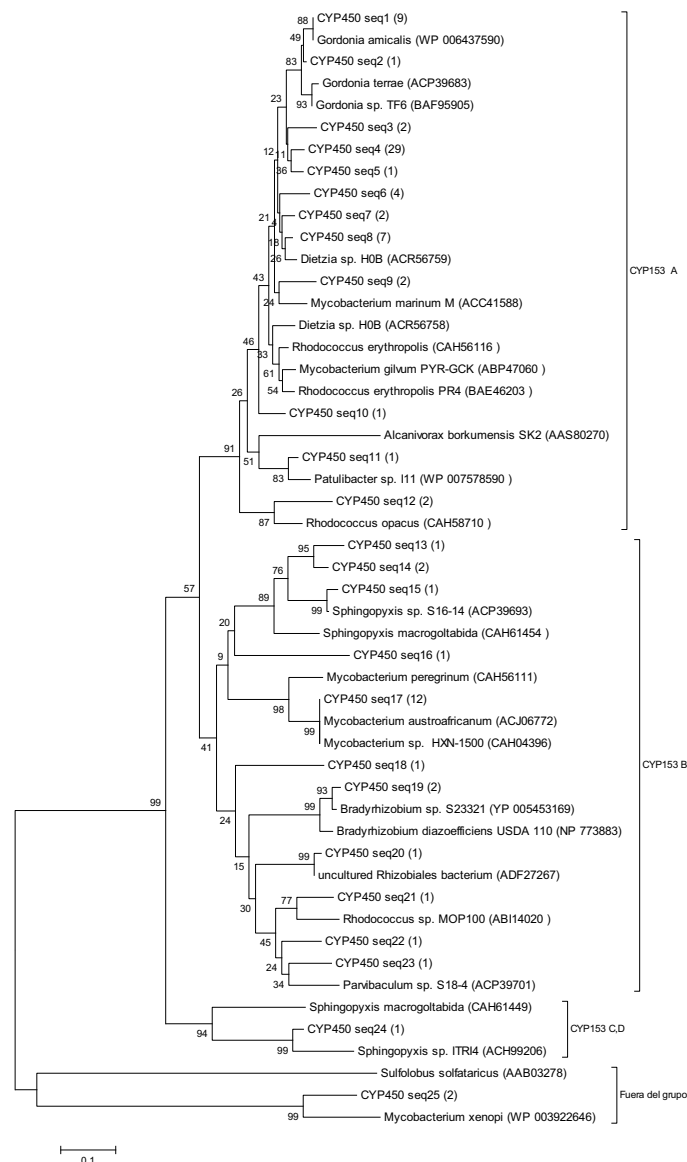


Figura 5.15. Árbol filogenético, realizado con secuencias de aminoácidos de Citocromo P450 obtenidas de la librería de clones y secuencias de referencia. La distancia del árbol fue generada mediante ClustalW, y el árbol se construyó mediante el método *Neighbour joining* utilizando Bootstrap con el software MEGA 5.10. Entre paréntesis se muestra el número de clones detectados.

5.3.1.3 Dioxigenasas de HAPs en Gram-negativos (Cebadores Clase B)

Con los cebadores de clase B se consiguió amplificar dioxigenasas de Gram-negativos en todos los microcosmos, inclusive en aquellos con sólo fracción alifática (F1). Tal y como se ha descrito para los enzimas anteriores, se utilizaron como molde muestras de tiempos representativos (Tabla 5.5). Se obtuvieron un total de 99 clones, que se secuenciaron y tradujeron, y las secuencias de aminoácidos obtenidas se agruparon con un umbral de similitud del 97%. Sorprendentemente, todas las secuencias analizadas correspondían a una secuencia única que presentaba una similitud del 100% con una Naftaleno dioxigenasa de *Pseudomonas stutzeri* (*Gammaproteobacteria*) (Tabla 5.5).

Tabla 5.5. Propiedades de las secuencias aminoácidos de clones detectados en la librería de clones de Clase B (dioxigenasas de HAPs en gram negativos)

Nombre	Enzima más proxima	Accession number ^a	Sim (%) ^a	MM		F1			F3		F1F3		Nº total de clones
				T3	T15	T3	T7	T15	T3	T15	T3	15	
Naph diox	naphthalene dioxygenase iron sulfur protein [<i>Pseudomonas stutzeri</i>]	AAG25684	100	10	10	11	17	10	12	10	12	7	99

^a Enzima más próximo según la base de datos GenBank

Esta secuencia única se detectó en todos los tiempos de incubación y en cada una de las condiciones ensayadas, incluyendo el control con medio mineral sin fuente de carbono. Es especialmente interesante su presencia en los microcosmos con sólo fracción alifática.

Esta secuencia se relacionó con la de otras naftaleno dioxigenasas presentes en la literatura y se obtuvo un árbol filogenético conjunto basado en el obtenido por Brett et al (2003). Se observó que nuestra secuencia (Naphdiox seq) se encontraba en un cluster formado por dioxigenasas de varias especies de *Pseudomonas* y que incluía las naftaleno dioxigenasas *nahAc*, *ndoC2*, *DoxB*, *nahA3* y *pahA3*. La más cercana a la encontrada en este trabajo era *nahAc* de *Pseudomonas stutzeri* AN10 (Figura 5.16), que se ha tomado como modelo de degradadora de naftaleno (Brunet-Galmés et., 2012).

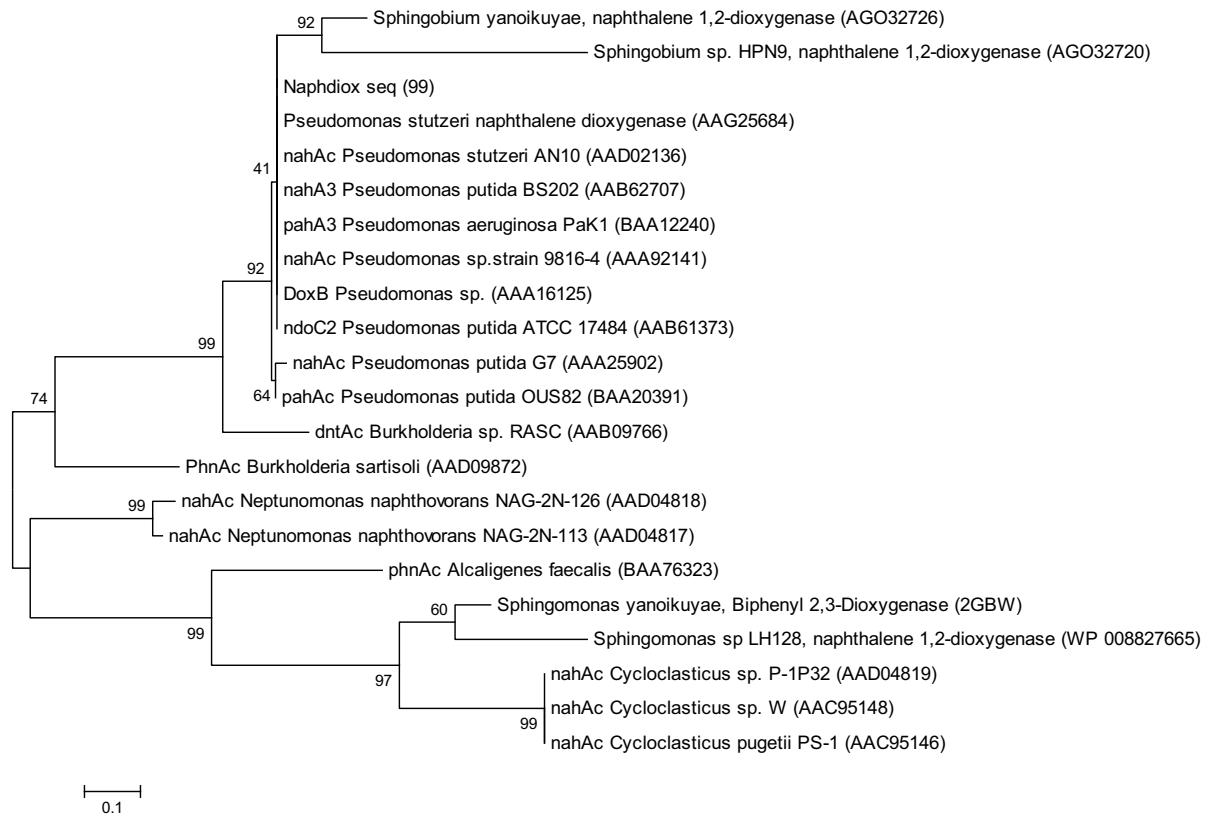


Figura 5.16. Árbol filogenético, realizado con secuencias de aminoácidos de dioxigenasas de HAPs de Gram negativos (Clase B), obtenidas de la librería de clones y secuencias de referencia. La distancia se generó mediante ClustalW, y el árbol se construyó con el método de *Neighbour joining* utilizando Bootstrap con el software MEGA 5.10. Entre paréntesis se muestra el número de clones detectados.

5.3.1.4. Tolueno/bifenil dioxigenasas (Cebadores Clase D)

Tal y como se ha descrito para los cebadores de clase B, con los cebadores de clase D también se logró amplificación en todos los microcosmos, inclusive en los microcosmos con fracción alifática (F1), en los mismos tiempos representativos utilizados para el resto de análisis. Se obtuvieron un total de 87 clones, que tras agrupar sus secuencias de aminoácidos de la misma forma que en los casos anteriores, dieron lugar a 9 secuencias diferentes (Tabla 5.6, Figura 5.17).

Tabla 5.6. Propiedades de las secuencias aminoácidos detectadas en la librería de clones de Clase D (Tolueno/Bifenil dioxigenasa)

Nombre	Enzima más proxima	Accession number ^a	Sim (%) ^a	MM		F1			F3		F1F3		Nº total de clones	
				T3	T15	T3	T7	T15	T3	T15	T3	T15		
Biphe seq1	putative Rieske non-heme iron oxygenase alpha subunit [uncultured <i>Pseudoxanthomonas</i>]	AAZ95321	100	1	8				3		3	2	7	24
Biphe seq2	ring hydroxylating dioxygenase subunit alpha [<i>Pseudoxanthomonas spadix</i> BD-a59]	YP_004930555	97										1	1
Biphe seq3	ring hydroxylating dioxygenase subunit alpha [<i>Pseudoxanthomonas spadix</i> BD-a59]	YP_004930555	99										3	3
Biphe seq4	biphenyl dioxygenase biphenyl dioxygenase [uncultured <i>Polaromonas</i>]	ADW95848	99							1				1
Biphe seq5	biphenyl 2,3-dioxygenase alpha subunit, partial [<i>Pseudomonas</i> sp. S210]	ACZ56174	99								1			1
Biphe seq6	biphenyl 2,3-dioxygenase alpha subunit [<i>Pseudomonas</i> sp. S9(2010)]	ACZ56176	100	9		12	6	6	8	6	7			54
Biphe seq7	biphenyl dioxygenase subunit alpha [<i>Achromobacter</i> sp. BP3]	ACF20634	100	1										1
Biphe seq8	biphenyl 2,3-dioxygenase alpha subunit [<i>Pseudomonas</i> sp. S9(2010)]	ACZ56176	80				1							1
Biphe seq9	biphenyl 2,3-dioxygenase alpha subunit [uncultured <i>Rhodococcus</i> sp.]	AEP31943	93				1							1
Total de clones				11	8	12	8	9	8	10	10	11	87	

a Enzima más próxima según la base de datos GenBank

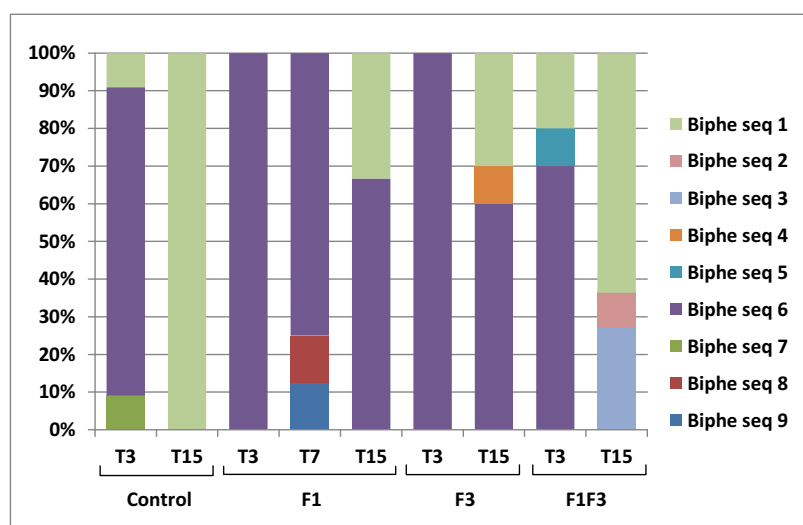


Figura 5.17. Abundancia relativa de clones en los diferentes tiempos y con las diferentes fracciones

Se observa que 8 de las 9 secuencias presentan máxima similitud con miembros de *Proteobacteria* [6 *Gammaproteobacteria* (*Pseudoxanthomonas*, *Pseudomonas*) y 2 *Betaproteobacteria* (*Polaromonas*, *Achromobacter*)], mientras que la otra secuencia correspondería a una bifenil dioxigenasa de *Actinobacteria* (*Rhodococcus*).

Las secuencia más frecuente (62% de los clones analizados) es Biphe seq6, 100% similar a una bifenil 2,3-dioxigenasa de una cepa de *Pseudomonas* degradadora de bifenil. Esta secuencia se encuentra en todas las condiciones y en prácticamente todos tiempos analizados, a excepción del T15 de los microcosmos F1F3. Un comportamiento similar lo presenta la secuencia Biphe seq 1 (28% de los clones analizados), relacionada con una dioxigenasa de *Pseudoxanthomonas*. Si descontamos estas dos secuencias, el resto (7) corresponden a únicamente 9 de los clones analizados, obtenidos en su mayoría a partir de microcosmos F1F3 (como por ejemplo seq2 y 3, identificadas como dioxigenasas de *Pseudoxanthomonas spadix*).

Estas secuencias se compararon con otras descritas en la literatura, como las obtenidas por Taylor et al. (2002) a partir de la detección de una serie de nuevos genes de dioxigenasas dihidroxilantes en bacterias del suelo degradadoras de hidrocarburos. El árbol filogenético corrobora los resultados obtenidos en la búsqueda en GeneBank, mostrando que casi la totalidad de nuestras secuencias encajan en el clúster de las bifenil dioxigenasas de *Proteobacterias*, con la excepción de la secuencia 9, que tal y como había determinado la comparación con las bases de datos mediante BLAST, correspondía al clúster de bifenil dioxigenasas de *Rhodococcus* (Figura 5.18).

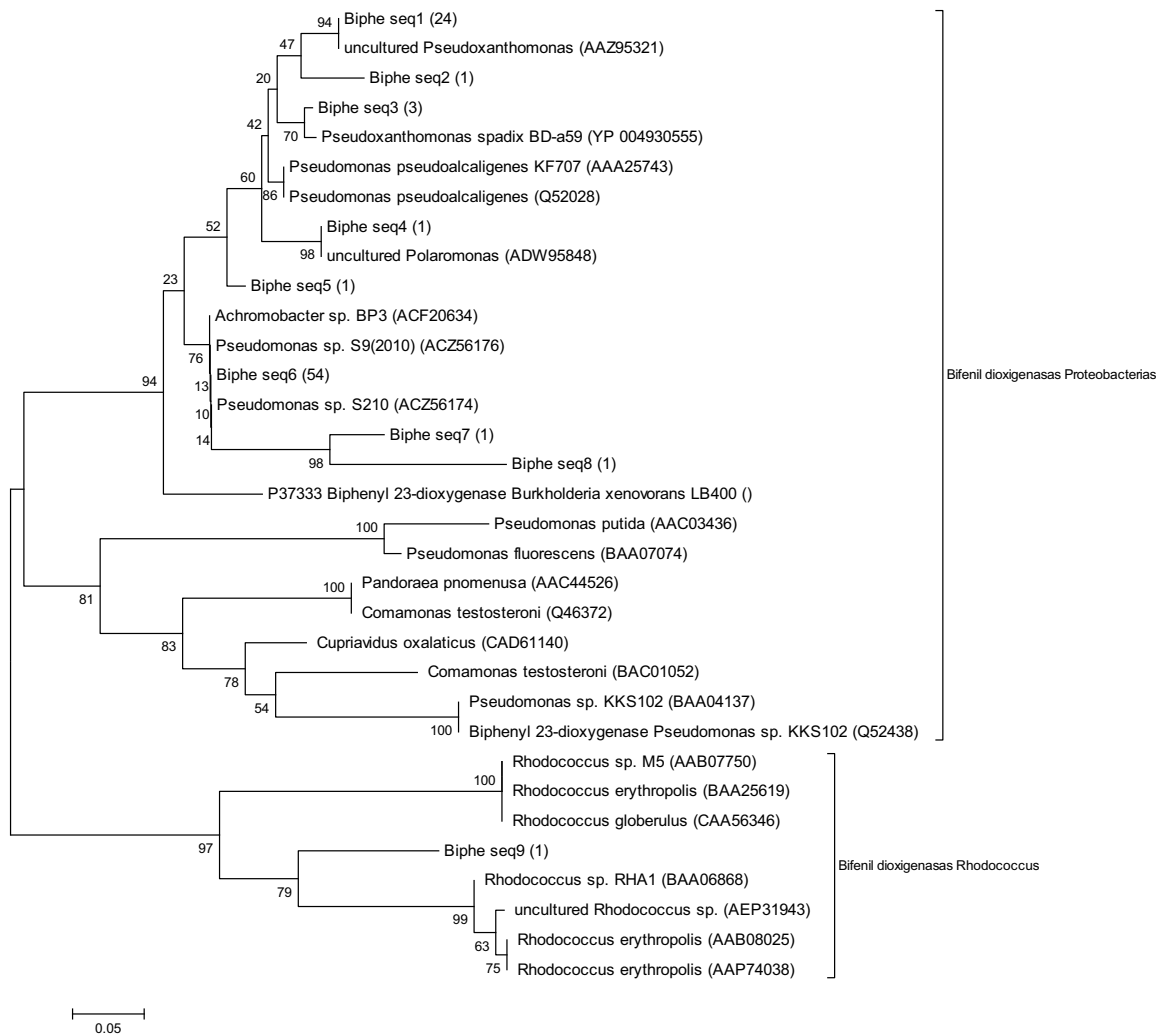


Figura 5.18. Árbol filogenético realizado con secuencias de aminoácidos de dioxigenasas de Clase D (Touleno/Bifenil dioxigenasas de HAPs de Gram negativos) obtenidas de la librería de clones y secuencias de referencia. La distancia se calculó mediante ClustalW, y el árbol se construyó con el método *Neighbour joining* utilizando Bootstrap con el software MEGA 5.10. Entre paréntesis se indican el número de clones detectados.

5.3.1.5. Detección de genes funcionales a lo largo de la incubación en los distintos microcosmos

Oxigenasas detectadas en microcosmos con fracción alifática (F1)

El análisis mediante librerías de clones de genes funcionales de los microcosmos F1 solo se realizó para cubrir los periodos de máxima degradación. Algunas secuencias de *alkB* y de P450 con alta similitud con enzimas descritos en *Agrobacterium* (Alfaproteobacterias) y *Dietzia* (*Actinobacteria*), son importantes a los 3 días, pero a los 7 días, cuando se inicia la degradación de alcanos de cadena corta y media, se detectan valores máximos en tres secuencias *alkB* y tres de P450 distintas que corresponden a dos géneros de *Actinobacteria* (*Gordonia* y *Nocardia*). Ello indicaría la participación de estos enzimas en la degradación de alcanos de cadena corta. Entre los 7 y 15 días, la degradación del grueso de los alcanos coincide con máximos de secuencias de dos homólogos de *alkB* descritos en *Nocardia*, así como de oxigenasas P450 de *Mycobacterium* y *Gordonia*. Por lo tanto, queda claro el papel clave de *Actinobacteria* en la degradación de alcanos. Estos resultados son consistentes con los encontrados en el análisis de poblaciones mediante pirosecuenciación. Por otro lado, estas monooxigenasas podrían actuar de forma cometabólica sobre grupos metilo de los HAPs alquilados si estos están presentes. (Buscar en la bibliografía si esta capacidad está descrita para los enzimas encontrados, para la discusión). De hecho, se ha descrito que una cepa de *Parvibaculum*, del que se ha detectado también una citocromo P450 a los 15 días, degrada alcanos y alquibencenos (Schleheck et al., 2004).

Como se esperaba, en las dioxigenasas detectadas, no se observaron cambios relevantes en sus abundancias relativas en los microcosmos incubados con F1, de 3 a 15 días. Además, estos enzimas se detectaron también en los controles sin fuente de carbono. Al parecer las bacterias que alojan estas dioxigenasas se encontraban ya de forma importante en el inóculo y han persistido. Por ejemplo, la abundancia de la naftaleno dioxigenasa de *Pseudomonas stutzeri* es consistente con la abundancia de esta bacteria al inicio de la incubación y su persistencia en los controles sin fuente de carbono. Sólo un bifenil dioxigenasa correspondiente a *Pseudoxanthomonas* mostró un incremento a los 15 días. De igual manera ello es coherente con la detección de este género mediante pirosecuenciación.

Oxigenasas detectadas en microcosmos con fracción de HAPs (F3)

La falta de amplificación de alcano hidroxilasas en estos microcosmos demuestra su baja importancia relativa a lo largo de la incubación con HAPs. Sin embargo, los genes de citocromo P450 sí presentaron una buena amplificación. Los detectados mayoritariamente a los 3 días (T3), correspondientes a *Actinobacteria* (*Dietzia* sp. HOB, *Rhodococcus*), habían sido también detectados en los microcosmos con F1. Ninguna de estas enzimas fueron detectadas a los 15 días, siendo sustituidas por una P450 de *Gordonia amicalis*, que también se había observado en microcosmos con F1, y varias enzimas P450 no detectadas anteriormente y asignadas a miembros de *Alfaproteobacteria* como *Bradyrhizobium* sp. (*Rhizobiales*) y *Sphingopyxis* (*Sphingomonadales*).

La naftaleno dioxigenasa de *P. stutzeri*, y las bifenil dioxigenasas de *Pseudomonas* sp. S9 y *Pseudoxanthomonas spadix*, presentaron un comportamiento similar al observado en los microcosmos con F1, la última ganando importancia a los 15 días. Sin embargo, en ese mismo tiempo, en los cultivos con la fracción de HAPs se detectó otra bifenil dioxigenasa similar a las detectadas en miembros de *Polaromonas*.

Oxigenasas en microcosmos con fracciones alifática y de HAPs combinadas (F1F3)

En cuanto a las alcano hidroxilasas, a los 3 días se detectaron también homólogos de alkB descritos en *Agrobacterium* sp., que no aparecieron a los 15 días. A diferencia de estos, se detectó una alkB atribuible a *Pedobacter*, miembro de la familia *Sphingobacteriaceae* que se mantuvo a niveles similares en los dos puntos. A los 15 días, tal y como se había observado también en los microcosmos con alcanos, se detectaron homólogos de alkB de *Nocardia* (*Nocardia asteroides*, *Nocardia* sp) no observados en cultivos con F1. La abundancia de estos genes puede relacionarse directamente con la utilización de alcanos de cadena media y larga, pero su presencia podría sin duda tener un efecto cometabólico sobre los grupos metilo de alquil HAPs.

A los tres días se observó la presencia de tres homólogos de citocromos P450 que corresponderían a *Dietzia* y que ya se habían detectado en los cultivos con F1. Se podría deducir la participación de estas enzimas en la degradación de alcanos de cadena corta, pero lo cierto es que a los 3 días la degradación de estos compuestos es mínima.

A los 15 días, estos genes fueron completamente substituidos por distintos citocromos P450 de *Gordonia* así como una alkB de *Dietzia* no detectada a los 3 días. Ello parece indicar que *Gordonia* jugaría un papel importante en la degradación del grueso de los alcanos, a través de su oxidación catalizada por citocromo P450 hidroxilasas.

La presencia de una naftaleno dioxigenasa de *Pseudomonas stutzeri* no parece ser crítica para la degradación de HAPs, ya que se detectó de igual modo en microcosmos con F1 y con F3. Sin embargo, sorprende la no detección de otras dioxigenasas. La pregunta que se plantea es si las dioxigenasas necesarias para la degradación de aromáticos alquilados son distintas a las implicadas en la degradación de compuestos no metilados. Las bifenil dioxigenasas de *Pseudomonas* son importantes a los 3 días, pero a los 15 días son completamente reemplazadas por varias bifenil dioxigenasas (3) similares a las detectadas en miembros de *Pseudoxanthomonas spadix*. Este cambio en las bifenil dioxigenasas es interesante, y junto a la ausencia de otras dioxigenasas, nos permite hipotetizar que podrían jugar un papel importante en el ataque bien a los HAP metilados o a sus metabolitos (ácidos carboxílicos aromáticos).

5.3.2. Detección de genes involucrados en la degradación de HAPs mediante *Microarrays*

Para esta parte del trabajo se utilizó un *microarray* diseñado por el grupo de investigación del Dr. Pierre Peyret y la Dra. Corinne Petit para la detección de una gran variedad de genes involucrados en la degradación de contaminantes orgánicos, entre ellos los HAPs. El desarrollo y validación de esta herramienta no han sido publicados todavía y el grupo tenía gran interés en probarlo en nuestro tipo de muestras.

Este *microarray* incorporaba sondas diseñadas a partir de unas 1.500 secuencias nucleotídicas correspondientes a más de 600 genes codificantes para enzimas implicadas en rutas de biodegradación aerobias y anaerobias de contaminantes orgánicos, sobre todo de HAPs, bifenilos policlorados (PCBs) y disolventes clorados.

Se trabajó con los extractos de DNA obtenidos en la UB a partir de los microcosmos, empleados también para el análisis de la diversidad bacteriana mediante pirosecuenciación y la construcción de librerías de clones de genes funcionales. Los extractos de ADN de cada una de las 3 réplicas de los microcosmos de cada tiempo y

condición, se combinaron y este ADN genómico se marcó con los colorantes fluorescentes para su posterior hibridación con el *microarray*, tal como se describe en materiales y métodos.

Después de la hibridación, los *microarrays* fueron escaneados, y la intensidad de los píxeles se cuantificó, obteniendo informes con las intensidades de señal para cada punto del *array* vinculadas a su identificador de sonda correspondiente. A continuación se normalizaron los datos y se obtuvieron los resultados en SNR (intensidad de la señal de la sonda en relación al ruido de fondo). Señales inferiores a 5 fueron descartadas por no ser significativas. Aquí, para simplificar el análisis de los datos se recogen sólo los resultados con valores de SNR de 7,5 o superiores.

Aunque el *microarray* incluía una gran variedad de genes, aquí se esperaban detectar únicamente aquellos vinculados a las rutas de degradación de HAPs u otros compuestos aromáticos, tanto bacterianos como fúngicos. De hecho, así fue, obteniéndose resultados para una variedad de dioxigenasas bacterianas que incluían dioxigenasas dihidroxilantes del naftaleno y del bifenil, de *meta*-ruptura del bifenil, dihidroxilantes del benzoato, de ruptura de catecol y del hidroxiquinol, y, en menor proporción, de antranilato y clorocatecol. Además se detectaron, pero con poca intensidad, algunas peroxidasas de hongos ligninolíticos. Sin embargo, sorprendió tener resultados negativos para otras enzimas que se consideran claves en la degradación de HAPs en suelos y que se encontraban en el *microarray*. Algunas de ellas son carbazol 1,9a-dioxigenasa (carAa); dibenzofurano dioxigenasa; ftalato 3,4-dioxigenasa; ftalato 4,5 dioxigenasas; naftaleno 1,2 dioxigenasas (narAa), (phnA1), (phnA1b), y (phnAc); naftaleno dioxigenasas de Gram-positivos (nidA, pdoA1) y (nidA3); pireno dioxigenasas también de Gram-positivos (pdoA2, pdoA, phdA), (pdoX, nidX) y (phdF, pdoF); y salicilato hidroxilasa. En los extractos de ADN de los microcosmos recién inoculados (0 días) se detectaron muy pocos genes, lo que podría deberse a la poca cantidad de inóculo utilizada (equivalente al lixiviado de 50 mg de suelo). De hecho, la pirosecuenciación del extracto de estos microcosmos no produjo resultados, y hubo que repetirla con extractos obtenidos directamente del suelo utilizado como inóculo. Recordemos que en este caso se obtuvo una gran diversidad (Figura 5.8). Esto explicaría también la poca señal obtenida en los *microarrays*.

Cuando se analizaron los resultados de los controles sin fuente de carbono, sorprendió que a los 3 días de incubación se había producido un importante incremento en algunos de los enzimas (Anexo 1). En la mayoría casos, después de un máximo a los 3 días, las abundancias disminuyeron rápidamente, pero en otros

permanecieron aproximadamente constantes. Genes que mostraron un especial incremento en controles sin fuente de carbono fueron: varias naftaleno dioxigenas de gram-negativos del grupo de (nagAc, pahAc, pahC, RobertDuran, ndoB, doxB, nahAc, y phnAc) (cluster 2_2, 2_4, 2_5, 2_8), una toluato dioxigenasa del grupo de xylX (58) de *Pseudomonas*, 1,2-dihidroxinaftaleno dioxigenasas del grupo de (nahC, pahC y doxG) (21_2 y 21_3) de *Pseudomonas*, una bifenil 2,3-dioxigenasa de del grupo (313) de *Pseudomonas*, una 2,3-dihidroxi-bifenil dioxigenasa del grupo de bphC (37) y catecol 2,3-dioxigenasas del grupo (xylE, bztE, bphE, nahH) (37, 4_1, 4_2) de varias proteobacterias.

Aparentemente este aumento se debe al crecimiento oligotrófico inespecífico de cepas bacterianas que llevan estos genes. Dado el origen del inóculo, no es sorprendente que algunas bacterias que crecieron a costa de materiales de reserva o de trazas de materia orgánica introducida con el inóculo, puedan contener genes de degradación.

En general, los enzimas con valores elevados en los controles, cuando se detectaron en cultivos siempre mostraron un máximo a 3 días y luego disminuyeron. Ello, unido al hecho que todos los microcosmos mostraron una degradación mínima a tiempo 3, recomendaba que no fueran considerados en la discusión de los microcosmos con fracciones. Además, estos resultados deben de tenerse en cuenta también al interpretar los obtenidos en las librerías de genes funcionales, ya que en ellas se observó también un incremento de determinados genes de oxigenasas a los tres días.

De acuerdo con lo expuesto, aquí presentaremos los resultados de aquellos enzimas que mostraron incrementos en los cultivos no detectados en controles sin fuente de carbono, y cuya presencia, por tanto, puede ser directamente atribuible a la respuesta de las poblaciones a la presencia de la fracción concreta de hidrocarburos. De todas las secuencias de genes presentes en el *microarray*, dieron resultados positivos, con una evolución distinta de los controles, un total de 78.

Microcosmos con fracción alifática (F1)

En estos microcosmos no se esperaba un aumento de los genes de dioxigenasas a lo largo de la incubación, sin embargo, en unos pocos casos se observó un incremento importante. Aumentó el número de copias de los genes codificantes para naftaleno 1,2-dioxigenasas de tipo (bphA1f, phnA1a) (bphA1b) (bphA1a, bphA1e) (cluster 59, 146, 156, 180), tolueno dioxigenasa xylX (127), y bifenil 2,3-dioxigenasa (173) de

Sphingomonas, además de los de la 2,3-dihidroxibifenil 1,2-dioxigenasa (bphC) (101) de *Sphingomonas* y de edoC (100) de *Rhodococcus*; todas ellas mostrando máximos a los 7 días (SNR entre 74-207) (ver Figura 5.19). Una catecol 1,2-dioxigenasa del grupo (687) de *Rhizobium* también mostró un incremento con máximo a los 30 días (SNR 139).

Considerando que ni las dioxigenasas dihidroxilantes ni las de ruptura del anillo pueden asociarse a rutas productivas de degradación de alcanos, debemos asumir que el aumento en el número de copias génicas de estas enzimas se debe a, i) que las cepas que las albergan poseen también enzimas de degradación de alcanos, o a ii) que la oxidación de alcanos proporciona metabolitos intermedios (por ejemplo productos del metabolismo central), que favorecerían la multiplicación de estos microorganismos. La segunda posibilidad parece menos probable, ya que ese tipo de sustratos provocaría un crecimiento más generalizado de las poblaciones presentes en el inóculo, produciendo un incremento similar en una mayor variedad de poblaciones, lo que resultaría en el aumento en una diversidad más elevada de enzimas. De hecho, la detección de enzimas con valores de SNR entre 7,5 y 40, algunas de las cuales se detectaron también en los microcosmos control y otras no, podría explicarse por este efecto.

Un tercer grupo de genes codificantes para enzimas relacionadas con la degradación de HAPs aumentaron durante la incubación, alcanzando valores de SNR entre 37-51, a los 15-30 días. A este grupo pertenecen varias dioxigenasas de Gram-positivos (*Actinobacteria*), como por ejemplo una benzoato 1,2-dioxigenasa (73) y catecol 1,2-dioxigenasas de *Mycobacterium* (681), *Gordonia* (676) o *Rhodococcus* (294). En este caso en particular, sí está demostrado que varias cepas de *Mycobacterium* son capaces de utilizar tanto alcanos de cadena larga como HAPs para el crecimiento, por lo tanto el incremento en los genes de dioxigenasas quedaría claramente explicado por la multiplicación de las cepas que los albergan a expensas de la utilización de los alcanos de la F1.

