

UNIVERSIDAD DE GRANADA

INSTITUTO UNIVERSITARIO DE INVESTIGACIÓN DEL AGUA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA



Memoria presentada por la Licenciada en Biotecnología Dña. *Imane Uad* para aspirar al grado Doctor por la Universidad de Granada

**CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA Y MOLECULAR DE BACTERIAS
DEGRADORAS DE HIDROCARBUROS AISLADAS DE FONDOS MARINOS
(DEL PRESTIGE)**

Fdo. Doctoranda *Imane Uad*

VºBº de los Directores:

Fdo.
Dña. Concepción Calvo Saínz
Catedrática de Universidad
Dpto. de Microbiología
Universidad de Granada

Fdo.
D. Jesús González López
Catedrático de Universidad
Dpto. de Microbiología
Universidad de Granada

Fdo.
D. Maximino Manzanera
Investigador contratado
Ramón y Cajal
Instituto Universitario de
Investigación del Agua
Universidad de Granada

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Imane Uad
D.L.: GR 1225-2012
ISBN: 978-84-695-1168-8

Esta Tesis Doctoral ha sido parcialmente subvencionada por la Agencia Española de Cooperación Internacional (A.E.C.I.), por la empresa Repsol YPF mediante la financiación del proyecto de investigación “Estudio de viabilidad del fuel del Prestige” y por el grupo de investigación del PAI “Microbiología Ambiental (RNM270)”

Durante el periodo de la presente Tesis Doctoral se han realizado las siguientes publicaciones y comunicaciones a congresos:

∞ Publicaciones en revistas internacionales (Anexo II):

Uad, I., Silva-Castro, G. A., Pozo, C. González- López, J. and Calvo, C. (2010). Biodegradative potential and characterization of bioemulsifiers of marine bacteria isolated from samples of seawater, sediment and fuel extracted at 4000m of depth (Presige wreck). *International Biodeterioration and Biodegradation*: 511-518.

Calvo, C., Manzanera, M., Silva-Castro, G.A., Uad, I., and González-López, J. (2009). Application of bioemulsifiers in soil oil bioremediation processes. Future prospects. *Sc. Total Environ.* 407: 3634-3640

Calvo, C. Silva-Castro, G. A. Uad, I., García Fandiño, C., Laguna, J. and González-López, J. (2008). Efficiency of the EPS emulsifier produced by *Ochrobactrum anthropi* in different hydrocarbon bioremediation assays. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35: 1493–1501

∞ Capítulos de libro

Calvo, C., Silva-Castro, G.A., Uad, I., Manzanera, M., Perucha, C., Laguna, J., GonzálezLópez, J. 2010. Biostimulation combined treatments for remediation of diesel contaminated soil. In: *Environmental Toxicology III*. (Eds V. Popov and C.A. Brebbia) ISBN: 978-1-84564-438-3. WITpress. Southampton. UK.

Calvo, C., Silva-Castro, G.A., Uad, I., González-López, J. 2008. When can surfactants enhance Hydrocarbons biodegradation in oil biotreatments?. *Environmental Toxicology II* (Eds A.G. Kungolos, C.A. Brebbia, M. Zamorano) ISBN: 978-1-84564-114-6. WITpress. Southampton. UK.

∞ Comunicaciones a congresos nacionales e internacionales:

Uad, I., Toledo, F.L., Pozo, C., Silva-Castro, G. A., González- López, J. y Calvo, C. Caracterización de bacterias productoras de bioemulgentes aisladas de ambientes marinos. XXI Congreso Nacional de Microbiología, Sevilla, 2007.

Calvo, C. Uad, I., Pozo, C., Silva-Castro, G.A., Manzanera, M., and González, J. Characterization of oil Hydrocarbon degrading bacteria Isolated from samples of sediment, Seawater and fuel extracterd at 4000 m of depth. 14th International bioremediation and Biodeterioration symposium. Messina.Italy, 2010.

Uad, I., Nuñez-Lechado, M.C., Silva-Castro, G. A., Pozo, C., Manzanera, M., González- López, J. y Calvo, C. Influencia de la salinidad y tiempo de incubación en la productividad y actividad emulgente de los biopolímeros sintetizados por cepas de *Halomonas* aisladas de fondos oceánicos. XXIII Congreso Nacional de Microbiología. Salamanca, 2011.

A Abdelghani
A mis padres Mohammed y Fatima Z.
A herman@s Ikram, Abdellah y Omar

AGRADECIMIENTOS

Ya han pasado años desde que un buen día llegué a Granada. Para hacer un balance resumido de lo que han supuesto todos estos años para mí, he de decir en mi primer lugar que Granada se ha convertido sin lugar a dudas en mi casa, mi otra casa. La experiencia que me llevo de todos estos años no podría ser mejor. Creo que he aprendido muchas cosas, pero aún más importante es que he conocido a grandes amigos y a grandes personas, algunas de las cuales las llevaré conmigo para siempre...

En primer lugar quiero agradecer a mis Directores de Tesis todo el apoyo y la ayuda que me han ofrecido durante el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Concepción Calvo, le agradezco la oportunidad que me brindó para iniciar esta investigación, la confianza que depositó en mí desde el primer momento para llevar a cabo este proyecto que me entusiasmó y también su enorme amabilidad y disponibilidad en todo momento, sus sabios consejos, la experiencia profesional que me ha transmitido y la dedicación y el cariño que me ha mostrado durante todo este tiempo.

Al Dr. Jesús González López, le agradezco por haberme hecho sentir parte de un grupo y, quisiera aprovechar esta oportunidad para agradecerle el trato tan afectuoso que siempre me ha ofrecido.

En el Dr. Maximino Manzanera Ruiz he encontrado siempre una gran ayuda y orientación científica. Sus conocimientos en el mundo de la genética y de la biología molecular han enriquecido de forma considerable mi investigación. Gracias por ayudarme a resolver tantísimo problemas.

Muchas gracias por todo el tiempo dedicado a resolver mis consultas y dudas, y por la ayuda y el apoyo que incondicionalmente me han demostrado a lo largo de la realización de esta Tesis Doctoral. Y sobre todo, quiero agradecer a los tres su enorme calidad humana.

Agradezco enormemente al Dr. Antonio Luis Extremera, la oportunidad que me brindó de iniciar mi actividad investigadora en el Instituto Universitario de Investigación del Agua de la Universidad de Granada.

A las Dras. Clementina Pozo, M^a Victoria Martínez, Belén Rodelas, Belén Juárez y M^a Angustias Rivadeneira, de las que he recibido siempre un trato valioso y un generoso apoyo.

Aunque a veces el tiempo conlleva el olvido, espero en mi caso recordar siempre y con la misma gratitud como hasta ahora, a todos mis compañeros y amigos que cuando empecé me acompañaban en el laboratorio. Fuisteis unos grandes maestros y demostrasteis una enorme paciencia con la principiante: Gracias a Lucia, por su amabilidad y gentileza, a Kadiya, Cinta, Jessica, Paqui, Marisa, Almudena, Chiara, Fede, Camino, Juan Jesús, Ginés, Patricia, Paula, Rafael, Isabel, Alejandro, Ignacio, Luís, María por vuestra colaboración y simpatía, por vuestra disposición y por hacerme el trabajo más agradable.

Quiero agradecer enormemente a la persona con la que compartí horas y horas y horas en el laboratorio, con la que compartí momentos buenos y otros duros, la persona que me acompañó durante todos

estos años, mi compañera Andrea, Gracias por tu generoso apoyo, por tu ayuda y por animarme en cada momento durante los 6 años, muchas gracias.

Quiero agradecer de manera muy especial el apoyo, la acogida y la amistad que me prestaron mis amigas Mar y Carmen. Siempre recordaré los buenos momentos que hemos pasado juntas.

Por último pero como en los artículos, los más importantes, los verdaderos responsables de que hoy esté aquí. A mis padres porque este es un buen momento para dejar por escrito mi agradecimiento por la ilusión y el interés que siempre han manifestado por mi trabajo y por todo lo que conseguía, por los sacrificios y esfuerzos que habéis realizado a lo largo de... siempre. Sois unos padres estupendos. Os quiero papa y mamá...

Agradecer también desde estas páginas a toda mi familia, en especial a mi hermana KoKi con la que he compartido tantas cosas, a Abdeljebbar, a Abdelah-karim y Paqui por su generoso apoyo en todos los momentos y por estar siempre a mi lado, a mi querido Omar, a Dina y Ahmad. A Mamakhadoj, Salwa, Otman, Khalil, Ahmed y Adam por la alegría e interés que siempre me han transmitido. A todos los otros tíos y primos, por su apoyo y afecto.

A mi marido Abdelghani "mi Ghinino", quien sin duda ha sido mi mayor apoyo, por la gran confianza que ha depositado en mí, por haberme aguantado durante todo este tiempo, por su paciencia y apoyo que sin cuyo generoso apoyo esta Tesis jamás hubiese visto la luz.

Si la vida son experiencias creo que aquí he vivido mucho. Si alguien me pregunta "¿Cómo fue la experiencia de tu Tesis?". Yo no podré más que responder, "Inolvidable".

A todos... Muchas gracias.

Para Mohammed y Fátima Z. ...

Investigar es ver lo que todo el mundo ha visto y pensar lo que nadie más ha pensado

البحث هو رؤية ما شهد الجميع والتفكير في ما لم يفكر أحد آخر

Albert von Szent-Györgyi

ÍNDICE

ABREVIATURAS -----	19
RESUMEN -----	21
1. INTRODUCCIÓN -----	23
1.1 Problemática de la contaminación con hidrocarburos-----	25
1.2 Composición química del petróleo-----	26
1.3 Biorremediación-----	28
1.3.1 Microorganismos degradadores-----	31
1.3.2 Rutas metabólicas de la biodegradación-----	35
1.3.3 Genética de la biodegradación de hidrocarburos-----	38
1.3.4 Genes catabólicos para la degradación de los HPAs-----	38
1.4 Exopolisacáridos (EPS)-----	40
1.4.1 Descripción y concepto -----	40
1.4.2 Composición química de los exopolisacáridos -----	41
1.4.3 Estructura de los exopolisacáridos -----	42
1.4.4 Biosíntesis de los Exopolisacáridos -----	43
1.4.5 Condiciones de cultivo para la producción de los EPS-----	45
1.4.6 Funciones de los EPS microbianos -----	45
1.4.7 Bioemulgentes -----	46
1.4.8 Aplicaciones biotecnológicas de los EPS microbianos-----	49
2. OBJETIVOS -----	51
3. MATERIAL Y MÉTODOS -----	55
3.1 Cepas bacterianas -----	57
3.2 Medios de cultivo -----	58
3.3 Antibióticos-----	60
3.4 Conservación de microorganismos -----	60
3.5 Genética y manipulación de ADN -----	60
3.5.1 Construcción de librería de clones -----	60
3.5.1.1 Plásmido utilizado -----	61
3.5.1.2 Aislamiento de ADN plasmídico: Método “Qiapreps”-----	61
3.5.1.3 Extracción rápida de ADN bacteriano total -----	61
3.5.1.4 Aislamiento a gran escala de ADN bacteriano total-----	62
3.5.1.5 Transferencia de plásmidos por electroporación-----	62
3.5.1.6 Restricción de ADN-----	63
3.5.1.7 Desfosforilación de ADN plasmídico con fosfatasa alcalina -----	64
3.5.1.8 Ligación de ADN-----	64
3.5.1.9 Conservación de la librería de clones -----	64
3.5.2 Electroforesis de ADN en geles de agarosa -----	64
3.5.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) -----	65
3.5.3.1 PCR-16S-----	65
3.5.3.2 PCR-GFP -----	66

3.5.4 Purificación y secuenciación de fragmentos de ADN -----	66
3.5.5 Análisis filogenético -----	67
3.5.6 Construcción de árboles filogenéticos -----	67
3.6 Estudio fenotípico -----	67
3.6.1 Metabolitos para microorganismos Gram positivos -----	68
3.6.2 Metabolitos para microorganismos Gram negativos -----	69
3.7 Estudio del espectro-salino y crecimiento en salinidad -----	70
3.8 Producción de exopolisacáridos (EPS) -----	70
3.8.1 Composición química de los EPS: Análisis colorimétrico -----	71
3.8.1.1 Contenido en carbohidratos totales -----	71
3.8.1.2 Contenido en proteínas -----	72
3.8.2 Actividad emulgente -----	74
3.9 Degradación de hidrocarburos -----	74
3.9.1 Crecimiento en medio sólido con HPA -----	74
3.9.2 Crecimiento en medio líquido con naftaleno -----	75
3.9.2.1 Determinación de la cantidad óptima del disolvente para la extracción de naftaleno	75
3.9.2.2 Curva patrón de naftaleno -----	76
3.9.2.3 Extracción y cuantificación de naftaleno -----	76
3.9.3 Crecimiento en presencia de crudo Kirkuk -----	77
3.9.3.1 Extracción de crudo -----	78
3.9.3.2 Determinación del contenido en hidrocarburos totales (TPH) -----	78
3.10 Ensayo catecol-dioxigenasa -----	78
3.11 Programas estadístico empleados -----	79
4. RESULTADOS -----	81
4.1 CAPÍTULO I. CARACTERIZACIÓN FILOGENÉTICA Y FENOTÍPICA DE LAS CEPAS-- -----	83
4.1.1 Caracterización filogenética de las cepas -----	83
4.1.1.1 Identificación filogenética de las cepas seleccionadas -----	83
4.1.1.2 Estudio de la relación evolutiva entre las cepas seleccionadas -----	85
4.1.2 Caracterización fenotípica de las cepas -----	86
4.1.2.1 Utilización de metabolitos por las cepas seleccionadas -----	86
4.1.2.2 Perfiles metabólicos obtenidos -----	87
4.1.2.3 Interrelación de los distintos perfiles metabólicos de las cepas objeto de estudio y sus cepas tipo -----	89
4.1.2.4 Crecimiento en salinidad -----	93
4.2 CAPÍTULO II. CARACTERIZACIÓN Y PRODUCCIÓN DE BIOEMULGENTES (EXOPOLISACÁRIDOS)-----	98
4.2.1 Características de los bioemulgentes sintetizados -----	98
4.2.2 Estudio de las propiedades emulgentes de los exopolisacáridos -----	104
4.2.3 Índice de calidad bioemulgente -----	109
4.2.4 Análisis estadístico -----	111
4.3 CAPÍTULO III. DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS -----	113
4.3.1 Degradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs) -----	113
4.3.1.1 Crecimiento en medio sólido con HPAs -----	113