Microcosmos con fracción de HAPs (F3)

Estos microcosmos solo poseen como única fuente de carbono HAPs, el sustrato de las dioxigenasas. Los genes codificantes para dioxigenasas que claramente incrementaron en número de copias como respuesta al crecimiento utilizando los HAPs de la F3 del crudo, fueron dioxigenasas de grupos asociados a *Sphingomonas* y a

Novosphingobium. Cinco naftaleno 1,2-dioxigenasas de grupos distintos de enzimas de *Sphingomonas* presentaron un incremento significativo. Cuatro de ellas, (bphA1a) (bphA1b) (bphA1e) (bphA1f, phnA1a) (156, 146, 180, 59), de las cuales 3 son homólogas a las detectadas en *Sphingomonas yanoikuyae*, presentaron valores máximos de SNR (78-121) a los 30 días. Es interesante que 3 de estos genes (146, 156 y 180) también se incrementaron en número de copias en los microcosmos con F1, pero con diferente cinética, puesto que en estos microcosmos F1 llegaron a valores máximos a los 7 días de incubación. La quinta naftaleno 1,2-dioxigenasa perteneciente al cluster de (phnA1b, bphA1) (83) de Sphingomonadales (83), presentó un valor máximo a los 7 días, pero no fue detectada en los microcosmos con F1. Una naftaleno 1,2-dioxigenasa (phnAc) (263) descrita en *Novosphingobium*, presentó un aumento importante con máximos entre los 7 y los 15 días (SNR 183-177) (ver Figura 5.19).

Otros genes de dioxigenasas homólogas a enzimas de *Sphingomonas* que multiplicaron también su número de copias a diferentes tiempos, fueron una tolueno dioxigenasa (xylX)(127) y una bifenil 2,3-dioxigenasa (bphA1c) (173), que presentaron valores máximos a 30 días (SNR 111 y 84, respectivamente), y una 2,3-dihidroxibifenil 1,2-dioxigenasa (bphC, phnC, dmdC) (48), que mantuvo valores altos a lo largo de toda la incubación (SNR 188, a los 7 días). Varis genes de catecol 2,3-dioxigenasas homólogas a las de un grupo de *Sphingomonas* (xylE, catE, cmpE, catA, nahH) (8_1 a 8_4) mostraron también incrementos importantes a través de toda la incubación, lo que es coherente con el aumento en las copias de genes de las enzimas anteriores, que las preceden en las rutas de degradación de HAPs. Estas catecol 2,3-dioxigenasas presentaron valores muy bajos o no fueron detectadas en los microcosmos con F1.

Se observa también que las dioxigenasas de Gram-positivos no presentaron aumentos importantes, aunque algunas de ellas fueron detectadas con valores bajos (SNR 5-14), como catecol 1,2-dioxigenasas de *Gordonia* (674, 676) y de *Mycobacterium* (681). En general, las dioxigenasas se detectaron en menor número en comparación con las detectadas en los microcosmos con F1.

Microcosmos con fracciones alifática y de HAPs combinadas (F1F3)

En general, algunos de los enzimas que presentaron los incrementos más elevados en los microcosmos con F1 o con F3, también aumentaron en estos microcosmos. Los genes codificantes para naftaleno 1,2-dioxigenasas que mostraron el mayor aumento

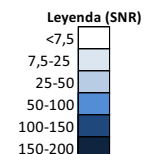
en número de copias fueron homólogos de tres grupos de enzimas [(phnA1b, bphA1c), (bphA1e), (catA, catA2)] (83, 180, 263) de *Sphingomonas* y *Novosphingobium*. Dos de ellas (83 y 263), habían sido detectadas únicamente en los microcosmos con HAPs, mientras que la tercera (180), que había aumentado tanto en los microcosmos con alcanos como en los que contenían HAPs pero con cinéticas muy distintas, mostró aquí una combinación de ambas (ver Figura 5.19).

Otros genes de dioxigenasas que presentaron un aumento a lo largo de tiempo en los microcosmos F1F3 fueron los de la 2,3-dihidroxibifenil 1,2-dioxigenasa (bphC, phnC, dmdC) (48) y los de catecol 2,3-dioxigenasas (xylE, catE, cmpE, catA, nahH) (8_1, 8_2) de *Sphingomonas*, que habían mostrado incrementos únicamente en los microcosmos con F3. Aunque la degradación de HAPs fue más rápida y más extensa en los microcosmos con F1 y F3, los valores de SNR detectados para los genes de estas dioxigenasas en estos microcosmos no fueron más elevados que los observados en los microcosmos con F1 o con F3, individualmente.

Varios genes de dioxigenasas que aumentaron notablemente en los microcosmos con alcanos (F1) (173, 100, 101, 687) o con HAPs (F3) (tolueno dioxigenasa xylX, naphthaleno-1,2-dioxigenasas (bphA1f, phnA1a) (bphA1b) (bphA1a), bifenil dioxigenasa (bphA1c), y catecol dioxigenasa (xylE, catE, cmpE, catA, nahH) (127, 59, 146, 156, 173, 8_1) todas de *Sphingomonas*, presentaron valores bajos de SNR en los microcosmos con ambas fracciones (F1F3). El primer grupo no sorprende puesto que, como mencionamos anteriormente, su incremento podría deberse a la degradación de alcanos. Sin embargo, el segundo grupo representa un resultado muy interesante, sugiriendo que los mecanismos (rutas) por los que los HAPs son degradados en presencia de la fracción alifática (F1), son distintos a los que se seleccionan en su ausencia. Este resultado, junto al de mayor degradación de la fracción de HAPs (F3) en presencia de alcanos, y al hecho mencionado anteriormente de que los genes detectados no presentan valores más elevados en los microcosmos con F1F3 que en los que contienen sólo F3, es consistente con que en la degradación de HAPs cuando estos se encuentran inmersos en una matriz de alifáticos participa un conjunto de enzimas distinto que cuando los alcanos no están presentes. Tal vez sean necesarias dioxigenasas distintas para la degradación de productos cometabólicos producidos por la acción fortuita de las numerosas alcano hidroxilasas activas como resultado del crecimiento de la población degradadora de los alcanos. Estas dioxigenasas no son conocidas todavía y por lo tanto no se encontraban en el *microarray* utilizado.

Cluster	Organismo	Función	Con	F1					F3				F1F3							
			T0	T3	T7	T15	T30	T3	T7	T15	T30	T3	T7	T15	T30					
127	<i>Sphingomonas</i> sp.	Toluene_dioxygenase (xylX,)																		
59	<i>Sphingomonas</i> sp.	Naphthalene_1,2_dioxygenase (bphA1f, phnA1a)																		
83	<i>Sphingomonas</i> sp.	Naphthalene_1,2_dioxygenase (bphA1b, bphA1c)																		
146	<i>Sphingomonas yanoikuyae</i>	Naphthalene_1,2_dioxygenase (bphA1b)																		
156	<i>Sphingomonas yanoikuyae</i>	Naphthalene_1,2_dioxygenase (bphA1a)																		
180	<i>Sphingomonas yanoikuyae</i>	Naphthalene_1,2_dioxygenase (bphA1e)																		
263	<i>Novosphingobium</i> sp.	Naphthalene_1,2_dioxygenase (phnAc)																		
144	<i>Polaromonas naphthalenivorans</i>	Biphenyl_2,3_dioxygenase																		
173	<i>Sphingomonas</i> sp.	Biphenyl_2,3_dioxygenase (bphA1c)																		
250	<i>Acidovorax</i> sp.	Biphenyl_2,3_dioxygenase (bphA)																		
46	<i>Burkholderia cepacia</i>	2,3_dihydroxybiphenyl_1,2_dioxygenase (bphC, bphC2)																		
48	<i>Sphingomonas</i> sp.	2,3_dihydroxybiphenyl_1,2_dioxygenase (bphC, phnC, dmdC)																		
68	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	2,3_dihydroxybiphenyl_1,2_dioxygenase (bphC)																		
94	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	2,3_dihydroxybiphenyl_1,2_dioxygenase (bphC7, bphC)																		
96	<i>Rhodococcus</i> sp.	2,3_dihydroxybiphenyl_1,2_dioxygenase (edoC)																		
98	<i>Rhodococcus</i> sp.	2,3_dihydroxybiphenyl_1,2_dioxygenase (bphC2)																		
100	<i>Rhodococcus opacus</i>	2,3_dihydroxybiphenyl_1,2_dioxygenase (edoB)																		
101	<i>Sphingomonas</i> sp.	2,3_dihydroxybiphenyl_1,2_dioxygenase (bphC)																		
220	<i>Rhodococcus equi</i>	2,3_dihydroxybiphenyl_1,2_dioxygenase (bphC)																		
241	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	2,3_dihydroxybiphenyl_1,2_dioxygenase																		
70_1	<i>Rhodococcus</i> sp.	2,3_dihydroxybiphenyl_1,2_dioxygenase (bphC, bphC6)																		
23	<i>Burkholderia mallei</i>	Benzoate_1,2_dioxygenase (benA)																		
57	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Benzoate_1,2_dioxygenase (benA)																		
72	<i>Burkholderia</i> sp.	Benzoate_1,2_dioxygenase (benA)																		
73	<i>Mycobacterium</i> sp.	Benzoate_1,2_dioxygenase																		
76	<i>Mycobacterium</i> sp.	Benzoate_1,2_dioxygenase																		
78	<i>Methylobacterium nodulans</i>	Benzoate_1,2_dioxygenase																		
124	<i>Cupriavidus necator</i>	Benzoate_1,2_dioxygenase																		
125	<i>Gordonia bronchialis</i>	Benzoate_1,2_dioxygenase																		
126	<i>Dietzia cinnamea</i>	Benzoate_1,2_dioxygenase																		
132	<i>Cupriavidus pinatubonensis</i>	Benzoate_1,2_dioxygenase																		
152	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	Benzoate_1,2_dioxygenase																		
105	<i>Burkholderia</i> sp.	Catechol_1,2_dioxygenase																		
106	<i>Rhodococcus</i> sp.	Catechol_1,2_dioxygenase (catA)																		
255	<i>Rhodococcus</i> sp.	Catechol_1,2_dioxygenase (catA, catA2)																		
294	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Catechol_1,2_dioxygenase (catA)																		
666	<i>Arthrobacter</i> sp. (strain FB24)	Catechol_1,2_dioxygenase																		
669	<i>Arthrobacter</i> sp. BA-5-17	Catechol_1,2_dioxygenase																		
674	<i>Gordonia neofelifaecis</i>	Catechol_1,2_dioxygenase																		
675	<i>Gordonia hydrophobica</i>	Catechol_1,2_dioxygenase																		
676	<i>Gordonia namibiensis</i>	Catechol_1,2_dioxygenase																		
681	<i>Mycobacterium</i> sp.	Catechol_1,2_dioxygenase																		
683	<i>Mycobacterium gilvum</i>	Catechol_1,2_dioxygenase																		
684	<i>Paracoccus denitrificans</i>	Catechol_1,2_dioxygenase																		
687	<i>Rhizobium meliloti</i>	Catechol_1,2_dioxygenase																		
5_1	<i>Burkholderia mallei</i>	Catechol_1,2_dioxygenase (catA2, catA)																		
5_3	<i>Burkholderia mallei</i>	Catechol_1,2_dioxygenase (catA2, catA)																		
26	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Catechol_2,3_dioxygenase (nahH)																		
92	<i>Burkholderia</i> sp.	Catechol_2,3_dioxygenase																		
93	<i>Acidovorax</i> sp.	Catechol_2,3_dioxygenase (tdnC2,)																		
222	<i>Methylibium petroleiphilum</i>	Catechol_2,3_dioxygenase																		
4_1	<i>Achromobacter</i> sp.	Catechol_2,3_dioxygenase (xylE, bztE, bphE, nahH)																		
4_2	<i>Achromobacter</i> sp.	Catechol_2,3_dioxygenase (xylE, bztE, bphE, nahH)																		
4_3	<i>Achromobacter</i> sp.	Catechol_2,3_dioxygenase (xylE, bztE, bphE, nahH)																		
8_1	<i>Sphingomonas</i> sp.	Catechol_2,3_dioxygenase (xylE, catE, cmpE, catA, nahH)																		
8_2	<i>Sphingomonas</i> sp.	Catechol_2,3_dioxygenase (xylE, catE, cmpE, catA, nahH)																		
8_3	<i>Sphingomonas</i> sp.	Catechol_2,3_dioxygenase (xylE, catE, cmpE, catA, nahH)																		
8_4	<i>Sphingomonas</i> sp.	Catechol_2,3_dioxygenase (xylE, catE, cmpE, catA, nahH)																		
22	<i>Burkholderia multivorans</i>	Hydroxyquinol_1,2_dioxygenase																		
252	<i>Achromobacter xylosoxydans</i>	Hydroxyquinol_1,2_dioxygenase																		
690	<i>Acidovorax avenae</i>	Hydroxyquinol_1,2_dioxygenase																		
693	<i>Arthrobacter</i> sp.	Hydroxyquinol_1,2_dioxygenase																		
697	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	Hydroxyquinol_1,2_dioxygenase																		
654	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	2_chlorobenzoate_1,2_dioxygenase																		
688	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Chlorocatechol_1,2_dioxygenase																		
lso	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	oxygZnase																		
656	<i>Achromobacter piechaudii</i>	Anthranilate_1,2_dioxygenase																		
403	<i>Trametes versicolor</i>	Laccase																		
407	<i>Ganoderma lucidum</i>	Laccase																		
425_8	<i>Phanerochaete sordida</i>	Lignin peroxydase																		
429	<i>Phanerochaete sordida</i>	Lignin peroxydase																		
434_6	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Manganese peroxydase																		
434_5	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Manganese peroxydase																		
436	<i>Trametes versicolor</i>	Manganese peroxydase																		
448	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Manganese peroxydase																		
434_1	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Manganese peroxydase																		

Figura 5.19. Respuesta de los genes a partir de los datos obtenidos del *microarray* con muestras de DNA de los diferentes microcosmos, a lo largo de la incubación. Los niveles de respuesta de los genes (media de la intensidad de la señal de la sonda, SNR), se indican mediante el uso de un gradiente de azul y blanco. Con, significa microcosmo control; F1, F3 y F1F3 representan las diferentes fracciones utilizadas en los microcosmos.



6.1. Cambios en la comunidad bacteriana asociados a la degradación de HAPs durante el tratamiento con biopila activa de un suelo contaminado con hidrocarburos del petróleo

La biorremediación mediante biopilas es una tecnología eficiente para la recuperación de suelos, cuyo bajo costo la hace atractiva en comparación con las técnicas convencionales. Esta tecnología ha demostrado funcionar especialmente bien frente a contaminación por hidrocarburos del petróleo (Koning et al., 1998) y HAPs (Porta et al., 1997), por lo cual se ha aplicado a suelos contaminados con distintas mezclas ambientales como diésel (Sanscartier et al., 2009, Chemlal et al., 2012, Chemlal et al., 2013) o crudos de petróleo (Jørgensen et al., 2000; Mohn et al., 2001; Delille et al., 2008; Wang et al., 2012; Yergeau et al., 2008). Hasta ahora, la mayoría de estudios realizados sobre los procesos implicados en la biodegradación de hidrocarburos en suelos contaminados sometidos a una biorremediación por biopilas, se han realizado con pilas de distintas escalas y capacidades tanto a nivel de campo ($4 \times 40 \text{ m}^3$) (Jørgensen et al., 2000), (4 m^3) (Sanscartier et al., 2009), (10 m de largo, 5 m de ancho y 1,5 m de altura) (Xang et al., 2012), como de laboratorio (26 cm x 36 cm) (Delille et al., 2007); pero ningún trabajo recoge el estudio de una biopila de suelo de las dimensiones de la descrita en este trabajo (37 m de largo, 28 m de ancho y 2 m de altura, con una capacidad de 1800 m^3).

Por otro lado, la mayoría de estos estudios previos se habían basado en análisis físico-químicos destinados a monitorizar la concentración de los contaminantes, TPHs y HAPs, a lo largo del tratamiento mediante la extracción química de los hidrocarburos del suelo y su posterior análisis por GC-FID o GC-MS. A pesar de todo, ninguno de ellos recoge un análisis exhaustivo de la concentración de HAPs y sus derivados alquilados durante el tratamiento de derivados del crudo de petróleo en biopilas. En cambio, muy pocos estudios han analizado la formación y destino de metabolitos intermediarios y/o compuestos de oxidación parcial producto de su utilización o cometabolismo. Además, los análisis de parámetros microbiológicos se han centrado mayoritariamente en realizar un seguimiento de la actividad microbiana mediante respirometría, el aislamiento e identificación de microorganismos y/o la enumeración de bacterias cultivables, siendo pocos los estudios que recogen el análisis de la estructura de la comunidad bacteriana mediante técnicas de ecología microbiana molecular basadas en el estudio del ARNr 16S.

Aquí se estudian los procesos bacterianos implicados en la biodegradación de HAPs en una biopila real utilizada para la descontaminación de un suelo industrial contaminado con una matriz compleja, resultado de la mezcla de aceites hidráulicos y diésel, en un tiempo relativamente limitado (120 días) en comparación con los llevados a cabo en otros estudios. Esta aproximación se ha llevado a cabo siguiendo no solo la concentración de los HAPs parentales, sino también la de sus distintos derivados metilados, a menudo no monitorizados, y sus productos de oxidación parcial, como cetonas aromáticas o ácidos carboxílicos. Además, se ha caracterizado la población bacteriana implicada, empleando tanto métodos dependientes de cultivo, enumeración mediante NMP de poblaciones heterótrofa total y degradadora de HAPs, como independientes de cultivo basados en el análisis del ADNr 16S, PCR-DGGE y librerías de clones. En este sentido es uno de los primeros trabajos, que destaca la utilización de técnicas de secuenciación masiva, como la pirosecuenciación de librerías de ADNr 16S, que se aplica al estudio de la comunidad bacteriana implicada en la biodegradación de HAPs en biopilas a gran escala para la restauración de suelos contaminados *on site*.

Los ensayos de tratabilidad previos llevados a cabo por la empresa gestora del suelo recomendaban su recuperación mediante la construcción de biopilas estáticas, llevando a cabo una bioestimulación de las poblaciones autóctonas mediante la adición de nutrientes y aireación. En este sentido, los recuentos de poblaciones microbianas antes de iniciarse el tratamiento mostraban la presencia de unas poblaciones heterótrofas altamente enriquecidas en degradadores de (hexadecano) y HAPs (fenantreno y pireno), con valores próximos, o en algunos casos superiores, a los 10^6 NMP/g. Estos valores son muy elevados en comparación con los marcados en las directrices de la USEPA, o los recomendados por otros autores, que se sitúan en un mínimo de 10^3 células viables/g de suelo (Battelle & NFESC, 1996; Lin et al., 2010), lo que permitía afirmar que este suelo podía ser tratado por procesos biológicos mediante microorganismos nativos. Por otro lado, diversos autores han llevado a cabo con éxito tratamientos de biorremediación con recuentos de microorganismos próximos a 10^5 células viables/g (Margesin & Schinner 2001; Jørgensen et al., 2000; Eriksson et al., 2001; Chemlal et al., 2013), ligeramente inferiores a los detectados aquí. Por este motivo, en base a los resultados obtenidos en los ensayos de tratabilidad, la empresa gestora optó por una biorremediación en biopilas estáticas aireadas con una bioestimulación de las poblaciones naturales por adición de nutrientes en una proporción C:N:P:K 100:10:1:1.

Como ya se ha comentado, el suelo excavado para la construcción de las biopilas presentaba una contaminación compleja resultado de la mezcla de dos productos, uno más ligero y enriquecido en HAPs (C_{11} - C_{22}), correspondiente a un gasoil envejecido, y otro más pesado (C_{23} - C_{36}), correspondiente a aceites hidráulicos. Esta composición se confirmó tras el análisis de los TPHs recuperados del suelo mediante GC-FID, donde se observó un perfil bimodal indicativo de la presencia de dos productos. Estos mismos análisis revelaron que, tras la excavación y acopio del suelo, la concentración de TPHs se redujo drásticamente (43%). Esta degradación se puede atribuir a una estimulación de la biodegradación como consecuencia del esponjamiento y aireación del suelo resultado del volteo, y a la adición de nutrientes llevados a cabo durante los 10 días de la fase de homogeneización. Tras la construcción de la biopila, y a lo largo del primer mes de tratamiento, estas tasas de degradación se mantuvieron elevadas, alcanzándose porcentajes de degradación de hasta un 90%. Esta rápida respuesta de los microorganismos del suelo es normal, ya que normalmente las primeras fases de biodegradación se encuentran limitadas por la falta de aireación y nutrientes propias del suelo. A partir de este punto, tal y como se ha descrito en otros estudios de biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos mediante biopilas (Jørgensen et al., 2000; Chemlal et al., 2012; Eriksson et al., 2001; Wang et al., 2012), la degradación entró en una fase asintótica en la que no se observó mayor reducción en la concentración de TPHs, y donde incluso se observó un cierto incremento de la fracción residual, atribuible a la heterogeneidad propia de un sistema de las dimensiones de la biopila analizada. Al final del tratamiento, los TPHs presentaban porcentajes de biodegradación de un 68%, habiéndose reducido su concentración de los 19799 mg/kg iniciales a 6373 mg/kg a los 120 días. Estos resultados supusieron alcanzar el umbral objetivo de biorremediación marcado por la empresa gestora del suelo, fijado en menos de 8000 mg/kg, para su uso industrial.

Esta fracción residual, en nuestro caso un 32,2% del total de TPHs, se observa habitualmente tras la biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos, y en general, incrementa cuanto más pesado es el derivado del crudo presente en el suelo (gasolina < queroseno < aceite de calefacción < diésel < fuel oil; Song et al., 1990). La naturaleza exacta de este residuo no se conoce, pero está formada mayoritariamente por alcanos de cadena ramificada, ácidos grasos saturados de múltiples anillos y HAPs de elevado peso molecular. La presencia de esta fracción residual y su elevada recalcitrancia se puede atribuir a su baja biodisponibilidad (Ortega-Calvo et al., 2013), a la limitación de nutrientes o aireación al final del

tratamiento (Gallego et al., 2010) o a su mayor toxicidad, tal y como se ha demostrado mediante análisis por Microtox (Pelletier et al., 2004). Este incremento de la toxicidad se ha atribuido a una acumulación en el residuo de los productos más tóxicos de la mezcla, que se degradarían más lentamente, y a la formación de metabolitos durante la biodegradación.

Los perfiles cromatográficos (GC-FID) mostraron que la reducción en la concentración de TPHs iba acompañada de la desaparición de la mayoría de picos resueltos del cromatograma, e incluso de una disminución de la matriz no resuelta del cromatograma (UCM), que en muchos casos se ha descrito que aumenta durante la degradación de crudo de petróleo (Wang et al., 1998). Además, esta reducción en los picos resueltos, especialmente en la fracción ligera del contaminante (C_{11} - C_{22}), se llevó a cabo de forma secuencial, mostrando en un primer momento la eliminación de los *n*-alcanos, que prácticamente no se detectan en esta parte del perfil tras la construcción de las biopilas (T0), y la posterior disminución de las distintas familias de HAPs. Resultados similares han sido observados por otros autores durante la biorremediación de suelos contaminados por diésel en biopilas, mostrando unas elevadas tasas altas de degradación de los compuestos alifáticos durante los primeros días del tratamiento, seguidas por la eliminación de los compuestos aromáticos (Coulon et al., 2010; Chelmal et al., 2012).

La cuantificación del contenido de HAPs en las distintas muestras de la biopila, reveló que al final del tratamiento la concentración de todos los productos analizados (alquilados y no alquilados) se había reducido de forma significativa ($p < 0,05$), con porcentajes que oscilaron entre el 73% y el 98%. Entre los 16 HAPs incluidos en la lista de contaminantes prioritarios de la EPA, los compuestos de dos y tres anillos se degradaron más rápida y extensamente (93-96%) que los compuestos de mayor peso molecular, como los de cuatro (86-91%) o cinco (73-96%) anillos. Esta secuencia de degradación, con una preferencia por los compuestos más ligeros respecto a los más pesados, sigue el patrón observado habitualmente en la degradación de HAPs del petróleo a partir del estudio de cultivos puros y mixtos bacterianos y muestras ambientales (Vila & Grifoll, 2009; Wang et al., 2010). A pesar de todo, destacan los porcentajes de biodegradación alcanzados, que sobre todo para los compuestos de mayor peso molecular, son sorprendentemente elevados. En ensayos realizados en biopilas dinámicas a nivel de laboratorio con suelo contaminado con creosota, Viñas y colaboradores (2005) describieron que las poblaciones microbianas autóctonas estimuladas con nutrientes eran capaces de degradar extensivamente HAPs de 2, 3 y 4 anillos aromáticos, con porcentajes que

oscilaron del 62% observado para criseno hasta el 100% de fenantreno y fluoreno, pero mostraron una capacidad muy limitada de atacar compuestos de mayor peso molecular como el benzo(a)pireno (11%). De hecho, la degradación de compuestos de 5 anillos en suelos se ha descrito básicamente en ensayos a nivel de laboratorio realizados con suelos contaminados con HAPs con un elevado grado de envejecimiento, tras la aplicación de estrategias de bioaumentación ya sea con bacterias (Teng et al., 2010) o hongos (Lladó et al., 2013). En ambos casos se describieron degradaciones de HAPs de 5 anillos de entre un 25-28%.

La mayoría de estudios sobre la degradación de hidrocarburos en biopilas se han centrado en el análisis de compuestos alifáticos y de los 16 HAPs incluidos en la lista de contaminantes prioritarios de la EPA, siendo pocos los que han abordado los procesos bacterianos que tienen lugar sobre HAPs alquilados, componentes mayoritarios de la fracción aromática del crudo de petróleo y sus derivados. Concretamente, en nuestro caso, las concentraciones relativas de los derivados metilados respecto al parental sin grupos alquilo fueron de aproximadamente 11:1 en el caso de los distintos derivados de los metil-naftalenos, 7:1 para metil-fenantrenos, 11:1 para metil-fluorantenos/pirenos, y 17:1 para metil-crisenos. De hecho, de los 1434 mg/Kg de HAPs totales presentes en el suelo al inicio del tratamiento, 1267 mg/Kg correspondían a compuestos metilados (89%), mientras que únicamente 166 mg/Kg correspondían a compuestos parentales.

Cuando se determinó su concentración al final del tratamiento en biopilas, se observó que los porcentajes de biodegradación alcanzados para todas las familias de HAPs alquilados analizados, incluyendo compuestos de dos (naftalenos) (95-98%), tres (fenantrenos) (90-95%) y cuatro anillos (fluorantenos/pirenos y crisenos) (85-91%), eran similares a los observados para sus contrapartes sin alquilar. De hecho, las cinéticas de degradación a lo largo del tratamiento mostraron, ya desde la fase de homogenización, un comportamiento muy similar para todos los derivados de cada una de estas familias, independientemente de su grado de metilación. Estos resultados contrastan con lo descrito habitualmente en la literatura en relación a la degradación de crudo de petróleo y sus derivados. En general, en los estudios realizados con cultivos puros y mixtos se observa una utilización secuencial de estos productos, observándose una mayor resistencia a la biodegradación con el aumento del número de grupos metilos en la molécula (Vila & Grifoll, 2009, Vila et al., 2009; Díez et al., 2005). Observaciones similares se han realizado también a partir del análisis de muestras ambientales, contaminadas con crudo de petróleo (Venosa et al., 1996; Wang *et al.*, 1995, 1998; Watson et al, 2001).

A pesar de todo, considerando que los resultados descritos hasta el momento corresponden todos a organismos y ambientes marinos, no se puede descartar que en ambientes terrestres los mecanismos y poblaciones implicados en su degradación/transformación sean distintos.

Como ya se ha comentado anteriormente, los estudios realizados hasta el momento sobre la degradación de HAPs en biopilas se centran exclusivamente en la monitorización de las concentraciones de HAPs y TPHs, no habiéndose abordado hasta ahora la posible formación de productos de oxidación y degradación parcial. En este caso se analizó la presencia de cetonas, quinonas y ácidos carboxílicos aromáticos a partir de una muestra compuesta correspondiente al momento de máxima degradación de HAPs y sus contrapartes alquilados. Esta muestra se extrajo mediante el método desarrollado por el grupo previamente, que implica la obtención de lixiviados del suelo para la detección de metabolitos ácidos (Arias, 2008), habitualmente no detectados en el análisis de suelos contaminados por HAPs (Lundsted et al., 1999). La presencia de quinonas y cetonas, generalmente los productos oxidados más abundantes presentes en suelos contaminados por HAPs (Eriksson et al., 2000; Lundsted et al., 2003), se detectaron tras el fraccionamiento de la muestra mediante cromatografía en columna.

Gracias a la utilización de métodos selectivos de análisis mediante GC-MS basados en la obtención de fragmentogramas de iones reconstruidos, se detectaron toda una serie de cetonas y quinonas aromáticas, indanona, fluorenona o antraquinona/fenantrenona con distintos grados de metilación (derivados mono-, di- y trimetilados), que resultarían de la oxidación parcial de las distintas familias de metilfluorenos (indanona y fluorenona) y fenantrenos/antracenos (antraquinona). De hecho, la presencia de fluorenona y antraquinona se ha descrito habitualmente en suelos contaminados con creosota, siendo en algunos casos su concentración similar, o incluso superior, a la de los HAPs parentales de los cuales derivan. La acumulación de estos productos se ha atribuido a la elevada reactividad del carbono nafténico del fluoreno y de los carbonos 9 y 10 del antraceno, facilitando su oxidación por reacciones cometabólicas. Por otro lado, el análisis de los extractos ácidos de los lixiviados permitió detectar toda una serie de ácidos carboxílicos aromáticos derivados de la oxidación del grupo alquilo de distintos derivados metilados de metil-naftalenos y metil-fenantrenos. Entre estos productos destacan la presencia de ácidos naftaleno mono- y dicarboxílicos, y ácidos fenantreno carboxílicos con distinto grado de metilación.

La oxidación de los grupos metilo de HAPs durante la degradación de crudo de petróleo y sus derivados se ha sugerido que podría ser el resultado de la oxidación cometabólica llevada a cabo por bacterias degradadoras de alcanos (Bayona et al., 1986; Solanas et al., 1984; Sugiura et al., 1997; Viñas et al., 2002). Por lo tanto, a pesar de que tal y como se ha observado, la degradación de HAPs y de sus derivados metilados seguía cinéticas prácticamente idénticas, esta desaparición de los compuestos con distinto grado de metilación podría ser el resultado de procesos microbianos distintos a los que dan lugar a la mineralización de los HAPs, y corresponder, mayoritariamente, a una transformación por reacciones cometabólicas.

Los recuentos mediante la técnica del NMP mostraron que los incrementos de las poblaciones heterótrofas y degradadoras de alcanos y HAPs, no se correspondían con las cinéticas de degradación observadas para TPHs, HAPs y sus derivados metilados. Como ya se ha visto, la desaparición de todos estos compuestos se producía mayoritariamente entre la fase de homogeneización y los 30 primeros días de tratamiento en biopilas, mientras que los máximos de las poblaciones degradadoras de HAPs analizadas (fenantreno y pireno) se observaron a los 90 días de tratamiento. Esto sugiere que dichas poblaciones dispondrían de fuentes de carbono alternativas que no se estarían detectando durante la cuantificación de TPHs y de HAPs. En este sentido, la transformación de los HAPs metilados a los distintos productos oxidados detectados en el análisis de metabolitos, sugiere que estas poblaciones podrían estar implicadas en la reutilización de estos productos cometabólicos. Estos resultados aumentan el interés en el estudio de la composición y de las dinámicas de las poblaciones microbianas implicadas en las distintas fases del tratamiento en la biopila.

El análisis de la estructura de la comunidad bacteriana presente en la biopila se llevó a cabo mediante técnicas independientes de cultivo basadas en el análisis del ADNr 16S. En este sentido, el análisis mediante PCR-DGGE ha sido una de las aproximaciones más utilizadas para el estudio de las dinámicas de poblaciones en suelos contaminados por HAPs sometidos a biorremediación (Viñas et al., 2005; Lors et al., 2010; Taccari et al., 2012). De esta forma, el análisis multivariante mediante clústeres de los perfiles de bandas obtenidos mediante DGGE, mostró que a lo largo del tratamiento la población se homogeneizaba, observándose a los 120 días unos perfiles muy similares en todas las réplicas. De hecho, prácticamente todas las réplicas de este punto agrupaban juntas formando un grupo homogéneo además de presentar una mayor diversidad que los otros tiempos, lo que indica un elevado grado

de madurez y homogeneización de las poblaciones bacterianas al final del tratamiento. Este análisis mostró la presencia de tres clústeres principales, el primero de los cuales, muy distante del resto incluía a la mayoría de muestras de la fase de homogeneización. A medida que avanzó el tratamiento los perfiles se hicieron cada vez más similares, de tal forma que, a pesar de formar dos clústeres independientes, la distancia entre ellos era menor. En estos dos clústeres se observó como en uno de ellos agrupaban la mayoría de muestras de 30 y 60 días, mientras que en el tercero se agrupaban, junto con las muestras de 120 días, algunas réplicas de otros tiempos que presentaban ya unos perfiles más maduros, y las mayoría de muestras de tiempo 0, que a pesar de agrupar en este clúster, formaban un grupo independiente bastante homogéneo.

En general, esta tendencia de las poblaciones microbianas a homogeneizarse es habitual en emplazamientos contaminados, y podría atribuirse a un enriquecimiento selectivo de las poblaciones responsables de la degradación de los contaminantes. Está claro que la exposición a hidrocarburos provoca un descenso de la población de la diversidad microbiana (Atlas 1981; Lindstrom et al., 1999), ya que el uso de los hidrocarburos como fuente de carbono solo enriquece a algunos miembros de la comunidad microbiana, pero su impacto de la biorremediación no es todavía claro. Mientras otros autores han descrito fuertes reducciones en la diversidad durante los tratamientos (Ogino et al., 2001; Roling et al., 2012; Viñas et al., 2005), otros trabajos muestran un incremento de la biodiversidad durante la biorremediación, como en nuestro caso que aumento la diversidad al final del tratamiento (Zucchi et al., 2003). Aunque este caso el índice de Shannon-Wiener nos permitió observar cambios significativos en la diversidad microbiana a lo largo del tratamiento, se debe tomar en cuenta como un indicador de la diversidad más que índice absoluto. Puesto que la técnica de la DGGE, no puede llegar a detectar las comunidades microbianas que conforman biodiversidad “rara”, no amplificadas durante la PCR, porque no se encuentran representados en los perfiles de las bandas. Por lo que se debe tener en cuenta los valores del índice de Shannon-Wiener obtenidos de la pirosecuenciación, ya que esta técnica nos permite detectar a miembros no detectados en la DGGE.

Considerando el elevado grado de homogeneización observado en las poblaciones bacterianas a los 120 días, se analizó la composición de la comunidad microbiana en este punto mediante la obtención de una librería de clones del ADNr 16S. Se analizaron un total de 96 clones, que después su secuenciación y análisis, se agruparon en 52 OTUs distintas, lo que hizo imposible obtener una curva de rarefacción adecuada que garantizara un análisis representativo de la población.

Por este motivo, se optó por llevar a cabo un análisis de la comunidad bacteriana presente mediante la pirosecuenciación de librerías de ADNr 16S, más adecuados para el análisis de poblaciones complejas como las presentes en un suelo.

Esta tecnología, de reciente aplicación en ecología microbiana, permite obtener una mayor profundidad en el análisis de las comunidades microbianas, de hecho, la mayoría de secuencias obtenidas en la librería de clones también se detectaron en la pirosecuenciación aunque en diferente proporción, por lo que los análisis de la estructura de la comunidad se centran en los resultados de la pirosecuenciación.

A lo largo de todo el tratamiento se observó un gran predominio de *Proteobacteria*, representando alrededor del 90% de las secuencias obtenidas, de forma similar a lo observado en la librería de clones (84%) y en otros trabajos similares con suelos árticos contaminados con hidrocarburos en biopilas (Yergeau et al., 2012). Esta predominancia de *Proteobacteria* es consistente con la prevalencia de este filo en suelos descrita habitualmente (Roesch et al., 2007; Militon et al., 2010; Sutton et al., 2013), habiéndosele atribuido un rol preeminente en el ciclo de los nutrientes. Resultados similares se han observado también en ambientes alterados por la presencia de hidrocarburos tanto a largo plazo como tras un episodio de contaminación (Margesin et al., 2007; Zhang et al., 2012). De hecho, diversos miembros de las clases *Alfa*, *Beta* y *Gamma* de este filo han sido descritos como degradadores de hidrocarburos alifáticos y aromáticos. Los miembros de *Actinobacteria* fueron el segundo filo más abundante detectado, mostrando una abundancia del 3% en la fase de homogeneización, y del 9% a lo largo de todo el tratamiento en biopila. Nuevamente estos resultados concuerdan con los descritos en la bibliografía, donde se ha señalado una correlación positiva entre el número de fenotipos Gram negativos y la contaminación de suelos, mientras que los Gram positivos generalmente se mantienen en cantidades similares (Margesin et al., 2003).

Dentro del filo *Proteobacteria* se detectaron miembros de las clases *Alfa*, *Beta*, *Gamma*, *Delta* y *Epsilon*, siendo los tres primeros los componentes mayoritarios de la comunidad a lo largo de todo el tratamiento, aunque mostrando alternancia entre ellos. Los miembros de *Betaproteobacteria* (60% de abundancia), predominaban tras la excavación del suelo, y durante las primeras fases de biorremediación, manteniendo una abundancia del 50% a los 30 días. A pesar de todo, en el momento de la construcción de la biopila, 0 días, se observó un incremento puntual de *Gammaproteobacteria*, concretamente de miembros de *Pseudomonas*, que de forma transitoria, pasaron a ser el componente mayoritario de la comunidad.

Este periodo, como ya se ha comentado, coincidió con las máximas tasas de desaparición de TPHs, HAPs y sus derivados metilados. Tras esta fase inicial, hubo una sucesión en las comunidades bacterianas, pasando a estar dominadas por *Alfaproteobacteria*. Los miembros de esta clase aumentaron su abundancia de forma gradual desde la fase de homogeneización (7%) hasta los 120 días de tratamiento (77%).

Como se ha comentado, los miembros de *Betaproteobacteria* predominaron durante las primeras fases del tratamiento. El análisis mediante pirosecuenciación mostró la presencia de siete géneros mayoritarios distintos, *Comamonas*, *Rhodoferrax*, *Hydrogenophaga*, *Acidovorax*, *Methyloversatilis*, *Massilia* y *Thiobacillus*, entre los cuales también se observó una alternancia. *Methyloversatilis* (29%), *Rhodoferrax* (10%) y *Thiobacillus* (7%) predominaron en la fase de homogeneización, mientras que *Hydrogenophaga* (20%), *Acidovorax* (3%) y *Massilia* (10%) presentaron un incremento desde este punto hasta los 30 días. Estudios recientes mediante SIP utilizando fenantreno marcado han relacionado claramente a los miembros de *Betaproteobacteria* con la utilización de HAPs en suelos, especialmente en las fases iniciales, observándose unas alternancias similares en las poblaciones (Martin et al., 2012). De hecho, muchos de los géneros detectados aquí (*Acidovorax*, *Rhodoferrax*, *Hydrogenophaga* y *Thiobacillus*) fueron detectados en las fracciones de ADN marcado. De hecho, esta relación de los miembros de *Betaproteobacteria* con la degradación de hidrocarburos se ha observado también en suelos contaminados con derivados del crudo del petróleo, como el gasoil, y se ha sugerido a este taxón como una buena diana a estimular durante la biorremediación de suelos contaminados con este tipo de mezclas (Bell et al., 2013). Además, se ha descrito que muchas de las vías para la degradación de hidrocarburos en *Betaproteobacteria* vienen codificadas por plásmidos (Parales, 2010), lo que podría facilitar su transferencia horizontal y la adaptación de estos microorganismos, lo que explicaría su enriquecimiento en emplazamientos expuestos a hidrocarburos durante largos periodos de tiempo. Distintos miembros de esta clase detectados en este trabajo ya se habían relacionado previamente con la utilización de hidrocarburos. Se ha descrito que *Acidovorax* puede utilizar como fuente de carbono y energía fenantreno (Singleton et al., 2009); *Comamonas*, fenantreno y naftaleno (Goyal & Zylstra, 1996,1997); *Hydrogenophaga*, benceno y tolueno (Fahy et al., 2008); *Massilia* ha sido detectada en un suelo contaminado con fenantreno (Bodour et al., 2003); y *Thiobacillus* fue asociada a la utilización de pireno a partir de la aplicación de SIP (stable isotop probing) en un suelo contaminado (Singleton et al., 2006).

En el momento de la construcción de la biopila *Gammaproteobacteria* presentó un pico de abundancia, debido básicamente al incremento de miembros del género *Pseudomonas*, que pasó a ser el componente mayoritario de la comunidad. Este predominio se observó únicamente de forma transitoria, ya que su abundancia volvió a disminuir rápidamente, pasando del 37% al 10% a 30 días. Dentro de este género se detectaron cinco miembros diferentes, próximos a *Pseudomonas umsongensis*, las más predominante, *Pseudomonas mandelii*, *Pseudomonas borbori*, *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas stutzeri*. El gran incremento en su abundancia en el periodo comprendido entre la homogenización y los 0 días, coincide con unas tasas de degradación de TPHs y HAPs muy elevadas, por lo que se podría asociar su incremento a la utilización de estos hidrocarburos, aunque sólo parcialmente, ya que la degradación continúa hasta los 30 días, cuando la concentración de estas bacterias se reduce. De hecho, varios estudios han descrito la degradación de alcanos (van Beilen & Witholt, 2004), compuestos aromáticos (Jiménez et al., 2004), HAPs (Kasai & Harayama, 2004) y compuestos cloro-aromáticos (Pieper & Reineke, 2004) y nitro-aromáticos (Nishino & España, 2004), por parte de *Pseudomonas*.

La presencia *Gammaproteobacteria* en suelos alterados por la presencia de hidrocarburos ha sido ampliamente descrita (Mills et al., 2003; Popp et al., 2006). En un estudio de la evolución de la comunidad bacteriana durante la biorremediación de HAPs en suelo contaminado con alquitrán, consistieron aproximadamente un 83% y 70% de bacterias degradadoras de fenantreno y fluoranteno respectivamente (Lors et al., 2010). De hecho, se ha propuesto utilizar *Gammaproteobacteria* como un bioindicador para detectar el impacto sobre la comunidad bacteriana de vertidos de HAPs en los suelos agrícolas (Niepceron et al., 2013).

Otros miembros de esta clase detectados, aunque de forma muy minoritaria, fueron algunos representantes de la familia *Xantomonadaceae* (*Lysobacter*, *Xanthomonas*, *Pseudoxanthomonas*), *Pseudomonadaceae*, *Legionellaceae*, y bacterias no cultivadas. De hecho, en el análisis mediante librerías de clones, el miembro más abundante de la comunidad (18%), fue una bacteria incultivable relativamente próxima al género *Thioalkalivibrio*. Este clon, presentó su máxima homología con un microorganismo detectado mediante el análisis con técnicas moleculares de la comunidad bacteriana presente en un suelo contaminado por hidrocarburos alifáticos sometido a biorremediación (Milton et al., 2010), conjuntamente con otros grupos detectados también en este trabajo (*Lysobacter*, *Xanthomonas* y *Steroidobacter*).

Representantes de las *Xanthomonadaceas* también se han descrito como uno de los grupos dominantes en la comunidad bacteriana de un suelo contaminado con creosota sometido a un tratamiento de bioestimulación, donde los TPHs y HAPs fueron degradados significativamente (Viñas et al., 2005).

Los miembros de *Alfaproteobacteria* fueron los componentes mayoritarios de la comunidad en las fases finales del tratamiento. Dentro de esta clase se detectaron 4 géneros mayoritarios *Sphingomonas*, *Sphingobium*, *Novosphingobium* y *Porphyrobacter*, todos ellos pertenecientes a la familia *Sphingomonadaceae*, y que presentaron un comportamiento prácticamente idéntico. En la fase de homogeneización presentaron niveles relativos muy bajos (<2%), incrementando su abundancia relativa a lo largo del tiempo, especialmente tras la construcción de la biopila. Los miembros mayoritarios fueron *Porphyrobacter* y *Sphingobium* que incrementaron sus abundancias relativas a partir de los 30 días de incubación (4 y 6%, respectivamente), hasta dominar claramente la población, constituyendo un 31% y 23% de la comunidad, respectivamente en la fase final del tratamiento. El incremento de su abundancia relativa se puede asociar con la utilización de TPHs y HAPs sólo hasta los 30 días. A partir de ese punto, aunque su abundancia se incrementa de forma muy significativa, esta no va asociada a la degradación de ninguno de los componentes de los TPHs analizados. A pesar de todo, considerando que prácticamente son los únicos miembros de la comunidad que incrementan su abundancia, este aumento sí que puede relacionarse directamente con el máximo observado en el recuento de microorganismos degradadores de HAPs (fenantreno y pireno) mediante la técnica del NMP a los 90 días. Este resultado sugiere que quizá podrían desempeñar un papel en la reutilización de los productos de oxidación parcial acumulados en el suelo como resultado de la acción cometabólica sobre los HAPs metilados.

Se han aislado numerosos miembros de la familia *Sphingomonadaceae* a partir de suelos contaminados por su capacidad de utilizar hidrocarburos aromáticos como fuente de carbono. De hecho se les considera unos de los principales artífices de la degradación de HAPs en suelos, siendo bien conocida su capacidad para degradar una amplia variedad HAPs (Leys et al., 2004) y HAPs sustituidos (Dimitriou-Christidis et al., 2007; Lamberts et al., 2008). De hecho, la capacidad de degradación de hidrocarburos aromáticos por bacterias *Sphingomonadales* se ha descrito para distintos géneros de esta familia como *Novosphingobium*, *Sphingobium* y *Sphingomonas* (Hilyard et al., 2008; Roy et al., 2012).

En cambio, se tiene poca información sobre su capacidad para utilizar alcanos. Estudios recientes de degradación de hidrocarburos en el agua de mar en Indonesia revelaron una diversidad de *Alphaproteobacteria*, pertenecientes a *Sphingomonadales* y *Rhodobacterales*, que estaban involucrados en la degradación de los hidrocarburos alifáticos y aromáticos de bajo peso molecular (Harwati et al., 2007).

Finalmente, el último grupo mayoritario detectado mediante pirosecuenciación fue *Actinobacteria* del cual se detectaron cuatro géneros (*Microbacterium*, *Agrococcus*, *Mycobacterium* y *Dietzia*). A diferencia de lo observado para las distintas clases de *Proteobacteria*, sus niveles se mantuvieron relativamente constantes a lo largo de todo el tratamiento, con valores constantes próximos al 2% de abundancia de *Mycobacterium*. Únicamente en el caso de *Dietzia*, se observaron unas oscilaciones más evidentes, pasando su abundancia del 5% entre los 0 y 30 días, hasta pasar a no ser prácticamente detectada a los 120 días. Los miembros de *Mycobacterium*, que pese a mostrar una tendencia a aumentar desde la homogenización hasta los 120 días, presentaron unas abundancias relativamente constantes, manteniendo una abundancia próxima al 9% al final de la incubación. El hecho de que la población de *Mycobacterium* se mantenga elevada hasta el final, unido al hecho de que se considere a los miembros de este género como unos de los principales artífices de la degradación de HAPs de elevado peso molecular (Kanaly & Harayama, 2010), sugiere que podrían estar implicados en la utilización de estos compuestos generalmente abundantes en la fracción residual.

Los miembros de la familia *Dietziaceae* que solo posee un género, *Dietzia* han sido asociados a la biodegradación de hexadecano (Liu & Shao, 2007) y otros alcanos (Al-Adwathi et al, 2007; Brito et al, 2006; Sette et al, 2007), en ambientes marinos y moderadamente alcalinos. Por lo tanto, considerando que su abundancia es importante en las primeras fases de la biopila y que después prácticamente desaparecen, los miembros de este género podrían estar implicados en la degradación de alcanos en la biopila. De hecho, algunos autores sugieren que las actinobacterias podrían desempeñar un papel clave en la biorremediación de alcanos en suelos contaminados con humedad limitada (Pucci et al., 2000), y distintos géneros de este *phylum*, como *Microbacterium* (Gauthier et al., 2003) o *Mycobacterium* (Kanally & Harayama, 2000; Vila et al., 2001), se han descrito por su capacidad de utilizar hidrocarburos aromáticos policíclicos, especialmente de elevado peso molecular.

De hecho, la mayoría de los microorganismos degradadores de estos compuestos aislados hasta el momento son bacterias Gram positivas del grupo de los actinomicetos (Kanally & Harayama, 2000).

Otros miembros de *Actinobacteria* detectados en menor abundancia y en la librería de clones fueron representantes de la familia *Microbacteriaceae* y de *Nocardia*. La familia *Microbacteriaceae* contiene varios géneros como *Microbacterium*, *Agrococcus*, *Agromyces* y *Leifsonia*, algunos de los cuales fueron detectados en las biopilas. Miembros del género *Microbacterium* están involucrados en la degradación hexaclorociclohexano (Manickam et al, 2006), HAPs (Jacques et al, 2008; Zhang et al, 2004), y bifenilo (Chen et al, 2008). Por otro lado, varios estudios han reportado la degradación de hidrocarburos por diferentes especies de *Nocardia*, y han sido relacionadas con la biorremediación de emplazamientos contaminados con petróleo (Jirasripongpun, 2002; Baek et al., 2007; Quatrini et al., 2008).

La utilización de la pirosecuenciación permitió detectar distintos filos minoritarios pero que podrían desarrollar un papel relevante en la biorremediación. Entre ellos, se observó la presencia de representantes de *Firmicutes* y *Bacteroidetes*, cuya abundancia relativa fue disminuyendo a través del tratamiento. Estos filos se han encontrado en ambientes contaminados con petróleo como sedimentos y suelos contaminados con diésel (Mortazavi et al., 2012; Sutton et al., 2013). Otros filos minoritarios detectados a lo largo de todo el tratamiento, fueron *Acidobacteria*, *Cyanobacteria*, *Chloroflexi*, *Planctomycetes*, *Thermotogae*, *Deferribacteres*, *Spirochaetes*, *Tenericutes*, *Chlorobi*, *Verrucomicrobia* y Candidate divisions (op3, op8, op9, tm7, ws3, spam, tg3,), cuyas abundancias relativas no superaron en ningún caso el 0,4%. Algunos de estos filos también han sido identificados por metagenómica y relacionados en la degradación de hidrocarburos (An et al., 2013).

Los índices de diversidad de Shannon-Wiener, obtenidos de la pirosecuenciación, nos permitió observar la diversidad microbiana a lo largo del tratamiento de la biopila, observando un incremento de la diversidad de la homogenización a los 0 días (máxima diversidad), la misma que disminuye a lo largo del tiempo, hasta llegar a su nivel más bajo a los 120 días. Como lo reportado en otros trabajos, que han reportado una disminución de la diversidad durante los tratamientos (Ogino et al., 2001; Roling et al., 2012; Viñas et al., 2005).

Con el objetivo de identificar poblaciones específicas asociadas a la utilización de HAPs concretos, se realizaron aislamientos y análisis por PCR-DGGE a partir de las placas de microtitulación (120 días) empleadas para los recuentos de

microorganismos degradadores de fenantreno y pireno (NMP). A partir de los pocillos de fenantreno, se detectó una predominancia de bandas correspondientes a representantes de *Sphingobium herbicidovorans*, además de la presencia de miembros de *Sphingopyxis*, *Xanthomonadaceae* y *Dietzia maris*. Este resultado pone de manifiesto el posible rol de los miembros de *Alfaproteobacteria* (*Sphingobium*) detectados en la utilización del fenantreno y sus derivados. De hecho, ya en el análisis por pirosecuenciación se había observado una coincidencia entre el incremento de poblaciones degradadoras de este hidrocarburo y de la abundancia de los miembros de este grupo en el análisis por pirosecuenciación.

En caso de los pocillos de pireno, en general se observó la presencia de una banda mayoritaria, correspondiente a miembros de *Sphingopyxis* (*Alfaproteobacteria*) y de otras cuatro correspondientes a *Nocardioides* (*Actinobacteria*). Estos resultados indican la implicación de los miembros de estos dos grupos en la utilización de HAPs, destacando de nuevo la presencia de miembros de las alfaproteobacterias y de representantes de *Actinobacteria*, tradicionalmente relacionados con la utilización de este sustrato. Estos análisis mostraron la presencia de una única población común para ambos sustratos, que correspondía a un mismo miembro del género *Shingopyxis*, que tendría la capacidad de utilizar ambos hidrocarburos, que podría estar relacionada con la convergencia que presenta la ruta de degradación del pireno hacia la del fenantreno. Hay que destacar que todos los grupos detectados mediante esta aproximación se habían detectado previamente también en el análisis por pirosecuenciación, lo cual indica que su abundancia relativa en la población original era elevada, y que su presencia no es únicamente un artefacto de las condiciones de cultivo de la técnica del NMP.

A partir de los mismos pocillos se aislaron un total de 22 cepas distintas, la mayoría de las cuales (13) pertenecían al grupo *Actinobacteria*. Además de los miembros de *Actinobacteria*, también se recuperaron cepas pertenecientes a *Alfa*-, *Beta*- y *Gammaproteobacteria* (2, 4 y 2 representantes, respectivamente), y un miembro del filo *Firmicutes* muy próximo al género *Staphylococcus*. Cabe destacar que este filo no se había detectado en el análisis mediante librería de clones, pero sí mediante pirosecuenciación, y que recientemente miembros de *Staphylococcus* han sido relacionados con la degradación de HAPs por otros autores (Mallick et al., 2007; Chang et al., 2011).

De los distintos aislados obtenidos, una *Xanthomonadacea* y el representante de *Staphylococcus*, presentaron la capacidad de utilizar fenantreno como sustrato de

crecimiento. La capacidad de utilizar pireno se observó en dos actinobacterias próximas a los géneros *Nocardioides* y *Brevibacterium* y un representante de *Pseudomonas* (*Gammaproteobacteria*). Finalmente, un miembro de *Promicromonospora* (*Actinobacteria*), tres *Alcaligenaceas* (*Betaproteobacteria*), una *Comamonadaceae* (*Betaproteobacteria*) y una *Rhizobiaceae* (*Alfaproteobacteria*), presentaron la capacidad de utilizar ambos sustratos como fuente de carbono y energía. Por lo tanto, la capacidad de utilizar HAPs parece distribuida entre distintos representantes de la comunidad, y destaca la capacidad de diversas Gram-negativas, sobretodo de la clase *Betaproteobacteria*, de utilizar pireno.

6.2. Análisis de poblaciones y funciones microbianas asociadas a la degradación de las fracciones alifática y de HAPs en microcosmos inoculados con suelo contaminado

Estructura de la comunidad microbiana en el inóculo:

En el suelo utilizado como inóculo existe cierta diversidad que como se ha visto después disminuye en cada uno de los tratamientos. Los análisis de pirosecuenciación revelaron un predominio de *Actinobacteria* (76%), destacando ya géneros que incrementan su abundancia relativa más tarde como respuesta a las distintas condiciones de incubación, sobre todo *Marmoricola* (*Nocardioideaceae*), seguida de *Gordonia* (*Corynebacteriaceae*), y *Nocardia* (*Nocardiaceae*). Con menor proporción encontramos una variedad de *Proteobacteria* (19%) como *Sphingomonas* (*Alfaproteobacteria*), *Hydrogenophaga* y *Massilia* (*Betaproteobacteria*), *Pseudomonas stutzeri* (*Gammaproteobacteria*), y algunos miembros de *Deltaproteobacteria*. Otros filos mucho menos importantes (5%), y que no se detectarán durante la incubación en los microcosmos, incluyen *Bacteroidetes*, *Cloroflexi*, *Deferribacter*, *Cianobacteria*, *Thermi*, *Planctomyces*, *Firmicutes*, y varias *Candidate divisions*.

Aunque este suelo proviene del tratamiento en biopila descrito en el capítulo anterior, esta composición difiere de la descrita para las muestras de suelo correspondientes a los 120 días. Ello se debe sin duda a que el suelo reposó durante un periodo de tiempo después de tratado y después fue almacenado a 4°C, sufriendo un cambio en las proporciones relativas de las poblaciones. Por lo tanto, la estructura del inóculo no se discutirá más a fondo y nos centraremos en los cambios que produce en ella la exposición a las distintas fuentes de carbono.

Evolución de la comunidad al incubarse sin fuente de carbono

Los microcosmos control nos permitieron evaluar los cambios en la comunidad utilizada como inóculo como simple respuesta a las condiciones de incubación de los microcosmos sin el efecto de las fracciones. Estas condiciones incluyen la no limitación de nitrógeno, una aireación y homogenización óptimas, y posiblemente la introducción de una pequeña cantidad de materia orgánica procedente del suelo durante la inoculación.

Como se ha visto, estas condiciones ejercieron un cambio dramático en la estructura de la comunidad que debe de tenerse en cuenta al interpretar los resultados de los microcosmos con fracciones. Ello no era inesperado, de hecho, en un trabajo previo del grupo, se describió que un inóculo de una cepa de *Marinobacter* degradadora de fenoles crecía hasta aumentar su concentración en tres órdenes (de 10^4 a 10^7 UFC/ml) al ser incubado en medio mineral sin fuente de carbono (Dosta et al., 2011).

En estos controles, y de forma muy rápida, el filo *Proteobacteria*, y más concretamente un número discreto de representantes de *Gamma-* y *Betaproteobacteria*, desplaza casi completamente a los miembros de *Actinobacteria*, inicialmente predominantes. A los 3 días predominan dos componentes que ya eran importantes en el inóculo, pero cuya proporción aumenta todavía más: *P. stutzeri* (53%)(γ), que se mantiene abundante hasta el final de la incubación y *Massilia* (40%)(β), que es posteriormente desplazada por otros grupos como *Variovorax* (β) que aparecían como muy minoritarios en el inóculo.

Estas bacterias se encontraron también con mayor o menor frecuencia en microcosmos con hidrocarburos, y, por otro lado, en el análisis con *microarrays* de los controles, se observó un incremento relativamente importante de algunas dioxigenasas. Por lo tanto, no podemos descartar que estas poblaciones o los enzimas detectados puedan jugar un papel en la degradación de los hidrocarburos cuando estos están presentes. Sin embargo, dado que en este trabajo se detecta la presencia de genes y no su expresión, la única forma de atribuir los genes detectados a funciones determinadas es analizar cambios en la abundancia relativa como respuesta específica a la exposición a determinadas familias de hidrocarburos. Por todo ello, aquí se expone y discute únicamente aquellas poblaciones y enzimas que en los microcosmos con fracciones presentaron una evolución distinta a la observada en los controles.

Como se ha comentado anteriormente, la presencia e incremento de estas poblaciones se atribuye a que son capaces de sobrevivir y crecer rápidamente en condiciones de estrés nutricional, bien por su oligotrofia o por la posible acumulación de materiales de reserva (Álvarez & Steinbüchel, 2002; Walterman et al., 2005). Esta capacidad se ha descrito en diversas *Proteobacterias* degradadoras de hidrocarburos, como *Alcanivorax* (Kalscheuer et al., 2007), *Pseudomonas putida* GPo1 (de Smet et al., 1983) o representantes de *Pseudomonas stutzeri* (Lalucat et al., 2006), componente mayoritario de estos microcosmos.

Resumen de biodegradación y de poblaciones en los microcosmos con fracciones

A simple vista, los cromatogramas obtenidos mediante GC de todos los microcosmos ya muestran una elevada degradación a partir de los 3 días, y sobre todo entre los 7 y 15 días. A partir de entonces, los picos que no han desaparecido se degradan con tasas más lentas. Al final de la incubación en los microcosmos con F1 han desaparecido completamente todos los alcanos. En los de F3 queda un residuo de HAPs que corresponde a un 41% de los iniciales. En los microcosmos F1F3 la degradación es mucho más extensa, con un residuo de alcanos del 2% y del 27% de HAPs. Durante la incubación no se detectaron metabolitos en los extractos ácidos.

En cuanto a la estructura de la comunidad bacteriana, los resultados revelan una baja diversidad y muy pocos representantes no cultivables. A excepción del tiempo 0, cuando un 5% de las secuencias corresponden a otros filos, se detectan únicamente *Actinobacteria* y *Proteobacteria*, con un número limitado de géneros y especies. En microcosmos con F1 los periodos de mayor degradación coinciden con predominio de *Actinobacteria*, mientras que en los de F3 la situación es inversa, con una abundancia casi absoluta de *Proteobacteria*.

Las librerías de clones de genes funcionales revelaron también poca diversidad. Se detectaron secuencias correspondientes a *AlkB* sólo en microcosmos con F1 y con F1F3 que mostraron una elevada similitud con *AlkB* de Gram-positivos y Gram-negativos. Las librerías de citocromo P450 monooxigenasa bacterianas (*CYP153A*) permitieron detectar una variedad de secuencias en todas las condiciones de incubación. Sin embargo, los cebadores utilizados para la detección de dioxigenasas sólo permitieron la recuperación de una única secuencia correspondiente a naftaleno dioxigenasas, que al ser observada en todos los tiempos y condiciones no permite extraer conclusiones a parte de su simple presencia en las bacterias inoculadas, además de distintas bifenil y catecol dioxigenasas. Aunque estos cebadores estaban recomendados en la bibliografía (Iwai et al., 2011) como apropiados para detectar un gran número de dioxigenasas, el resultado obtenido aquí, y su comparación con los obtenidos más tarde con los *microarrays*, ponen de manifiesto sus limitaciones.

Estos *microarrays* contenían un gran número de sondas con dianas, aproximadamente 600 genes que incluyen una gran diversidad de dioxigenasas depositadas en las bases de datos. Entre ellas encontramos dioxigenasas dihidroxilantes y de ruptura de anillos de HAPs de bajo y alto peso molecular, tanto de Gram-positivos como de Gram-negativos, de heterociclos, y de metabolitos monoaromáticos a los que convergen distintas rutas de degradación (ej. catecol, antranilato, protocatecuato, benzoato).

Los resultados se discuten en detalle más adelante, pero aquí queremos destacar el valor de esta herramienta que permitió detectar de forma semicuantitativa las dioxigenasas a tiempo 0 y a lo largo de la incubación en todos los microcosmos. La falta de detección de dioxigenasas de Gram-positivos, que se han asociado a la degradación de compuestos de elevado peso molecular, especialmente de pireno, es consistente con la ausencia de géneros como *Mycobacterium* en los microcosmos con F3. Aunque la degradación de estos compuestos fue limitada, en los cultivos con F1F3 se esperaba que hubieran aumentado su abundancia de forma significativa. Este es un aspecto a valorar y validar en relación a los *microarrays*.

Degradación de alcanos y dinámica de poblaciones/genes funcionales en microcosmos con la fracción alifática

En los microcosmos con la fracción saturada (F1) los alcanos se degradan prácticamente por completo. Tras un corto periodo de adaptación en que no se detecta una degradación significativa, desaparecen en primer lugar los *n*-alcanos de cadena más corta C₁₂-C₁₄ (10% de los hidrocarburos en esta fracción), que alcanzan una tasa máxima a los 3-7 días siendo reducidos en un 80%, para casi desaparecer antes de los 15 días (99%). Al mismo tiempo empiezan a degradarse los alcanos de cadena media, C₁₅-C₃₁ (77% del total), con cinética lineal y tasa máxima entre los 3-15 días (98%). Por último, tal y como se esperaba, son atacados los alcanos de cadena larga C₃₂-C₃₅ (0,7% del total) junto a los isoprenoides pristano y fitano (11%) que empiezan a degradarse a los 7 días, haciéndolo de forma lineal y con tasa máxima hasta los 15 días (80%), y de forma más lenta hasta casi desaparecer a los 30 días (92-99%).

La evolución de las poblaciones revela el papel clave de las actinobacterias del suelo en la eliminación de todas las familias de alcanos. De esta forma, a partir del día 3 ya se producen diferencias muy importantes respecto a los controles, con una predominancia de *Actinobacteria* (64-78%) que se mantiene hasta los 15 días, ya que a los 30 días son desplazadas por *Alfaproteobacteria* (32%). *Betaproteobacteria* mantiene una proporción relativamente elevada y constante desde el día 3 hasta el final de la incubación (aprox 20%), pero varios de los representantes detectados lo fueron también en controles.

A los 3 días se detecta muy poca degradación, pero como hemos dicho, la estructura de la comunidad microbiana ya ha cambiado adaptándose a la utilización de alcanos. Dentro de las actinobacterias en este punto se produce un máximo de *Marmoricola* (63%), ya detectada en el inóculo, pero cuyo incremento la vincularía a la degradación de alcanos de cadena corta (C₁₂-C₁₅). Este género ya se había asociado con la utilización de estos compuestos durante la prospección, mediante métodos independientes de cultivo, de la diversidad microbiana presente en suelos contaminados con petróleo y gas de una cuenca sedimentaria en Brasil (Miquelletto et al., 2011). A los 7 y hasta los 15 días, coincidiendo con los máximos de degradación del grueso de los alcanos de cadena media a cadena media-larga (C₁₅-C₃₁), es completamente desplazada por *Gordonia amicalis* (68% y 58%). Otras actinobacterias importantes en este periodo pero con una abundancia muy menor son varios representantes de *Nocardia*, incluyendo *N. tenerifensis*, *N. asteroides*, *N. cyriacigeorgica*, *N. otidiscaviarum* y *N. caishijiensis*. La capacidad de utilizar alcanos de cadena media y larga como sustrato de crecimiento se ha descrito previamente para los miembros de ambos géneros (De Pasquale et al., 2012; Quatrini et al., 2008). De hecho, miembros de *Gordonia amicalis*, muy próximos a los observados en este trabajo, han sido detectados mediante métodos moleculares en suelos fuertemente contaminados con petróleo (Shen et al., 2008), y han mostrado su capacidad de degradar alcanos de C₁₂-C₃₆ (Quatrini et al., 2008).

Entre las betaproteobacterias, el máximo a 3 días de *Cupriavidus*, lo relacionaría con los alcanos de cadena corta, mientras que *Rhodoferax* estaría asociada a los de cadena media. *Hydrogenophaga* se detecta también en controles, pero aquí mantiene abundancias relativas más elevadas a lo largo de toda la incubación. Ello podría indicar su papel como degradador secundario. Finalmente, destacan tres alfa-proteobacterias que aumentan a tiempo 15 pero alcanzan sus máximos al final. Se trata de *Ensifer*, *Rhizobium*, y sobre todo *Sphingopixys*, que junto a la gamma-proteobacteria *Pseudoxanthomonas mexicana* podrían estar vinculadas a la degradación de alcanos de cadena larga e isoprenoides, o posiblemente a la degradación secundaria de ácidos grasos remanentes en el medio tras el primer ataque oxidativo.