4.3.1.2	Relación entre las cepas y su utilización de los HPAs	114
4.3.1.3	Crecimiento en medio líquido con naftaleno	115
4.3.2	Degradación de crudo Kirkuk	120
4.3.2.1	Crecimiento en presencia de crudo Kirkuk	121
4.3.2.2	Capacidad degradadora de las cepas	123
4.3.2.3	Relación entre los resultados obtenidos en los estudios de degradación de hidrocarburos	125
4.4	CAPÍTULO IV. ESTUDIO DE GENES CATABÓLICOS	127
4.4.1	Construcción de genoteca	127
4.4.2	Selección de clones con potencial inserto para eliminación de aromáticos	130
5.	DISCUSIÓN GENERAL	133
6.	CONCLUSIONES	145
7.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	149
	LISTA DE FIGURAS Y TABLAS	169
	ANEXO I	177
	ANEXO II	189

ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico
ARN: ácido ribonucleico
BSA: seroalbúmina bovina
dNTP: deoxinucleotido trifosfato
Amp: ampicilina
Tc: tetraciclina
MY: Moraine y Rogovin
MMS: medio mínimo marino sintético
TE: Tampón de elución
UFC: unidades formadores de colonias
HPAs: hidrocarburos policíclicos aromáticos (Polycyclic aromatic hydrocarbons)
TPH: hidrocarburos totales del petróleo (Total Petroleum Hydrocarbon)
PCR: reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction)
P: producción
Pr: proteínas
C: carbohidratos
t: tiempo de incubación
S: concentración de sales o salinidad
AE: actividad emulgente
E: emulsión
Ic: Índice de calidad bioemulgente
BE: bioemulgente
BS: biosurfactante
p/v: relación de peso por volumen
v/v: relación de volumen por volumen
p/p: relación de peso por peso
rpm: revoluciones por minuto
SDS: dodecilsulfato sódico
GFP: Green Fluorescent Protein
ác.: ácido
y col.: y colaboradores

RESUMEN

Este proyecto de investigación presenta el estudio de 18 cepas bacterianas, aisladas de muestras de agua y sedimentos marinos procedentes de la zona del hundimiento del petrolero Prestige, así como de muestras de fuel que se encontraba en los tanques de almacenamiento del pecio. Las muestras analizadas fueron obtenidas a 4.000 m de profundidad por los equipos de operaciones marinas de Repsol YPF en septiembre de 2003. El análisis de dichas muestras permitió el aislamiento de 133 cepas bacterianas de las cuales se seleccionaron las 18 incluidas en la presente memoria de tesis doctoral debido a su potencial biotecnológico en la biorremediación de ecosistemas contaminados con hidrocarburos. Así en una primera aproximación se observó que estos microorganismos eran capaces de proliferar en presencia de hidrocarburos y de producir exopolisacáridos con actividad emulgente.

Se realizó la caracterización fisiológica y molecular de los microorganismos objeto de estudio y se determinó su eficacia para producir biopolímeros con actividad emulgente así como su capacidad para crecer en presencia de diferentes hidrocarburos.

Los resultados obtenidos indicaron que las 18 cepas objeto de estudio pertenecieron a los géneros *Bacillus* (siete cepas), *Brevibacterium* (una cepa), *Halomonas* (cuatro cepas), *Thalassospira* (dos cepas), *Marinobacter* (una cepa), *Pseudomonas* (dos cepas) y *Pseudoaltermonas* (una cepa).

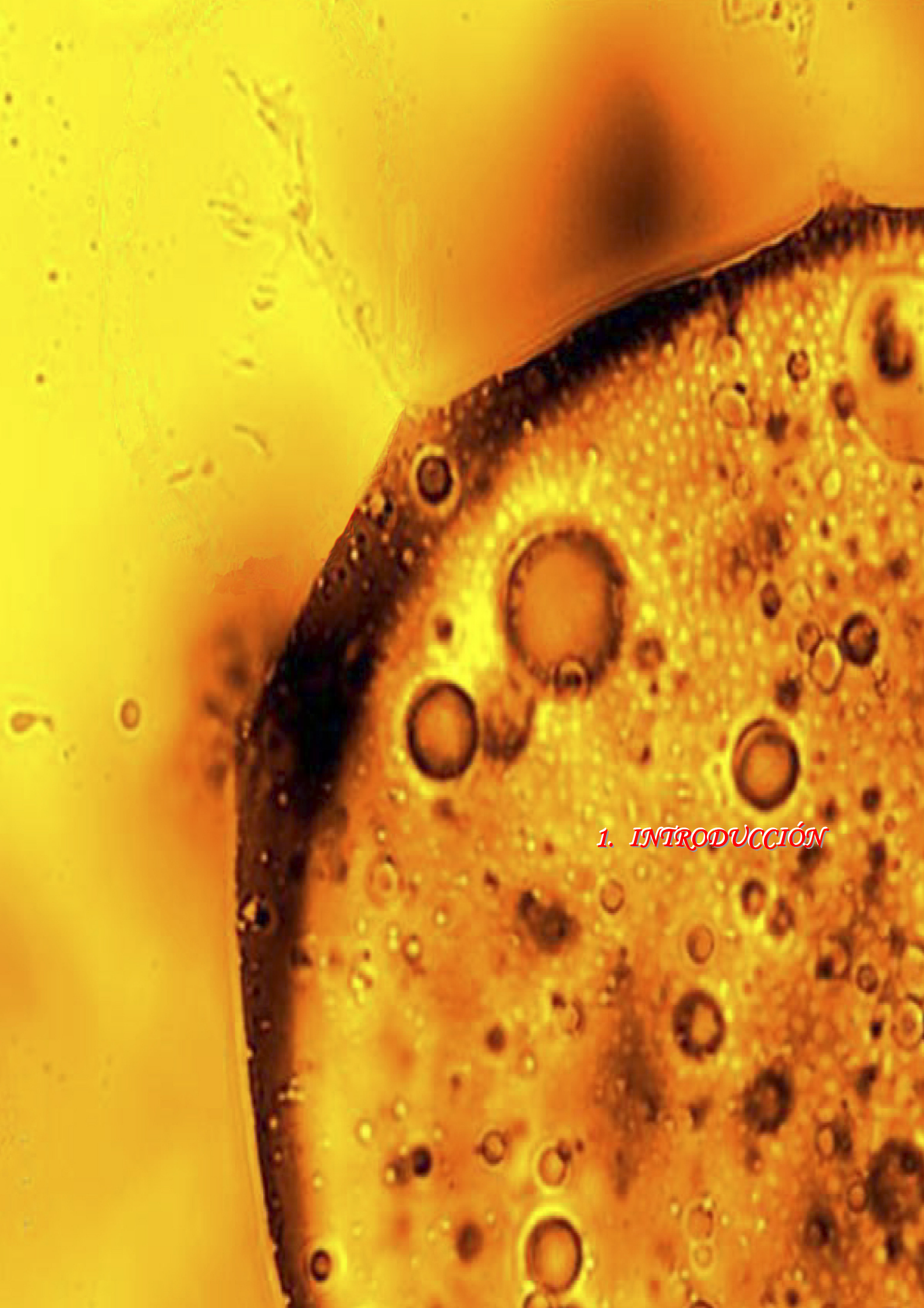
El estudio fenotípico de dichos microorganismos puso de manifiesto la variabilidad metabólica dentro de las cepas del género *Bacillus*. Por otro lado y dentro de esta caracterización fisiológica, se estudió la tolerancia de las cepas a distintas concentraciones de sales, demostrándose que las cepas de los géneros *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Pseudomonas* y *Pseudoalteromonas* proliferaban en un rango de salinidad comprendido entre 0,5 y 10% (p/v) de sales, mientras que para las cepas pertenecientes a los géneros de *Halomonas*, *Thalassospira* y *Marinobacter*, este efecto estaba comprendido entre el 0,5 y el 15% (p/v) de sales.

Asimismo se estudió la capacidad de estos microorganismos para producir bioemulgentes tanto a nivel cuantitativo como cualitativo, obteniéndose producciones superiores a 1g/l de bioemulgente con las cepas *Bacillus thuringiensis* W1, *Bacillus pumilus* W15, F20 y S22, *Brevibacterium casei* F2, *Halomonas alkantarctica* W3, *Halomonas variabilis* W4 y W10, *Halomonas* sp. W12, *Thalassospira* sp. W5 y W7, *Marinobacter* sp. W8, *Pseudoalteromonas elyakovii* W18, *Pseudomonas fluorescence* S21 y *Pseudomonas grimontii* S24.

Los biopolímeros producidos se caracterizaron por poseer una actividad emulgente superior al 25% de emulsión frente a 7 sustancias hidrófobas. Con objeto de comparar la eficacia de las cepas productoras y determinar las mejores condiciones de producción se desarrolló un índice de calidad bioemulgente (Ic) que relacionara la productividad con la actividad emulgente. La aplicación de este índice identificó a los bioemulgentes producidos por *Halomonas alkantarctica* W3, *Halomonas variabilis* W4 y W10, *Halomonas* sp. W12 como los poseedores de las mejores características bioemulgentes.

Con respecto al crecimiento de las 18 cepas seleccionadas en presencia de los hidrocarburos policíclicos aromáticos (naftaleno, fenantreno, antraceno y pireno), se observó que las cepas *Bacillus thuringiensis* W1, *Bacillus pumilus* W15, W16, F17 y F20, *Brevibacterium casei* F2, *Thalassospira* sp. W5 y W7 y *Marinobacter* sp. W8 fueron las únicas capaces de proliferar en presencia de estos cuatro compuestos aromáticos. Por otro lado, el crecimiento en presencia de naftaleno en medio líquido mostró que las cepas más eficientes en la degradación de naftaleno al 1% (p/v) fueron las cepas *Halomonas variabilis* W10 con 10% de eliminación y *Marinobacter* sp. W8 con 14% de eliminación. Asimismo se demostró que *B. pumilus* F17, *Halomonas* sp. W12, *Pseudoalteromonas elyakovii* W18 y *Pseudomonas grimontii* S24 fueron las cepas más eficientes para eliminar las distintas fracciones de crudo Kirkuk.

Asimismo y como base para el desarrollo de futuras herramientas biotecnológicas, en el presente trabajo se inició el estudio de la caracterización de los promotores de uno de los microorganismos incluidos en este trabajo, para su uso como modelo de búsqueda de promotores que respondieran a señales de contaminación, en este caso a la presencia de hidrocarburos policíclicos aromáticos. Para ello, se seleccionó la cepa *Halomonas variabilis* W10 por ser una cepa Gram negativa y similar al fondo que queríamos utilizar como herramienta molecular. Se construyó una genoteca de clones para la búsqueda de promotores que respondieran a la presencia de naftaleno, utilizando como fondo genético la cepa *Escherichia coli* XL1Blue y utilizando como vector el plásmido p18GFP para futuras selecciones en base al uso de citometría de flujo. La librería construida en este estudio presentó una variabilidad de 37,5% y algunos clones se identificaron por presentar promotores que se inducen en presencia de hidrocarburos policíclicos aromáticos. En la presente memoria de tesis doctoral se presentan y se discuten los resultados obtenidos durante este trabajo de investigación.



1. INTRODUCCIÓN

1.1 Problemática de la contaminación con hidrocarburos

En la actualidad, uno de los problemas medioambientales más preocupantes son los vertidos de petróleo en el mar con la consiguiente contaminación de la costa (Gentili y col., 2006). Los accidentes que provocan vertidos masivos, son espectaculares y reciben gran atención y preocupación tanto de las autoridades como de la opinión pública, pero afortunadamente ocurren en raras ocasiones (Swannell y col., 1996), y aunque representen una cantidad importante del total de hidrocarburos contaminantes, se producen liberaciones de menor entidad, debidas a operaciones rutinarias de trasiego, limpieza de buques y embarcaciones, pequeños vertidos etc. que globalmente suponen una mayor contaminación para el ecosistema marino (Head y Swannell, 1999). Así, cuando estas operaciones se efectúan sin el control necesario dan lugar a una contaminación continua, progresiva y acumulativa, que puede llegar a comprometer no solamente el equilibrio ecológico del medio receptor sino también aquellas actividades humanas habituales en la zona (González-Doncel y col., 2008).

En 1967, el gran petrolero *Torrey Canyon* se hundió en la costa sur de Inglaterra, contaminando 180 km de costas inglesas y 80 km de costas francesas, provocando un desastre ecológico sin precedentes. Esto hizo que la comunidad científica, de forma dramática, centrara sus esfuerzos en combatir el efecto de la contaminación (Atlas, 1981). En 1978 el *Amoco Cadiz* descargó unas 220.000 toneladas de crudo a lo largo de la bahía de Morlaix en la costa británica, tras zozobrar debido a un temporal (Gómez Gesteira y col., 2003). Años más tarde en 1989, en la bahía Prince William Sound, el hundimiento del petrolero *Exxon Valdez*, liberó al mar 37.000 toneladas de hidrocarburos (Swannell y col., 1996). En 1991 y 1993 se repitió el desastre. Los petroleros *Haven* y *Braer* se hundieron frente a las costas italianas, liberando 140.000 toneladas de crudo el primero y en la costa de las Islas Shetland contaminando con 80.000 toneladas de petróleo el segundo. También se pueden citar ejemplos de derrames deliberados, por ejemplo, durante la Guerra del Golfo en 1991, se vertieron en Kuwait 820.000 toneladas de fuel, lo que amenazó de gravedad el ecosistema de la zona y varias plantas de desalado (Swannell y col., 1996). En España, sobre todo en el área de A Coruña, se han producido 3 grandes desastres de este tipo. En 1972, la ruptura del casco del petrolero *Urquiola*, produjo un vertido de 100.000 toneladas de crudo procedente de la zona del Golfo, que afectaron a 215 km de costa. Posteriormente el hundimiento del petrolero *Mar Egeo* en 1992, en el exterior del puerto de A Coruña, provocó el derrame de 79.000 toneladas de crudo,

que debido a los fuertes vientos contaminó rápidamente 200 km de costas. El tercer gran desastre tuvo lugar el 13 de noviembre de 2002 con el hundimiento del petrolero Prestige (Gómez Gesteira y Dauvin, 2005; Del Corral y col., 2005).

Existe un listado de artículos que detallan los efectos nocivos que el petróleo o alguno de sus componentes o derivados tienen sobre el medio ambiente y sobre los organismos vivos (Gómez Gesteira y col., 2003; Varela y col., 2006; Alonso-Álvarez y col., 2007; Banks y col., 2008; Lobon y col., 2008; Martin-Skilton y col., 2008; Sanpera y col., 2008; Joly-Turquin y col., 2009), incluso sobre la salud de aquellas personas que colaboran en las tareas de limpieza de los grandes desastres, como los grandes derrames de crudo (Rodríguez-Trigo y col., 2007).

Los microorganismos con capacidad de degradar los hidrocarburos del petróleo están presentes en la naturaleza. Es por este motivo por el que se les considera como una herramienta útil en el tratamiento y limpieza de zonas afectadas con derrames de petróleo (Harayama y col., 2004; Igwo-Ezikpe y col., 2010).

1.2 Composición química del petróleo

El petróleo, así como sus derivados, es un conjunto complejo de compuestos químicos en el que coexisten fases sólidas, líquidas y gaseosas (Henry, 1998). En la bibliografía existen varias publicaciones acerca de la composición del petróleo y a medida que se mejoran las técnicas analíticas de separación e identificación, se consigue identificar nuevos componentes (King, 1988; Postanogova, 1991; Henry, 1998). Está compuesto básicamente por carbono e hidrogeno, y algunos hetero-átomos, principalmente nitrógeno, azufre y oxígeno (Alajbeg y col., 2000), formando hidrocarburos; moléculas altamente reducidas y con un gran potencial químico (kenney y col., 2002).

Los compuestos del petróleo que pueden ser separados mediante cromatografía de adsorción se dividen en cuatro fracciones: saturados, aromáticos, asfaltenos y resinas (Harayama y col., 1999). Además, no todos los tipos de crudo son iguales, la composición concreta de cada tipo de petróleo varía en función de la combinación de sus condiciones de formación (Fernández-Valera y col., 2008)

❖ Hidrocarburos saturados

Los hidrocarburos saturados son aquellos que no poseen dobles enlaces (**Figura 1.1**).

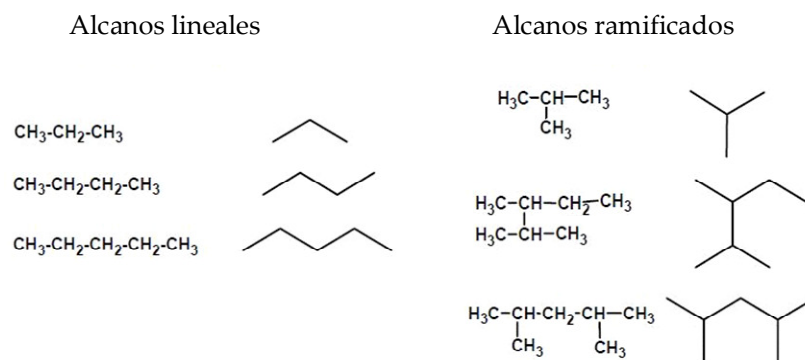


Figura 1.1. Algunos ejemplos de hidrocarburos saturados que forman parte de la mezcla de hidrocarburos de petróleo. Se muestran ejemplos de hidrocarburos tanto lineales como ramificados.

Los hidrocarburos se dividen en función de su estructura química en alcanos o parafinas y cicloalcanos o naftalenos. Los alcanos se pueden dividir a su vez en ramificados o no ramificados en función de su estructura química lineal y están definidos por la formula general $\text{C}_n\text{H}_{2n+2}$ (Harayama y col., 1999). Los cicloalcanos tienen al menos un anillo de átomos de carbono, aunque el número de anillos es muy variable. Su formula general es C_nH_{2n} y la presencia a lo largo de sus estructura de sustituyentes del tipo alquilo es relativamente común (Haramaya y col., 1999).

❖ Hidrocarburos aromáticos

Los hidrocarburos aromáticos son aquellos que poseen uno o más anillos aromáticos, y pueden estar sustituidos, o no, por radicales alquilo (**Figura 1.2**). El petróleo incluye compuestos que poseen de uno a cinco anillos aromáticos. Estos compuestos son más estables que los cicloalcanos, debido a la compartición de sus electrones por los enlaces (Eweis y col., 1999). El benceno es el más simple, y junto al tolueno, el etilbenceno y los tres xilenos son conocidos como BTEX, un conjunto de compuestos relativamente solubles en agua, y por tanto son de los más móviles de la gasolina. Además estos compuestos poseen un potencial contaminante elevado, especialmente el benceno al ser cancerígeno (Eweis y col., 1999), y por ello se suelen utilizar como indicadores de contaminación.

Los hidrocarburos con varios anillos aromáticos también conocidos como poliaromáticos (HPA), como el antraceno y el fenantreno, son productos de diversas operaciones industriales a altas temperaturas como el refinado del petróleo. En general son poco solubles en agua y poco volátiles, y los incrementos en la masa molecular y el número de anillos, decrece aun más su volatilidad y solubilidad.

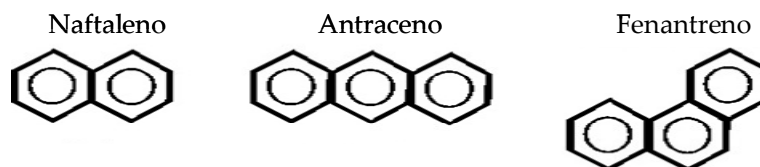


Figura 1.2. Algunos ejemplos de hidrocarburos presentes en la fracción aromática del petróleo.

❖ Resinas y asfaltenos

La fracción del crudo conocida como resina y asfaltenos, a diferencia de las anteriores, contiene compuestos polares no hidrocarbonados (Haramaya y col., 1999). Son compuestos en general de alto peso molecular que además de carbono e hidrógeno, contienen oxígeno, nitrógeno y azufre (**Figura 1.3**). Su estructura puede incluir ramificaciones policíclicas aromáticas, incluso en ocasiones forman complejos con metales pesados como níquel y vanadio. Son compuestos recalcitrantes, debido a su insolubilidad y a que poseen grupos funcionales que les protegen de ataques microbianos, como las estructuras de anillos aromáticos (Eweis y col., 1999). Para discriminar entre resinas y asfaltenos se utiliza el parámetro de solubilidad en disolventes similares al n-heptano. Los asfaltenos son insolubles, mientras que las resinas, son compuestos que se disuelven en este tipo de disolventes (Haramaya y col., 1999).

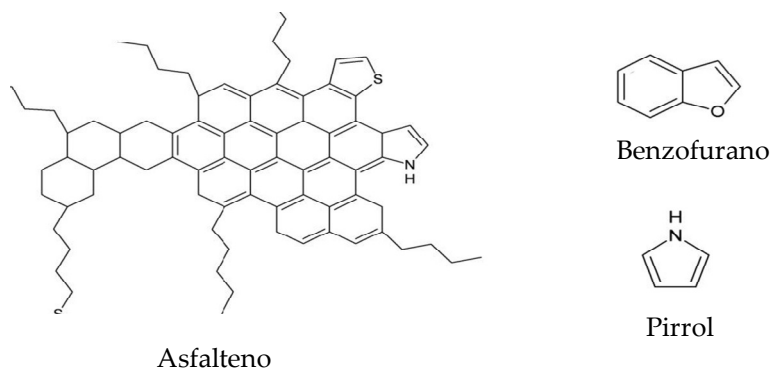


Figura 1.3. Ejemplos de asfalteno y resinas.

1.3 Biorremediación

La biorremediación es una tecnología que utiliza el potencial metabólico de los microorganismos (su capacidad de degradación) para recuperar los ecosistemas acuáticos y/o terrestres contaminados (Watanabe, 2001). También se puede definir como un grupo de tratamientos, para la remediación de un ecosistema, que aplica sistemas biológicos para catalizar la mineralización o transformación de compuestos químicos en otros menos tóxicos (Atlas y Unterman, 1999; Hughes y col., 2000).

La biorremediación de contaminantes orgánicos es posible gracias a que la mayoría de estos contaminantes son biodegradables e incluye los procesos que llevan su transformación en productos menos tóxicos o sin toxicidad. La microbiota autóctona del ecosistema contaminado suele poseer la capacidad de biodegradar el contaminante y en general la propia contaminación induce el enriquecimiento de las poblaciones degradadoras (Singh y col., 2008). En concreto, cuando se refiere a petróleo, la biorremediación consiste en un proceso para acelerar la degradación normal de los contaminantes, es decir en una solución natural para que los contaminantes causen el menor impacto ecológico posible, dado el alto número de compuestos que forman el petróleo y su alta complejidad estructural, la biodegradación del petróleo produce un incremento en la resistencia a una posterior biodegradación de la mezcla residual (Atlas, 1995a; Esin y Aiten, 2011). El crudo de petróleo no llega nunca a degradarse completamente, y siempre deja algunos residuos complejos. Sin embargo, estos residuos, que contienen principalmente asfaltenos, tienen una toxicidad muy baja y terminan convirtiéndose en residuos inertes sin efecto ecológico (Atlas, 1995b; Franco y col., 2004). Existen varias clasificaciones que dividen la biorremediación en tipos distintos en función de una serie de parámetros.

Si atendemos al lugar en el que se aplica el proceso de biorremediación, existen dos modelos diferentes. El primero de ellos, es aquel en el que la acción se lleva a cabo en el mismo lugar, sin apenas modificar el ambiente. Este proceso es conocido como biorremediación *in situ* e incluye como ventajas su bajo coste de transporte, la escasa modificación del entorno y baja generación de residuos. Presenta como inconvenientes, el bajo control de variables y la dilución de biomasa y nutrientes, aunque existen algunos métodos para evitar estos problemas, como la inmovilización de biomasa (Gentili y col., 2006). Si se traslada el material contaminado a un lugar distinto, se dice que la estrategia llevada a cabo es *ex situ*. A pesar de que se controlan las variables, los elevados costes de transporte y de equipamiento hacen que estos métodos sean menos utilizados que los que se realizan *in situ*.

Las técnicas de biorremediación pueden utilizar dos tipos de herramientas, la bioestimulación y el bioaumentación. La bioestimulación es considerada en forma casi unánime como un procedimiento casi esencial para mejorar los niveles de eliminación de los contaminantes (Delille y col., 2008; Nikolopoulou y Kalogerakis, 2009). Por el contrario el bioaumentación es la introducción en el medio natural de microorganismos que degraden

específicamente los compuestos contaminantes (Bouchez y col., 2000), y puede incluir la estimulación *ex situ* de biomasa nativa, la introducción de organismos o de cultivos mixtos de cepas silvestres no nativa, que degraden o co-metabolizan el contaminante, o la introducción de cepas modificadas genéticamente (Scow y Hicks, 2005).

Como la biorremediación está limitada por la biodegradación es importante diferenciar algunos conceptos, como biotransformación y biodegradación o mineralización. Con el término “mineralización” se define la transformación de un compuesto en CO₂, agua y formas inorgánicas por la acción de los seres vivos, por lo que implica la alteración estructural de un compuesto y la formación de intermediarios metabólicos antes de la oxidación final. La “biotransformación” es el proceso a través del cual un microorganismo modifica un compuesto sin llegar a mineralizarlo, de manera que pueden llegar a formarse productos intermedios no mineralizables, en algunos casos más tóxicos y perjudiciales que la sustancia de partida (Ramos y Rojo, 1990).

Hay numerosos factores que pueden limitar la biodegradación, como la temperatura, el contenido y disponibilidad de oxígeno, el pH, el contenido de nutrientes, etc. Se considera que la biodegradación en el medio ambiente está restringida, fundamentalmente por **i)** La población autóctona de microorganismos, **ii)** La biodisponibilidad del compuesto a degradar, **iii)** La toxicidad de los metabolitos.