La mayoría de estos grupos de *Proteobacteria* se han vinculado a la utilización de hidrocarburos. Durante la degradación de fracciones de keroseno mediante un consorcio microbiano obtenido de suelos, se detectó la predominancia de betaproteobacterias, entre ellas *Cupriavidus*, que se asociaron a la degradación de las fracciones alifática y aromática de la mezcla (Bacosa et al., 2010).

Se ha descrito el cometabolismo de (MTBE) (Metil tert-butil éter) en presencia de alcanos (Nava et al., 2007), siendo *Hydrogenophaga flava* ENV735 (Hatzinger y col., 2001), la responsable de la oxidación de MTBE a TBA (Terbutanol) a través de la actividad de alcano hidroxilasas inducibles, por lo que sus alcanos hidroxilasas podrían estar implicadas en la degradación de la fracción alifática. Por otro lado, se conoce que especies de *Rhizobium* son capaces de metabolizar una variedad de compuestos orgánicos como hidroxí y dihidroxibenzoatos, compuestos aromáticos halogenados y alcanos; además en estudios de bioaumentación con suelos se demostró que tras su inóculo se incrementó la degradación de hexadecano (Vela et al., 2002). Miembros de Sphingopyxis han sido aislados por su capacidad de degradar alcanos (C₆, C₈, C₁₀, C₁₂ y C₁₆) a partir de la rizosfera de suelos contaminados con crudo de petróleo, mostrando la presencia de citocromo P450 monooxigenasas (Yousaf et al., 2010). Finalmente, miembros de *Pseudoxanthomonas*, como la cepa RN402, han mostrado la capacidad de degradar efectivamente diésel, crudo de petróleo, *n*-tetradecano y *n*-hexadecano (Nopcharoenkul et al., 2012).

Los genes *AlkB* detectados en las librerías de clones a tres días presentan homología con enzimas de la gammaproteobacteria *Agrobacterium* y de *Pedobacter* (*Bacteroidetes*). En el análisis de la estructura de la comunidad bacteriana se detectaron varias gammaproteobacterias, entre ellas *Agrobacterium*, pero su abundancia era muy baja. Ello unido a que el grado de similitud de estas secuencias de *AlkB* es muy bajo (73-82%), podría indicar que pertenecen a otros grupos. De hecho, el análisis filogenético de las secuencias de *AlkB* detectadas, agrupó a *AlkBseq* 10-14 en un grupo muy homogéneo dentro del cluster IIB_2c2, donde se encuentran todo el resto de secuencias detectadas en este trabajo, y en el cual se ubican mayoritariamente *AlkB* correspondientes a Actinobacteria, siendo las secuencias AEY77890 y AEY77872, las únicas identificadas como correspondientes a bacterias Gram-negativas. Por otro lado, teniendo en cuenta que en los cultivos a tiempo 0 y controles no se obtuvo amplificación, y que a 15 días no se detectan, estas enzimas podrían estar relacionados con la degradación de alcanos de cadena corta. En este sentido, considerando que *Marmoricola* es el componente mayoritario de la comunidad en este punto, la detección de estas alcano monooxigenasas podría vincularse a este género. De hecho, se han encontrado genes relacionados con *AlkB* implicados en la degradación de alcanos de cadena corta en cepas del género *Nocardioides* (Hamamura et al., 2001), el cual juntamente con *Marmoricola* constituye la familia *Nocardioideaceae*, dentro de la cual ambos géneros se encuentran filogenéticamente interrelacionados (Urzi et al., 2000).

El papel de *Gordonia* y *Nocardia* en la degradación de alcanos está confirmado por el hecho de que la mayoría de genes *AlkB* detectados en la librería de clones a 7 y 15 días presentan una alta homología (90-100%) con alcano hidroxilasas descritas para estos géneros. Concordando con la sucesión observada en los análisis poblacionales, los genes *AlkB* de *Gordonia* se detectan a los 7 días, mientras que los de *Nocardia* son los únicos detectados a 15 días. Ello sugiere una predilección de *Gordonia* por los alcanos de cadena más corta. De hecho, las dos secuencias de *AlkB* correspondientes a *Gordonia* detectadas aquí (*AlkB* seq4 y seq5), presentaron su máxima similitud con dos *AlkB* correspondientes a dos aislados de *Gordonia* obtenidos en el mismo trabajo (Shen et al., 2010), los cuales presentaron la capacidad de utilizar compuestos de cadena media C₆-C₂₀. En el mismo sentido, dos de las *AlkB* de *Nocardia* detectadas (*AlkB* seq 3 y seq6), presentaban su máxima similitud con dos *AlkB* de la cepa *Nocardia* sp. SoB, en la que se detectaron hasta tres genes codificantes para este tipo de enzimas (Quatrini et al., 2008), y que presentaba la capacidad de utilizar alcanos de C₁₂-C₃₆. Otras *AlkB* detectadas a 7 días estarían relacionadas con enzimas del bacteroidete *Pedobacter*, que en cambio, no se detectó en la pirosecuenciación. Dado que el grado de similitud de estas dioxigenasas es bajo (76%), podrían corresponder a alcano hidroxilasas de otros taxones.

La alcano hidroxilasa *AlkB* más estudiada es la de *Pseudomonas putida*, que ataca compuestos C₅-C₁₁, sin embargo, se han descrito numerosos homólogos de este enzima tanto en Gram-positivos como en Gram-negativos que atacan alcanos de mayor peso molecular (C₁₂-C₂₀). Esto es consistente la sucesión observada en los distintos homólogos de este gen, y con su presencia pasados los 7 días de incubación, cuando ya prácticamente se han eliminado la totalidad de alcanos de cadena corta (<C₁₂).

En cuanto al gen *CYP153A*, codificante para el citocromo P450 oxigenasa, a tiempo 3 se detectaron homólogos a los descritos para las actinobacterias *Dietzia* y *Rhodococcus*, que podrían haberse relacionado con el incremento de *Marmoricola*, pero fueron también detectados en controles, por lo que no son relevantes.

Lo que sí es significativo es la detección a los 7 y 15 días de genes con secuencias proteicas idénticas a las de P450 de *Gordonia amicalis* y *Mycobacterium austroafricanum*, además de otras similares a las de *G. terrae* y *M. xenopi*. A los 15 días se detectan además P450 próximos a los de la actinobacteria recientemente descrita *Patulibacter*, así como a los de alfaproteobacterias como *Parvibaculum* y *Sphingopyxis*.

Esta última sería consistente con la detección e incremento de este y otros géneros de alfa-proteobacterias a partir de 15 días, apoyando su relación con la degradación de alcanos y no de otros productos metabólicos de otros degradadores primarios. De hecho, como se ha comentado previamente, se han aislado miembros de este género con la capacidad de degradar alcanos y que presentan alcano hidroxilasas tipo citocromo P450 (Yousaf et al., 2010).

En general, las monooxigenasas P450 descritas en la bibliografía actúan sobre alcanos de cadena corta (C₅-C₁₂) (Rojo et al., 2010). En cambio, nuestros resultados las vinculan directamente con hidrocarburos de mayor peso molecular, pudiendo tener una importancia en la degradación de los alcanos de crudos de petróleo y aceites minerales no revelada hasta ahora.

La detección de una naftaleno dioxigenasa idéntica a la de *Pseudomonas stutzeri*, así como bifenil dioxigenasas de otras Gram-negativas, no puede discutirse en términos de degradación de alifáticos, pero sí es consistente con la presencia de esta bacteria en el inóculo y su incremento en todos los microcosmos, incluidos los controles. Sin duda, el aporte de carbono debido a la degradación de alcanos y que se halla disponible en forma de metabolitos parcialmente oxidados por las bacterias que los atacan, favorece el crecimiento de poblaciones acompañantes, que en un suelo contaminado pueden ser portadoras de enzimas de degradación de aromáticos. Esta hipótesis se ve fuertemente reforzada por los resultados obtenidos en el análisis de *microarrays*.

Ya se ha comentado que el *microarray* utilizado no contiene secuencias de genes de alcano hidroxilasas. El objetivo de su utilización era la detección exhaustiva de una variedad de dioxigenasas de HAPs. Se aplicó a los cultivos con F1 con dos finalidades. La primera, utilizarlos como control respecto a los cultivos con HAPs, y, segunda, y no menos importante, determinar si la presencia de alcanos puede tener como consecuencia indirecta el incremento en el número de genes de dioxigenasas, que podrían ejercer su capacidad catalítica en caso de que estuvieran presentes los correspondientes sustratos poliaromáticos. Ello tendría también un efecto importante al favorecer reacciones cometabólicas no necesariamente ligadas a la utilización de los HAPs como sustratos.

A primera vista podría sorprender que en los cultivos con F1 se detecten incrementos de una mayor diversidad de dioxigenasas que en los cultivos con F3 (ver más adelante), aunque, como es lógico, con una abundancia relativa inferior a la que presentan en cultivos con F3 o F1F3. De acuerdo con lo expuesto para la librería de

clones de naftaleno dioxigenasa, su detección se debe a un crecimiento inespecífico de las bacterias que las albergan, que se encuentran en el inóculo y aumentan al aumentar la población en general por el aporte de carbono hecho disponible por las degradadoras de alcanos. Estas dioxigenasas empiezan a detectarse a los 7 días y se mantienen o incrementan su intensidad a los 15 días, coincidiendo por tanto con etapas de máxima degradación en los alcanos. Sin embargo, hay algunos casos en que se producen máximos puntuales muy elevados, casi siempre a los 7 días. Se trata específicamente de naftaleno dioxigenasas de los *clusters* 59 (bphA1f y phnA1a de *Sphingomonas*) y 146, 156 y 180 [(bphA1b), (bphA1a) y (bphA1e), de *Sphingomonas yanoikuyae*]; y de 2,3-dihidroxifenil-1,2-dioxigenasas de los *clusters* 173 (bphA1c de *Sphingomonas*) y 101 (bphC de *Sphingomonas*). El hecho de que estos máximos se produzcan en enzimas tan concretos y de forma tan puntual hace que no puedan interpretarse como la respuesta inespecífica de diversas poblaciones a la presencia de fuentes de carbono fácilmente asimilables, producto del metabolismo de los alcanos por otras bacterias. El incremento selectivo de estos enzimas es consistente más bien con la respuesta de poblaciones que presentan una ventaja selectiva en presencia de alcanos, es decir, de degradadoras de alcanos portadoras de dioxigenasas. Este resultado es consistente con el aumento de géneros de esfingobacterias en la población, como *Sphigopyxis*, que pasa a ser casi el 20% del total, y dentro del que, tal y como se ha comentado, se han descrito cepas degradadoras de alcanos. Además, la bibliografía recoge varias cepas de *Shingomonas* degradadoras de alcanos (van Beilen, 2006), que pueden crecer en compuestos de cadena media y hexadecano (Vomberg et al., 2000).

La detección de elevados niveles de catecol 2,3-dioxygenasas de los *clusters* 4_1 y 4_2 (xylE, bztE, bphE, nahH) de *Achromobacter* sí parece deberse al crecimiento inespecífico debido a la disponibilidad de fuentes de carbono de fácil utilización.

Degradación de HAPs y dinámica de poblaciones/genes funcionales en microcosmos con la fracción de HAPs (F3)

La fracción de HAPs estaba constituida en un 80% por naftalenos y fenantrenos, mientras que el resto eran dibenzotiofeno y HAPs de 4 o más anillos. Después de un corto periodo de adaptación, la fracción de HAPs es degradada rápida y extensivamente por las poblaciones del suelo tratado. Las cinéticas dependen de cada compuesto, pero en general la máxima degradación se produce entre los 3 y 15 días (el 50%). Después, aunque en los compuestos más degradados se observa una

ralentización, en los de mayor peso molecular las tasas continúan siendo lineales hasta final de la incubación. Tal y como está descrito (Vila & Grifoll, 2009), la preferencia con que se degradan los compuestos depende el número de anillos y de sustituyentes metilo en la molécula, y corresponde a la siguiente secuencia: N, N1 (max 0-7d)>N2, N3, Fl (3-15d)> Phe, Fl1, Phe1, DBT, DBT1 (7-15d)>N4, Phe2, DBT2 (7-30d)>Phe3, DB3, C1, C2 (15-30). El pireno y metilpirenos no fueron degradados significativamente pero se observa una lenta tendencia a la reducción en los últimos días. El residuo final contiene el 41% de los HAPs (59% de degradación).

Al igual que en el caso de los alcanos, los análisis de pirosecuenciación revelan una muy baja diversidad a lo largo de toda la degradación. En este caso hay un predominio de *Alfaproteobacteria* y, concretamente, de un representante de *Sphingobium* que alcanza proporciones relativas de casi el 100% a los 7 y 15 días, para disminuir hasta un 66% a los 30 días. Esta disminución en la segunda parte de la incubación permite una mayor diversidad, con incrementos de *Actinobacteria* que ya habíamos detectado en los microcosmos con F1, como *Nocardia cyriacigeorgica*, *N. asteroides*, *Gordonia amicalis* y *Marmoricola*. Ello asocia directamente *Sphingobium* a la degradación de la mayoría de los HAPs, que como recordaremos en un 80% eran compuestos de 2-3 anillos. La presencia de las actinobacterias, aunque no puede descartarse su posible papel en la degradación de HAPs de elevado peso molecular, podría deberse a que aquí realicen un papel de degradadoras secundarias. La poca abundancia y el bajo porcentaje de degradación de HAPs de más de 4 anillos no permiten, seguramente, destacar a las poblaciones específicas directamente implicadas en su ataque.

En los microcosmos con F3 no se obtuvo amplificación de *AlkB* pero, en cambio, si se detectaron varias citocromo P450 oxidasas. A los 3 días, en la librería de clones predominan secuencias asociadas a *Dietzia* que también se encuentran en controles, pero a los 15 días se detecta un set completamente distinto de secuencias de P450, formado por dos grupos, uno corresponde a la de P450 de *Gordonia amicalis* y *Mycobacterium austroafricanum* detectadas en cultivos con F1, y el otro a distintas secuencias cercanas a P450 de alfaproteobacterias como *Sphingopyxis* y *Bradyrhizobium*. La presencia de estos genes obedece en parte al incremento en la abundancia relativa de las actinobacterias al final de la incubación. Este incremento no se puede relacionar con la degradación de HAPs, pero tiene su importancia, ya que la disponibilidad de alcanohidroxilasas P450 podría propiciar reacciones cometabólicas de estas cepas sobre algunos HAPs.

La amplificación del gen correspondiente a la naftaleno dioxigenasa dio lugar a una única secuencia ya detectada en los cultivos con F1 y que presenta un 100% de identidad con la naftaleno dioxigenasa de *Pseudomonas stutzeri*. A pesar de ello, no puede descartarse que las poblaciones de *Sphingobium* detectadas aquí alberguen homólogos de esta enzima, pero la detección de este enzima en todos los microcosmos y la presencia de niveles basales pero sistemáticos de *P. stutzeri* en todos ellos parece indicar que su presencia aquí no responde específicamente a una función prominente en la degradación de HAPs del crudo utilizado. De hecho, los primers utilizados para la amplificación de naftaleno dioxigenasas se definieron mayoritariamente en base a las secuencias de los genes *nahAc* y *ndo* de distintas cepas de *Pseudomonas* (Iwai et al., 2011), lo que sugiere la existencia de un sesgo a favor de la detección de las dioxigenasas de este género. En este sentido, un trabajo reciente realizado con distintas cepas de *Sphingomonas* y *Sphingobium* degradadoras de HAPs demostró que ninguna de ellas amplificaba con dos juegos de cebadores diseñados para la detección del gen *nahAc* y *phnAc* (Guo et al., 2010). Las biphenyl dioxigenasas detectadas en la librería tampoco difieren de las observadas en los cultivos con F1, que corresponden a *Pseudoxantomonas* y *Pseudomonas*, a excepción de una nueva secuencia próxima a una bifenil dioxigenasa de *Polaromonas*. Estos resultados plantean la posibilidad de que en la librería de clones no se hayan detectado las dioxigenasas realmente implicadas en el ataque a los HAPs.

En efecto, el análisis de los resultados de los *microarrays* ofrece una imagen de las dioxigenasas presentes en estos microcosmos muy distinta. De hecho, la detección de varias dioxigenasas con secuencias correspondientes a clústeres de dioxigenasas de *Sphingomonas* y *Novosphingobium*, es coherente con el predominio de *Sphingobium* en el análisis de poblaciones. Los tres géneros pertenecen a la misma familia de *Alfaproteobacteria* y desde el punto de vista tanto fenotípico como filogenético están muy cercanos. El temprano y progresivo aumento de naftaleno dioxigenasas de los clústeres **83** (*phnA1b*, *bphA1c*), **146** (*bphA1c*) y **263** (*phnA1b*), de 2,3-dihidroxibiphenyl-1,2-dioxigenasas del clúster **48** (*bphC*, *phnC*, *dmdC*), y de catecol-2,3-dioxigenasas de los clústeres **8_2** y **8_3** (*xylE*, *cate*, *xmpE*, *catA*, *nahH*) indica la participación de estas enzimas en la degradación tanto de naftalenos como de fenantrenos, así como lo adaptadas que están estas poblaciones a la degradación de este tipo de compuestos.

Estos resultados son coherentes con la información disponible en la bibliografía acerca de las rutas metabólicas y la organización de los genes de degradación en

Sphingomonas. En una revisión sobre *Sphingomonas yanoikuyae* (Zylstra & Kim, 1997) se recoge que esta bacteria es capaz de utilizar una gran variedad de compuestos aromáticos, incluyendo bifenil, naftaleno, fenantreno, tolueno, y *m*- y *p*-xileno. El ataque a los distintos compuestos puede producirse por naphthaleno dioxigenasas, que en ocasiones actúan sobre bifenil (bph) o por dioxigenasas más específicas, pero las distintas vías convergen en un intermediario común, el catecol, que es degradado via catecol 2,3-dioxigenasas. Los genes se encuentran en 6 operones distintos, pero no están organizados en rutas discretas sino combinados en grupos con genes para la degradación de varios tipos de compuestos, que son inducidos en presencia de cualquiera de los sustratos. Esto da un gran potencial catabólico a esta cepa, reaccionando a la presencia de cualquier sustrato con una amplia diversidad de enzimas, lo que le da una gran ventaja al enfrentarse a mezclas complejas, pudiendo atacar simultáneamente a muchos compuestos mediante reacciones metabólicas y cometabólicas.

Finalmente, destacar que algunas de las dioxigenasas detectadas presentan máximos a 30 días, cuando sólo queda el residuo de compuestos de mayor peso molecular. Se trata por ejemplo de tolueno dioxigenasas del cluster 127 (xylX), naftaleno dioxigenasas del 59 (bphA1a, phnA1a), 146 (bphA1b), 156 (bphA1a) y 180 (bphA1e) y bifenil dioxigenasas de 173 (bphA1c), todos presentes en *Sphingomonas*. Este máximo a 30 días cuando las tasas de biodegradación son muy bajas y sólo persiste el residuo hidrocarbonado más recalcitrante, podría vincular estos enzimas a la degradación de los HAPs de elevado peso molecular, o bien a que las subpoblaciones que los albergan incrementan su número a costa de la degradación de los productos de degradación parcial que persisten temporalmente después de que los HAPs parentales hayan desaparecido.

Es interesante notar que las catecol-1,2-dioxigenasas, que llevan a cabo una *orto*-ruptura del catecol, y que no suelen participar en vías de degradación de HAPs, se incrementan en microcosmos con F1, en cambio, aquí a penas se detectan, siendo más abundantes las catecol 2,3-dioxigenasas, que si forman parte de las rutas bajas de degradación de HAPs.

Los bajos porcentajes de degradación de compuestos de 4 anillos, como el pireno y sus derivados alquilados, coinciden con la falta de detección de dioxigenasas de Gram-positivos (Nid), que a pesar de formar parte del *array*, no han mostrado hibridación en ninguno de los microcosmos. El pireno es degradado sobre todo por actinobacterias del género *Mycobacterium* (Heitkamp et al., 1998b), por lo que la

detección de homólogos de P450 de *M. austroafricanum*, había sugerido la posibilidad de que este microorganismo pudiera estar presente a baja concentración como degradador de pireno. Aquí quizá hayan jugado un papel las condiciones de incubación, que favorecían el desarrollo de organismos de crecimiento rápido. Estos resultados son coherentes con la ausencia de detección de ftalato hidroxilasas y protocatecuato dioxigenasas, que suelen formar parte de las rutas bajas de degradación de HAPs por actinobacterias (Vila et al., 2001; López et al. 2006; El Azhari et al., 2008; Kweon et al., 2010).

Por otro lado, la no detección de dioxigenasas de Gram-positivos está en concordancia con el papel de *Gordonia* y *Nocardia*, que como hemos visto aumentaban al final de la incubación, no como degradadores de HAPs sino como acompañantes degradando metabolitos no aromáticos de bajo peso molecular liberados por las sphingobacterias.

Degradación de alcanos y HAPs y dinámica de poblaciones/genes funcionales en microcosmos con las dos fracciones combinadas (F1F3)

La cinética de degradación del grueso de los alcanos (C15-31) en microcosmos con las dos fracciones combinadas es prácticamente idéntica a la de los microcosmos con F1. Su degradación se inicia a los 3 días y progresa de forma lineal hasta los 15 días, cuando son completamente eliminados. El pequeño retraso en la degradación de compuestos de cadena corta y de los isoprenoides puede deberse a una posible toxicidad por parte de los naftalenos. La menor extensión en la degradación de alcanos de cadena corta (C32-35) que se observa en las gráficas es poco significativa ya que estos compuestos representan sólo el 0.7% de los HAPs, pero se podría especular que quedan atrapados en la fracción residual formada sobre todo por aromáticos, quedando así reducida su disponibilidad.

La presencia de la fracción alifática tiene un efecto claro en la degradación de la aromática, acelerando la degradación de todas las familias de HAPs. Se produce una degradación significativa de todos los compuestos de cuatro anillos (pirenos, crisenos, y metil derivados) y el residuo de HAPs al final de la incubación es un 66% menor que en los microcosmos con solo F3.

Es especialmente interesante el hecho de que, aunque las tasas de degradación y la extensión de la misma varían en función del tamaño molecular y grupos metilo, las tasas máximas de degradación para todos los compuestos se alcanzan de forma simultánea y muy tempranamente (de 3 a 7 días).

El incremento en las tasas de degradación puede deberse a distintos efectos: (i) Puede ser que los alcanos directamente o sus metabolitos inmediatos (ácidos grasos) aumenten la biodisponibilidad de los HAPs, favoreciendo su utilización por las sphingobacterias degradadoras. Este efecto se apuntó ya en un trabajo previo del grupo (Vila & Grifoll, 2009); ii) Otra posibilidad es que la utilización de la fracción alifática por las bacterias degradadoras de alcanos tenga como consecuencia un aporte inespecífico de carbono al sistema (por ejemplo en forma de ácidos de pequeño tamaño o intermediarios del metabolismo central), que estimule el crecimiento de todas las poblaciones presentes, entre ellas las portadoras de genes de degradación de HAPs; iii) Una variante de esta sería que existan subpoblaciones portadoras de genes de degradación de alcanos que además porten genes de degradación de HAPs, por lo que su crecimiento a costa de los alcanos tendría un efecto directo en el incremento del número de genes de degradación de HAPs de las mismas; iv) Por último, y no menos importante, podría ser que el crecimiento de las poblaciones degradadoras de alcanos y/o el crecimiento inespecífico de algunas degradadoras de HAPs, favorecieran reacciones **cometabólicas** producto del ataque fortuito de alcano hidroxilasas (monooxigenasas del P450, alkB, etc) y/o dioxigenasas dihidroxilantes sobre los HAPs. Es conocido que los citocromo P450 de micobacterias pueden llevar a cabo un ataque no productivo a HAPs de elevado peso molecular, como el pireno, para producir *trans*-dihidrodióles que pueden resolverse como alcoholes y cetonas (Vila et al., 2001; Kanaly & Haramaya, 2010). Por otro lado, dioxigenasas bien conocidas, como la naftaleno dioxigenasa de Nah7 y la tolueno dioxigenasa TDO de *Pseudomonas aeruginosa* (producen una rápida monooxigenación de grupos metilo de alquilHAPs (Selifonov et al., 1996; Robertson et al., 1992), dando lugar a alcoholes que son rápidamente deshidrogenados a ácidos aromáticos carboxílicos. Parece ser que distintas alcano hidroxilasas, incluidos los P450, podrían también atacar los grupos metilo, aunque esta hipótesis está poco estudiada (Brezna et al., 2006). Estas reacciones cometabólicas producirían una rápida reducción de los HAPs parentales formándose oxy-HAPs que podrían ser posteriormente mineralizados por rutas más o menos específicas, y del todo desconocidas. Este trabajo es una primera aproximación para desvelar estos posibles efectos.

Un primer paso en nuestra investigación fue el intento de detección de oxy-PAHs en el medio de cultivo de los microcosmos. La identificación de productos de monooxidación, especialmente de ácidos carboxílicos aromáticos, y su posible cinética de acumulación daría soporte a la hipótesis de cometabolismo. En un trabajo previo de nuestro grupo, en el que se estudiaba la degradación de crudo de petróleo por una cepa de *Mycobacterium gilvum* (AP1), se detectó una variedad de ácidos naftoicos en el extracto ácido de los cultivos (Vila & Grifoll, 2009). Más recientemente hemos puesto a punto y validado un protocolo que nos ha permitido detectar oxy-HAPs en varios suelos y aguas subterráneas contaminados por creosota (Arias, 2008). Al aplicar un protocolo similar aquí, no se consiguió demostrar la presencia de metabolitos ácidos en ninguno de los microcosmos. Ello no descarta totalmente que pudieran formarse. Los microcosmos albergan una comunidad microbiana especializada y las condiciones de incubación son óptimas para la degradación (oxigenación y homogenización continua). Ello unido al pequeño volumen de los microcosmos ha podido dificultar la identificación de estos compuestos, ya habitualmente acumulados en muy bajas concentraciones. Otra posibilidad es que estos productos si se producen, estén atrapados en la NAPL y se extraigan en los extractos neutros. Un futuro fraccionamiento y derivatización de estos extractos nos permitirá confirmar o descartar esta posibilidad.

Analicemos ahora el cambio en la estructura de la comunidad de los microcosmos con las dos fracciones, alifática y aromática (F1F3). A los 7 días de incubación y coincidiendo con el periodo de máxima desaparición de los HAPs, las poblaciones de actinobacterias degradadoras de alcanos (sobre todo *Gordonia*), que en cultivos con la F1 persistían hasta el final de la incubación, aquí son desplazadas por las esfingobacterias (α) degradadoras de HAPs. No se trata pues de una simple desaparición de los HAPs debida a una oxidación inicial, sino que incrementan de forma importante las bacterias que los utilizan como fuente de carbono para el crecimiento. Por tanto, una simple acción cometabólica (iv) no parece ser la única causa de la desaparición más rápida de los HAPs. En todo caso, si esta acción se da, los productos producidos serían subsecuente y rápidamente utilizados como fuentes de carbono por las degradadoras de HAPs.

Este incremento podría deberse simplemente a que los alcanos incrementan la disponibilidad de los HAPs y ello produce un incremento en su tasa de degradación y de crecimiento en las poblaciones degradadoras (hipótesis i). Sin embargo, si hacemos un balance aproximado de la desaparición de alcanos y HAPs, veremos que a los 7 días se han degradado 165 $\mu\text{g/ml}$ de alcanos y sólo 31 $\mu\text{g/ml}$ de HAPs, cinco

veces menos. Si el carbono de los alcanos fuera utilizado únicamente por las actinobacterias y el de los HAPs sólo por las sphingobacterias (α), como ocurre en los microcosmos con F1 o F3, y asumimos una conversión similar en ambas poblaciones, no puede ser que la utilización de una cantidad de carbono (HAPs) cinco veces menor por las sphingobacterias haya resultado en su predominio (75%) sobre las actinobacterias. Por lo tanto, la hipótesis del incremento de la biodisponibilidad (i) tampoco explica por sí sola la aceleración en la degradación de los HAPs

Estos datos indican que en el periodo 3-7 días una parte del carbono proveniente de la degradación de alcanos ha sido utilizado por las alfaproteobacterias (sphingobacterias), lo que les ha permitido una utilización sinérgica de los HAP de bajo peso molecular, creciendo rápidamente y desplazando a las actinobacterias (hipótesis ii). Este carbono puede estar constituido por ácidos grasos de cadena larga o corta, que después del ataque inicial por las alcanohidroxilasas de las actinobacterias o después incluso de sufrir una degradación extensiva hasta ácidos de bajo peso molecular, hayan difundido al medio de cultivo y hayan sido utilizados por las alfaproteobacterias. Se ha demostrado que en presencia de fuentes de carbono fácilmente asimilables se produce una más rápida adaptación de las poblaciones degradadoras a la utilización de contaminantes orgánicos complejos, aunque las razones no estén completamente demostradas (Alexander, 1999). La causa podría ser un efecto de *quorum sensing* o un aporte de la energía umbral necesaria para iniciar el proceso de inducción de los enzimas de oxidación de HAPs y para que se lleve a cabo el ataque inicial de las dioxigenasas. Las dioxigenaciones iniciales necesitan un importante aporte de poder reductor.

La hipótesis iii) también puede tener importancia. Ya hemos visto que existen cepas de sphingobacterias que pueden degradar alcanos (Vomberg et al., 2000). La utilización de los alcanos tendría un efecto directo en su crecimiento y en las tasas de degradación simultánea de HAPs.

A los 7 días se han degradado los HAPs de 2-3 anillos con bajo número de alquilo y las fracciones más disponibles de los HAPs de 4 anillos. El residuo es menos disponible y las tasas de degradación se hacen más lentas. Ello hace que en el periodo de 7-15 días las alfaproteobacterias retrocedan a favor de las actinobacterias, que continúan degradando alcanos con la misma tasa, hasta agotarlos.

Después de los 15 días, tras el agotamiento del sustrato e igual que sucedía en los cultivos con F1, las poblaciones de actinobacterias degradadoras de alcanos se reducen dramáticamente hasta casi desaparecer. Esto permite un segundo incremento relativo de alfa-proteobacterias, que continúan degradando los HAPs residuales. No proliferan las oligotróficas gamma y beta-proteobacterias dominantes en los cultivos sin fuente de carbono porque aquí queda todavía carbono disponible. Aunque no se ha podido demostrar, parte de este carbono podría estar constituido aquí por compuestos aromáticos parcialmente oxidados.

La presencia de las *Nocardia* tendría la misma explicación que en los microcosmos F1, donde realizaban funciones de ataque a alcanos de cadena media, y en los microcosmos F3, donde aumentaban como degradadoras secundarias, a costa del carbono liberado por las alfa-proteobacterias.

Las alcano hidroxilasas Alk B detectadas a 15 días en estos microcosmos son también de *Gordonia* y *Nocardia*, pero la mayoría son secuencias distintas a las observadas en los microcosmos F1. Probablemente existan distintas subpoblaciones de estos géneros que reaccionan de forma distinta a la presencia de HAPs. Las monooxigenasas P450 coinciden con las detectadas en los microcosmos con F1 a tiempo 7 días, sobre todo las de *Mycobacterium austroafricanum*.

Los resultados obtenidos en la librería de clones de dioxigenasas de clase B (tolueno y bifenil dioxigenasa) difieren de los encontrados previamente. A parte de las homólogas a las bifenil dioxigenasas de *Pseudoxantomonas*, que aparecen en controles y en los microcosmos F1 y F3 hacia el final de la incubación cuando se agotan las fuentes de carbono, en el tiempo 15 de los microcosmos con F1F3 aparecen secuencias no detectadas anteriormente y que presentan alta homología con enzimas de *Pseudoxantomonas spadix*. Quizá su presencia aquí sea debida a que la mayoría de los HAPs han sido degradados y queden sólo productos parcialmente oxidados que podrían ser posteriormente atacados por estas enzimas.

En los resultados de los *microarrays*, los genes de dioxigenasas con mayores incrementos a través del tiempo coinciden con aquellos con valores máximos en los microcosmos con F3: naftaleno 1,2-dioxigenasas de los clusters (phnA1b, bphA1c), (bphA1e) y (phnAc) (83, 180, 263), 2,3-dihidroxibifenil 1,2-dioxigenasas homólogas de (bphC, phnC, dmdC) (48), y catecol 2,3-dioxigenasas de los grupos (xylE, catE, cmpE, catA, nahH) (8_1, 8_2), descritos para enzimas de *Sphingomonas* y *Novosphingovium*.

El hecho de que no se detecten muchos de los genes de dioxigenasas que aumentaron notablemente en los microcosmos con F1 (clusters 173, 100, 101, 687) no sorprende, ya que hemos asociado su incremento a un aumento de las poblaciones que las albergan asociado directa o indirectamente a la degradación de alcanos. De modo que aquí, como ocurría en los microcosmos con F3, su abundancia relativa se ha visto desplazada por las dioxigenasas más específicamente implicadas a la utilización de HAPs.

Es más interesante el hecho de que un grupo de genes codificantes de dioxigenasas que destacaron en los microcosmos con HAPs (F3) no fuera detectado o presentara valores bajos en los microcosmos con F1F3. Estos genes incluyen los de tolueno dioxigenasas *xylX*, varias naphthaleno-1,2-dioxigenasas de los grupos (*bphA1f*, *phnA1a*) (*bphA1b*) y (*bphA1a*), bifenil dioxigenasas homologas de (*bphA1c*), y catecol dioxigenasas del grupo (*xylE*, *catE*, *cmpE*, *catA*, *nahH*) (127, 59, 146, 156, 173) todas típicas de *Sphingomonas*. Ello sugiere sin duda que los mecanismos (rutas) por los que los HAPs son degradados en presencia de la fracción alifática (F1), son distintos a los que se seleccionan en su ausencia. Este resultado, junto al de mayor degradación de la fracción de HAPs (F3) en presencia de alcanos, y al hecho de que los genes de dioxigenasas detectados en microcosmos con F1F3 no presenten valores más elevados que en los microcosmos que contienen sólo F3, apunta a que en la degradación de HAPs, cuando estos se encuentran inmersos en una matriz de alifáticos, participa un conjunto de enzimas distinto que cuando los alcanos no están presentes. Tal vez, sean necesarias dioxigenasas distintas para la degradación de los productos cometabólicos producidos por la acción fortuita de las numerosas alcano hidroxilasas activas como resultado del crecimiento de la población degradadora de alcanos. Este posible set de dioxigenasas que permitirían el aprovechamiento de los productos cometabólicos por poblaciones degradadoras de HAPs y quizá por componentes del género *Nocardia*, que aparecen en todas las condiciones pero incrementan de forma mucho más marcada en cultivos con F1F3, no son conocidas todavía, y por lo tanto no se encontraban en el *microarray* utilizado. Nuestros esfuerzos se centrarán ahora en el aislamiento de los grupos detectados para correlacionar directamente las bacterias con los enzimas e investigar su comportamiento en consorcios discretos.

En la presente tesis doctoral se ha evaluado la biorremediación *on site* de un emplazamiento real contaminado con derivados del crudo de petróleo mediante la utilización de biopilas aerobias estáticas. Se ha determinado el destino de los HAPs, haciendo énfasis en sus derivados metilados, y se han caracterizado las poblaciones microbianas autóctonas implicadas, analizando su dinámica en respuesta a la estrategia de remediación planteada, y su estructura desde un punto filogenético y funcional a partir incubaciones con distintos componentes a nivel de laboratorio.

- Durante el tratamiento de biorremediación, la concentración de TPHs se redujo de los 19799 mg/kg iniciales a 6373 mg/kg a los 120 días (67,8%). Esto permitió alcanzar el umbral objetivo de biorremediación, fijado en menos de 8000 mg/kg, para su uso industrial.
- La concentración de los 16 HAPs incluidos en la lista de contaminantes prioritarios de la EPA se redujo en un 93%, siendo los compuestos de dos y tres anillos los que se degradaron más rápida y extensamente (93-96%) en comparación a los compuestos de mayor peso molecular, como los de cuatro (86-91%) o cinco (73-96%) anillos. Sorprendentemente, en contra de las observaciones habituales, sus derivados metilados se degradaron también con extensiones y cinéticas similares.
- El análisis mediante fragmentogramas de iones reconstruidos permitió detectar la presencia de productos de oxidación de carbonos aromáticos, nafténicos y metílicos de alquil HAPs con distinto grado de metilación. La presencia de estos productos sería el resultado de oxidaciones cometabólicas, posiblemente realizadas por bacterias degradadoras de alcanos, y podrían explicar las cinéticas de degradación atípicas observadas para los HAPs alquilados.
- El análisis de la estructura de la comunidad bacteriana mediante técnicas moleculares (PCR-DGGE, librería de clones y pirosecuenciación) mostró una homogeneización de las poblaciones a lo largo del tratamiento,
- A lo largo del tratamiento se observó un predominio de *Proteobacteria*, con alternancias entre géneros típicamente asociados a la degradación de HAPs y alcanos, como *Hydrogenophaga*, *Acidovorax* (*Betaproteobacteria*), *Sphingomonas*, *Novosphingobium* (*Alfaproteobacteria*) y *Pseudomonas* (*Gammaproteobacteria*). *Actinobacteria* fue el segundo filo más abundante (10%), detectándose miembros de *Microbacterium*, *Agrococcus*, *Mycobacterium* y

Dietzia, típicamente asociados a la degradación de HAPs de elevado peso molecular y alcanos.

- Mediante dilución hasta la extinción se ha identificado a *Sphingobium*, juntamente con miembros de *Sphingopyxis*, *Xanthomonadaceae* y *Dietzia*, como el componente mayoritario implicado en la degradación de fenantreno. *Sphingopyxis* y distintos miembros de *Nocardioides* se han vinculado a la utilización de pireno. Varias de estas cepas, y otras no detectadas por DGGE, se han aislado por su capacidad de utilizar estos sustratos.
- En microcosmos inoculados con las poblaciones del suelo, la degradación de HAPs se vio favorecida por la presencia de la fracción alifática, observándose un 14% más de degradación en los microcosmos F1F3 en relación a los cultivos con fracción aromática individualmente (F3).
- La degradación de alcanos se ha asociado a miembros de *Actinobacteria*, siendo *Marmoricola*, *Gordonia amicalis* y diferentes especies de *Nocardia*, los responsables principales. En cambio, la degradación de HAPs se ha vinculado eminentemente a miembros de *Sphingobium* (*Alphaproteobacteria*), también vinculado a la utilización de fenantreno a partir del análisis del suelo. Los microcosmos con F1F3 muestran una diversidad de poblaciones que correspondería a la combinación de ambas individualmente, aunque sus abundancias relativas evolucionan de forma distinta.
- El análisis filogenético y funcional de la comunidad bacteriana indica que el efecto sinérgico de la presencia de alcanos sobre la degradación de HAPs no es atribuible únicamente al incremento de la biodisponibilidad. Al contrario, sería el resultado de la suma de distintos factores: el crecimiento inespecífico de poblaciones degradadoras a partir de subproductos de la degradación de los alcanos, el crecimiento específico de poblaciones degradadoras de alcanos y HAPs, y posibles fenómenos de cometabolismo de las poblaciones degradadoras de alcanos sobre los alquil-HAPs.

- Abalos, A., Vinas, M., Sabate, J., Manresa, M. A., & Solanas, A. M. (2004). Enhanced biodegradation of Casablanca crude oil by a microbial consortium in presence of a rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10. *Biodegradation*, 15(4), 249-260.
- Acosta-Martinez, V., Dowd, S., Sun, Y., & Allen, V. (2008). Tag-encoded pyrosequencing analysis of bacterial diversity in a single soil type as affected by management and land use. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(11), 2762-2770.
- Al-Awadhi, H., Sulaiman, R. H., Mahmoud, H. M., & Radwan, S. S. (2007). Alkaliphilic and halophilic hydrocarbon-utilizing bacteria from Kuwaiti coasts of the Arabian Gulf. *Applied microbiology and biotechnology*, 77(1), 183-186.
- Alexander, M. (1999). *Biodegradation and bioremediation*. 2nd ed. Academic Press Inc, San Diego, Calif.
- Alexander, M. (2000). Aging, bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants. *Environmental Science & Technology*, 34(20), 4259-4265.
- Alonso-Gutiérrez, J., Teramoto, M., Yamazoe, A., Harayama, S., Figueras, A., & Novoa, B. (2011). Alkane-degrading properties of *Dietzia* sp. HOB, a key player in the Prestige oil spill biodegradation (NW Spain). *Journal of applied microbiology*, 111(4), 800-810.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research*, 25(17), 3389-3402.
- Alvarez, H., & Steinbüchel, A. (2002). Triacylglycerols in prokaryotic microorganisms. *Applied microbiology and biotechnology*, 60(4), 367-376.
- Alvarez, P. J., & Illman, W. A. (2005). *Bioremediation and natural attenuation: process fundamentals and mathematical models* (Vol. 27). John Wiley & Sons.
- Amann, R. I., Ludwig, W., & Schleifer, K. H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological reviews*, 59(1), 143-169.
- An, D., Brown, D., Chatterjee, I., Dong, X., Ramos-Padron, E., Wilson, S., ... & Voordouw, G. (2013). Microbial community and potential functional gene diversity involved in anaerobic hydrocarbon degradation and methanogenesis in an oil sands tailings pond 1. *Genome*, 56(999), 1-7.
- Andreoni, V., Cavalca, L., Rao, M. A., Nocerino, G., Bernasconi, S., Dell'Amico, E., ... & Gianfreda, L. (2004). Bacterial communities and enzyme activities of PAHs polluted soils. *Chemosphere*, 57(5), 401-412.
- Arias L. (2008). Procesos de biodegradación bacteriana de HAPs en suelos. Tesis doctoral.
- Arias, L., Bauzá, J., Tobella, J., Vila, J., & Grifoll, M. (2008). A microcosm system and an analytical protocol to assess PAH degradation and metabolite formation in soils. *Biodegradation*, 19(3), 425-434.
- Atagana, H. I., Haynes, R. J., & Wallis, F. M. (2003). Optimization of soil physical and chemical conditions for the bioremediation of creosote-contaminated soil. *Biodegradation*, 14(4), 297-307.
- Atlas, R. M. (1981). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiological reviews*, 45(1), 180.
- Atlas, R. M. (1995). Bioremediation of petroleum pollutants. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 35(1), 317-327.
- Bacosa, H., Suto, K., & Inoue, C. (2010). Preferential degradation of aromatic hydrocarbons in kerosene by a microbial consortium. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 64(8), 702-710.
- Baek, K. H., Yoon, B. D., Kim, B. H., Cho, D. H., Lee, I. S., Oh, H. M., & Kim, H. S. (2007). Monitoring of microbial diversity and activity during bioremediation of crude oil-contaminated soil with different treatments. *Journal of microbiology and biotechnology*, 17(1), 67-73.

- Balba, M. T., Al-Awadhi, N., & Al-Daher, R. (1998). Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. *Journal of microbiological methods*, 32(2), 155-164.
- Baldwin, B. R., Nakatsu, C. H., & Nies, L. (2003). Detection and enumeration of aromatic oxygenase genes by multiplex and real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(6), 3350-3358.
- Bamforth, S. M., & Singleton, I. (2005). Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 80(7), 723-736.
- Bardgett, R. (2005). *The biology of soil: a community and ecosystem approach*. Oxford University Press on Demand.
- Batie, C. J., Ballou, D. P., & Correll, C. C. (1991). Phthalate dioxygenase reductase and related flavin-iron-sulfur containing electron transferases. *Chem. Biochem. Flavoenzymes*, 3, 543-556.
- Battelle and NFESC, 1996, Battelle and NFESC, Biopile Operations and Maintenance Manual (1996) Technical Memorandum TM-2190-ENV, 65. Port Hueneme. CA
- Bayona, J. M., Albaigés, J. S. A. M., Solanas, A. M., & Grifoll, M. (1986). Selective aerobic degradation of linear alkylbenzenes by pure microbial cultures. *Chemosphere*, 15(5), 595-598.
- Bell, T. H., Yergeau, E., Maynard, C., Juck, D., Whyte, L. G., & Greer, C. W. (2013). Predictable bacterial composition and hydrocarbon degradation in Arctic soils following diesel and nutrient disturbance. *The ISME journal*, 7(6), 1200-1210.
- Bester, K. (2012). The MAK-Collection for Occupational Health and Safety. *Methods (DFG)*.
- Blumer, M. (1976). Polycyclic aromatic compounds in nature. *Sci. Am. (United States)*, 234(3).
- Bodour, A. A., Wang, J. M., Brusseau, M. L., & Maier, R. M. (2003). Temporal change in culturable phenanthrene degraders in response to long-term exposure to phenanthrene in a soil column system. *Environmental microbiology*, 5(10), 888-895.
- Bossert, I., & Bartha, R. (1984). The fate of petroleum in soil ecosystems. R.M. Atlas (Ed.), *Petroleum Microbiology*, Macmillan, New York (1984), pp. 453-473
- Bouchez, T., Patureau, D., Dabert, P., Juretschko, S., Dore, J., Delgenes, P., ... & Wagner, M. (2000). Ecological study of a bioaugmentation failure. *Environmental Microbiology*, 2(2), 179-190.
- Brezna, B., Kweon, O., Stingley, R. L., Freeman, J. P., Khan, A. A., Polek, B., ... & Cerniglia, C. E. (2006). Molecular characterization of cytochrome P450 genes in the polycyclic aromatic hydrocarbon degrading *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *Applied microbiology and biotechnology*, 71(4), 522-532.
- Brito, E. M. S., Guyoneaud, R., Goñi-Urriza, M., Ranchou-Peyruse, A., Verbaere, A., Crapez, M. A., ... & Duran, R. (2006). Characterization of hydrocarbonoclastic bacterial communities from mangrove sediments in Guanabara Bay, Brazil. *Research in microbiology*, 157(8), 752-762.
- Brunet-Galmés, I., Busquets, A., Peña, A., Gomila, M., Nogales, B., García-Valdés, E., ... & Bosch, R. (2012). Complete genome sequence of the naphthalene-degrading bacterium *Pseudomonas stutzeri* AN10 (CCUG 29243). *Journal of bacteriology*, 194(23), 6642-6643.
- Budzinski, H., Nadalig, T., Raymond, N., Matuzahroh, N., & Gilewicz, M. (2000). Evidence of two metabolic pathways for degradation of 2-methylphenanthrene by *Sphingomonas* sp. strain (2MP11). *Environmental toxicology and chemistry*, 19(11), 2672-2677.
- Cammack R (1992) Iron-sulfur clusters in enzymes: themes and variations. *Adv Inorganic Chem* 38: 281-322.
- Campbell, B. J., Polson, S. W., Hanson, T. E., Mack, M. C., & Schuur, E. A. (2010). The effect of nutrient deposition on bacterial communities in Arctic tundra soil. *Environmental microbiology*, 12(7), 1842-1854.

- Capone, K. A., Dowd, S. E., Stamatas, G. N., & Nikolovski, J. (2011). Diversity of the human skin microbiome early in life. *Journal of Investigative Dermatology*, 131(10), 2026-2032.
- Cardenas, E., & Tiedje, J. M. (2008). New tools for discovering and characterizing microbial diversity. *Current opinion in biotechnology*, 19(6), 544-549.
- Carpio, R. (1997). Refino de petróleo, gas natural y petroquímica. pg 49-52
- Cassidy, M. B., Lee, H., & Trevors, J. T. (1996). Environmental applications of immobilized microbial cells: a review. *Journal of Industrial Microbiology*, 16(2), 79-101.
- Cerniglia, C. E. (1993). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology*, 4(3), 331-338.
- Cole, J. R., Chai, B., Marsh, T. L., Farris, R. J., Wang, Q., Kulam, S. A., ... & Tiedje, J. M. (2003). The Ribosomal Database Project (RDP-II): previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. *Nucleic acids research*, 31(1), 442-443.
- Colwell, R. R. (1979). Enumeration of specific populations by the most-probable-number (MPN) method. *Native aquatic bacteria: enumeration, activity and ecology*. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, 56-61.
- Coulon, F., Al Awadi, M., Cowie, W., Mardlin, D., Pollard, S., Cunningham, C., ... & Paton, G. I. (2010). When is a soil remediated? Comparison of biopiled and windrowed soils contaminated with bunker-fuel in a full-scale trial. *Environmental Pollution*, 158(10), 3032-3040.
- Chaineau, C. H., Morel, J. L., & Oudot, J. (1995). Microbial degradation in soil microcosms of fuel oil hydrocarbons from drilling cuttings. *Environmental science & technology*, 29(6), 1615-1621.
- Chang, C. H., Lee, J., Ko, B. G., Kim, S. K., & Chang, J. S. (2011). *Staphylococcus* sp. KW-07 contains *nahH* gene encoding catechol 2, 3-dioxygenase for phenanthrene degradation and a test in soil microcosm. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65(1), 198-203.
- Chemlal, R., Abdi, N., Lounici, H., Drouiche, N., Pauss, A., & Mameri, N. (2013). Modeling and qualitative study of diesel biodegradation using biopile process in sandy soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 78, 43-48.
- Chemlal, R., Tassist, A., Drouiche, M., Lounici, H., Drouiche, N., & Mameri, N. (2012). Microbiological aspects study of bioremediation of diesel-contaminated soils by biopile technique. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 75, 201-206.
- Chen, H., Zhang, W. J., Cai, Y. B., Zhang, Y., & Li, W. (2008). Elucidation of 2-hydroxybiphenyl effect on dibenzothiophene desulfurization by *Microbacterium* sp. strain ZD-M2. *Bioresource technology*, 99(15), 6928-6933.
- da Silva, M. L. B., & Alvarez, P. J. J. (2010). Bioaugmentation. In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* (pp. 4531-4544). Springer Berlin Heidelberg.
- Daniels L., Handson R. S., Phillips J. A. (1994) Chemical analysis. in *Methods for general and molecular bacteriology*. eds Gerhardt A. P., Murray R. G. E., Wood W. A., Krieg N. R. (ASM Press, Washington, D.C.) p 512.
- Dasch, J., Abdul, A. S., Rai, D. N., Gibson, T. L., & Grosvenor, N. (1997). Synergistic application of four remedial techniques at an industrial site. *Ground Water Monitoring & Remediation*, 17(3), 194-209.
- De Pasquale, C., Palazzolo, E., Piccolo, L. L., & Quatrini, P. (2012). Degradation of long-chain n-alkanes in soil microcosms by two actinobacteria. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 47(3), 374-381.
- De Smet, M. J., Eggink, G., Witholt, B., Kingma, J., & Wynberg, H. (1983). Characterization of intracellular inclusions formed by *Pseudomonas oleovorans* during growth on octane. *Journal of bacteriology*, 154(2), 870-878.

- DeBruyn, J. M., Chewing, C. S., & Saylor, G. S. (2007). Comparative quantitative prevalence of Mycobacteria and functionally abundant *nidA*, *nahAc*, and *nagAc* dioxygenase genes in coal tar contaminated sediments. *Environmental science & technology*, 41(15), 5426-5432.
- Declercq, I., Cappuyns, V., & Duclos, Y. (2012). Monitored natural attenuation (MNA) of contaminated soils: State of the art in Europe—A critical evaluation. *Science of the Total Environment*, 426, 393-405.
- Delille, D., Coulon, F., & Pelletier, E. (2004). Effects of temperature warming during a bioremediation study of natural and nutrient-amended hydrocarbon-contaminated sub-Antarctic soils. *Cold Regions Science and Technology*, 40(1), 61-70.
- Delille, D., Duval, A., & Pelletier, E. (2008). Highly efficient pilot biopiles for on-site fertilization treatment of diesel oil-contaminated sub-Antarctic soil. *Cold Regions Science and Technology*, 54(1), 7-18.
- Demaneche, S., Meyer, C., Micoud, J., Louwagie, M., Willison, J. C., & Jouanneau, Y. (2004). Identification and functional analysis of two aromatic-ring-hydroxylating dioxygenases from a *Sphingomonas* strain that degrades various polycyclic aromatic hydrocarbons. *Applied and environmental microbiology*, 70(11), 6714-6725.
- Desai, J. D., & Banat, I. M. (1997). Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and molecular Biology reviews*, 61(1), 47-64.
- DeSantis, T. Z., Hugenholtz, P., Larsen, N., Rojas, M., Brodie, E. L., Keller, K., ... & Andersen, G. L. (2006). Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Applied and environmental microbiology*, 72(7), 5069-5072.
- Dibble, J. T., & Bartha, R. (1979). Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, 37(4), 729-739.
- Díez, B., Pedrós-Alió, C., Marsh, T. L., & Massana, R. (2001). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to study the diversity of marine picoeukaryotic assemblages and comparison of DGGE with other molecular techniques. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(7), 2942-2951.
- Díez, S., Sabaté, J., Viñas, M., Bayona, J. M., Solanas, A. M., & Albaigés, J. (2005). The Prestige oil spill. I. Biodegradation of a heavy fuel oil under simulated conditions. *Environmental toxicology and chemistry*, 24(9), 2203-2217.
- Dimitriou-Christidis, P., Autenrieth, R. L., McDonald, T. J., & Desai, A. M. (2007). Measurement of biodegradability parameters for single unsubstituted and methylated polycyclic aromatic hydrocarbons in liquid bacterial suspensions. *Biotechnology and bioengineering*, 97(4), 922-932.
- Dosta, J., Nieto, J. M., Vila, J., Grifoll, M., & Mata-Álvarez, J. (2011). Phenol removal from hypersaline wastewaters in a Membrane Biological Reactor (MBR): operation and microbiological characterisation. *Bioresource Technology*, 102(5), 4013-4020.
- Dowd, S. E., Hanson, J. D., Rees, E., Wolcott, R. D., Zischau, A. M., Sun, Y., ... & Jones, C. E. (2011). Research survey of fungi and yeast in polymicrobial infections in chronic wounds. *Journal of wound care*, 20(1), 40-47.
- Dowd, S. E., Sun, Y., Wolcott, R. D., Domingo, A., & Carroll, J. A. (2008). Bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP) for microbiome studies: bacterial diversity in the ileum of newly weaned Salmonella-infected pigs. *Foodborne Pathogens and Disease*, 5(4), 459-472.
- Dowd, S., Callaway, T., Wolcott, R., Sun, Y., McKeenan, T., Hagevoort, R., & Edrington, T. (2008). Evaluation of the bacterial diversity in the feces of cattle using 16S rDNA bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP). *BMC microbiology*, 8(1), 125.
- Duba, A. G., Jackson, K. J., Jovanovich, M. C., Knapp, R. B., & Taylor, R. T. (1996). TCE remediation using in situ, resting-state bioaugmentation. *Environmental science & technology*, 30(6), 1982-1989.

- Dugat-Bony, E., Missaoui, M., Peyretailade, E., Biderre-Petit, C., Bouzid, O., Gouinaud, C., ... & Peyret, P. (2011). HiSpOD: probe design for functional DNA microarrays. *Bioinformatics*, 27(5), 641-648.
- Dutta, T. K., Selifonov, S. A., & Gunsalus, I. C. (1998). Oxidation of Methyl-Substituted Naphthalenes: Pathways in a Versatile Sphingomonas paucimobilis Strain. *Applied and environmental microbiology*, 64(5), 1884-1889.
- Edgar, R. C. (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, 26(19), 2460-2461.
- Efroymsen, R. A., & Alexander, M. (1995). Reduced mineralization of low concentrations of phenanthrene because of sequestering in nonaqueous-phase liquids. *Environmental science & technology*, 29(2), 515-521.
- Eisler, R. (1987). *Polycyclic aromatic hydrocarbon hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review* (No. PB-87-189825/XAB; BIOLOGICAL-85 (1.11)). Patuxent Wildlife Research Center, Laurel, MD (USA).
- El Azhari, N., Bru, D., Sarr, A., & Martin-Laurent, F. (2008). Estimation of the density of the protocatechuate-degrading bacterial community in soil by real-time PCR. *European Journal of Soil Science*, 59(4), 665-673.
- El Fantroussi, S., & Agathos, S. N. (2005). Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation?. *Current Opinion in Microbiology*, 8(3), 268-275.
- El Fantroussi, S., Verschuere, L., Verstraete, W., & Top, E. M. (1999). Effect of phenylurea herbicides on soil microbial communities estimated by analysis of 16S rRNA gene fingerprints and community-level physiological profiles. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(3), 982-988.
- Engelbrektson, A., Kunin, V., Wrighton, K. C., Zvenigorodsky, N., Chen, F., Ochman, H., & Hugenholtz, P. (2010). Experimental factors affecting PCR-based estimates of microbial species richness and evenness. *The ISME journal*, 4(5), 642-647.
- Eom, I. C., Rast, C., Veber, A. M., & Vasseur, P. (2007). Ecotoxicity of a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-contaminated soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 67(2), 190-205.
- EPA, U. S. (2004). <http://www.epa.gov>.
- Eren, A. M., Zozaya, M., Taylor, C. M., Dowd, S. E., Martin, D. H., & Ferris, M. J. (2011). Exploring the diversity of Gardnerella vaginalis in the genitourinary tract microbiota of monogamous couples through subtle nucleotide variation. *PloS one*, 6(10), e26732.
- Eriksson, M., Dalhammar, G., & Borg-Karlson, A. K. (2000). Biological degradation of selected hydrocarbons in an old PAH/creosote contaminated soil from a gas work site. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53(5), 619-626.
- Eriksson, M., Ka, J. O., & Mohn, W. W. (2001). Effects of low temperature and freeze-thaw cycles on hydrocarbon biodegradation in Arctic tundra soil. *Applied and environmental microbiology*, 67(11), 5107-5112.
- European Environmental Agency Report No 2/2007 (2007) Available from: <<http://www.eea.europa.eu>>
- Eweis, J. B., Ergas, S. J., & Schroeder, E. D. (1999). *Principios de biorrecuperación: tratamiento para la descontaminación y regeneración de suelos y aguas subterráneas mediante procesos biológicos y físico-químicos*. McGraw-Hill Interamericana.
- Fahy, A., Ball, A. S., Lethbridge, G., Timmis, K. N., & McGenity, T. J. (2008). Isolation of alkali-tolerant benzene-degrading bacteria from a contaminated aquifer. *Letters in applied microbiology*, 47(1), 60-66.
- Falahatpisheh, M. H., Donnelly, K. C., & Ramos, K. S. (2001). Antagonistic interactions among nephrotoxic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*, 62(7), 543-560.

- Feinstein, L. M., Sul, W. J., & Blackwood, C. B. (2009). Assessment of bias associated with incomplete extraction of microbial DNA from soil. *Applied and environmental microbiology*, 75(16), 5428-5433.
- Feng, L., Wang, W., Cheng, J., Ren, Y., Zhao, G., Gao, C., ... & Wang, L. (2007). Genome and proteome of long-chain alkane degrading *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 isolated from a deep-subsurface oil reservoir. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(13), 5602-5607.
- Fernandez, P., Grifoll, M., Solanas, A. M., Bayona, J. M., & Albaiges, J. (1992). Bioassay-directed chemical analysis of genotoxic components in coastal sediments. *Environmental science & technology*, 26(4), 817-829.
- Ferraro, D. J., Brown, E. N., Yu, C. L., Parales, R. E., Gibson, D. T., & Ramaswamy, S. (2007). Structural investigations of the ferredoxin and terminal oxygenase components of the biphenyl 2, 3-dioxygenase from *Sphingobium yanoikuyae* B1. *BMC Structural Biology*, 7(1), 10.
- Filauro, G., Andreotti, G., Arlotti, D., & Reisinger, H. J. (1998). Blow out of Trecate 24 crude oil well: How bioremediation techniques are solving a major environmental emergency in a valuable agricultural area. *Contaminated Soil*, 98, 403-412.
- Fischer, S. G., & Lerman, L. S. (1979). Length-independent separation of DNA restriction fragments in two-dimensional gel electrophoresis. *Cell*, 16(1), 191-200.
- Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Smyth, T. J., & Banat, I. M. (2010). Production and applications of trehalose lipid biosurfactants. *European journal of lipid science and technology*, 112(6), 617-627.
- Fritsche, W., & Hofrichter, M. (2000). Aerobic degradation by microorganisms. *Biotechnology Set, Second Edition*, 144-167.
- Fuchs G (1999) Oxidation of organic compounds. In *Biology of the Prokaryotes*. JW Lengeler, G Drews, HG Schlegel, (eds.). Stuttgart: Thieme, pp 187-233.
- Funhoff, E. G., Bauer, U., García-Rubio, I., Witholt, B., & van Beilen, J. B. (2006). CYP153A6, a soluble P450 oxygenase catalyzing terminal-alkane hydroxylation. *Journal of bacteriology*, 188(14), 5220-5227.
- Gallego, J. L. R., Sierra, C., Permanyer, A., Peláez, A. I., Menéndez-Vega, D., & Sánchez, J. (2011). Full-scale remediation of a jet fuel-contaminated soil: Assessment of biodegradation, volatilization, and bioavailability. *Water, Air, & Soil Pollution*, 217(1-4), 197-211.
- Gans, J., Wolinsky, M., & Dunbar, J. (2005). Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. *Science*, 309(5739), 1387-1390.
- Gauthier, E., Déziel, E., Villemur, R., Juteau, P., Lépine, F., & Beaudet, R. (2003). Initial characterization of new bacteria degrading high-molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons isolated from a 2-year enrichment in a two-liquid-phase culture system. *Journal of applied microbiology*, 94(2), 301-311.
- Gibson, D. T., & Parales, R. E. (2000). Aromatic hydrocarbon dioxygenases in environmental biotechnology. *Current opinion in biotechnology*, 11(3), 236-243.
- Gilewicz, M., Nadalig, T., Budzinski, H., Doumenq, P., Michotey, V., & Bertrand, J. C. (1997). Isolation and characterization of a marine bacterium capable of utilizing 2-methylphenanthrene. *Applied microbiology and biotechnology*, 48(4), 528-533.
- Goldman, R., Enewold, L., Pellizzari, E., Beach, J. B., Bowman, E. D., Krishnan, S. S., & Shields, P. G. (2001). Smoking increases carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in human lung tissue. *Cancer research*, 61(17), 6367-6371.
- Goldstein, R. M., Mallory, L. M., & Alexander, M. (1985). Reasons for possible failure of inoculation to enhance biodegradation. *Applied and Environmental Microbiology*, 50(4), 977-983.
- Gomes, N. C. M., Borges, L. R., Paranhos, R., Pinto, F. N., Krögerrecklenfort, E., Mendonça-Hagler, L. C., & Smalla, K. (2007). Diversity of ndo genes in mangrove sediments exposed to different sources of polycyclic aromatic hydrocarbon pollution. *Applied and environmental microbiology*, 73(22), 7392-7399.

- Goyal, A. K., & Zylstra, G. J. (1996). Molecular cloning of novel genes for polycyclic aromatic hydrocarbon degradation from *Comamonas testosteroni* GZ39. *Applied and environmental microbiology*, 62(1), 230-236.
- Goyal, A. K., & Zylstra, G. J. (1997). Genetics of naphthalene and phenanthrene degradation by *Comamonas testosteroni*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 19(5-6), 401-407.
- Gray, N. D., & Head, I. M. (2001). Linking genetic identity and function in communities of uncultured bacteria. *Environmental Microbiology*, 3(8), 481-492.
- Green, S. J., Leigh, M. B., & Neufeld, J. D. (2010). Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) for microbial community analysis. In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* (pp. 4137-4158). Springer Berlin Heidelberg.
- Griest WH, Tomkins BA, Epler JL, Rao TK (1979) Characterization of multialkylated polycyclic aromatic hydrocarbons in energy-related materials. In: Jones PW, Leber P (eds) *Carcinogenesis*, vol 4. Raven Press, New York, pp 395±409
- Grifoll, M., Solanas, A. M., & Bayona, J. M. (1990). Characterization of genotoxic components in sediments by mass spectrometric techniques combined with *Salmonella*/microsome test. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 19(2), 175-184.
- Guo, C., Dang, Z., Wong, Y., & Tam, N. F. (2010). Biodegradation ability and dioxygenase genes of PAH-degrading *Sphingomonas* and *Mycobacterium* strains isolated from mangrove sediments. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 64(6), 419-426.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In *Nucleic acids symposium series* (Vol. 41, pp. 95-98).
- Hamamura, N., Yeager, C. M., & Arp, D. J. (2001). Two Distinct Monooxygenases for Alkane Oxidation in *Nocardioides* sp. Strain CF8. *Applied and environmental microbiology*, 67(11), 4992-4998.
- Hamann, C., Hegemann, J., & Hildebrandt, A. (1999). Detection of polycyclic aromatic hydrocarbon degradation genes in different soil bacteria by polymerase chain reaction and DNA hybridization. *FEMS microbiology letters*, 173(1), 255-263.
- Handelsman, J. (2004). Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(4), 669-685.
- Hara, A., Baik, S. H., Syutsubo, K., Misawa, N., Smits, T. H., Van Beilen, J. B., & Harayama, S. (2004). Cloning and functional analysis of *alkB* genes in *Alcanivorax borkumensis* SK2. *Environmental Microbiology*, 6(3), 191-197.
- Hara, A., Syutsubo, K., & Harayama, S. (2003). *Alcanivorax* which prevails in oil-contaminated seawater exhibits broad substrate specificity for alkane degradation. *Environmental microbiology*, 5(9), 746-753.
- Harayama, S., Kasai, Y., & Hara, A. (2004). Microbial communities in oil-contaminated seawater. *Current opinion in biotechnology*, 15(3), 205-214.
- Harmsen, J. (2004). *Landfarming of polycyclic aromatic hydrocarbons and mineral oil contaminated sediments*. Wageningen Universiteit (Wageningen University).
- Harwati, T. U., Kasai, Y., Kodama, Y., Susilaningsih, D., & Watanabe, K. (2007). Characterization of diverse hydrocarbon-degrading bacteria isolated from Indonesian seawater. *Microbes and Environments*, 22(4), 412-415.
- Hatzinger, P. B., McClay, K., Vainberg, S., Tugusheva, M., Condee, C. W., & Steffan, R. J. (2001). Biodegradation of methyl tert-butyl ether by a pure bacterial culture. *Applied and environmental microbiology*, 67(12), 5601-5607.