La biorremediación tiene también inconvenientes y limitaciones. Por ejemplo, la biodegradación incompleta puede generar intermediarios metabólicos inaceptables, con un poder contaminante similar o incluso superior al producto de partida. Por otra parte, algunos compuestos, son resistentes o inhiben la biorremediación. El tiempo requerido para un tratamiento adecuado puede ser difícil de predecir y el seguimiento y control de la velocidad y/o extensión del proceso es laborioso.

La biodegradación de hidrocarburos por poblaciones naturales de microorganismos es una de las vías por las cuales se elimina el crudo de zonas contaminadas. Las cepas bacterianas capaces de degradar algunos de los compuestos presentes en el petróleo son ubicuas en la naturaleza. Es por este motivo que la biorremediación se considera una herramienta útil en la limpieza de derrames de petróleo. Sin embargo estos microorganismos dependen de diversos nutrientes para su supervivencia (Leahy y Colwell, 1990). A pesar de que los requerimientos son diferentes en función del tipo de microorganismo de que se trate,

todos necesitan nitrógeno, fósforo y carbono. En la descomposición del fuel, la fuente de carbono no representa ninguna limitación ya que proviene de las propias moléculas orgánicas. Existe cierta confusión y conflicto cuando se analiza la limitación de la biodegradación de petróleo debido a la disponibilidad de nitrógeno y fósforo en agua de mar. Mientras que un gran número de investigadores han afirmado que se trata de nutrientes limitantes (Head y Swannell, 1999); aunque con distintas conclusiones a cerca de la proporción C/N, C/P idónea, otros han llegado a la conclusión opuesta, debido a la baja solubilidad de los hidrocarburos que imposibilita que se dé una relación C/N o C/P desfavorable (Atlas, 1981).

Además de estos factores nutricionales, existen varias variables ambientales que influyen en la degradación de los contaminantes orgánicos, tanto en sistemas terrestres como acuáticos. Estas variables incluyen la temperatura, pH, salinidad y, en particular la disponibilidad de oxígeno. Entre los factores fisicoquímicos, se incluyen aquellas propiedades del contaminante, que pueden afectar la biodegradación. La composición y estructura química del contaminante (tipo de compuesto, elementos químicos constituyentes, grado de ramificación, grado de insaturación, naturaleza y efecto de los sustituyentes, peso molecular, etc.), la concentración y sus propiedades físicas como: solubilidad, viscosidad, volatilidad y densidad, determinarán la interacción del contaminante con la comunidad microbiana presente (Eweis y col., 1999). En aquellos casos en los que la concentración de hidrocarburos es demasiado elevada se produce una reducción en la cantidad de oxígeno y nutrientes disponibles. Esto crea una situación de estrés, para los microorganismos, que puede reducir su capacidad para degradar los hidrocarburos.

1.3.1 Microorganismos degradadores

La contaminación del ambiente marino con hidrocarburos es uno de los problemas mundiales más frecuentes (Alquati y col., 2005). Muchos microorganismos han sido capaces de evolucionar para adquirir la capacidad de utilizar las moléculas de hidrocarburos como fuente de carbono y energía (Yakimov y col., 2007). A mediados del siglo XX se desarrollaron las primeras investigaciones encaminadas a estudiar el potencial de los microorganismos para biodegradar contaminantes (Zobell, 1946; Davis, 1956). Estas investigaciones proporcionaron una base sólida de conocimientos acerca de la biodegradación de hidrocarburos, especialmente de alcanos y se identificaron una gran cantidad de microorganismos capaces de utilizar estos compuestos orgánicos altamente reducidos.

Se ha descrito que las bacterias marinas degradadoras de hidrocarburos pertenecen a más de 20 géneros distribuidos a través de varios grupos: Alfa-, Beta-, y Gamma-proteobacteria, Gram positivas, Flexibacter, Citofaga, Bacteroides (Gauthier y col., 1992; Yakimov y col., 2007; van Beilen y Funhoff, 2007; Kodama y col., 2008).

El género *Pseudomonas* es un grupo de bacterias gram negativas que se encuadran dentro del grupo γ -proteobacterias. Se han aislado bacterias de este género tanto en suelos limpios como en suelos contaminados por productos biogénicos y xenobióticos. También son microbiota predominante en la rizosfera y en la filosfera de plantas. Del mismo modo, se han aislado de ambientes acuáticos, tanto de agua dulce como de aguas marinas. Este género es uno de los más proclives a la degradación de compuestos orgánicos, especialmente cepas de la especie *Pseudomonas putida*. El amplio potencial catabólico de los componentes del género viene dado en muchos casos por la presencia de determinantes plasmídicos y transposones autotransmisibles. Además de su uso en biodegradación las especies del género *Pseudomonas* se emplean en distintos procesos industriales. La posición taxonómica de las distintas especies del género se encuentra sujeta a revisión. Además, las cepas de este género han sido descritas por numerosos autores por su capacidad de utilizar los hidrocarburos policíclicos aromáticos (Darvishi y col., 2011). Asimismo el género *Pseudoalteromonas* presenta un grupo de bacterias aeróbicas Gram negativas aisladas de ambientes marinos. Este género fue descrito por primera vez por Zobell y Upham (1944), además Hedlund y Staley (2006) describieron la identificación de una cepa del género *Pseudoalteromonas* con capacidad de crecer con hidrocarburos policíclicos aromáticos.

Asimismo, se han identificado cepas capaces de degradar hidrocarburos, especialmente, alcanos pertenecientes a los género *Bacillus*, *Geobacillus* y *Thermus* (Meintanis y col., 2006; van Beilen y Funhoff, 2007). El género *Bacillus* presenta el grupo de bacterias bacilos Gram positivas presentes en hábitat terrestres y agua dulce así como se encuentran ampliamente distribuidos en ambientes marinos (Oguntoyinbo, 2007). Los microorganismos marinos de este género son bacterias halotolerantes capaces de propagar en condiciones marinas (Oguntoyinbo, 2007). Yousefi-Kebira y col (2009) caracterizaron una cepa nueva del género *Bacillus* con capacidad de degradar el diesel.

El género *Brevibacterium* es un grupo de bacterias Gram positivas que fue descrito por primera vez por Breed (1953). Las especies de este género fueron aislados de distintos hábitat

(Gavriš y col., 2004; Lee, 2006). Pavitrán y col (2004) describieron una cepa DSM20657 identificada como *Brevibacterium casei* que estaba implicada en la degradación de hidrocarburos.

El género *Halomonas* incluye las bacterias halófilas moderadas y las bacterias halotolerantes, la mayoría de estos microorganismos fueron aislados tanto de ambientes terrestres como ambientes marinos e hipersalinos. Poli y col (2007) describieron una especie nueva del género *Halomonas* con capacidad de producir exopolisacáridos. Algunas cepas pertenecientes a los géneros *Pseudoalteromonas* y *Halomonas* fueron aisladas de ambientes salinos y presentaron alta capacidad de degradar y hidrocarburos (Martínez-Checa y col., 2007).

El género *Marinobacter* es un grupo representante de las bacterias marinas Gram negativas, este género fue descrito por primera vez por Gauthier (1992), este grupo fue descrito también como género de especies degradadoras de hidrocarburos. Roh y col (2008) describieron una cepa degradadora de HPAs perteneciente al género *Marinobacter*, aislada de agua de mar con capacidad de proliferar en presencia de un rango de concentración de NaCl de 1-25% (p/v). Asimismo, el género *Thalassospira* presenta el grupo de bacterias marinas Gram negativas, este género fue descrito por Liu y col (2007), por Kodama y col (2008) y por Zhao y col (2010) como un grupo de bacterias degradadoras de hidrocarburos policíclicos aromáticos.

Entre los microorganismos eucariotas, muchos hongos y levaduras y algunas algas y cianobacterias han sido descritos como degradadores de hidrocarburos (van Beilen y col., 2003). En consecuencia se puede afirmar que muchos microorganismos poseen la capacidad de utilizar diferentes compuestos contaminantes como única fuente de carbono y se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza. Estos se encuentran sin embargo en bajas concentraciones en áreas no contaminadas y se incrementan en ambientes sometidos a impactos crónicos del contaminante (Madigan y col., 2004).

Por otro lado, numerosos estudios basados en técnica no dependientes de cultivo encaminadas a analizar los cambios en la estructura de las comunidades microbianas en ambientes marinos afectados por derrames de petróleo han demostrado que tras la llegada del hidrocarburo, la diversidad dentro de la comunidad microbiana puede ser substancialmente reducida debido a una fuerte selección de un número limitado de especies degradadores de

hidrocarburos (Vila y col., 2010, Röling y col., 2002; McKew y col., 2007). Principalmente pertenecientes a la clase Gamma-proteobacterias. (Yakimov y col., 2007).

La mayoría de los sistemas de biorremediación en aguas marinas están desarrollados para condiciones de aerobiosis. No obstante, la transferencia de oxígeno en el medio puede no ser suficiente para mantener el metabolismo, por lo que la degradación anaerobia de los hidrocarburos puede alcanzar una importancia relativamente considerable (Head y Swannell, 1999).

En ecosistemas marinos, las bacterias constituyen un componente esencial en la cadena trófica, las cuales a través de su interacción con otros seres, modifican los ambientes, y llegan a ser capaces de crecer en ambientes contaminados. En sedimentos marinos, las bacterias juegan un papel ecológico dentro del ecosistema de gran importancia, ya que pueden degradar compuestos contaminantes de origen orgánico (Liu y col., 2009).

La capacidad de las comunidades bacterianas para biodegradar compuestos en forma natural está limitada por factores ambientales como el oxígeno molecular y los nutrientes (fosfato, amonio, nitrato, nitrito y compuestos orgánicos del nitrógeno). Sin embargo, diversos autores han encontrado la degradación de petróleo en condiciones que no son aptas para el desarrollo bacteriano (Michaud y col., 2004).

La biodegradación de una mezcla de hidrocarburos de una zona contaminada con petróleo depende de la especificidad metabólica de los microorganismos presentes en la zona y de la regulación de la misma en presencia de diferentes sustratos. La inducción y especificidad del metabolismo de compuestos aromáticos puede tener una gran importancia en la biodegradación de estos compuestos, mientras que la co-oxidación puede ser el principal mecanismo para la limpieza de la zona contaminada con hidrocarburos de petróleo (Baldwin y col., 2005).

Aunque la mayoría de los hidrocarburos contaminantes se encuentran en el ambiente formando parte de mezclas complejas, los estudios de biodegradación se centran, generalmente, en cada compuesto de forma individual. Las bacterias aisladas de estas zonas, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Weeksella* sp., *Acinetobacter calcoaceticus*, *Burkholderia cepacia*, *Xylella fastidiosa* y *Rhodococcus* sp., son generalmente, especies frecuentes en zonas contaminadas aunque pueden presentar algunas características, como la resistencia al

vanadio, que son, probablemente una adaptación a la presencia del contaminante (Yuste y col., 2000; Röling y col., 2002).

Poco se sabe de las poblaciones microbianas involucradas en la eliminación de hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs) de los ambientes marinos contaminados con mezclas complejas de hidrocarburos sin embargo, recientes estudios sugieren que el género *Cycloclasticus* podría desempeñar un papel importante (McKew y col., 2007). En un estudio previo sobre la biorremediación del fuel del Prestige se obtuvo un consorcio de bacterias marinas degradadoras de fuel (UBF) que originó una gran degradación de las fracciones alifáticas y aromáticas del fuel de Prestige (Fernández-Álvarez y col., 2006, 2007).

1.3.2 Rutas metabólicas de la biodegradación

La mayoría de los componentes del crudo de petróleo son biodegradables. Los hidrocarburos se diferencian en su susceptibilidad a la degradación microbiana. Los alcanos lineales son considerados compuestos del crudo de petróleo con mayor susceptibilidad a la biodegradación. Se ha demostrado que existe degradación microbiana incluso por encima de C_{44} , en general, los compuestos más susceptibles son los saturados, seguidos de los aromáticos ligeros y por último los aromáticos de alto peso molecular y los compuestos polares, que muestran tasas muy bajas de degradación (Colwell, 1977; Leahy y Colwell, 1990).