- Hatzinger, P. B., Whittier, M. C., Arkins, M. D., Bryan, C. W., & Guarini, W. J. (2002). In-Situ and Ex-Situ Bioremediation Options for Treating Perchlorate in Groundwater. *Remediation Journal*, 12(2), 69-86.
- Hazen, T. C. (2010). Biostimulation. In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* (pp. 4517-4530). Springer Berlin Heidelberg.
- He, Z., Van Nostrand, J. D., & Zhou, J. (2012). Applications of functional gene microarrays for profiling microbial communities. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(3), 460-466.
- Head, I. M., Jones, D. M., & Röling, W. F. (2006). Marine microorganisms make a meal of oil. *Nature Reviews Microbiology*, 4(3), 173-182.
- Head, I. M., Saunders, J. R., & Pickup, R. W. (1998). Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microbial Ecology*, 35(1), 1-21.
- Heitkamp, M. A., Franklin, W., & Cerniglia, C. E. (1988a). Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: isolation and characterization of a pyrene-degrading bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(10), 2549-2555.
- Heitkamp, M. A., Freeman, J. P., Miller, D. W., & Cerniglia, C. E. (1988b). Pyrene degradation by a *Mycobacterium* sp.: identification of ring oxidation and ring fission products. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(10), 2556-2565.
- Hilyard, E. J., Jones-Meehan, J. M., Spargo, B. J., & Hill, R. T. (2008). Enrichment, isolation, and phylogenetic identification of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from Elizabeth River sediments. *Applied and environmental microbiology*, 74(4), 1176-1182.
- Holden, P. A., LaMontagne, M. G., Bruce, A. K., Miller, W. G., & Lindow, S. E. (2002). Assessing the role of *Pseudomonas aeruginosa* surface-active gene expression in hexadecane biodegradation in sand. *Applied and environmental microbiology*, 68(5), 2509-2518.
- Howe-Grant, M. (1996). Petroleum. *Encyclopedia of chemical technology* 4th ed. New York. pp. 342-480.
- Howsam, M., & Jones, K. (1998). Sources of PAHs in the environment. *Handbook of environmental chemistry*, 1998, 137-174.
- Hugenholtz, P. (2002). Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. *Genome Biol*, 3(2), 1-0003.
- Hughes, J. B., Hellmann, J. J., Ricketts, T. H., & Bohannon, B. J. (2001). Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(10), 4399-4406.
- Ibekwe, A. M., Kennedy, A. C., Frohne, P. S., Papiernik, S. K., Yang, C. H., & Crowley, D. E. (2002). Microbial diversity along a transect of agronomic zones. *FEMS Microbiology Ecology*, 39(3), 183-191.
- Iwai, S., Chai, B., Sul, W. J., Cole, J. R., Hashsham, S. A., & Tiedje, J. M. (2010). Gene-targeted-metagenomics reveals extensive diversity of aromatic dioxygenase genes in the environment. *The ISME journal*, 4(2), 279.
- Jacques, R. J., Okeke, B. C., Bento, F. M., Teixeira, A. S., Peralba, M. C., & Camargo, F. A. (2008). Microbial consortium bioaugmentation of a polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soil. *Bioresource Technology*, 99(7), 2637-2643.
- Jakoncic, J., Jouanneau, Y., Meyer, C., & Stojanoff, V. (2007). The crystal structure of the ring-hydroxylating dioxygenase from *Sphingomonas* CHY-1. *FEBS Journal*, 274(10), 2470-2481.
- Janssen, P. H., Yates, P. S., Grinton, B. E., Taylor, P. M., & Sait, M. (2002). Improved culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel members of the divisions Acidobacteria, Actinobacteria, Proteobacteria, and Verrucomicrobia. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(5), 2391-2396.

- Janssen, P. H. (2006). Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(3), 1719-1728.
- Jimenez, J. I., Miñambres, B., Garcia, J. L., & Diaz, E. (2004). Genomic insights in the metabolism of aromatic compounds in *Pseudomonas*. In *Pseudomonas* (pp. 425-462). Springer US.
- Jiménez, N., Viñas, M., Sabaté, J., Díez, S., Bayona, J. M., Solanas, A. M., & Albaiges, J. (2006). The Prestige oil spill. 2. Enhanced biodegradation of a heavy fuel oil under field conditions by the use of an oleophilic fertilizer. *Environmental science & technology*, 40(8), 2578-2585.
- Jirasripongpun, K. (2002). The characterization of oil-degrading microorganisms from lubricating oil contaminated (scale) soil. *Letters in applied microbiology*, 35(4), 296-300.
- Johnsen, A. R., De Liphay, J. R., Sørensen, S. J., Ekelund, F., Christensen, P., Andersen, O., ... & Jacobsen, C. S. (2006). Microbial degradation of street dust polycyclic aromatic hydrocarbons in microcosms simulating diffuse pollution of urban soil. *Environmental microbiology*, 8(3), 535-545.
- Johnsen, A. R., Schmidt, S., Hybholt, T. K., Henriksen, S., Jacobsen, C. S., & Andersen, O. (2007). Strong impact on the polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading community of a PAH-polluted soil but marginal effect on PAH degradation when priming with bioremediated soil dominated by mycobacteria. *Applied and environmental microbiology*, 73(5), 1474-1480.
- Johnsen, A. R., Wick, L. Y., & Harms, H. (2005). Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environmental Pollution*, 133(1), 71-84.
- Jørgensen, K. S., Puustinen, J., & Suortti, A. M. (2000). Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by composting in biopiles. *Environmental pollution*, 107(2), 245-254.
- Jørgensen, K. S. (2007). *In Situ* Bioremediation. *Advances in applied microbiology*, 61, 285-305.
- Juhasz, A. L., & Naidu, R. (2000). Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo [*a*] pyrene. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 45(1), 57-88.
- Juwarakar, A. A., Singh, S. K., & Mudhoo, A. (2010). A comprehensive overview of elements in bioremediation. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 9(3), 215-288.
- Kalin, R. M. (2004). Engineered passive bioreactive barriers: risk-managing the legacy of industrial soil and groundwater pollution. *Current opinion in microbiology*, 7(3), 227-238.
- Kalscheuer, R., Stöveken, T., Malkus, U., Reichelt, R., Golyshin, P. N., Sabirova, J. S., ... & Steinbüchel, A. (2007). Analysis of storage lipid accumulation in *Alcanivorax borkumensis*: evidence for alternative triacylglycerol biosynthesis routes in bacteria. *Journal of bacteriology*, 189(3), 918-928.
- Kanally, R. A., & Harayama, S. (2000). Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *Journal of Bacteriology*, 182(8), 2059-2067.
- Kanally, R. A., & Harayama, S. (2010). Advances in the field of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation by bacteria. *Microbial Biotechnology*, 3(2), 136-164.
- Kaplan, C. W., & Kitts, C. L. (2004). Bacterial succession in a petroleum land treatment unit. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(3), 1777-1786.
- Karamalidis, A. K., Evangelou, A. C., Karabika, E., Koukkou, A. I., Drainas, C., & Voudrias, E. A. (2010). Laboratory scale bioremediation of petroleum-contaminated soil by indigenous microorganisms and added *Pseudomonas aeruginosa* strain Spet. *Bioresource technology*, 101(16), 6545-6552.
- Kasai, Y., & Harayama, S. (2004). Catabolism of PAHS. In *Pseudomonas* (pp. 463-490). Springer US.
- Kästner, M. (2008). Degradation of aromatic and polyaromatic compounds. *Biotechnology Set, Second Edition*, 211-239.

- Keith, L., & Telliard, W. (1979). ES&T special report: priority pollutants: la perspective view. *Environmental Science & Technology*, 13(4), 416-423.
- Kelley, I., Freeman, J. P., & Cerniglia, C. E. (1990). Identification of metabolites from degradation of naphthalene by a *Mycobacterium* sp. *Biodegradation*, 1(4), 283-290.
- Kembel, S. W., Wu, M., Eisen, J. A., & Green, J. L. (2012). Incorporating 16S gene copy number information improves estimates of microbial diversity and abundance. *PLoS computational biology*, 8(10), e1002743.
- Kim, S. I., Kukor, J. J., Oh, K. H., & Kahng, H. Y. (2006). Evaluating the genetic diversity of dioxygenases for initial catabolism of aromatic hydrocarbons in *Pseudomonas rhodesiae* KK1. *Enzyme and microbial technology*, 40(1), 71-78.
- Kloos, K., Munch, J. C., & Schloter, M. (2006). A new method for the detection of alkane-monooxygenase homologous genes (*alkB*) in soils based on PCR-hybridization. *Journal of microbiological methods*, 66(3), 486-496.
- Knothe, G., & Steidley, K. R. (2007). Kinematic viscosity of biodiesel components (fatty acid alkyl esters) and related compounds at low temperatures. *Fuel*, 86(16), 2560-2567.
- Kodres, C. A. (1998). Coupled water and air flows through a bioremediation soil pile. *Environmental modelling & software*, 14(1), 37-47.
- Koning, M., Hupe, K., Lüth, J. C., Cohrs, I., Quandt, C., & Stegmann, R. (1998). Comparative investigations into the biological degradation of contaminants in fixed-bed and slurry reactors. *Contaminated soil*, 98, 531-538.
- Kotani, T., Yamamoto, T., Yurimoto, H., Sakai, Y., & Kato, N. (2003). Propane monooxygenase and NAD⁺-dependent secondary alcohol dehydrogenase in propane metabolism by *Gordonia* sp. strain TY-5. *Journal of bacteriology*, 185(24), 7120-7128.
- Kotani, T., Kawashima, Y., Yurimoto, H., Kato, N., & Sakai, Y. (2006). Gene structure and regulation of alkane monooxygenases in propane-utilizing *Mycobacterium* sp. TY-6 and *Pseudonocardia* sp. TY-7. *Journal of bioscience and bioengineering*, 102(3), 184-192.
- Koukkou, A. I., & Vandera, E. (2011). Hydrocarbon-degrading Soil Bacteria: Current Research. *Microbial Bioremediation of Non-metals: Current Research*, 93.
- Kovaleva, E. G., Neibergall, M. B., Chakrabarty, S., & Lipscomb, J. D. (2007). Finding intermediates in the O₂ activation pathways of non-heme iron oxygenases. *Accounts of chemical research*, 40(7), 475-483.
- Kovaleva, E. G., & Lipscomb, J. D. (2008). Versatility of biological non-heme Fe (II) centers in oxygen activation reactions. *Nature chemical biology*, 4(3), 186-193.
- Kubota, M., Nodate, M., Yasumoto-Hirose, M., Uchiyama, T., Kagami, O., Shizuri, Y., & Misawa, N. (2005). Isolation and functional analysis of cytochrome P450 CYP153A genes from various environments. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 69(12), 2421-2430.
- Kweon, O., Kim, S. J., Baek, S., Chae, J. C., Adjei, M. D., Baek, D. H., ... & Cerniglia, C. E. (2008). A new classification system for bacterial Rieske non-heme iron aromatic ring-hydroxylating oxygenases. *BMC biochemistry*, 9(1), 11.
- Kweon, O., Kim, S. J., & Cerniglia, C. E. (2010). 81. Genomic View of Mycobacterial High Molecular Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation.
- Kweon, O., Kim, S. J., & Cerniglia, C. E. (2010). Genomic View of Mycobacterial High Molecular Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation. In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*(pp. 1168-1173). Springer Berlin Heidelberg.

- Lahlou, M., & Ortega-Calvo, J. J. (1999). Bioavailability of labile and desorption-resistant phenanthrene sorbed to montmorillonite clay containing humic fractions. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18(12), 2729-2735.
- Lalucat, J., Bennasar, A., Bosch, R., García-Valdés, E., & Palleroni, N. J. (2006). Biology of *Pseudomonas stutzeri*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(2), 510-547.
- Lamberts, R. F., Christensen, J. H., Mayer, P., Andersen, O., & Johnsen, A. R. (2008). Isomer-specific biodegradation of methylphenanthrenes by soil bacteria. *Environmental science & technology*, 42(13), 4790-4796.
- LANE, D. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, 115-175.
- Lang, S. (2002). Biological amphiphiles (microbial biosurfactants). *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 7(1), 12-20.
- Larkin, M. J., Kulakov, L. A., & Allen, C. C. R. (2010). *Rhodococcus: Genetics and Functional Genomics*. In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* (pp. 1345-1353). Springer Berlin Heidelberg.
- LaVoie, E., Bedenko, V., Hirota, N., Hecht, S. S., & Hoffmann, D. (1979). A comparison of the mutagenicity, tumor-initiating activity and complete carcinogenicity of polynuclear aromatic hydrocarbons. *Carcinogenesis*, 4, 705-721.
- LaVoie, E. J., Tulley-Freiler, L., Bedenko, V., & Hoffmann, D. (1981). Mutagenicity, tumor-initiating activity, and metabolism of methylphenanthrenes. *Cancer research*, 41(9 Part 1), 3441-3447.
- Leahy, J. G., & Colwell, R. R. (1990). Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological reviews*, 54(3), 305-315.
- Lee, K., & Gibson, D. T. (1996). Toluene and ethylbenzene oxidation by purified naphthalene dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain NCIB 9816-4. *Applied and environmental microbiology*, 62(9), 3101-3106.
- Lehning, A., Fock, U., Wittich, R., Timmis, K. N., & Pieper, D. H. (1997). Metabolism of Chlorotoluenes by *Burkholderia* sp. Strain PS12 and Toluene Dioxygenase of *Pseudomonas putida* F1: Evidence for Monooxygenation by Toluene and Chlorobenzene Dioxygenases. *Applied and environmental microbiology*, 63(5), 1974-1979.
- Levin, M., & Gealt, M. (1997). Biotratamiento de residuos tóxicos y peligrosos. Selección, estimación, modificación de organismos y aplicaciones.
- Leys, N. M. E. J., Ryngaert, A., Bastiaens, L., Verstraete, W., & Top, E. M. D. Springael (2004). Occurrence and Phylogenetic Diversity of Sphingomonas Strains in Soils Contaminated with Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Appl. Envir. Microbiol*, 70, 1944-1955.
- Li, L., Liu, X., Yang, W., Xu, F., Wang, W., Feng, L., ... & Rao, Z. (2008). Crystal structure of long-chain alkane monooxygenase (LadA) in complex with coenzyme FMN: unveiling the long-chain alkane hydroxylase. *Journal of molecular biology*, 376(2), 453-465.
- Li, X., Lin, X., Li, P., Liu, W., Wang, L., Ma, F., & Chukwuka, K. S. (2009). Biodegradation of the low concentration of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by microbial consortium during incubation. *Journal of hazardous materials*, 172(2), 601-605.
- Lin, T. C., Pan, P. T., & Cheng, S. S. (2010). Ex situ bioremediation of oil-contaminated soil. *Journal of hazardous materials*, 176(1), 27-34.
- Lindstrom, J. E., Barry, R. P., & Braddock, J. F. (1999). Long-term effects on microbial communities after a subarctic oil spill. *Soil Biology and Biochemistry*, 31(12), 1677-1689.
- Liu, L., Schmid, R. D., & Urlacher, V. B. (2006). Cloning, expression, and characterization of a self-sufficient cytochrome P450 monooxygenase from *Rhodococcus ruber* DSM 44319. *Applied microbiology and biotechnology*, 72(5), 876-882.

- Liu, Y. J., Zhang, A. N., & Wang, X. C. (2009). Biodegradation of phenol by using free and immobilized cells of *Acinetobacter* sp. XA05 and *Sphingomonas* sp. FG03. *Biochemical Engineering Journal*, 44(2), 187-192.
- Liu, Z., & Shao, Z. Z. (2007). The diversity of alkane degrading bacteria in the enrichments with deep sea sediment of the South China Sea]. *Wei sheng wu xue bao= Acta microbiologica Sinica*, 47(5), 869.
- López, Z., Vila, J., Minguillón, C., & Grifoll, M. (2006). Metabolism of fluoranthene by *Mycobacterium* sp. strain AP1. *Applied microbiology and biotechnology*, 70(6), 747-756.
- Lors, C., Ryngaert, A., Périé, F., Diels, L., & Damidot, D. (2010). Evolution of bacterial community during bioremediation of PAHs in a coal tar contaminated soil. *Chemosphere*, 81(10), 1263-1271.
- Lundstedt, S., Haglund, P., Van Bavel, B., & Oberg, L. (1999). Analysis of PAHs and metabolites during treatment of contaminated soil. *Bioremediation Technologies for Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Compounds*. Battelle Press, Columbus, OH, 135-140.
- Lundstedt, S., Haglund, P., & Öberg, L. (2003). Degradation and formation of polycyclic aromatic compounds during bioslurry treatment of an aged gasworks soil. *Environmental toxicology and chemistry*, 22(7), 1413-1420.
- Lladó, S., Covino, S., Solanas, A. M., Viñas, M., Petruccioli, M., & D'annibale, A. (2013). Comparative assessment of bioremediation approaches to highly recalcitrant PAH degradation in a real industrial polluted soil. *Journal of hazardous materials*, 248, 407-414.
- Maeng, J. H., Sakai, Y., Ishige, T., Tani, Y., & Kato, N. (1996). Diversity of dioxygenases that catalyze the first step of oxidation of long-chain n-alkanes in *Acinetobacter* sp. M-1. *FEMS microbiology letters*, 141(2-3), 177-182.
- Mahajan, M. C., Phale, P. S., & Vaidyanathan, C. S. (1994). Evidence for the involvement of multiple pathways in the biodegradation of 1-and 2-methylnaphthalene by *Pseudomonas putida* CSV86. *Archives of microbiology*, 161(5), 425-433.
- Maidak, B. L., Cole, J. R., Lilburn, T. G., Parker Jr, C. T., Saxman, P. R., Farris, R. J., ... & Tiedje, J. M. (2001). The RDP-II (ribosomal database project). *Nucleic acids research*, 29(1), 173-174.
- Maier, T., Förster, H. H., Asperger, O., & Hahn, U. (2001). Molecular Characterization of the 56-kDa CYP153 from *Acinetobacter* sp. EB104. *Biochemical and biophysical research communications*, 286(3), 652-658.
- Mallick, S., Chatterjee, S., & Dutta, T. K. (2007). A novel degradation pathway in the assimilation of phenanthrene by *Staphylococcus* sp. strain PN/Y via meta-cleavage of 2-hydroxy-1-naphthoic acid: formation of trans-2, 3-dioxo-5-(2'-hydroxyphenyl)-pent-4-enoic acid. *Microbiology*, 153(7), 2104-2115.
- Manickam, N., Mau, M., & Schlömann, M. (2006). Characterization of the novel HCH-degrading strain, *Microbacterium* sp. ITRC1. *Applied microbiology and biotechnology*, 69(5), 580-588.
- Manual, E. P. A. (2004). How To Evaluate Alternative Cleanup Technologies For Underground Storage Tank Sites: A Guide For Corrective Action Plan Reviewers. *US Environmental Protection Agency*.
- Mardis, E. R. (2008). Next-generation DNA sequencing methods. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, 9, 387-402.
- Margesin, R., & Schinner, F. (2001). Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. *Applied microbiology and biotechnology*, 56(5-6), 650-663.
- Margesin, R., Labbe, D., Schinner, F., Greer, C. W., & Whyte, L. G. (2003). Characterization of hydrocarbon-degrading microbial populations in contaminated and pristine alpine soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(6), 3085-3092.

- Margesin, R., Hämmerle, M., & Tschерko, D. (2007). Microbial activity and community composition during bioremediation of diesel-oil-contaminated soil: effects of hydrocarbon concentration, fertilizers, and incubation time. *Microbial ecology*, 53(2), 259-269.
- Martin, F., Torelli, S., Le Paslier, D., Barbance, A., Martin-Laurent, F., Bru, D., ... & Jouanneau, Y. (2012). Betaproteobacteria dominance and diversity shifts in the bacterial community of a PAH-contaminated soil exposed to phenanthrene. *Environmental Pollution*, 162, 345-353.
- Menendez-Vega, D., Gallego, J. L. R., Pelaez, A. I., Fernandez de Cordoba, G., Moreno, J., Muñoz, D., & Sanchez, J. (2007). Engineered *in situ* bioremediation of soil and groundwater polluted with weathered hydrocarbons. *European Journal of Soil Biology*, 43(5), 310-321.
- Meynet, P., Hale, S. E., Davenport, R. J., Cornelissen, G., Breedveld, G. D., & Werner, D. (2012). Effect of activated carbon amendment on bacterial community structure and functions in a PAH impacted urban soil. *Environmental science & technology*, 46(9), 5057-5066.
- Milton, C., Boucher, D., Vachelard, C., Perchet, G., Barra, V., Troquet, J., ... & Peyret, P. (2010). Bacterial community changes during bioremediation of aliphatic hydrocarbon-contaminated soil. *FEMS microbiology ecology*, 74(3), 669-681.
- Mills, D. K., Fitzgerald, K., Litchfield, C. D., & Gillevet, P. M. (2003). A comparison of DNA profiling techniques for monitoring nutrient impact on microbial community composition during bioremediation of petroleum-contaminated soils. *Journal of microbiological methods*, 54(1), 57-74.
- Miqueletto, P. B., Andreote, F. D., Dias, A. C., Ferreira, J. C., dos Santos Neto, E. V., & de Oliveira, V. M. (2011). Cultivation-independent methods applied to the microbial prospection of oil and gas in soil from a sedimentary basin in Brazil. *AMB Express*, 1(1), 1-16.
- Mishra, S., Jyot, J., Kuhad, R. C., & Lal, B. (2001). *In situ* bioremediation potential of an oily sludge-degrading bacterial consortium. *Current Microbiology*, 43(5), 328-335.
- Mohn, W., Radziminski, C., Fortin, M. C., & Reimer, K. (2001). On site bioremediation of hydrocarbon-contaminated Arctic tundra soils in inoculated biopiles. *Applied microbiology and biotechnology*, 57(1-2), 242-247.
- Morgan, P., & Watkinson, R. J. (1992). Factors limiting the supply and efficiency of nutrient and oxygen supplements for the *in situ* biotreatment of contaminated soil and groundwater. *Water Research*, 26(1), 73-78.
- Mortazavi, B., Horel, A., Beazley, M. J., & Sobczyk, P. A. (2012). Intrinsic rates of petroleum hydrocarbon biodegradation in Gulf of Mexico intertidal sandy sediments and its enhancement by organic substrates. *Journal of hazardous materials*.
- Moser, R., & Stahl, U. (2001). Insights into the genetic diversity of initial dioxygenases from PAH-degrading bacteria. *Applied microbiology and biotechnology*, 55(5), 609-618.
- Moslemy, P., Neufeld, R. J., & Guiot, S. R. (2002). Biodegradation of gasoline by gellan gum-encapsulated bacterial cells. *Biotechnology and bioengineering*, 80(2), 175-184.
- Nacke, H., Thürmer, A., Wollherr, A., Will, C., Hodac, L., Herold, N., ... & Daniel, R. (2011). Pyrosequencing-based assessment of bacterial community structure along different management types in German forest and grassland soils. *PLoS one*, 6(2), e17000.
- Nam, J. W., Nojiri, H., Yoshida, T., Habe, H., Yamane, H., & OMORI, T. (2001). New classification system for oxygenase components involved in ring-hydroxylating oxygenations. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 65(2), 254-263.
- Nava, V., Morales, M., & Revah, S. (2007). Cometabolism of methyl tert-butyl ether (MTBE) with alkanes. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 6(4), 339-352.
- Neher, T. M., & Lueking, D. R. (2009). *Pseudomonas fluorescens* ompW: Plasmid localization and requirement for naphthalene uptake. *Canadian journal of microbiology*, 55(5), 553-563.

- Neilson, A. H. (2010). *Organic chemicals: an environmental perspective*. CRC Press.
- Niepceron, M., Martin-Laurent, F., Crampon, M., Portet-Koltalo, F., Akpa-Vinceslas, M., Legras, M., ... & Bodilis, J. (2013). GammaProteobacteria as a potential bioindicator of a multiple contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in agricultural soils. *Environmental Pollution*, 180, 199-205.
- Nisbet, I. C., & LaGoy, P. K. (1992). Toxic equivalency factors (TEFs) for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Regulatory toxicology and pharmacology*, 16(3), 290-300.
- Nishino, S. F., & Spain, J. C. (2004). Catabolism of nitroaromatic compounds. In *Pseudomonas* (pp. 575-608). Springer US.
- Nopcharoenkul, W., Netsakulnee, P., & Pinyakong, O. (2012). Diesel oil removal by immobilized Pseudoxanthomonas sp. RN402. *Biodegradation*, 1-11.
- Nyysönen, M., Kapanen, A., Piskonen, R., Lukkari, T., & Itävaara, M. (2009). Functional genes reveal the intrinsic PAH biodegradation potential in creosote-contaminated groundwater following in situ biostimulation. *Applied microbiology and biotechnology*, 84(1), 169-182.
- Ogino, A., Koshikawa, H., Nakahara, T., & Uchiyama, H. (2001). Succession of microbial communities during a biostimulation process as evaluated by DGGE and clone library analyses. *Journal of Applied Microbiology*, 91(4), 625-635.
- Ortega-Calvo, J. J., & Gschwend, P. M. (2010). Influence of low oxygen tensions and sorption to sediment black carbon on biodegradation of pyrene. *Applied and environmental microbiology*, 76(13), 4430-4437.
- Ortega-Calvo, J. J., Birman, I., & Alexander, M. (1995). Effect of varying the rate of partitioning of phenanthrene in nonaqueous-phase liquids on biodegradation in soil slurries. *Environmental science & technology*, 29(9), 2222-2225.
- Ortega-Calvo, J. J., Marchenko, A. I., Vorobyov, A. V., & Borovick, R. V. (2003). Chemotaxis in polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from coal-tar-and oil-polluted rhizospheres. *FEMS microbiology ecology*, 44(3), 373-381.
- Ortega-Calvo, J. J., Tejada-Agredano, M. C., Jimenez-Sanchez, C., Congiu, E., Sungthong, R., Niqui-Arroyo, J. L., & Cantos, M. (2013). Is it possible to increase bioavailability but not environmental risk of PAHs in bioremediation?. *Journal of hazardous materials*.
- Pace, N. R. (1996). New perspective on the natural microbial world: molecular microbial ecology. *ASM news*, 62(9), 463-470.
- Palmer, C., Bik, E. M., Eisen, M. B., Eckburg, P. B., Sana, T. R., Wolber, P. K., ... & Brown, P. O. (2006). Rapid quantitative profiling of complex microbial populations. *Nucleic Acids Research*, 34(1), e5-e5.
- Parales, R. E. (2010). Hydrocarbon degradation by Betaproteobacteria. In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* (pp. 1715-1724). Springer Berlin Heidelberg.
- Paul EA, Clark FG (1989) *Soil Microbiology and Biochemistry*. San Diego: Academic Press.
- Pei, X. H., Zhan, X. H., Wang, S. M., Lin, Y. S., & Zhou, L. X. (2010). Effects of a Biosurfactant and a Synthetic Surfactant on Phenanthrene Degradation by a *Sphingomonas* Strain. *Pedosphere*, 20(6), 771-779.
- Peijnenburg, W., Sneller, E., Sijm, D., Lijzen, J., Traas, T., & Verbruggen, E. (2002). Implementation of bioavailability in standard setting and risk assessment?. *Journal of Soils and Sediments*, 2(4), 169-173.
- Pelletier, E., Delille, D., & Delille, B. (2004). Crude oil bioremediation in sub-Antarctic intertidal sediments: chemistry and toxicity of oiled residues. *Marine environmental research*, 57(4), 311-327.

- Peplies, J., Lau, S. C. K., Pernthaler, J., Amann, R., & Glöckner, F. O. (2004). Application and validation of DNA microarrays for the 16S rRNA-based analysis of marine bacterioplankton. *Environmental microbiology*, 6(6), 638-645.
- Pérez-de-Mora, A., Engel, M., & Schloter, M. (2011). Abundance and diversity of n-alkane-degrading bacteria in a forest soil co-contaminated with hydrocarbons and metals: a molecular study on alkB homologous genes. *Microbial ecology*, 62(4), 959-972.
- Phale, P. S., Mahajan, M. C., & Vaidyanathan, C. S. (1995). A pathway for biodegradation of 1-naphthoic acid by *Pseudomonas maltophilia* CSV89. *Archives of microbiology*, 163(1), 42-47.
- Philp, J. C., & Atlas, R. M. (2005). Bioremediation of contaminated soils and aquifers. *Bioremediation applied microbial solutions for real-world environmental cleanup*. Am. Soc. Microbiol. Washington DC, 140-190.
- Pieper, D. H., & Reineke, W. (2004). Degradation of chloroaromatics by *Pseudomonas* (d) s. In *Pseudomonas* (pp. 509-574). Springer US.
- Pinyakong, O., Habe, H., & Omori, T. (2003). The unique aromatic catabolic genes in sphingomonads degrading polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *The Journal of general and applied microbiology*, 49(1), 1-19.
- Popp, N., Schlömann, M., & Mau, M. (2006). Bacterial diversity in the active stage of a bioremediation system for mineral oil hydrocarbon-contaminated soils. *Microbiology*, 152(11), 3291-3304.
- Porta, A., Trovato, A., McCarthy, K., Uhler, A., & Andreotti, G. (1997, April). Degradation of saturated and polycyclic aromatic hydrocarbons and formation of their metabolites in bioremediation crude oil-containing soils. In B. C. Vol. 1. Alleman, & A. Lesson (Eds.), *Proceedings of the International Symposium on In situ and On-site Bioremediation, New Orleans, LO, USA* (Vol. 28, pp. 505-510).
- Pouli, M., & Agathos, S. N. (2011). Bioremediation of PAH-contaminated sites: from pathways to bioreactors. *Microbial Bioremediation of Non-metals*, 119-147.
- Prince, R. C., Elmendorf, D. L., Lute, J. R., Hsu, C. S., Haith, C. E., Senius, J. D., ... & Butler, E. L. (1994). 17. alpha.(H)-21. beta.(H)-hopane as a conserved internal marker for estimating the biodegradation of crude oil. *Environmental science & technology*, 28(1), 142-145.
- Pucci, O. H., Bak, M. A., Peressutti, S. R., Klein, I., Härtig, C., Alvarez, H. M., & Wünsche, L. (2000). Influence of crude oil contamination on the bacterial community of semiarid soils of Patagonia (Argentina). *Acta biotecnologica*, 20(2), 129-146.
- Quatrini, P. A. O. L. A., Scaglione, G. I. U. S. E. P. P. E., De Pasquale, C., Riela, S. E. R. E. N. A., & Puglia, A. M. (2008). Isolation of Gram-positive n-alkane degraders from a hydrocarbon-contaminated Mediterranean shoreline. *Journal of applied microbiology*, 104(1), 251-259.
- Quatrini, P., Scaglione, G., De Pasquale, C., Riela, S., & Puglia, A. M. (2008). Isolation of Gram-positive n-alkane degraders from a hydrocarbon-contaminated Mediterranean shoreline. *Journal of Applied Microbiology*, 104(1), 251-259.
- Real Decreto 9/2005. Ministerio de la presidencia. BOE No.15 1833
- Rehm, H. J., & Reiff, I. (1981). *Mechanisms and occurrence of microbial oxidation of long-chain alkanes* (pp. 175-215). Springer Berlin Heidelberg.
- Reva, O. N., Hallin, P. F., Willenbrock, H., Sicheritz-Ponten, T., Tümmler, B., & Ussery, D. W. (2008). Global features of the *Alcanivorax borkumensis* SK2 genome. *Environmental microbiology*, 10(3), 614-625.
- Rhee, S. K., Liu, X., Wu, L., Chong, S. C., Wan, X., & Zhou, J. (2004). Detection of genes involved in biodegradation and biotransformation in microbial communities by using 50-mer oligonucleotide microarrays. *Applied and environmental microbiology*, 70(7), 4303-4317.

- Riesenfeld, C. S., Schloss, P. D., & Handelsman, J. (2004). Metagenomics: genomic analysis of microbial communities. *Annu. Rev. Genet.*, 38, 525-552.
- Robertson, J. B., Spain, J. C., Haddock, J. D., & Gibson, D. T. (1992). Oxidation of nitrotoluenes by toluene dioxygenase: evidence for a monooxygenase reaction. *Applied and environmental microbiology*, 58(8), 2643-2648.
- Roesch, L. F., Fulthorpe, R. R., Riva, A., Casella, G., Hadwin, A. K., Kent, A. D., ... & Triplett, E. W. (2007). Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *The ISME Journal*, 1(4), 283-290.
- Rojo, F. (2010). Enzymes for aerobic degradation of alkanes. In *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology* (pp. 781-797). Springer Berlin Heidelberg.
- Rojo, F. (2005). Specificity at the end of the tunnel: understanding substrate length discrimination by the AlkB alkane hydroxylase. *Journal of bacteriology*, 187(1), 19-22.
- Röling, W. F., Milner, M. G., Jones, D. M., Lee, K., Daniel, F., Swannell, R. J., & Head, I. M. (2002). Robust hydrocarbon degradation and dynamics of bacterial communities during nutrient-enhanced oil spill bioremediation. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(11), 5537-5548.
- Ron, E. Z., & Rosenberg, E. (2002). Biosurfactants and oil bioremediation. *Current opinion in biotechnology*, 13(3), 249-252.
- Rosenberg, E. (1993). Exploiting microbial growth on hydrocarbons—new markets. *Trends in Biotechnology*, 11(10), 419-424.
- Rosenberg, E., Legmann, R., Kushmaro, A., Taube, R., Adler, E., & Ron, E. Z. (1992). Petroleum bioremediation—a multiphase problem. *Biodegradation*, 3(2), 337-350.
- Rosselló-Mora, R., & Amann, R. (2001). The species concept for prokaryotes. *FEMS microbiology reviews*, 25(1), 39-67.
- Rothberg, J. M., & Leamon, J. H. (2008). The development and impact of 454 sequencing. *Nature biotechnology*, 26(10), 1117-1124.
- Roy, M., Khara, P., & Dutta, T. K. (2012). meta-Cleavage of hydroxynaphthoic acids in the degradation of phenanthrene by *Sphingobium* sp. strain PNB. *Microbiology*, 158(Pt 3), 685-695.
- Sabaté, J., Grifoll, M., Viñas, M., & Solanas, A. M. (1999). Isolation and characterization of a 2-methylphenanthrene utilizing bacterium: identification of ring cleavage metabolites. *Applied microbiology and biotechnology*, 52(5), 704-712.
- Sabirova, J. S., Ferrer, M., Regenhardt, D., Timmis, K. N., & Golyshin, P. N. (2006). Proteomic insights into metabolic adaptations in *Alcanivorax borkumensis* induced by alkane utilization. *Journal of bacteriology*, 188(11), 3763-3773.
- Sanscartier, D., Zeeb, B., Koch, I., & Reimer, K. (2009). Bioremediation of diesel-contaminated soil by heated and humidified biopile system in cold climates. *Cold Regions Science and Technology*, 55(1), 167-173.
- Sanscartier, D., Reimer, K., Zeeb, B., & George, K. (2010). Management of hydrocarbon-contaminated soil through bioremediation and landfill disposal at a remote location in Northern Canada A paper submitted to the Journal of Environmental Engineering and Science. *Canadian Journal of Civil Engineering*, 37(1), 147-155.
- Sato, S. I., Nam, J. W., Kasuga, K., Nojiri, H., Yamane, H., & Omori, T. (1997). Identification and characterization of genes encoding carbazole 1, 9a-dioxygenase in *Pseudomonas* sp. strain CA10. *Journal of bacteriology*, 179(15), 4850-4858.
- Saul, D. J., Aislabie, J. M., Brown, C. E., Harris, L., & Foght, J. M. (2005). Hydrocarbon contamination changes the bacterial diversity of soil from around Scott Base, Antarctica. *FEMS Microbiology Ecology*, 53(1), 141-155.