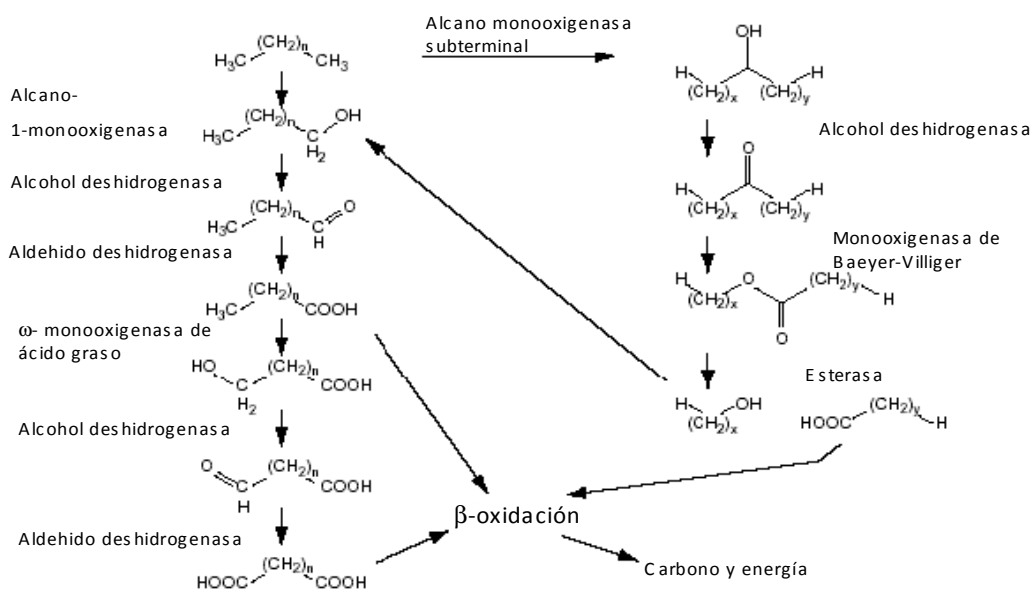
Además, el petróleo, posee moléculas con cierta resistencia a la biodegradación, como son los compuestos con níquel o con vanadio, y la concentración de estos varía en función de cómo ha sido generado cada tipo concreto de crudo de petróleo, por ejemplo, de la temperatura a la que es generado y expulsado de las rocas (Head y col., 2003). Este no es un orden universal, ya que algunos autores han demostrado en casos concretos distintos grados de degradación diferentes. Por ejemplo, existe una mayor degradación de naftaleno que de hexano en sedimentos, o una importante biodegradación de alquiloaromáticos antes de observar degradación de alcanos lineales en algunos sedimentos marinos (Leahy y colwell, 1990).

Se debe considerar asimismo, que la presencia de alcanos con un número reducido de carbonos, generalmente entre C_5 y C_{10} , en altas concentraciones, inhibe la biodegradación del resto de compuestos, ya que actúan como potentes solventes apolares rompiendo la membrana lipídica de los microorganismos.

❖ **Metabolismo de los alcanos**

La degradación de alcanos llevada a cabo por microorganismos, puede tener lugar a través de rutas monoterminal, subterminal o diterminal (Sharma y Pant, 2000). Generalmente, la degradación de alcanos comienza con la activación mediante la oxidación del carbono terminal, obteniendo el correspondiente alcohol primario y que posteriormente es oxidado por una alcohol y aldehído deshidrogenasa (**Figura 1.4**). Los ácidos grasos obtenidos entran en el metabolismo general mediante procesos de β-oxidación.

Algunos alcanos de cadena corta y excepcionalmente alcanos de cadena media, pueden ser degradados además a través de la oxidación del carbono en posición subterminal. El alcohol secundario es oxidado a una cetona, y posteriormente a través de una monooxigenasa a un éster. El éster es hidrolizado por una esterasa a un alcohol y ácido graso. En algunos casos muy concretos, los dos carbonos terminales del alcano son oxidados para obtener ácidos dicarboxílicos (van Beilen y col., 2003).



Rutas de degradación de alcanos a través de las vías de oxidación terminal, subterminal y biterminal. **Esquema adaptado de van Beilen y col. (2003).**

Dependiendo de la longitud de la cadena del alcano, se requieren sistemas enzimáticos diferentes y especializados para poder llevar a cabo la primera de las oxidaciones del sustrato y comenzar el proceso de biodegradación. Esquematizando, los alcanos entre metano y butano son oxidados por enzimas del tipo metano monooxigenasa, los alcanos entre C_5 y C_{16} (*n*-pentano a *n*-hexadecano) son degradados por enzimas integrales de membrana, con hierro

en forma o hemo, o del tipo citocromo P450, y los alcanos por encima de C_{17} , son oxidados por un sistema enzimático no conocido aún en profundidad (Rojo, 2009). Los rangos de sustratos de estos sistemas enzimáticos se solapan y a menudo incluyen diferentes grupos de alcanos (van Beilen y Funhoff, 2007).

❖ Metabolismo de los aromáticos

Los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs) se degradan muy lentamente, posiblemente por su baja solubilidad, su naturaleza inhibitoria y por la elevada energía de resonancia de sus estructuras su degradación ocurre a partir de la ruptura del anillo.

En las últimas décadas se ha estudiado extensamente la ruta biodegradativa del naftaleno en bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas* y de forma más concreta en la especie *Pseudomonas putida*. En estos organismos, los genes degradativos (a menudo denominados genes *nah*) se encuentran localizados en dos operones: la vía degradativa superior que codifica para la conversión de naftaleno a salicilato, y la vía degradativa inferior que codifica para la transformación de salicilato a metabolitos centrales vía catecol (**Figura 1.5**) (Smith, 1990).

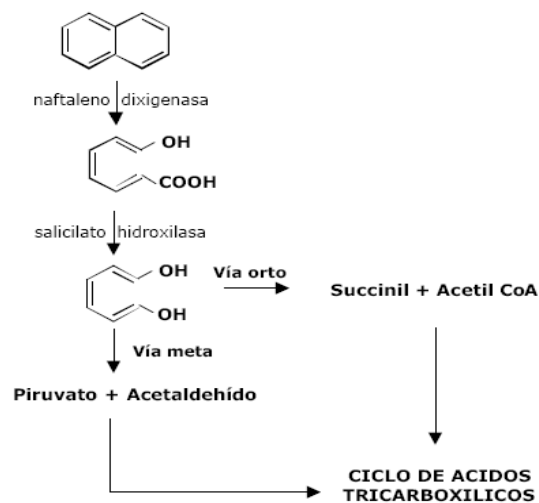


Figura 1.4. Ruta metabólica de degradación de naftaleno por *Pseudomonas aeruginosa* (Smith, 1990). El último paso en la degradación de poliaromáticos finaliza en ciclo de ácidos tricarbóxicos (CAT) vía catecol como compuesto intermediario.

La reacción inicial en la degradación de naftaleno es catalizada por un sistema enzimático multi-componente que agrega dos átomos de oxígeno al anillo aromático para formar cis-1,2-dihidroxi-1,2-dihidronaftaleno. Este sistema enzimático consiste en una reductasa, una ferredoxina y un componente catalítico oxigenasa. El componente catalítico,

llamado naftaleno 1,2-dioxigenasa (NDO), es un hexámero $\alpha_3\beta_3$. La subunidad α de la NDO (NDO α), contiene el sitio activo y la subunidad β más pequeña quizás tenga solamente un rol estructural (Boyd y col., 2001).

1.3.3 Genética de la biodegradación de hidrocarburos

Las dioxigenasas responsables de la primera reacción de la oxidación aerobia de naftaleno presentan muchas similitudes dentro de un mismo género, lo que sugiere que presentan un origen evolutivo común, aunque distante. Además se considera que las dioxigenasas de diferentes géneros y especificidades tienen un origen independiente (Xia y col., 2005).

Más recientemente se han comenzado a caracterizar las rutas biodegradativas en otros géneros de bacterias capaces de degradar HPAs de bajo peso molecular, diferentes de *Pseudomonas*. En algunos casos, los genes biodegradativos clonados a partir de estas bacterias muestran secuencias con muy baja homología con los genes tipo *nah* característicos de *Pseudomonas*, sugiriendo un origen diferente de estos genes o una divergencia temprana a partir de un ancestro común, este es el caso de los genes clonados a partir de especies de bacterias Gram positivas como por ejemplo *Rhodococcus* o a partir de bacterias marinas como *Cycloclasticus* (Uz y col., 2000). Existe además evidencia que en algunas bacterias degradadoras de naftaleno, como *Ralstonia* sp. U2, *Comamonas testosteroni* o *Rhodococcus*, la ruta biodegradativa no ocurre utilizando el catecol como intermediario, sino gentisato (Zhou y col., 2001). La biodegradación de HPAs de alto peso molecular también está siendo estudiada. Estos compuestos son en general más persistentes en el ambiente, debido a una mayor hidrofobicidad y a una mayor estabilidad molecular que los HPAs de dos o tres anillos, se han aislado varias bacterias con la capacidad de degradar HPAs de alto peso molecular, aunque en muchos casos la biodegradación de estos compuestos es consecuencia de un proceso de cometabolismo (Kanaly y Harayama, 2000).

1.3.4 Genes catabólicos para la degradación de los HPAs

Muchos contaminantes ambientales son degradados eficientemente por microorganismos, sin embargo otros persisten y constituyen un riesgo a la salud pública. En algunas instancias, la persistencia es una consecuencia del inadecuado potencial catabólico de los microorganismos disponibles. La tecnología de la construcción de librería de clones aunada a un sólido conocimiento de las vías catabólicas y de la fisiología microbiana, capacita

el desarrollo experimental de actividades nuevas o mejoradas sobre esos contaminantes (Atlas y col., 2006).

Los microorganismos constituyen el mayor reservorio de diversidad genética en nuestro planeta. La biotecnología puede ayudar a remediar esta situación mediante el desarrollo de técnicas biológicas para reciclar, desintoxicar o mineralizar aquellos compuestos que por su persistencia puedan alterar el equilibrio ecológico de la naturaleza. Para progresar en el desarrollo de estas técnicas primeramente es necesario identificar los compuestos que resisten en los actuales sistemas biológicos de tratamiento de residuos, y posteriormente proponer nuevos mecanismos de biodegradación basados en un mejor conocimiento de su estructura química (Uchiyama y col., 2007).

Asimismo, se deben conocer las rutas degradativas existentes en los diferentes microorganismos conocidos y los sucesivos pasos por los que el compuesto inicial se transforma en los productos finales. Entre los microorganismos capaces de crecer a expensas de compuestos aromáticos como fuente de carbono y energía se encuentran muchas bacterias aerobias y anaerobias facultativas, algunas levaduras y ciertos hongos. Todos estos organismos asimilan dichos compuestos a través de vías catabólicas que convergen en las rutas centrales del metabolismo. Los genes catabólicos para la degradación de HPAs generalmente se encuentran codificados en plásmidos autotransmisibles aunque en algunos casos pueden encontrarse localizados en el cromosoma. Debido a la localización de estos genes mayoritariamente en plásmidos, no existe una congruencia filogenética directa entre las secuencias de los genes catabólicos y del gen ARNr 16S (Mirdamadian y col., 2010).

En la degradación de compuestos aromáticos el tipo de inducción suele ser secuencial, de esta manera los microorganismos economizan y sintetizan sus enzimas de forma gradual. Los genes de las enzimas inducibles que están coordinadas se encuentran adyacentes en el genoma bacteriano y forman parte de una unidad reguladora u operón con un promotor y un operador (Das y Chandran, 2011). Uchiyama y col (2005) describieron un método denominado SIGEX que se basa en el hecho de que la expresión de genes catabólicos es generalmente inducida por sustratos o metabolitos de enzimas catabólicas, y que la expresión de genes catabólicos se controla con elementos de regulación situados aproximados, en muchos casos. Los clones seleccionados con el método SIGEX suelen ser expresados en presencia de sustratos y no se expresan en ausencia del sustrato. Para que el rendimiento de este método

SIGEX sea alto se construyó un vector con operon-trampa (p18GFP), en el que el sitio de clonación divide el promotor *lac* y el gen *gfp*. Además, Yun y col (2005) demostraron la práctica para la detección de genes catabólicos usando inductores apropiados o sustratos, y la posibilidad de SIGEX para producir más clones activos.

1.4 Exopolisacáridos (EPS)

1.4.1 Descripción y concepto

Los polisacáridos son moléculas complejas formadas por unidades simples repetitivas de azúcares, unidas mediante enlaces glucosídico, dando lugar a una estructura lineal o ramificada que puede llegar a estar constituida por miles de unidades de monosacáridos.

El término exopolisacárido (EPS) fue descrito por primera vez por Sutherland (1972) para describir polímeros carbohidratados de alto peso molecular producidos por bacterias marinas. Este término ha sido ampliamente utilizado para aquellos polisacáridos localizados en la superficie externa de las células microbianas entre los que se han encontrado polímeros de composición química y propiedades físicas diversas. Para designar a este tipo de sustancias se ha acuñado el término EPS, que se usa para hacer referencia a los “polisacáridos extracelulares”, “exopolisacáridos” o “exopolímeros” (Wingender y col., 1999)

Muchos microorganismos producen estos polímeros extracelulares para superar o resistir las adversidades de las condiciones extremas que suponen el medio en el que viven, influyendo en el ambiente fisicoquímico en las proximidades de la célula bacteriana. Son excretados al medio o bien quedan adheridos a la célula en forma de cápsula (Vicent y col., 1991; Mancuso Nichols y col., 2005 a, b; Margesin y Schinner, 2001).

La presencia de exopolisacáridos asociados a las células bacterianas se reconoce por la formación de colonias mucosas en el crecimiento del microorganismo en medio sólido, o bien por un aumento de viscosidad e incluso a veces la formación de un gel en medios líquidos (Sutherland, 1988). Para la detección y visualización de los exopolisacáridos se utilizan diversas técnicas. Mediante microscopía óptica es posible distinguir estas estructuras utilizando colorantes apropiados teniendo en cuenta la naturaleza aniónica de muchos de estos polisacáridos. En otros casos se realizan tinciones negativas que ofrecen la ventaja de poder distinguir entre los polisacáridos capsulares y aquellos más dispersos. Otras técnicas

utilizadas con éxito son la microscopía electrónica de barrido (SEM) y la microscopía electrónica de transmisión (TEM) (Mata, 2006).

1.4.2 Composición química de los exopolisacáridos

Los EPS están compuestos principalmente por carbohidratos, formando homo o heteropolímeros, que además pueden contener diversos sustituyentes orgánicos e inorgánicos. Los EPS homopolisacáridos están compuestos por un solo tipo de monosacárido, aunque difieran en su estructura y propiedades. Los EPS heteropolisacáridos están compuestos normalmente por unidades repetidas que varían en tamaño, desde disacáridos hasta compuestos por 24 tipos de monosacáridos y muchos de ellos, además, contienen grupos acilos adicionales (Sutherland, 2001).

❖ Carbohidratos

Existe una gran diversidad entre los carbohidratos constituyentes de los polisacáridos de origen microbiano. En la mayor parte de los EPS bacterianos están presentes los azúcares D-glucosa, D-galactosa y D-manosa; y se encuentran también con gran frecuencia los monómeros L-fucosa, L-ramnosa y las 6-desoxihexosas (Lindberg, 1990). Es frecuente encontrar ribosa asociada a los polisacáridos bacterianos. En un principio se pensó que su presencia podía deberse a una contaminación con ARN, sin embargo en la actualidad se considera, al menos en algunos casos, que es un componente propio de la estructura de dichos polímeros. Además de los monosacáridos más comunes, algunos polisacáridos pueden contener azúcares más raros, entre los que podemos citar las L-hexosas o la glucosa y galactosa en su forma furanosa. Dentro de este grupo de azúcares menos extendidos se encuentran también los aminoazúcares de algunos polisacáridos como N-acetil-D-glucosamina y N-acetil D-galactosamina. La mayoría de EPS son de naturaleza polianiónica, debido a la presencia en muchos de ellos de ácidos urónicos, componentes habituales de las moléculas polisacarídicas. El más común es el ácido D-glucurónico (Sutherland, 2001).

❖ Sustituyentes orgánicos

En la composición de los EPS también aparecen diferentes sustituyentes orgánicos, como los restos acetato, que no contribuyen a la carga total de la macromolécula, aunque están implicados en su conformación molecular. Estos sustituyentes contribuyen a la naturaleza lipofílica del polisacárido, lo cual le permitirá ser útil para determinadas aplicaciones industriales (Sutherland, 2001; Calvo y col., 2004; 2009). En muchos

exopolisacáridos, los grupos acetilos se encuentran en proporción estequiométrica con los monosacáridos presentes, aunque no siempre ocurre así. En el caso concreto de los alginatos bacterianos o la goma de xantano, un determinado monosacárido puede estar multi-acetilado, lo cual determina un contenido total de acetilos bastante elevado. Los alginatos presentan del orden del 15-20% (p/p) de acetilos y únicamente se encuentran acetilados los restos de ácido manurónico. Los restos piruvato que junto a los ácidos urónicos confieren naturaleza aniónica al EPS, suelen estar presentes en proporción estequiométrica con los azúcares integrantes del polímero y usualmente se encuentran unidos a una hexosa neutra. De forma ocasional se han localizado unidos a un resto urónico o una metilpentosa (Lindberg, 1976). En general la carga aniónica total de la molécula polisacáridica se debe a la presencia de ácidos urónicos y restos piruvato.

❖ Sustituyentes inorgánicos

Los sustituyentes inorgánicos cuya presencia se encuentra más extendida, son los grupos fosfato aunque estos sustituyentes no se han encontrado en polisacáridos producidos por bacterias Gram negativas como *Pseudomonas* (Sutherland, 1994). Aunque en un principio se pensó que la presencia de grupos sulfato era exclusiva de los polisacáridos de organismos eucariotas, se ha demostrado la existencia de estos grupos en algún exopolisacárido microbiano. Así, además de estar presentes en polímero de ciertas especies de cianobacterias, también se han encontrado en los EPS H28, H96 y V2-7, producidos por bacterias halófilas moderadas como *Halomonas eurihalina* (Béjar y col., 1998; Martínez-Checa y col., 2007; Calvo y col., 1998; 2002; 2008), *Halomonas ventosae* (Martínez-Cánovas y col., 2004c), *Halomonas maura* (Arias y col., 2003; Bouchotroch y col., 2001) o algunas bacterias marinas del género *Pseudomonas* (Matsuda y col., 1993). Los cationes también forman parte de la estructura de los EPS y se encuentran especialmente en polímeros polianiónicos. Así, algunos alginatos llevan fuertemente unidos cationes divalentes como Ca^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+} . Estos iones quedan adheridos al polisacárido durante su producción, pero pueden ser desplazados por procesos tales como intercambio iónico, electrodiálisis, etc.

1.4.3 Estructura de los exopolisacáridos

Las causas de la enorme variedad de exopolisacáridos son la diversidad de unidades básicas que los constituyen, la cantidad en que están presentes y los distintos tipos de enlaces que determinan la configuración final. Los homopolisacáridos se pueden clasificar en función

del tipo de enlace en β -D-glucanos y α -D-glucanos. Los β -D-glucanos son polímeros lineales formados por moléculas neutras unidas mediante un solo tipo de enlace (curdlano y celulosa) y polímeros que presentan ramificaciones y dos tipos de enlaces (escleroglucano y levano). Los α -D-glucanos son polímeros que presentan ramificaciones en sus estructuras y tres o más tipos de uniones (dextrosa).

Los heteropolisacáridos están constituidos por unidades repetidas que varían en cuanto a su naturaleza y tamaño (disacáridos, tetrasacáridos, pentasacáridos, etc.) en las unidades repetidas (**Figura 1.6**), cada hexosa puede presentar un enlace de tipo α ó β , o los dos a la vez (heparina), además de estar presente en su forma piranósica o furanósica. El punto de enlace de los azúcares varía también entre las posiciones 2, 3, 4 ó 6.

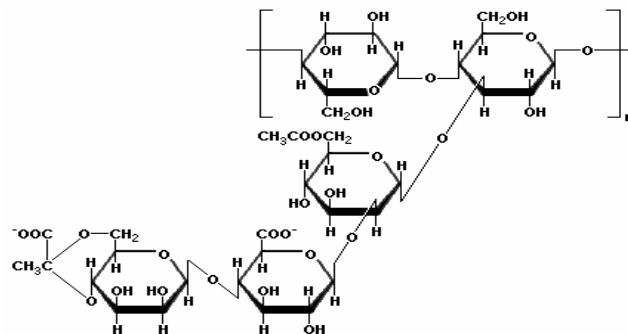


Figura 1.5. Estructura del heteropolisacárido xantano producido por *Xanthomonas campestris*.

1.4.4 Biosíntesis de los Exopolisacáridos

La biosíntesis de los exopolisacáridos microbianos es un proceso que en líneas generales se asemeja al de la síntesis del peptidoglucano y lipopolisacárido de la pared celular bacteriana (**Figura 1.7**). Se pueden distinguir cinco etapas:

1. Síntesis de precursores activados: Uno de los primeros pasos en la biosíntesis de EPS tiene lugar cuando el sustrato entra en la célula original o tras la fosforilación (Sutherland, 1977). El EPS es sintetizado cerca de la membrana plasmática y utiliza precursores activadores y moléculas transportadoras. La enzima UDP-glucosa es un enzima clave para producir el precursor de la biosíntesis de EPS en la pared celular de muchos microorganismos (Sutherland, 1977). Algunas enzimas participantes en la síntesis nucleotídica se encuentran en la membrana y otras, para el caso de las bacterias Gram-negativas, en el citoplasma (Whitfield, 1988). Sin embargo, no se sabe aún claramente si estos subproductos se producen libremente en el citoplasma o son producidos en sus proximidades por las enzimas responsables.

2. Ensamblaje de las unidades: Tiene lugar la formación de un glucolípidio intermediario por acción de glicosil-transferasas específicas, situadas probablemente sobre la cara interna de la membrana citoplasmática donde los precursores se encuentran disponibles (Reuber y Walker, 1991). Se produce una transferencia secuencial de los correspondientes precursores activados a un lípido aceptor intermediario, localizado en la membrana plasmática (Leigh y Coplin, 1992).

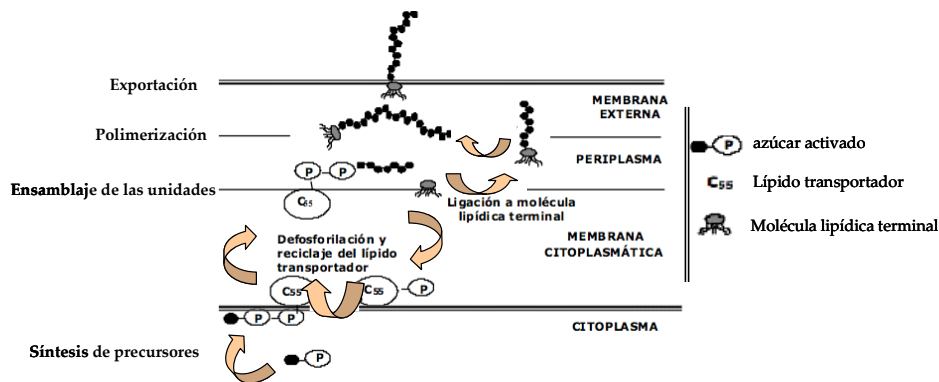


Figura 1.6. Etapas generales de la biosíntesis de exopolisacáridos (EPS), cápsulas y lipopolisacáridos en bacterias Gram negativas.

3. Adición de sustituyentes: El acetato y el piruvato son transferidos a partir de acetyl-CoA y fosfoenolpiruvato (PEP) mediante la acción de las enzimas acetiltransferasas I y II y cetalpiruvato-transferasas (Ielpi y col., 1981; 1983).

4. Polimerización: Estudios *in vitro* indicaron que este proceso se realiza por transferencia de la cadena en crecimiento al extremo reductor de una nueva unidad básica que se encuentra unida al transportador (Ielpi y col., 1993). El transportador lipídico es eliminado de la molécula en crecimiento durante la reacción de adición por desfosforilación, proporcionando así energía para la polimerización. Estas reacciones tienen lugar en la cara interna de la membrana citoplasmática.

5. Exportación del polisacárido a la superficie celular: Esta etapa es la menos conocida. Algunos autores creen que existen sistemas de translocación específicos como proteínas transportadoras, a través de las cuales los polímeros son conducidos en sus formas más extendidas o casi lineales. Otros autores consideran que la secreción del EPS ocurre al mismo tiempo que la polimerización de sus unidades, ya que ésta última se vería impedida por el tamaño del mismo (Ielpi y col., 1993).

1.4.5 Condiciones de cultivo para la producción de los EPS

La naturaleza química del EPS desempeña un papel importante en su función activa. Sin embargo, ésta depende no sólo de la cepa productora sino también de las condiciones ambientales y nutricionales del medio de cultivo: naturaleza de las fuentes de carbono y nitrógeno, la proporción C:N, limitaciones nutricionales y parámetros físicos (Temperatura, aireación y pH), que influyen no sólo en la cantidad sino también en la calidad del polímero producido. Estas condiciones, que determinan la producción óptima del biopolímero, varían de unas especies microbianas a otras e, incluso, entre cepas bacterianas de la misma especie. Así, las condiciones de cultivo pueden influir de manera importante en el rendimiento de producción y en la composición química y estructura de los exopolímeros microbianos (Calvo y col., 2009).

La posibilidad de crecimiento bajo condiciones controladas de laboratorio de una cepa aislada representa una aproximación adecuada para investigar la producción de EPS microbianos. Sin embargo, no existe un medio de cultivo específico que garantice altas productividades, ya que los microorganismos difieren en requerimientos de temperatura y pH óptimo. Además, es posible modular la masa molecular, el número de residuos y el grado de ramificaciones de EPS usando un control fisiológico. De hecho, las condiciones nutricionales y ambientales (condiciones de cultivo) pueden afectar a la productividad y calidad de los EPS microbianos (Kumar y col., 2007).

1.4.6 Funciones de los EPS microbianos

Las propiedades físicas de los polisacáridos están profundamente influenciadas por la manera en que los monosacáridos son enlazados unos a otros y por el ensamblaje de las cadenas simples de polímeros (Van hooren y Van damme, 1998).

El papel fisiológico de los EPS depende del nicho ecológico y del ambiente natural del cual han sido aislados los microorganismos. De hecho, la producción de EPS es un proceso que requiere un coste de energía notable de más del 70%, representando un gasto de carbono importante para los microorganismos. Sin embargo, los beneficios relacionados con los EPS son significativamente más altos que el coste de producción considerando el incremento de crecimiento y la supervivencia del microorganismo en presencia de éstos (Wolfaardt y col., 1999; Poli, 2007).

Indudablemente, poseen una naturaleza protectora; los EPS, formando una capa alrededor de la célula, proporcionan una protección eficaz frente a temperaturas extremas, elevada salinidad, desecación, o frente a posibles predadores. Son esenciales en la formación de agregados, en los mecanismos de adhesión superficial y a otros organismos, en la formación de biopelículas y en la captación de nutrientes (Alldredge, 2000; Holmstrom y Kjelleberg, 1999; Decho y Herndl, 1995; Mancuso Nichols y col., 2005a). En particular, en estudios de comunidades microbianas de los mares helados se han encontrado bacterias fuertemente asociadas a partículas y han indicado que los EPS microbianos desempeñan un importante papel en la crioprotección (Junge y col., 2004; Krembs y col., 2002). Los EPS presentan un papel importante en la matriz de las biopelículas, en las interacciones bioquímicas entre la bacteria y las células circundantes (Decho, 1990; Logan y col., 1987). Se ha comprobado que las cepas aisladas de fuentes hidrotermales de aguas profundas muestran resistencia a los metales pesados y sus EPS purificados presentan la capacidad de inmovilizar metales y sustancias tóxicas (Loaec y col., 1997; 1998).