- Schleheck, D., Tindall, B. J., Rosselló-Mora, R., & Cook, A. M. (2004). *Parvibaculum lavamentivorans* gen. nov., sp. nov., a novel heterotroph that initiates catabolism of linear alkylbenzenesulfonate. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 54(5), 1489-1497.
- Schloss, P. D., & Handelsman, J. (2005). Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Applied and environmental microbiology*, 71(3), 1501-1506.
- Schloss, P. D., & Handelsman, J. (2006). Toward a census of bacteria in soil. *PLoS computational biology*, 2(7), e92.
- Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., ... & Weber, C. F. (2009). Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and environmental microbiology*, 75(23), 7537-7541.
- Schloss, P. D. (2010). The effects of alignment quality, distance calculation method, sequence filtering, and region on the analysis of 16S rRNA gene-based studies. *PLoS computational biology*, 6(7), e1000844.
- Schmeisser, C., Stöckigt, C., Raasch, C., Wingender, J., Timmis, K. N., Wenderoth, D. F., ... & Streit, W. R. (2003). Metagenome survey of biofilms in drinking-water networks. *Applied and environmental microbiology*, 69(12), 7298-7309.
- Schmitz, C., Goebel, I., Wagner, S., Vomberg, A., & Kliner, U. (2000). Competition between n-alkane-assimilating yeasts and bacteria during colonization of sandy soil microcosms. *Applied microbiology and biotechnology*, 54(1), 126-132.
- Schneiker, S., dos Santos, V. A. M., Bartels, D., Bekel, T., Brecht, M., Buhrmester, J., ... & Golyshin, P. N. (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 & Technology*, 29(7), 318A-323A.
- Sekine, M., Tanikawa, S., Omata, S., Saito, M., Fujisawa, T., Tsukatani, N., ... & Harayama, S. (2006). Sequence analysis of three plasmids harboured in *Rhodococcus erythropolis* strain PR4. *Environmental microbiology*, 8(2), 334-346.
- Selifonov, S. A., Grifoll, M., Eaton, R. W., & Chapman, P. J. (1996). Oxidation of naphthoaromatic and methyl-substituted aromatic compounds by naphthalene 1, 2-dioxygenase. *Applied and environmental microbiology*, 62(2), 507-514.
- Semple, K. T., Morriss, A. W. J., & Paton, G. I. (2003). Bioavailability of hydrophobic organic contaminants in soils: fundamental concepts and techniques for analysis. *European Journal of Soil Science*, 54(4), 809-818.
- Seo, J. S., Keum, Y. S., Hu, Y., Lee, S. E., & Li, Q. X. (2007). Degradation of phenanthrene by *Burkholderia* sp. C3: initial 1, 2- and 3, 4-dioxygenation and meta- and ortho-cleavage of naphthalene-1, 2-diol. *Biodegradation*, 18(1), 123-131.
- Service, R. F. (1998). DNA ANALYSIS: Microchip Arrays Put DNA on the Spot. *Science*, 282(5388), 396-399.
- Sette, L. D., Simioni, K. C., Vasconcellos, S. P., Dussan, L. J., Neto, E. V., & Oliveira, V. M. (2007). Analysis of the composition of bacterial communities in oil reservoirs from a southern offshore Brazilian basin. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 91(3), 253-266.
- Shen, F. T., Ho, M. J., Huang, H. R., Arun, A. B., Rekha, P. D., & Young, C. C. (2008). Molecular detection and phylogenetic characterization of *Gordonia* species in heavily oil-contaminated soils. *Research in microbiology*, 159(7), 522-529.

- Shen, F. T., Young, L. S., Hsieh, M. F., Lin, S. Y., & Young, C. C. (2010). Molecular detection and phylogenetic analysis of the alkane 1-monoxygenase gene from *Gordonia* spp. *Systematic and applied microbiology*, 33(2), 53-59.
- Shor, L. M., Liang, W., Rockne, K. J., Young, L. Y., Taghon, G. L., & Kosson, D. S. (2003). Intra-aggregate mass transport-limited bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons to *Mycobacterium* strain PC01. *Environmental science & technology*, 37(8), 1545-1552.
- Singleton, D. R., Sangaiah, R., Gold, A., Ball, L. M., & Aitken, M. D. (2006). Identification and quantification of uncultivated Proteobacteria associated with pyrene degradation in a bioreactor treating PAH-contaminated soil. *Environmental microbiology*, 8(10), 1736-1745.
- Singleton, D. R., Ramirez, L. G., & Aitken, M. D. (2009). Characterization of a polycyclic aromatic hydrocarbon degradation gene cluster in a phenanthrene-degrading *Acidovorax* strain. *Applied and environmental microbiology*, 75(9), 2613-2620.
- Siqueira Jr, J. F., Fouad, A. F., & Rôças, I. N. (2012). Pyrosequencing as a tool for better understanding of human microbiomes. *Journal of oral microbiology*, 4.
- Smith, M. R. (1990). The biodegradation of aromatic hydrocarbons by bacteria. *Biodegradation*, 1(2), 191-206.
- Solanas, A. M., & Bayona, J. M. (1984). Degradation of aromatic petroleum hydrocarbons by pure microbial cultures. *Chemosphere*, 13(5), 593-601.
- Solano-Serena, F., Marchal, R., Heiss, S., & Vandecasteele, J. P. (2004). Degradation of isooctane by *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2173: growth and catabolic pathway. *Journal of applied microbiology*, 97(3), 629-639.
- Song, H. G., Wang, X., & Bartha, R. (1990). Bioremediation potential of terrestrial fuel spills. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(3), 652-656.
- Stach, J. E., & Burns, R. G. (2002). Enrichment versus biofilm culture: a functional and phylogenetic comparison of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading microbial communities. *Environmental microbiology*, 4(3), 169-182.
- Stingley, R. L., Khan, A. A., & Cerniglia, C. E. (2004). Molecular characterization of a phenanthrene degradation pathway in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *Biochemical and biophysical research communications*, 322(1), 133-146.
- Suenaga, H., Koyama, Y., Miyakoshi, M., Miyazaki, R., Yano, H., Sota, M., ... & Miyazaki, K. (2009). Novel organization of aromatic degradation pathway genes in a microbial community as revealed by metagenomic analysis. *The ISME journal*, 3(12), 1335-1348.
- Sugiura, K., Ishihara, M., Shimauchi, T., & Harayama, S. (1996). Physicochemical properties and biodegradability of crude oil. *Environmental science & technology*, 31(1), 45-51.
- Sutton, N. B., Maphosa, F., Morillo, J. A., Al-Soud, W. A., Langenhoff, A. A., Grotenhuis, T., ... & Smidt, H. (2013). Impact of long-term diesel contamination on soil microbial community structure. *Applied and environmental microbiology*, 79(2), 619-630.
- Sverdrup, L. E., Krogh, P. H., Nielsen, T., & Stenersen, J. (2002). Relative sensitivity of three terrestrial invertebrate tests to polycyclic aromatic compounds. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21(9), 1927-1933.
- Swannell, R. P., Lee, K., & McDonagh, M. (1996). Field evaluations of marine oil spill bioremediation. *Microbiological Reviews*, 60(2), 342-365.
- Swanson, K. S., Dowd, S. E., Suchodolski, J. S., Middelbos, I. S., Vester, B. M., Barry, K. A., ... & Fahey, G. C. (2010). Phylogenetic and gene-centric metagenomics of the canine intestinal microbiome reveals similarities with humans and mice. *The ISME journal*, 5(4), 639-649.

- Taccari, M., Milanovic, V., Comitini, F., Casucci, C., & Ciani, M. (2012). Effects of biostimulation and bioaugmentation on diesel removal and bacterial community. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 66(1), 39-46.
- Takeuchi, M., Hamana, K., & Hiraishi, A. (2001). Proposal of the genus *Sphingomonas* sensu stricto and three new genera, *Sphingobium*, *Novosphingobium* and *Sphingopyxis*, on the basis of phylogenetic and chemotaxonomic analyses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(4), 1405-1417.
- Talley WF, Sleeper PM (2006) Roadblocks to the implementation of biotreatment strategies. *Ann NY Acad Sci* 16-29
- Tani, A., Ishige, T., Sakai, Y., & Kato, N. (2001). Gene structures and regulation of the alkane hydroxylase complex in *Acinetobacter* sp. strain M-1. *Journal of bacteriology*, 183(5), 1819-1823.
- Taylor, P. M., Medd, J. M., Schoenborn, L., Hodgson, B., & Janssen, P. H. (2002). Detection of known and novel genes encoding aromatic ring-hydroxylating dioxygenases in soils and in aromatic hydrocarbon-degrading bacteria. *FEMS microbiology letters*, 216(1), 61-66.
- Teixeira, L. C., Peixoto, R. S., Cury, J. C., Sul, W. J., Pellizari, V. H., Tiedje, J., & Rosado, A. S. (2010). Bacterial diversity in rhizosphere soil from Antarctic vascular plants of Admiralty Bay, maritime Antarctica. *The ISME journal*, 4(8), 989-1001.
- Teng, Y., Luo, Y., Sun, M., Liu, Z., Li, Z., & Christie, P. (2010). Effect of bioaugmentation by *Paracoccus* sp. strain HPD-2 on the soil microbial community and removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from an aged contaminated soil. *Bioresource technology*, 101(10), 3437-3443.
- Thomas, J. M., & Ward, C. H. (1989). In situ bioremediation of organic contaminants in the subsurface. *Environmental science & technology*, 23(7), 760-766.
- Thomas, J. M., & Ward, C. H. (1992). Subsurface microbial ecology and bioremediation. *Journal of hazardous materials*, 32(2), 179-194.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research*, 22(22), 4673-4680.
- Thompson, I. P., Van Der Gast, C. J., Ciric, L., & Singer, A. C. (2005). Bioaugmentation for bioremediation: the challenge of strain selection. *Environmental Microbiology*, 7(7), 909-915.
- Throne-Holst, M., Markussen, S., Winnberg, A., Ellingsen, T. E., Kotlar, H. K., & Zotchev, S. B. (2006). Utilization of n-alkanes by a newly isolated strain of *Acinetobacter venetianus*: the role of two AlkB-type alkane hydroxylases. *Applied microbiology and biotechnology*, 72(2), 353-360.
- Throne-Holst, M., Wentzel, A., Ellingsen, T. E., Kotlar, H. K., & Zotchev, S. B. (2007). Identification of novel genes involved in long-chain n-alkane degradation by *Acinetobacter* sp. strain DSM 17874. *Applied and environmental microbiology*, 73(10), 3327-3332.
- Tiedje, J. M., Thiem, S. M., Massol-Deya, A., Ka, J. O., & Fries, M. R. (1995). Tracking microbial populations effective in reducing exposure. *Environmental health perspectives*, 103(Suppl 5), 117.
- Tøndervik, A., Bruheim, P., Berg, L., Ellingsen, T. E., Kotlar, H. K., Valla, S., & Throne-Holst, M. (2012). *Ralstonia* sp. U2 naphthalene dioxygenase and *Comamonas* sp. JS765 nitrobenzene dioxygenase show differences in activity towards methylated naphthalenes. *Journal of bioscience and bioengineering*, 113(2), 173-178.
- Torsvik, V., Ovreas, L., & Thingstad, T. F. (2002). Prokaryotic diversity--magnitude, dynamics, and controlling factors. *Science Signaling*, 296(5570), 1064.
- Tringe, S. G., Von Mering, C., Kobayashi, A., Salamov, A. A., Chen, K., Chang, H. W., ... & Rubin, E. M. (2005). Comparative metagenomics of microbial communities. *Science*, 308(5721), 554-557.

- Tu, C., Teng, Y., Luo, Y., Sun, X., Deng, S., Li, Z., ... & Xu, Z. (2011). PCB removal, soil enzyme activities, and microbial community structures during the phytoremediation by alfalfa in field soils. *Journal of Soils and Sediments*, 11(4), 649-656.
- Twiss, M. R., Granier, L., Lafrance, P., & Campbell, P. G. (1999). Bioaccumulation of 2, 2', 5, 5'-tetrachlorobiphenyl and pyrene by picoplankton (*Synechococcus leopoliensis*, cyanophyceae): Influence of variable humic acid concentrations and pH. *Environmental toxicology and chemistry*, 18(9), 2063-2069.
- 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.
- Tyson, G. W., Chapman, J., Hugenholtz, P., Allen, E. E., Ram, R. J., Richardson, P. M., ... & Banfield, J. F. (2004). Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature*, 428(6978), 37-43.
- Ulrich, A. C., & Edwards, E. A. (2003). Physiological and molecular characterization of anaerobic benzene-degrading mixed cultures. *Environmental microbiology*, 5(2), 92-102.
- United States Environmental Protection Agency (US EPA). Use of monitored natural attenuation at superfund, RCRA corrective action, and underground storage tank sites—directive OSWER 9200.4-17P. United States of America: United States Environmental Protection Agency (US EPA); 1999.
- Urzi, C., Salamone, P., Schumann, P., & Stackebrandt, E. (2000). *Marmoricola aurantiacus* gen. nov., sp. nov., a coccoid member of the family Nocardioideae isolated from a marble statue. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 50(2), 529-536.
- US-EPA (1989) Bioremediation of hazardous waste sites workshop. CERL-89-11. Washington, DC.
- US-EPA, 1996a. Method 3540C: Soxhlet Extraction. US Environmental Protection Agency, Washington, DC.
- US-EPA. (1998). Seminar Series on Monitored Natural Attenuation for Ground Water, Vol. EPA/625/K-98/001.
- US-EPA. (2000). Engineered Approaches to In Situ Bioremediation of Chlorinated Solvents: Fundamentals and Field Applications, Vol. EPA-542-R-00-008.
- Van Beilen, J. B., & Witholt, B. (2003). Diversity, function, and biocatalytic applications of alkane oxygenases. *Petroleum microbiology*. ASM Press, Washington, DC USA, 317-336..
- Van Beilen, J. B., Li, Z., Duetz, W. A., Smits, T. H., & Witholt, B. (2003). Diversity of alkane hydroxylase systems in the environment. *Oil & gas science and technology*, 58(4), 427-440.
- van Beilen, J. B., & Witholt, B. (2004). Alkane degradation by pseudomonads. In *Pseudomonas* (pp. 397-423). Springer US.
- Van Beilen, J. B., Marin, M. M., Smits, T. H., Röthlisberger, M., Franchini, A. G., Witholt, B., & Rojo, F. (2004). Characterization of two alkane hydroxylase genes from the marine hydrocarbonoclastic bacterium *Alcanivorax borkumensis*. *Environmental microbiology*, 6(3), 264-273.
- Van Beilen, J. B., Smits, T. H., Roos, F. F., Brunner, T., Balada, S. B., Röthlisberger, M., & Witholt, B. (2005). Identification of an amino acid position that determines the substrate range of integral membrane alkane hydroxylases. *Journal of bacteriology*, 187(1), 85-91.
- van Beilen, J. B., Holtackers, R., Lüscher, D., Bauer, U., Witholt, B., & Duetz, W. A. (2005). Biocatalytic production of perillyl alcohol from limonene by using a novel *Mycobacterium* sp. cytochrome P450 alkane hydroxylase expressed in *Pseudomonas putida*. *Applied and environmental microbiology*, 71(4), 1737-1744.
- van Beilen, J. B., Funhoff, E. G., van Loon, A., Just, A., Kaysser, L., Bouza, M., ... & Witholt, B. (2006). Cytochrome P450 alkane hydroxylases of the CYP153 family are common in alkane-degrading eubacteria lacking integral membrane alkane hydroxylases. *Applied and environmental microbiology*, 72(1), 59-65.

- van Beilen, J. B., & Funhoff, E. G. (2007). Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation. *Applied microbiology and biotechnology*, 74(1), 13-21.
- Van Elsas, J. D., & Boersma, F. G. H. (2011). A review of molecular methods to study the microbiota of soil and the mycosphere. *European Journal of Soil Biology*, 47(2), 77-87.
- Van Straalen, N. M. (2002). Assessment of soil contamination-a functional perspective. *Biodegradation*, 13(1), 41-52.
- Van Veen, J. A., Van Overbeek, L. S., & Van Elsas, J. D. (1997). Fate and activity of microorganisms introduced into soil. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(2), 121-135.
- Vázquez, S., Nogales, B., Ruberto, L., Hernández, E., Christie-Oleza, J., Balbo, A. L., ... & Mac Cormack, W. (2009). Bacterial community dynamics during bioremediation of diesel oil-contaminated Antarctic soil. *Microbial Ecology*, 57(4), 598-610.
- Vázquez, S., Nogales, B., Ruberto, L., Mestre, C., Christie-Oleza, J., Ferrero, M., ... & Mac Cormack, W. P. (2013). Characterization of bacterial consortia from diesel-contaminated Antarctic soils: Towards the design of tailored formulas for bioaugmentation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 77, 22-30.
- Vela, S., Häggblom, M. M., & Young, L. Y. (2002). Biodegradation of aromatic and aliphatic compounds by rhizobial species. *Soil science*, 167(12), 802-810.
- Venosa, A. D., Suidan, M. T., Wrenn, B. A., Strohmeier, K. L., Haines, J. R., Eberhart, B. L., ... & Holder, E. (1996). Bioremediation of an experimental oil spill on the shoreline of Delaware Bay. *Environmental Science & Technology*, 30(5), 1764-1775.
- Venter, J. C., Remington, K., Heidelberg, J. F., Halpern, A. L., Rusch, D., Eisen, J. A., ... & Smith, H. O. (2004). Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *science*, 304(5667), 66-74.
- Vila, J., & Grifoll, M. (2009). Actions of *Mycobacterium* sp. strain AP1 on the saturated-and aromatic-hydrocarbon fractions of fuel oil in a marine medium. *Applied and environmental microbiology*, 75(19), 6232-6239.
- Vila, J., López, Z., Sabaté, J., Minguillón, C., Solanas, A. M., & Grifoll, M. (2001). Identification of a novel metabolite in the degradation of pyrene by *Mycobacterium* sp. strain AP1: actions of the isolate on two-and three-ring polycyclic aromatic hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(12), 5497-5505.
- Viñas, M., Grifoll, M., Sabaté, J., & Solanas, A. M. (2002). Biodegradation of a crude oil by three microbial consortia of different origins and metabolic capabilities. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 28(5), 252-260.
- Viñas, M., Sabaté, J., Espuny, M. J., & Solanas, A. M. (2005). Bacterial community dynamics and polycyclic aromatic hydrocarbon degradation during bioremediation of heavily creosote-contaminated soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11), 7008-7018.
- Vogel TM, Walter MV (2002). Bioaugmentation. In Manual of Environmental Microbiology 2nd edn. CJ Hurst, RL Crawford, GR Knudsen, MJ McInerney, LD Stezenback (eds.). ASM, Washington.
- Vomberg, A., & Klinner, U. (2000). Distribution of *alkB* genes within n-alkane-degrading bacteria. *Journal of applied microbiology*, 89(2), 339-348.
- Von Fahnestock, F. M., Smith, L. A., Wickramanayake, G. B., & Matthew, C. P. (1996). 'Biopile Design and Construction Manual. and "Biopile Operations and Maintenance Manual" Technical Memorandum, Battelle. Naval Facilities Engineering Service Center. Port Hueneme, California.
- Wältermann, M., Hinz, A., Robenek, H., Troyer, D., Reichelt, R., Malkus, U., ... & Steinbüchel, A. (2005). Mechanism of lipid-body formation in prokaryotes: how bacteria fatten up. *Molecular microbiology*, 55(3), 750-763.

- Wang, Y., Barbacioru, C., Hyland, F., Xiao, W., Hunkapiller, K. L., Blake, J., ... & Samaha, R. R. (2006). Large scale real-time PCR validation on gene expression measurements from two commercial long-oligonucleotide microarrays. *BMC genomics*, 7(1), 59.
- Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M., & Cole, J. R. (2007). Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and environmental microbiology*, 73(16), 5261-5267.
- Wang, C., Wang, F., Wang, T., Bian, Y., Yang, X., & Jiang, X. (2010). PAHs biodegradation potential of indigenous consortia from agricultural soil and contaminated soil in two-liquid-phase bioreactor (TLPB). *Journal of hazardous materials*, 176(1), 41-47.
- Wang, W., & Shao, Z. (2012). Diversity of flavin-binding monooxygenase genes (almA) in marine bacteria capable of degradation long-chain alkanes. *FEMS microbiology ecology*, 80(3), 523-533.
- Wang, X., Wang, Q., Wang, S., Li, F., & Guo, G. (2012). Effect of biostimulation on community level physiological profiles of microorganisms in field-scale biopiles composed of aged oil sludge. *Bioresource Technology*, 111, 308-315.
- Wang, Z., Fingas, M., & Sergy, G. (1995). Chemical characterization of crude oil residues from an arctic beach by GC/MS and GC/FID. *Environmental science & technology*, 29(10), 2622-2631.
- Wang, Z., Fingas, M., Blenkinsopp, S., Sergy, G., Landriault, M., Sigouin, L., ... & Westlake, D. W. S. (1998). Comparison of oil composition changes due to biodegradation and physical weathering in different oils. *Journal of Chromatography A*, 809(1), 89-107.
- Watkinson, R. J., & Morgan, P. (1991). Physiology of aliphatic hydrocarbon-degrading microorganisms. In *Physiology of Biodegradative Microorganisms* (pp. 79-92). Springer Netherlands.
- Watson, J. S., Jones, D. M., Swannell, R. P. J., & Van Duin, A. C. T. (2002). Formation of carboxylic acids during aerobic biodegradation of crude oil and evidence of microbial oxidation of hopanes. *Organic Geochemistry*, 33(10), 1153-1169.
- Weis, L. M., Rummel, A. M., Masten, S. J., Trosko, J. E., & Upham, B. L. (1998). Bay or baylike regions of polycyclic aromatic hydrocarbons were potent inhibitors of Gap junctional intercellular communication. *Environmental health perspectives*, 106(1), 17.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of bacteriology*, 173(2), 697-703.
- Weissenfels, W. D., Klewer, H. J., & Langhoff, J. (1992). Adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by soil particles: influence on biodegradability and biotoxicity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 36(5), 689-696.
- Wentzel, A., Ellingsen, T. E., Kotlar, H. K., Zotchev, S. B., & Throne-Holst, M. (2007). Bacterial metabolism of long-chain n-alkanes. *Applied microbiology and biotechnology*, 76(6), 1209-1221.
- Whyte, L. G., Schultz, A., Beilen, J. B., Luz, A. P., Pellizari, V., Labbé, D., & Greer, C. W. (2002). Prevalence of alkane monooxygenase genes in Arctic and Antarctic hydrocarbon-contaminated and pristine soils¹. *FEMS microbiology ecology*, 41(2), 141-150.
- Widdel, F., & Rabus, R. (2001). Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology*, 12(3), 259-276.
- Wild, S. R., & Jones, K. C. (1995). Polynuclear aromatic hydrocarbons in the United Kingdom environment: a preliminary source inventory and budget. *Environmental Pollution*, 88(1), 91-108.
- Wilson, M. S., Bakermans, C., & Madsen, E. L. (1999). In situ, real-time catabolic gene expression: extraction and characterization of naphthalene dioxygenase mRNA transcripts from groundwater. *Applied and environmental microbiology*, 65(1), 80-87.

- Williams, P. A., Catterall, F. A., & Murray, K. (1975). Metabolism of naphthalene, 2-methylnaphthalene, salicylate, and benzoate by *Pseudomonas* PG: regulation of tangential pathways. *Journal of bacteriology*, 124(2), 679-685.
- Wolicka, D., Suszek, A., Borkowski, A., & Bielecka, A. (2009). Application of aerobic microorganisms in bioremediation in situ of soil contaminated by petroleum products. *Bioresource technology*, 100(13), 3221-3227.
- Wongsa, P., Tanaka, M., Ueno, A., Hasanuzzaman, M., Yumoto, I., & Okuyama, H. (2004). Isolation and characterization of novel strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens* possessing high efficiency to degrade gasoline, kerosene, diesel oil, and lubricating oil. *Current microbiology*, 49(6), 415-422.
- Yakimov, M. M., Golyshin, P. N., Lang, S., Moore, E. R., Abraham, W. R., Lünsdorf, H., & Timmis, K. N. (1998). *Alcanivorax borkumensis* gen. nov., sp. nov., a new, hydrocarbon-degrading and surfactant-producing marine bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48(2), 339-348.
- Yakimov, M. M., Timmis, K. N., & Golyshin, P. N. (2007). Obligate oil-degrading marine bacteria. *Current opinion in biotechnology*, 18(3), 257-266.
- Yergeau, E., Sanschagrin, S., Beaumier, D., & Greer, C. W. (2012). Metagenomic analysis of the bioremediation of diesel-contaminated Canadian high arctic soils. *PLoS one*, 7(1), e30058.
- Yousaf, S., Andria, V., Reichenauer, T. G., Smalla, K., & Sessitsch, A. (2010). Phylogenetic and functional diversity of alkane degrading bacteria associated with Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) and Birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) in a petroleum oil-contaminated environment. *Journal of hazardous materials*, 184(1), 523-532.
- Youssef, N. H., & Elshahed, M. S. (2008). Diversity rankings among bacterial lineages in soil. *The ISME journal*, 3(3), 305-313.
- Yunker, M. B., Macdonald, R. W., Vingarzan, R., Mitchell, R. H., Goyette, D., & Sylvestre, S. (2002). PAHs in the Fraser River basin: a critical appraisal of PAH ratios as indicators of PAH source and composition. *Organic Geochemistry*, 33(4), 489-515.
- Zhang, D. C., Mörtelmaier, C., & Margesin, R. (2012). Characterization of the bacterial archaeal diversity in hydrocarbon-contaminated soil. *Science of the Total Environment*, 421, 184-196.
- Zhang, H., Kallimanis, A., Koukkou, A. I., & Drainas, C. (2004). Isolation and characterization of novel bacteria degrading polycyclic aromatic hydrocarbons from polluted Greek soils. *Applied microbiology and biotechnology*, 65(1), 124-131.
- Zhou, J. (2003). Microarrays for bacterial detection and microbial community analysis. *Current opinion in Microbiology*, 6(3), 288-294.
- Zucchi, M., Angiolini, L., Borin, S., Brusetti, L., Dietrich, N., Gigliotti, C., ... & Daffonchio, D. (2003). Response of bacterial community during bioremediation of an oil-polluted soil*. *Journal of applied microbiology*, 94(2), 248-257.
- Zylstra, G. J., & Kim, E. (1997). Aromatic hydrocarbon degradation by *Sphingomonas yanoikuyae* B1. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 19(5-6), 408-414.

Anexo 1. Respuesta de genes a partir de los datos obtenidos del *microarray* con muestras de ADN de los microcosmos sin fuente de carbono (sin fracciones). Valores expresan la media de la intensidad de la sonda (SNR) y (nd) no detectado. Clusters en gris, no fueron utilizados en la figura 5.16, porque presentaron un aumento a lo largo del tiempo.

Cluster	Función	T0	T3	T7	T15	T30
156	Naphthalene_1,2_dioxygenase (bphA1a)	9	nd	3	nd	nd
2_2	Naphthalene_1,2_dioxygenase (nagAc, pahAc, pahC, ndoB, doxB, nahAc, phnAc)	nd	111	85	140	150
2_4	Naphthalene_1,2_dioxygenase (nagAc, pahAc, pahC, ndoB, doxB, nahAc, phnAc)	nd	106	72	133	124
2_5	Naphthalene_1,2_dioxygenase (nagAc, pahAc, pahC, ndoB, doxB, nahAc, phnAc)	nd	39	34	47	40
2_8	Naphthalene_1,2_dioxygenase (nagAc, pahAc, pahC, ndoB, doxB, nahAc, phnAc)	nd	135	104	168	2
38	Pyrene_dioxygenase (phdF, pdoF)	53	nd	nd	nd	nd
58	Toluate_1,2_dioxygenase (xylX)	nd	199	175	130	54
313	Biphenyl_2,3_dioxygenase	nd	161	155	131	100
250	Biphenyl_2,3_dioxygenase (bphA)	16	nd	nd	7	9
21_1	1,2_dihydroxynaphthalene_dioxygenase (nahC, pahC, doxG)	nd	26	nd	25	nd
21_2	1,2_dihydroxynaphthalene_dioxygenase (nahC, pahC, doxG)	nd	182	152	234	245
21_3	1,2_dihydroxynaphthalene_dioxygenase (nahC, pahC, doxG)	nd	177	138	196	215
37	2,3_dihydroxybiphenyl_1,2_dioxygenase (bphC)	nd	144	137	121	59
46	2,3_dihydroxybiphenyl_1,2_dioxygenase (bphC, bphC2)	21	5	5	5	6
48	2,3_dihydroxybiphenyl_1,2_dioxygenase (bphC, phnC, dmdC)	nd	nd	nd	nd	5
98	2,3_dihydroxybiphenyl_1,2_dioxygenase (bphC2)	47	4	nd	3	3
215	2,3_dihydroxybiphenyl_1,2_dioxygenase (bphC6)	26	nd	nd	nd	nd
96	2,3_dihydroxybiphenyl_1,2_dioxygenase (edoC)	14	4	4	nd	nd
126	Benzoate_1,2_dioxygenase	32	6	nd	6	9
73	Benzoate_1,2_dioxygenase	nd	nd	nd	7	10
76	Benzoate_1,2_dioxygenase	15	4	5	6	6
11_1	Benzoate_1,2_dioxygenase (benA)	6	27	20	36	49
178	Benzoate_1,2_dioxygenase (benA)	nd	55	31	64	92
57	Benzoate_1,2_dioxygenase (benA)	4	7	10	5	4
666	Catechol_1,2_dioxygenase	39	5	nd	5	6
673	Catechol_1,2_dioxygenase	15	nd	nd	nd	nd
681	Catechol_1,2_dioxygenase	21	6	nd	6	8
316	Catechol_1,2_dioxygenase	27	7	7	5	nd
670	Catechol_1,2_dioxygenase	nd	7	8	8	10
687	Catechol_1,2_dioxygenase	nd	5	6	25	29
91	Catechol_2,3_dioxygenase	37	nd	6	nd	nd
26	Catechol_2,3_dioxygenase (nahH)	nd	18	15	16	12
1_1_1	Catechol_2,3_dioxygenase (phlH, dmpE, phhB, atdB, pheB, xylE, nahH)	25	46	49	32	27
1_1_2	Catechol_2,3_dioxygenase (phlH, dmpE, phhB, atdB, pheB, xylE, nahH)	nd	12	10	nd	nd
93	Catechol_2,3_dioxygenase (tdnC2)	15	4	5	4	4
4_1	Catechol_2,3_dioxygenase (xylE, bztE, bphE, nahH)	nd	107	147	81	78
4_2	Catechol_2,3_dioxygenase (xylE, bztE, bphE, nahH)	nd	166	186	132	99
4_3	Catechol_2,3_dioxygenase (xylE, bztE, bphE, nahH)	5	10	8	10	5
252	Hydroxyquinol_1,2_dioxygenase	32	6	6	7	10
697	Hydroxyquinol_1,2_dioxygenase	8	nd	3	nd	nd
688	Chlorocatechol_1,2_dioxygenase	17	6	nd	nd	nd
654	2_chlorobenzoate_1,2_dioxygenase	nd	6	6	8	11
141	Ethylbenzene_dioxygenase	30	nd	nd	nd	nd
43	Anthranilate_1,2_dioxygenase (hcaE, antA)	16	nd	5	nd	nd
401	Laccase	19	nd	nd	nd	nd
402	Laccase	8	nd	nd	4	4
403	Laccase	10	4	nd	6	7
429	Lignin peroxydase	18	5	4	6	8
425_4	Lignin peroxydase	45	nd	nd	8	12
425_5	Lignin peroxydase	11	nd	nd	nd	3
425_8	Lignin peroxydase	8	nd	nd	nd	5
448	Manganese peroxydase	9	2	nd	nd	nd

Anexo 2. Respuesta de genes a partir de los datos obtenidos del *microarray* con muestras de ADN de los microcosmos con fracción alifática (F1). Valores expresan la media de la intensidad de la sonda (SNR) y (nd) no detectado. Clusters en gris, no fueron utilizados en la figura 5.16, porque presentaron un aumento a lo largo del tiempo en los microcosmos control.