En su ambiente natural, la mayoría de las bacterias viven en agregados microbianos cuya integridad estructural y funcional está basada en la presencia de una matriz de sustancias poliméricas extracelulares y la producción de EPS parece ser esencial para su supervivencia (Wingender y col., 1999). En concreto, los polisacáridos marinos, junto con otras macromoléculas como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, constituyen la matriz orgánica presente en el espacio intracelular de las biopelículas microbianas, que representan uno de los mayores reservorios de carbono de la Tierra (Wingender y col., 1999; McCarthy y col., 1996).

Además muchos de estos microorganismos producen polímeros con propiedades bioemulgentes para facilitar la solubilidad de los compuestos hidrofóbicos en el ambiente y que así puedan ser utilizables como sustratos (Margesin y Schinner, 2001; Oliveira y col., 2003). Se ha sugerido que la presencia de moléculas superficialmente activas en la superficie de la célula microbiana incrementa la hidrofobicidad de la célula y ayuda a la supervivencia en ambientes hidrofóbicos (Perfumo y col., 2010).

1.4.7 Bioemulgentes

Numerosos microorganismos sintetizan una amplia variedad de moléculas de alto y bajo peso molecular con propiedades emulgentes y/o surfactantes. Son sustancias de origen biológico que facilitan la solubilización de compuestos hidrófobos y por ello son útiles en los

procesos de biorremediación. Se ha demostrado que la aplicación de biosurfactantes (BS) y bioemulgentes (BE) acelera el proceso de biodegradación de hidrocarburos al aumentar la biodisponibilidad de estos contaminantes (Margesin y Schinner, 2001).

Los polímeros de alto peso molecular son polisacáridos anfipáticos, proteínas, lipopolisacáridos, lipoproteínas o mezclas complejas de estos biopolímeros. En general se asocian con la capacidad de estabilizar emulsiones. Estos compuestos de alto peso molecular están asociados a la producción de emulsiones estables, pero la disminución de la tensión superficial no es un rasgo habitual de ellos, en consecuencia son considerados como bioemulgentes (Bognolo, 1999). En la **Tabla 1.1** se recogen algunos ejemplos de BE/BS y su correspondiente microorganismo productor.

Tabla 1.1. Algunos ejemplos de bioemulgentes y sus microorganismos productores. (Banat y col., 2000; Sutherland, 2001; Calvo y col., 2004)

Grupo	Bioemulgente	Microorganismo productor
Glicolípidos	Ramnolípidos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Rhodococcus erythropolis</i>
	Trehalolípido	<i>Arthrobacter sp.</i> <i>Mycobacterium sp</i>
	Soforolípidos	<i>Torulopsis bombicola</i>
	Lipopéptidos y lipoproteínas	Péptido-lípidos Viscosina Surfactina Fosfolípidos
Surfactantes Poliméricos	RAG-1 emulsano	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> RAG-1
	BD4 emulsano	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> BD4-13
	Alasano	<i>Acinetobacter radioresistens</i> KA53
	Biodispersano	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
	Liposano	<i>Candida lipolytica</i>
	Complejo proteico	<i>Mycobacterium thermoautotrophium</i>
	Emulgente termofílico	<i>Bacillus stearothermophilus</i>
	Acetilheteropolisacárido	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>
	Emulgente alimentario	<i>Candida utilis</i>
	Polisacarido sulfatado	<i>Halomonas eurihalina</i>

Durante la última década los BE/BS han sido objeto de estudio como potenciales sustituyentes de surfactantes sintéticos y tienen un interés considerable debido a su baja

toxicidad, naturaleza biodegradable y diversidad. El rango de aplicaciones potenciales industriales y medioambientales incluyen la mejora en recubrimientos de “las gotas de aceite”, extracción de petróleo crudo, lubricantes, biorremediación generalizada de contaminantes insolubles, aplicaciones en salud, industria farmacéutica/cosmética y procesado de alimentos. Todas estas aplicaciones están relacionadas con la actividad emulgente, la capacidad de formación de espuma, detergentes, espesantes, coagulantes, adhesión, estabilizantes, humectación, dispersión y solubilización de compuestos hidrofóbicos (Desai y Banat, 1997; Banat y col., 2000; Kumar y col., 2007; Satpute y col., 2010).

En resumen, de acuerdo a su estructura química, los BS/BE pueden ser clasificados en los siguientes grupos:

- **Glucolípidos:** Los carbohidratos como la soforosa, trehalosa o ramnosa están unidos a una larga cadena ácido alifática o lipopéptido. Por ejemplo, el ramnolípido sintetizado por *P. aeruginosa* consiste en una o dos partes de azúcar unidas a una o dos partes de ácido caprílico por un enlace glucosídico (Rosenberg y Ron, 1999; Lang y Wullbrandt, 1999).
- **Aminoácidos:** Los bioemulgentes como surfactina producida por *Bacillus subtilis*, compuesto de siete anillos de aminoácidos acoplados con una molécula de ácido 3-hidroxi-13-metiltetradecanoico.
- **Complejos polisacárido-lipídicos:** Las sustancias como el emulsano sintetizado por *Acinetobacter calcoaceticus* RG-1, que es un heteropolisacárido extracelular polianiónico (Rosenberg y col., 1979). Los exopolisacáridos se incluyen en este grupo y pueden deber su actividad emulgente a su capacidad viscosizante o a una simple asociación de una fracción proteica al polímero.
- **Grupos proteicos:** Las sustancias como liposano producido por *Candida lipolitica*, compuesto por proteínas y carbohidratos.

Se han propuesto tres funciones para los bioemulgentes en general: **i)** Incrementar el área de superficie entre dos fases inmiscibles, el agua y una fase oleosa o sustrato insoluble. **ii)** Incrementar la biodisponibilidad de sustratos hidrofóbicos mediante el aumento de su solubilidad. **iii)** Regular la adhesión y separación de los microorganismos respecto a las superficies (Rosenberg y Ron, 1999).

Los biopolímeros que contienen polisacáridos, uniones de polisacáridos con lípidos, o polisacáridos unidos a proteínas, han sido descritos como agentes emulgentes eficientes frente

a numerosos hidrocarburos (Plaza y col., 2005, Calvo y col., 2002). En este sentido, los exopolímeros, moléculas de alto peso molecular que frecuentemente presentan propiedades biosurfactantes y/o bioemulgentes, se ofrecen como sustancias propicias para su empleo en la bioestimulación.

1.4.8 Aplicaciones biotecnológicas de los EPS microbianos

En los últimos años el aumento de la demanda de polímeros de origen natural para industrias farmacéuticas y alimentarias entre otras, ha despertado un notable interés hacia el aislamiento e identificación de nuevos polisacáridos microbianos que puedan tener aplicaciones innovadoras como gelificantes, emulgentes y agentes estabilizantes (Sutherland, 2001). Estos biopolímeros han surgido como nuevos materiales poliméricos con características físicas nuevas y únicas y por lo tanto se han encontrado muchas y variadas aplicaciones.

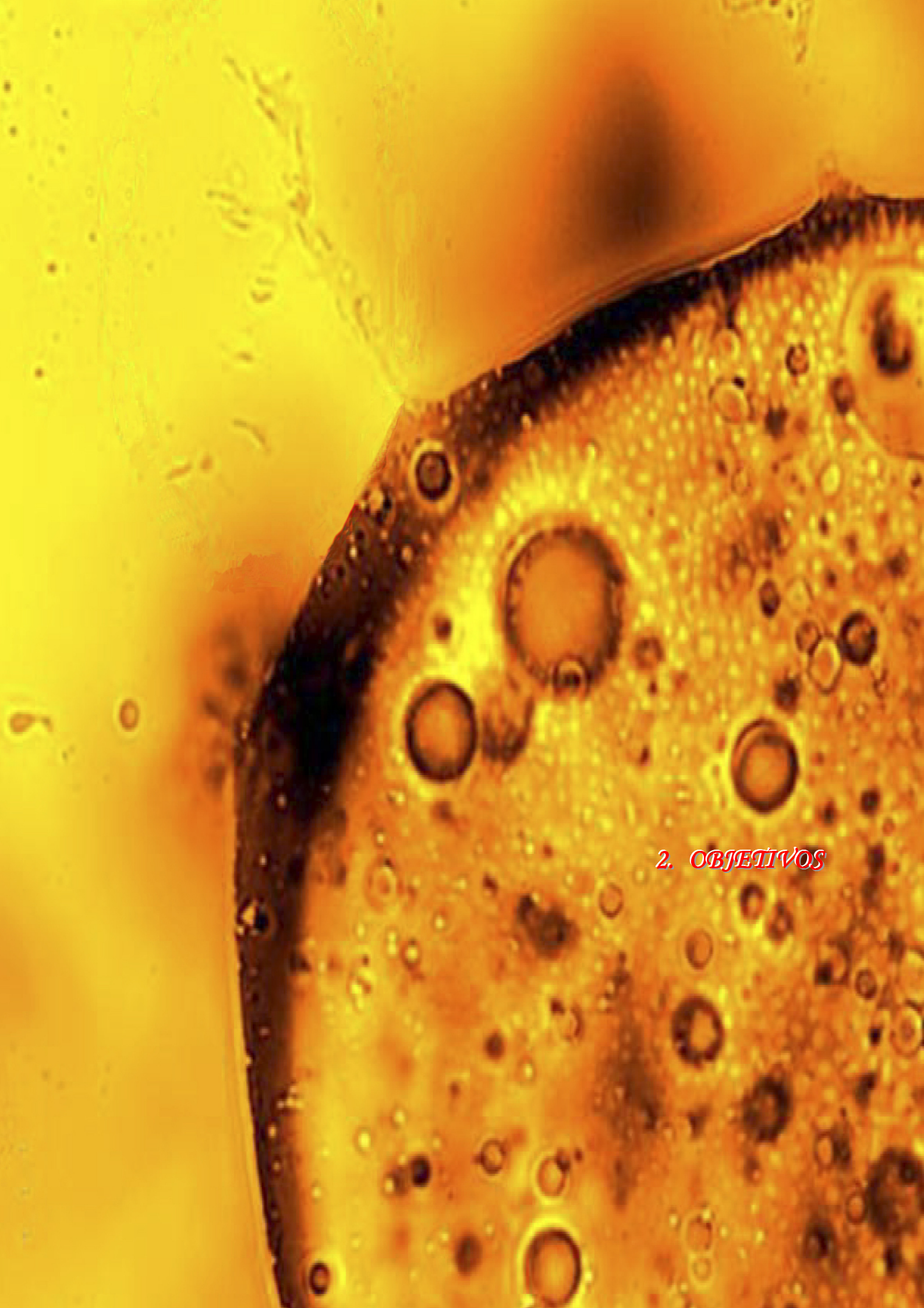
El empleo de los EPS, fuera de las aplicaciones clínicas y en alimentación, refleja varios de sus atributos físicos. Es en el sector de la industria del petróleo donde los EPS han sido realmente aceptados en competencia con gomas de plantas, sus derivados y compuestos químicos sintéticos (Sutherland, 1982). Entre las aplicaciones en este sector se incluyen la biorremediación/dispersión de los vertidos accidentales, tanto terrestres como marinos, eliminación/movilización de fangos de petróleo desde los tanques de almacenamiento y la mejora de la recuperación del petróleo (Georgiou y col., 1992).

Se han aislado más de 10.000 metabolitos de diferentes hábitats marinos con amplio espectro de actividad biológica producidos por microorganismos marinos con capacidad de sintetizar exopolímeros en diversos campos tecnológicos (Fusetani, 2000; Kelecom, 2002), algunos de ellos se recogen en la **Tabla 1.2**.

El hábitat marino proporciona una magnífica oportunidad para identificar nuevos compuestos como antibióticos, enzimas, vitaminas, fármacos, biosurfactantes (BS), bioemulgentes (BE) y otros compuestos de importante valor comercial (Austin, 1989; Lang y Wagner, 1993; Jensen y Fenical, 1994; Romanenko y col., 2001). Entre estos compuestos bioactivos marinos, los BS/BE son de gran importancia debido a su diversidad estructural y funcional y a sus aplicaciones industriales (Banat y col., 1991; Banat, 1995 a, b; Rodríguez y col., 2006).

Tabla 1.2. Relación de algunos microorganismos marinos productores de EPS.

Cepa productora	Procedencia	Propiedades	Referencia
<i>Bacillus B3-15</i>	Aguas superficiales	farmacéuticas	Maugeri y col., 2002
<i>Bacillus B3-72</i>	Aguas superficiales	farmacéuticas	Nicolaus y col., 2000
<i>B. licheniformis</i>	Isla Volcano	antiviral	Arena, 2004
<i>B. thermoantarcticus</i>	Sedimento marino	farmacéuticas	Nicolaus y col., 2000
<i>Planococcus maitriensis</i>	Aguas costeras	degradación HPAs	Kumar y col., 2007
<i>Enterobacter cloacae</i>	Sedimento marino	emulgente	Iyer y col., 2005
<i>Alteromonas sp.1545</i>	Mar abierto	emulgente	Vicent y col., 1994
<i>Pseudoalteromonas sp.CAM025</i>	Antártida	adsorción metales	Gutiérrez y col., 2008
<i>Pseudoalteromonas SM913</i>	Sedimento aguas profundas	floculante	Li y col., 2008
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Isla Okinawa 1000m prof.	degradación alcanos	Urai y col., 2007
<i>Zoogloea sp</i>	Aguas submarina	emulgente	Lim y col., 2007
<i>Vibrio alginolyticus</i>	Fuente hidrotermal	farmacéuticas	Jayaraman y Seetharaman, 2003
<i>Hyphomonas MHS-3</i>	Sedimento marino	adhesivas	Quintero y Weiner, 1995
<i>Flavobacterium uliginosum</i>	Aguas marinas	antitumoral	Umezawa y col., 1983
<i>Haloferax mediterranei</i>	Mar Mediterraneo	recuperación petróleo	Antón y col., 1988
<i>Beobacillus thermodenitrificans</i>	Fuente hidrotermal	antiviral	Antón y col., 1988
<i>Hahella chejuensis</i>	Sedimento marino	biosurfactante	Ko y col., 2004.
<i>Halomonas variabilis W10</i>	Agua de mar	Bioemulgente	Uad y col., 2010



2. OBJETIVOS

Los hidrocarburos derivados del petróleo suponen un gran problema de contaminación de ecosistemas acuáticos y terrestres. La contaminación por petróleo en los ambientes marinos y estuarios ha recibido gran atención en los últimos años, y sobre todo en los aspectos del destino y los efectos tóxicos del petróleo derramado. Hay certeza de que la incidencia de los derrames resultantes del transporte marino y terrestre, de los accidentes de petroleros, de las operaciones de exploración y explotación y de las actividades asociadas, se incrementarán en los años venideros en, tanto la demanda de petróleo como el principal recurso energético del planeta siga en aumento.