Cluster	Función	T0	T3	T7	T15	T30
58	Toluato_1,2_dioxygenase (xylX)	nd	141	54	78	61
127	Toluene_dioxygenase (xylX)	nd	nd	86	nd	3
59	Naphthalene_1,2_dioxygenase (bphA1f, phnA1a)	nd	nd	74	nd	nd
146	Naphthalene_1,2_dioxygenase (bphA1b)	nd	nd	174	nd	14
156	Naphthalene_1,2_dioxygenase (bphA1a)	9	nd	207	nd	10
180	Naphthalene_1,2_dioxygenase (bphA1e)	nd	nd	134	nd	nd
2_2	Naphthalene_1,2_dioxygenase (nagAc, pahAc, pahC, ndoB, doxB, nahAc, phnAc)	nd	137	26	12	49
2_4	Naphthalene_1,2_dioxygenase (nagAc, pahAc, pahC, ndoB, doxB, nahAc, phnAc)	nd	132	32	19	49
2_5	Naphthalene_1,2_dioxygenase (nagAc, pahAc, pahC, ndoB, doxB, nahAc, phnAc)	nd	66	13	22	16
2_8	Naphthalene_1,2_dioxygenase (nagAc, pahAc, pahC, ndoB, doxB, nahAc, phnAc)	nd	165	59	56	107
21_1	1,2_dihydroxynaphthalene_dioxygenase (nahC, pahC, doxG)	nd	52	6	nd	nd
21_2	1,2_dihydroxynaphthalene_dioxygenase (nahC, pahC, doxG)	nd	199	76	63	153
21_3	1,2_dihydroxynaphthalene_dioxygenase (nahC, pahC, doxG)	nd	180	87	75	143
173	Biphenyl_2,3_dioxygenase (bphA1c)	nd	nd	163	nd	nd
250	Biphenyl_2,3_dioxygenase (bphA)	16	nd	15	45	nd
313	Biphenyl_2,3_dioxygenase	nd	180	68	94	90
37	2,3_dihydroxybiphenyl_1,2_dioxygenase (bphC)	nd	151	31	62	48
46	2,3_dihydroxybiphenyl_1,2_dioxygenase (bphC, bphC2)	21	8	9	22	19
68	2,3_dihydroxybiphenyl_1,2_dioxygenase (bphC)	nd	2	9	9	3
94	2,3_dihydroxybiphenyl_1,2_dioxygenase (bphC7, bphC)	nd	nd	4	25	24
96	2,3_dihydroxybiphenyl_1,2_dioxygenase (edoC)	14	8	11	31	27
98	2,3_dihydroxybiphenyl_1,2_dioxygenase (bphC2)	47	8	11	15	20
100	2,3_dihydroxybiphenyl_1,2_dioxygenase (edoB)	nd	4	6	14	11
101	2,3_dihydroxybiphenyl_1,2_dioxygenase (bphC)	nd	nd	160	nd	3
215	2,3_dihydroxybiphenyl_1,2_dioxygenase (bphC6)	26	nd	nd	19	nd
220	2,3_dihydroxybiphenyl_1,2_dioxygenase (bphC)	7	6	10	15	13
241	2,3_dihydroxybiphenyl_1,2_dioxygenase	3	nd	nd	10	nd
70_1	2,3_dihydroxybiphenyl_1,2_dioxygenase (bphC, bphC6)	nd	nd	nd	10	nd
23	Benzoate_1,2_dioxygenase (benA)	nd	16	11	26	23
57	Benzoate_1,2_dioxygenase (benA)	4	19	5	10	15
72	Benzoate_1,2_dioxygenase (benA)	nd	8	nd	nd	nd
73	Benzoate_1,2_dioxygenase	nd	nd	34	47	nd
76	Benzoate_1,2_dioxygenase	15	9	9	17	12
78	Benzoate_1,2_dioxygenase	nd	5	25	38	9
124	Benzoate_1,2_dioxygenase	2	7	4	6	10
125	Benzoate_1,2_dioxygenase	nd	7	11	15	10
126	Benzoate_1,2_dioxygenase	32	9	12	28	24
132	Benzoate_1,2_dioxygenase	nd	9	3	5	8
152	Benzoate_1,2_dioxygenase	nd	3	3	13	41
178	Benzoate_1,2_dioxygenase (benA)	nd	57	23	25	59
11_1	Benzoate_1,2_dioxygenase (benA)	6	32	12	21	35
105	Catechol_1,2_dioxygenase	nd	6	8	22	12
106	Catechol_1,2_dioxygenase (cata)	nd	nd	18	28	31
294	Catechol_1,2_dioxygenase (cata)	nd	7	36	51	19
316	Catechol_1,2_dioxygenase	27	16	10	8	10
666	Catechol_1,2_dioxygenase	39	8	12	22	14
669	Catechol_1,2_dioxygenase	4	3	7	7	32
670	Catechol_1,2_dioxygenase	nd	16	19	49	41
674	Catechol_1,2_dioxygenase	nd	8	10	22	19
675	Catechol_1,2_dioxygenase	3	7	9	14	19
676	Catechol_1,2_dioxygenase	5	5	37	44	10
681	Catechol_1,2_dioxygenase	21	13	13	37	29
682	Catechol_1,2_dioxygenase	nd	2	20	18	3
683	Catechol_1,2_dioxygenase	nd	nd	nd	nd	12
684	Catechol_1,2_dioxygenase	nd	5	7	16	9
687	Catechol_1,2_dioxygenase	nd	12	33	79	139
91	Catechol_2,3_dioxygenase	37	4	3	nd	nd
26	Catechol_2,3_dioxygenase (nahH)	nd	16	12	17	21
66	Catechol_2,3_dioxygenase (pheG)	nd	5	7	9	12
93	Catechol_2,3_dioxygenase (tdnC2)	15	6	7	11	8
222	Catechol_2,3_dioxygenase	nd	5	5	8	10
1_1_1	Catechol_2,3_dioxygenase (pHh, dmpE, phhB, atdB, pheB, xylE, nahH)	25	30	33	46	41
1_1_2	Catechol_2,3_dioxygenase (pHh, dmpE, phhB, atdB, pheB, xylE, nahH)	nd	22	18	16	23
4_1	Catechol_2,3_dioxygenase (xylE, bztE, bphE, nahH)	nd	64	53	56	88
4_2	Catechol_2,3_dioxygenase (xylE, bztE, bphE, nahH)	nd	131	107	134	146
4_3	Catechol_2,3_dioxygenase (xylE, bztE, bphE, nahH)	5	16	13	15	20
5_1	Catechol_1,2_dioxygenase (cata2, cata)	nd	5	6	14	13
5_3	Catechol_1,2_dioxygenase (cata2, cata)	nd	nd	nd	16	14
5_5	Catechol_1,2_dioxygenase (cata2, cata)	nd	5	5	8	6
8_1	Catechol_2,3_dioxygenase (xylE, catE, cmpE, cata, nahH)	nd	4	138	11	8
8_3	Catechol_2,3_dioxygenase (xylE, catE, cmpE, cata, nahH)	nd	4	14	5	5
8_4	Catechol_2,3_dioxygenase (xylE, catE, cmpE, cata, nahH)	nd	nd	34	nd	19
325	1,2,4-benzenetriol_1,2-dioxygenase_Nitrophenol_degradation	nd	6	8	11	11
328	1,2,4-benzenetriol_1,2-dioxygenase_Nitrophenol_degradation	nd	nd	6	11	7
22	Hydroxyquinol_1,2_dioxygenase	nd	4	5	7	9
252	Hydroxyquinol_1,2_dioxygenase	32	10	10	30	21
690	Hydroxyquinol_1,2_dioxygenase	3	3	33	64	33
693	Hydroxyquinol_1,2_dioxygenase	7	7	9	14	14
697	Hydroxyquinol_1,2_dioxygenase	8	6	9	22	16
698	Hydroxyquinol_1,2_dioxygenase	nd	8	7	8	11
654	2_chlorobenzoate_1,2_dioxygenase	nd	18	29	51	52
39	Chlorocatechol_1,2_dioxygenase (cbnA, tetC, mocpA, clcA, tcbC)	nd	4	4	5	5
688	Chlorocatechol_1,2_dioxygenase	17	15	8	15	21
	Isooxygznase	nd	nd	45	nd	nd
656	Anthranilate_1,2_dioxygenase	5	10	9	13	10
402	Laccase	8	4	4	5	5
403	Laccase	10	5	7	15	12
425_4	Lignin peroxydase	45	12	nd	nd	39
425_5	Lignin peroxydase	11	nd	3	4	nd
425_8	Lignin peroxydase	8	nd	nd	9	nd
429	Lignin peroxydase	18	10	13	40	34
436	Manganese peroxydase	nd	7	10	20	14
448	Manganese peroxydase	9	6	nd	3	2
434_1	Manganese peroxydase	4	6	7	9	9
434_3	Manganese peroxydase	4	4	4	18	6
434_5	Manganese peroxydase	nd	14	20	50	34

Anexo 3. Respuesta de genes a partir de los datos obtenidos del *microarray* con muestras de ADN de los microcosmos con fracción aromática (F3). Valores expresan la media de la intensidad de la sonda (SNR) y (nd) no detectado. Clusters en gris, no fueron utilizados en la figura 5.16, porque presentaron un aumento a lo largo del tiempo en los microcosmos control.

Cluster	Función	T0	T3	T7	T15	T30
127	Toluene_dioxygenase (xylX,)	nd	6	nd	nd	111
58	Toluene_1,2_dioxygenase (xylX,)	nd	105	48	35,6	20
156	Naphthalene_1,2_dioxygenase (bphA1a)	9	7	nd	nd	95
146	Naphthalene_1,2_dioxygenase (bphA1b)	nd	16	55	31	114
180	Naphthalene_1,2_dioxygenase (bphA1e)	nd	38	nd	nd	121
2_2	Naphthalene_1,2_dioxygenase (nagAc, pahAc, pahC, ndoB, doxB, nahAc, phnAc)	nd	87	65	67	5
2_4	Naphthalene_1,2_dioxygenase (nagAc, pahAc, pahC, ndoB, doxB, nahAc, phnAc)	nd	85	72	68	6
2_5	Naphthalene_1,2_dioxygenase (nagAc, pahAc, pahC, ndoB, doxB, nahAc, phnAc)	nd	34	29	24	nd
2_8	Naphthalene_1,2_dioxygenase (nagAc, pahAc, pahC, ndoB, doxB, nahAc, phnAc)	nd	111	80	72	9
83	Naphthalene_1,2_dioxygenase (phnA1b, bphA1c)	nd	110	183	177	165
263	Naphthalene_1,2_dioxygenase (phnAc)	nd	90	176	180	142
59	Naphthalene_1,2_dioxygenase (bphA1f, phnA1a)	nd	nd	nd	nd	78
21_1	1,2_dihydroxynaphthalene_dioxygenase (nahC, pahC, doxG)	nd	nd	22	nd	nd
21_2	1,2_dihydroxynaphthalene_dioxygenase (nahC, pahC, doxG)	nd	108	105	69	12
21_3	1,2_dihydroxynaphthalene_dioxygenase (nahC, pahC, doxG)	nd	141	105	72	12
250	Biphenyl_2,3_dioxygenase (bphA)	16	nd	nd	nd	10
144	Biphenyl_2,3_dioxygenase	nd	nd	nd	18	nd
313	Biphenyl_2,3_dioxygenase	nd	98	84	45	22
173	Biphenyl_2,3_dioxygenase (bphA1c)	nd	4	nd	nd	84
101	2,3_dihydroxybiphenyl_1,2_dioxygenase (bphC)	nd	nd	nd	18	0
37	2,3_dihydroxybiphenyl_1,2_dioxygenase (bphC)	nd	113	67	63	23
46	2,3_dihydroxybiphenyl_1,2_dioxygenase (bphC, bphC2)	21	5	8	8	7
48	2,3_dihydroxybiphenyl_1,2_dioxygenase (bphC, phnC, dmdC)	nd	105	188	180	148
98	2,3_dihydroxybiphenyl_1,2_dioxygenase (bphC2)	47	4	4	5	6
215	2,3_dihydroxybiphenyl_1,2_dioxygenase (bphC6)	26	nd	nd	7	nd
96	2,3_dihydroxybiphenyl_1,2_dioxygenase (edoC)	14	4	6	8	7
152	Benzoate_1,2_dioxygenase	nd	2	3	13	4
23	Benzoate_1,2_dioxygenase (benA)	nd	8	7	nd	6
77	Benzoate_1,2_dioxygenase	nd	nd	4	nd	6
126	Benzoate_1,2_dioxygenase	32	5	7	8	6
78	Benzoate_1,2_dioxygenase	nd	5	9	11	10
73	Benzoate_1,2_dioxygenase	nd	n	8	8	9
76	Benzoate_1,2_dioxygenase	15	5	5	7	7
11_1	Benzoate_1,2_dioxygenase (benA)	6	34	13	12	8
178	Benzoate_1,2_dioxygenase (benA)	nd	51	21	22	7
57	Benzoate_1,2_dioxygenase (benA)	4	9	4	4	5
658	Benzoate_1,2_dioxygenase	nd	6	nd	nd	nd
148	Benzoate_1,2_dioxygenase	nd	3	nd	nd	nd
666	Catechol_1,2_dioxygenase	39	5	6	9	nd
674	Catechol_1,2_dioxygenase	nd	5	7	7	8
676	Catechol_1,2_dioxygenase	5	3	6	14	9
681	Catechol_1,2_dioxygenase	21	7	8	10	9
316	Catechol_1,2_dioxygenase	27	8	9	6	6
670	Catechol_1,2_dioxygenase	0	8	10	14	14
687	Catechol_1,2_dioxygenase	nd	9	16	36	6
26	Catechol_2,3_dioxygenase (nahH)	nd	17	10	nd	nd
1_1_1	Catechol_2,3_dioxygenase (phlH, dmpE, phhB, atdB, pheB, xylE, nahH)	25	44	15	16	9
1_1_2	Catechol_2,3_dioxygenase (phlH, dmpE, phhB, atdB, pheB, xylE, nahH)	nd	8	6	5	6
93	Catechol_2,3_dioxygenase (tdnC2)	15	5	5	5	5
4_1	Catechol_2,3_dioxygenase (xylE, bztE, bphE, nahH)	nd	90	37	43	11
4_2	Catechol_2,3_dioxygenase (xylE, bztE, bphE, nahH)	nd	96	57	40	17
8_1	Catechol_2,3_dioxygenase (xylE, catE, cmpE, catA, nahH)	nd	6	22	22	100
8_2	Catechol_2,3_dioxygenase (xylE, catE, cmpE, catA, nahH)	nd	60	171	175	126
8_3	Catechol_2,3_dioxygenase (xylE, catE, cmpE, catA, nahH)	nd	10	49	39	51
8_4	Catechol_2,3_dioxygenase (xylE, catE, cmpE, catA, nahH)	nd	3	65	10	19
252	Hydroxyquinol_1,2_dioxygenase	32	6	8	11	8
697	Hydroxyquinol_1,2_dioxygenase	8	3	nd	6	5
688	Chlorocatechol_1,2_dioxygenase	17	7	5	6	5
325	1,2,4-benzenetriol_1,2-dioxygenase_Nitrophenol_degradation	nd	nd	4	6	4
654	2_chlorobenzoate_1,2_dioxygenase	nd	7	12	14	12
656	Anthranilate_1,2_dioxygenase	5	7	8	7	7
iso	oxygznase	nd	nd	nd	nd	57
401	Laccase	19	nd	nd	10	8
402	Laccase	8	3	4	5	3
403	Laccase	10	5	6	7	6
429	Lignin peroxydase	18	6	9	12	9
434_5	Manganese peroxydase	nd	5	8	10	8
436	Manganese peroxydase	nd	5	7	8	6

Anexo 4. Respuesta de genes a partir de los datos obtenidos del *microarray* con muestras de ADN de los microcosmos con fracción alifática y aromática (F1F3). Valores expresan la media de la intensidad de la sonda (SNR) y (nd) no detectado. Clusters en gris, no fueron utilizados en la figura 5.16, porque presentaron un aumento a lo largo del tiempo en los microcosmos control.

Cluster	Función	T0	T3	T7	T15	T30
58	Toluatoe_1,2_dioxygenase (xylX)	ng	111	94	21	44
146	Naphthalene_1,2_dioxygenase (bphA1b)	nd	14	37	43	38
180	Naphthalene_1,2_dioxygenase (bphA1e)	nd	65	135	96	141
2_2	Naphthalene_1,2_dioxygenase (nagAc, pahAc, pahC, ndoB, doxB, nahAc, phnAc)	nd	117	43	29	18
2_4	Naphthalene_1,2_dioxygenase (nagAc, pahAc, pahC, ndoB, doxB, nahAc, phnAc)	nd	100	53	34	20
2_5	Naphthalene_1,2_dioxygenase (nagAc, pahAc, pahC, ndoB, doxB, nahAc, phnAc)	nd	42	20	14	nd
2_8	Naphthalene_1,2_dioxygenase (nagAc, pahAc, pahC, ndoB, doxB, nahAc, phnAc)	nd	127	67	53	30
83	Naphthalene_1,2_dioxygenase (phnA1b, bphA1c)	nd	69	175	178	173
263	Naphthalene_1,2_dioxygenase (phnAc)	nd	122	148	197	174
313	Biphenyl_2,3_dioxygenase	nd	118	70	33	49
250	Biphenyl_2,3_dioxygenase (bphA,)	16	7	9	nd	10
21_1	1,2_dihydroxynaphthalene_dioxygenase (nahC, pahC, doxG)	nd	26	12	nd	nd
21_2	1,2_dihydroxynaphthalene_dioxygenase (nahC, pahC, doxG)	nd	156	94	60	35
21_3	1,2_dihydroxynaphthalene_dioxygenase (nahC, pahC, doxG)	nd	141	109	60	39
37	2,3_dihydroxybiphenyl_1,2_dioxygenase (bphC)	nd	136	62	59	52
220	2,3_dihydroxybiphenyl_1,2_dioxygenase (bphC)	7	5	6	14	12
68	2,3_dihydroxybiphenyl_1,2_dioxygenase (bphC)	nd	2	7	9	5
101	2,3_dihydroxybiphenyl_1,2_dioxygenase (bphC)	nd	nd	nd	9	nd
46	2,3_dihydroxybiphenyl_1,2_dioxygenase (bphC, bphC2)	21	5	7	8	6
48	2,3_dihydroxybiphenyl_1,2_dioxygenase (bphC, phnC, dmdC)	nd	72	162	190	180
98	2,3_dihydroxybiphenyl_1,2_dioxygenase (bphC2)	47	5	5	32	34
215	2,3_dihydroxybiphenyl_1,2_dioxygenase (bphC6)	26	nd	nd	11	7
100	2,3_dihydroxybiphenyl_1,2_dioxygenase (edoB)	nd	3	3	9	10
96	2,3_dihydroxybiphenyl_1,2_dioxygenase (edoC)	14	5	10	10	8
152	Benzoate_1,2_dioxygenase	nd	2	3	17	13
124	Benzoate_1,2_dioxygenase	nd	4	4	4	8
126	Benzoate_1,2_dioxygenase	32	6	7	8	10
78	Benzoate_1,2_dioxygenase	nd	5	13	17	13
73	Benzoate_1,2_dioxygenase	nd	6	11	19	13
76	Benzoate_1,2_dioxygenase	15	5	8	8	7
23	Benzoate_1,2_dioxygenase (benA)	nd	6	7	8	8
11_1	Benzoate_1,2_dioxygenase (benA)	6	31	18	13	16
178	Benzoate_1,2_dioxygenase (benA)	nd	51	30	21	21
666	Catechol_1,2_dioxygenase	39	6	6	8	6
669	Catechol_1,2_dioxygenase	4	5	4	9	9
318	Catechol_1,2_dioxygenase	nd	nd	nd	nd	12
320	Catechol_1,2_dioxygenase	nd	3	4	4	9
674	Catechol_1,2_dioxygenase	nd	5	8	9	8
675	Catechol_1,2_dioxygenase	3	4	5	8	8
676	Catechol_1,2_dioxygenase	5	4	21	26	16
681	Catechol_1,2_dioxygenase	21	7	8	10	8
316	Catechol_1,2_dioxygenase	27	9	7	6	8
670	Catechol_1,2_dioxygenase	nd	8	13	22	14
687	Catechol_1,2_dioxygenase	nd	7	18	26	36
294	Catechol_1,2_dioxygenase (catA)	nd	4	26	32	19
106	Catechol_1,2_dioxygenase (catA)	nd	nd	6	9	7
99	Catechol_1,2_dioxygenase (catA2)	nd	nd	nd	nd	9
26	Catechol_2,3_dioxygenase (nahH)	nd	15	16	9	11
66	Catechol_2,3_dioxygenase (pheG)	nd	4	6	5	5
1_1_1	Catechol_2,3_dioxygenase (phlH, dmpE, phhB, atdB, pheB, xylE, nahH)	25	31	32	13	15
1_1_2	Catechol_2,3_dioxygenase (phlH, dmpE, phhB, atdB, pheB, xylE, nahH)	nd	12	13	10	14
4_1	Catechol_2,3_dioxygenase (xylE, bztE, bphE, nahH)	nd	81	67	31	36
4_2	Catechol_2,3_dioxygenase (xylE, bztE, bphE, nahH)	nd	122	93	48	63
4_3	Catechol_2,3_dioxygenase (xylE, bztE, bphE, nahH)	5	10	10	9	10
8_1	Catechol_2,3_dioxygenase (xylE, catE, cmpE, catA, nahH)	nd	5	28	35	38
8_2	Catechol_2,3_dioxygenase (xylE, catE, cmpE, catA, nahH)	nd	59	151	186	153
8_3	Catechol_2,3_dioxygenase (xylE, catE, cmpE, catA, nahH)	nd	10	66	81	85
8_4	Catechol_2,3_dioxygenase (xylE, catE, cmpE, catA, nahH)	nd	4	14	41	29
328	1,2,4-benzenetriol_1,2-dioxygenase_Nitrophenol_degradation	nd	3	8	5	nd
252	Hydroxyquinol_1,2_dioxygenase	32	7	7	8	6
690	Hydroxyquinol_1,2_dioxygenase	3	3	8	34	25
693	Hydroxyquinol_1,2_dioxygenase	7	6	6	8	6
697	Hydroxyquinol_1,2_dioxygenase	8	4	5	7	5
654	2_chlorobenzoate_1,2_dioxygenase	nd	8	12	16	13
688	Chlorocatechol_1,2_dioxygenase	17	6	n	6	12
656	Anthranilate_1,2_dioxygenase	5	6	7	9	8
401	Laccase	19	nd	nd	8	7
403	Laccase	10	5	6	6	nd
429	Lignin peroxydase	nd	7	9	10	10
434_5	Manganese peroxydase	nd	6	9	12	9
448	Manganese peroxydase	9	2	nd	2	2

Anexo 5. Representa los organismos presentes en cada cluster, detectado en el *microarray*.

Cluster	Organismos
22	<i>Burkholderia multivorans</i> , <i>Burkholderia ambifaria</i>
26	<i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Pseudomonas putida</i>
37	<i>Achromobacter sp.</i> , <i>Burkholderia xenovorans</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>P. pseudoalcaligenes</i> , <i>P. putida</i>
38	<i>Mycobacterium vanbaalenii</i> , <i>Mycobacterium sp.</i>
43	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
48	<i>Sphingomonas sp.</i> , <i>Sphingomonas aromaticivorans</i> , <i>Pseudomonas paucimobilis</i>
57	<i>Ralstonia solanacearum</i>
58	<i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Pseudomonas putida</i>
59	<i>Sphingomonas sp.</i> , <i>Pseudomonas paucimobilis</i> , <i>Sphingomonas yanoikuyae</i>
66	<i>Cupriavidus necator</i> , <i>Ralstonia sp.</i>
68	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
72	<i>Burkholderia sp.</i> , <i>Burkholderia xenovorans</i>
73	<i>Mycobacterium sp.</i>
76	<i>Mycobacterium sp.</i> , <i>Mycobacterium gilvum</i>
77	<i>Burkholderia sp.</i>
78	<i>Methylobacterium nodulans</i> , <i>Methylobacterium sp.</i>
83	<i>Sphingomonas sp.</i> , <i>Sphingomonas aromaticivorans</i> , <i>Novosphingobium aromaticivorans</i>
91	<i>Ralstonia pickettii</i> , <i>Cupriavidus pinatubonensis</i>
93	<i>Acidovorax sp.</i> , <i>Pseudomonas putida</i>
94	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
96	<i>Rhodococcus sp.</i> , <i>Rhodococcus opacus</i>
98	<i>Rhodococcus sp.</i> , <i>Rhodococcus opacus</i>
99	<i>Burkholderia sp.</i> , <i>Burkholderia phymatum</i>
100	<i>Rhodococcus opacus</i> , <i>Rhodococcus rhodochrous</i>
101	<i>Sphingomonas sp.</i> , <i>Pseudomonas paucimobilis</i> , <i>Sphingomonas yanoikuyae</i>
105	<i>Burkholderia sp.</i>
106	<i>Rhodococcus sp.</i> , <i>Rhodococcus opacus</i>
124	<i>Cupriavidus necator</i>
125	<i>Gordonia bronchialis</i>
126	<i>Dietzia cinnamea</i>
127	<i>Sphingomonas sp.</i>
132	<i>Cupriavidus pinatubonensis</i>
141	<i>Rhodococcus sp.</i>
146	<i>Sphingomonas yanoikuyae</i>
152	<i>Burkholderia cenocepacia</i>
156	<i>Sphingomonas yanoikuyae</i>
173	<i>Sphingomonas sp.</i>
178	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
180	<i>Sphingomonas yanoikuyae</i>
215	<i>Rhodococcus equi</i>
220	<i>Rhodococcus equi</i>
222	<i>Methylibium petroleiphilum</i>
241	<i>Mycobacterium smegmatis</i>
250	<i>Acidovorax sp.</i>
252	<i>Achromobacter xylosoxydans</i>
263	<i>Novosphingobium sp.</i>
294	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
313	<i>Pseudomonas sp. B4</i>
316	<i>Pseudomonas putida</i>
318	<i>Burkholderia sp. NK8</i>
320	<i>Cupriavidus necator</i>
325	<i>Pseudomonas sp. PNP5</i>
328	<i>Pseudomonas sp. PNP4</i>
349	<i>Thauera sp. (strain MZ1T)</i>
401	<i>Trametes versicolor</i>
402	<i>Trametes versicolor</i>

Continuación del Anexo 5.

Cluster	Organismos
403	<i>Trametes versicolor</i>
429	<i>Phanerochaete sordida</i>
429	<i>Phanerochaete sordida</i>
436	<i>Trametes versicolor</i>
448	<i>Pleurotus ostreatus</i>
654	<i>Pseudomonas brassicacearum</i> (strain NFM421)
656	<i>Achromobacter piechaudii</i> ATCC 43553
658	<i>Arthrobacter phenanthrenivorans</i> (strain DSM 18606 / JCM 16027 / LMG 23796 / Sphe3)
666	<i>Arthrobacter sp.</i> (strain FB24)
669	<i>Arthrobacter sp.</i> BA-5-17
670	<i>Ralstonia metallidurans</i> (strain CH34 / ATCC 43123 / DSM 2839)
673	<i>Dietzia cinnamnea</i> P4
674	<i>Gordonia neofelifaecis</i> NRRL B-59395
675	<i>Gordonia hydrophobica</i>
676	<i>Gordonia namibiensis</i>
681	<i>Mycobacterium sp.</i> (strain KMS)
682	<i>Mycobacterium smegmatis</i> (strain ATCC 700084 / mc(2)155)
683	<i>Mycobacterium gilvum</i> (strain PYR-GCK)
684	<i>Paracoccus denitrificans</i> (strain Pd 1222)
687	<i>Rhizobium meliloti</i>
688	<i>Ralstonia solanacearum</i>
690	<i>Acidovorax avenae</i> (strain ATCC 19860 / DSM 7227 / JCM 20985 / NCPPB 1011)
693	<i>Arthrobacter sp.</i>
697	<i>Mycobacterium smegmatis</i> (strain ATCC 700084 / mc(2)155)
698	<i>Ralstonia metallidurans</i> (strain CH34 / ATCC 43123 / DSM 2839)
1_1_1	<i>Alcaligenes sp.</i> , <i>Acinetobacter sp.</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>P. oryzihabitans</i> , <i>P. migulae</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>P. mendocina</i> , <i>P. putida</i> , <i>Pseudomonas stutzeri</i>
1_1_2	<i>Alcaligenes sp.</i> , <i>Acinetobacter sp.</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>P. oryzihabitans</i> , <i>P. migulae</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>P. mendocina</i> , <i>P. putida</i> , <i>Pseudomonas stutzeri</i>
11_1	<i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Pseudomonas entomophila</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Pseudomonas putida</i>
2_2	<i>Polaramonas naphthalenivorans</i> , <i>Acidovorax sp.</i> , <i>Burkholderia sp.</i> , <i>Comamonas testosteroni</i> , <i>Delftia acidovorans</i> , <i>Ralstonia sp.</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>P. putida</i> , <i>Pseudomonas stutzeri</i>
2_4	<i>Polaramonas naphthalenivorans</i> , <i>Acidovorax sp.</i> , <i>Burkholderia sp.</i> , <i>Comamonas testosteroni</i> , <i>Delftia acidovorans</i> , <i>Ralstonia sp.</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>P. putida</i> , <i>Pseudomonas stutzeri</i>
2_5	<i>Polaramonas naphthalenivorans</i> , <i>Acidovorax sp.</i> , <i>Burkholderia sp.</i> , <i>Comamonas testosteroni</i> , <i>Delftia acidovorans</i> , <i>Ralstonia sp.</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>P. putida</i> , <i>Pseudomonas stutzeri</i>
2_8	<i>Polaramonas naphthalenivorans</i> , <i>Acidovorax sp.</i> , <i>Burkholderia sp.</i> , <i>Comamonas testosteroni</i> , <i>Delftia acidovorans</i> , <i>Ralstonia sp.</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>P. putida</i> , <i>Pseudomonas stutzeri</i>
21_1	<i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Pseudomonas stutzeri</i> , <i>Pseudomonas putida</i>
21_2	<i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Pseudomonas stutzeri</i> , <i>Pseudomonas putida</i>
21_3	<i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Pseudomonas stutzeri</i> , <i>Pseudomonas putida</i>
4_1	<i>Achromobacter sp.</i> , <i>Alcaligenes xylosoxydans</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>P. oryzihabitans</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>P. putida</i> , <i>P. stutzeri</i>
4_2	<i>Achromobacter sp.</i> , <i>Alcaligenes xylosoxydans</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>P. oryzihabitans</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>P. putida</i> , <i>P. stutzeri</i>
4_3	<i>Achromobacter sp.</i> , <i>Alcaligenes xylosoxydans</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>P. oryzihabitans</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>P. putida</i> , <i>P. stutzeri</i>
425_4	<i>Phanerochaete sordida</i> ,
425_5	<i>Phanerochaete sordida</i> ,
425_8	<i>Phanerochaete sordida</i> ,
434_1	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>
434_3	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>
434_5	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>
5_1	<i>Burkholderia mallei</i> , <i>Burkholderia sp.</i> , <i>B. multivorans</i> , <i>B. pseudomallei</i> , <i>B. ambifaria</i> , <i>B. vietnamiensis</i> , <i>B. cenocepacia</i> , <i>B. thailandensis</i> ,
5_3	<i>Burkholderia mallei</i> , <i>Burkholderia sp.</i> , <i>B. multivorans</i> , <i>B. pseudomallei</i> , <i>B. ambifaria</i> , <i>B. vietnamiensis</i> , <i>B. cenocepacia</i> , <i>B. thailandensis</i> ,
5_5	<i>Burkholderia mallei</i> , <i>Burkholderia sp.</i> , <i>B. multivorans</i> , <i>B. pseudomallei</i> , <i>B. ambifaria</i> , <i>B. vietnamiensis</i> , <i>B. cenocepacia</i> , <i>B. thailandensis</i> ,
70_1	<i>Rhodococcus sp.</i> , <i>Rhodococcus opacus</i> , <i>Rhodococcus erythropolis</i> ,
8_1	<i>Sphingomonas sp.</i> , <i>Sphingomonas aromaticivorans</i> , <i>Sphingomonas agrestis</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Pseudomonas paucimobilis</i> , <i>Sphingomonas yanoikuyae</i>
8_2	<i>Sphingomonas sp.</i> , <i>Sphingomonas aromaticivorans</i> , <i>Sphingomonas agrestis</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Pseudomonas paucimobilis</i> , <i>Sphingomonas yanoikuyae</i>
8_3	<i>Sphingomonas sp.</i> , <i>Sphingomonas aromaticivorans</i> , <i>Sphingomonas agrestis</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Pseudomonas paucimobilis</i> , <i>Sphingomonas yanoikuyae</i>
8_4	<i>Sphingomonas sp.</i> , <i>Sphingomonas aromaticivorans</i> , <i>Sphingomonas agrestis</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Pseudomonas paucimobilis</i> , <i>Sphingomonas yanoikuyae</i>
Iso	<i>Sphingomonas paucimobilis</i> EPA505