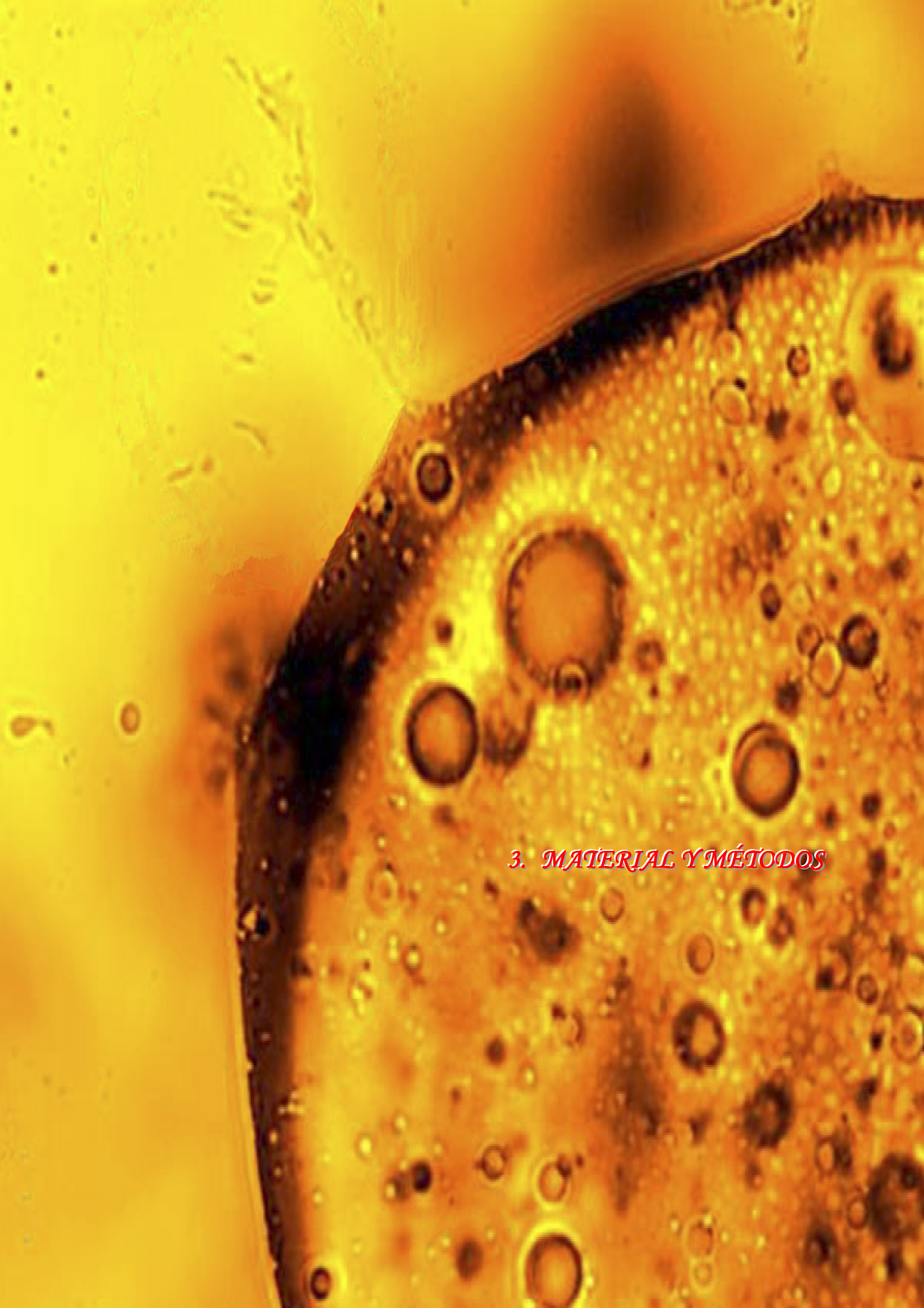
La existencia de microorganismos degradadores y el descubrimiento de nuevos genes, enzimas y rutas metabólicas han hecho que la biorremediación constituya una opción muy válida para el tratamiento de los emplazamientos contaminados con hidrocarburos.

Basándonos en estas premisas y teniendo en cuenta el interés creciente por los procesos de biorremediación, nos propusimos realizar el estudio taxonómico de los microorganismos aislados de muestras de agua, fuel y sedimentos marinos aislados a 4.000 m de profundidad en la zona del hundimiento del buque Prestige. Además y dentro de este mismo contexto general, nos planteamos conocer las propiedades funcionales y la composición química de los bioemulgentes producidos por estos microorganismos con el claro objetivo de establecer las posibles aplicaciones biotecnológicas de biorremediación que estos biopolímeros pudieran aportar.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, los objetivos específicos planteados en esta tesis doctoral se detallan en los siguientes puntos:

- I. Caracterización taxonómica de las cepas productoras de EPS y degradadoras de hidrocarburos mediante el análisis filogenético de las mismas.
- II. Caracterización fenotípica y/o nutricional de las cepas mediante la evaluación del perfil metabólico de las mismas, así como estudiar su capacidad de crecimiento en un amplio rango de concentraciones salinas.

- III. Estudiar la capacidad de las cepas seleccionadas para degradar hidrocarburos policíclicos aromáticos (naftaleno) y mezclas complejas (crudo Kirkuk).
- IV. Generar una genoteca y validar su calidad para su posible uso en estudios de caracterización de los genes incluidos en la biodegradación de compuestos recalcitrantes.
- V. Estudiar la producción de EPS con potencial bioemulgente y determinar su composición química estableciendo un índice de calidad bioemulgente.



3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Cepas bacterianas

El aislamiento de las 18 cepas objeto de estudio se realizó a partir de muestras de agua y sedimentos marinos extraídos a 4.000 m de profundidad en las proximidades del hundimiento del petrolero Prestige, así como de muestras de fuel del mencionado petrolero tras su naufragio. Estas bacterias fueron seleccionadas en base a su capacidad para crecer en presencia de diferentes hidrocarburos y/o de producir exopolisacáridos con actividad emulgente, de un total de 133 cepas bacterianas aisladas en nuestro laboratorio durante el proyecto de investigación realizado para determinar la viabilidad de biorremediación del fuel del Prestige (Proyecto de investigación concerniente al estudio de viabilidad de biorremediación de fuel del Prestige: Fase II).

En una primera etapa, a partir de las placas de aislamiento utilizadas para el recuento de microorganismos heterótrofos mesófilos y psicrófilos presentes en las muestras de agua, sedimentos y fuel anteriormente mencionadas, se realizó una selección de 133 aislados, de los cuales se seleccionaron 18 cepas bacterianas atendiendo a su capacidad para proliferar en presencia de diferentes hidrocarburos y/o de producir exopolisacáridos. Se empleó la cepa *Escherichia coli* XL1-Blue como fondo genético para la búsqueda de promotores que respondan a la presencia de naftaleno (Tabla 3.1).

Tabla 3.1. Cepas bacterianas empleadas en el presente trabajo. Se indica el nombre y el origen de cada cepa objeto de estudio y sus referencias. También se indican las características más relevantes de las cepas aisladas así como las cepas *Escherichia coli* y *Pseudomonas putida* utilizadas como control en otros ensayos.

Cepa	Procedencia	Genotipo	Referencia
W1- W3- W4- W5- W7- W8- W10- W12- W15- W16- W18	Muestras de agua de mar		
F2- F17- F20	Muestras de fuel		Uad y col., 2010
S21- S22- S24- S27	Muestras de sedimento marinos		
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue	-	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 re1A1 lac</i> [F'proAB <i>lac1</i> ^q Z MΔ15 Tn10 (Tet ^r)]	Bullock y col., 1987
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	-	<i>hsdMR</i> , Ben ^r	Franklin y col., 1981

3.2 Medios de cultivo

❖ Medio MY

El medio MY (Moraine y Rogovin, 1966) se empleó para determinar el efecto de la concentración de sales sobre el crecimiento de las cepas objeto de estudio, para la producción de los exopolisacáridos y para la conservación de las cepas. Se recoge su composición en g/l en la **Tabla 3.2**. Para la preparación de medio MY sólido se adicionó agar Difco® a una concentración final de 1,8% (p/v).

Tabla 3.2. Composición del medio de cultivo MY. Se indica la composición del medio MY en gramos por litro de agua destilada c.s.p.

Glucosa (Panreac®)	10
Extracto de levadura (Difco®)	3
Proteasa peptona (Difco®)	5
Extracto de malta (Panreac®)	3

❖ Solución stock de sales

Como solución de sales para la preparación de los medios de cultivo a distintas concentraciones de sales, se empleó una solución stock de sales propuesta por Rodríguez-Valera y col. (1981), al 30% (p/v). Dicha solución presentó una composición de sales similar a la del agua de mar, es decir posee un carácter talasohalino (**Tabla 3.3**).

Tabla 3.3. Solución de sales al 30% (p/v). Se indica la composición de stock de sales gramos por litro de agua destilada c.s.p.

NaCl (Panreac®)	234
MgSO ₄ 7H ₂ O (Merk®)	59,8
MgCl ₂ 6H ₂ O (Merk®)	41,6
KCl (Merk®)	6
CaCl ₂ 2H ₂ O (Merk®)	1,1
FeCl ₃ 6H ₂ O (Merk®)	0,1
NaBr (Merk®)	0,65
NaHCO ₃ (Merk®)	0,2

❖ Medio Trypticasa Soja Agar (TSA)

Este medio se utilizó para los estudios de caracterización genética de los microorganismos. Se empleó el medio TSA Difco® cuya composición en g/l fue la siguiente: 40 g de TSA (Disco®) en 1000 ml de agua destilada c.s.p.

❖ Medio Caldo Trypticasa Soja (TSB)

El medio TSB se utilizó para los estudios de caracterización genética de los microorganismos. Se empleó el medio TSB Difco® cuya composición en g/l fue la siguiente: 30g de TSB (Disco®) en 1000 ml de agua destilada c.s.p.

❖ Medio mínimo S4

Para la preparación del medio S4 se siguió la metodología descrita por Abril y col. (1991), modificada. Este medio mínimo se empleó para los estudios de la determinación de crecimiento de las cepas en presencia de HPAs (naftaleno, fenantreno, antraceno y pireno), la composición se detalla en la **Tabla 3.4.**

Tabla 3.4. Medio Mínimo S4 (Abril y col., 1991)

10x M9	100 ml
Subow (30x)	33 ml
Agua destilada	1000 ml

Para la preparación de medio S4 sólido se adicionó bacto-agar Difco® a una concentración final de 2,25% (p/v).

❖ Solución 10xM9

Para la elaboración del medio 10xM9, se utilizó una modificación del medio M9 (Sambrook y col., 1989) cuya composición fue la siguiente: Solución 10xM9: 100 ml; Solución A9 "Goodies": 2,5 ml; MgSO₄ 1M: 1 ml; citrato férrico amónico 6‰ (p/v): 1 ml; y agua destilada hasta 1 litro. Las soluciones empleadas en este medio se prepararon y esterilizaron por separado en autoclave.

La solución 10xM9 se preparó con la siguiente composición: Na₂HPO₄ 7H₂O: 70 g; KH₂PO₄: 30 g; NH₄Cl: 5 g y agua destilada hasta 1 litro.

❖ Solución A9

La solución A9 se preparó con la siguiente composición: HBO₃: 300 mg; ZnCl₂: 50 mg; MnCl₂ 4H₂O: 30 mg; CoCl₂: 200 mg; CuCl₂ 2 H₂O: 10 mg; NiCl₂ 6H₂O: 20 mg; NaMO₄ 2H₂O:

30 mg y agua destilada hasta 1 litro. Todos los medios fueron preparados con agua destilada, el pH se ajustó a 7.3 con NaOH (Panreac®).

❖ Medio mínimo marino sintético (MMS)

Este medio fue utilizado para los estudios de degradación de naftaleno y crudo en medio líquido. La composición se detalla en la **Tabla 3.5**.

Tabla 3.5. Medio Marino Sintético (MMS). Se indica la composición en gramos por litro de agua destilada c.s.p.

NH ₄ NO ₃ (Merk®)	8
Na ₂ HPO ₄ (Merk®)	14
Solución de sal	1% (p/v)

3.3 Antibióticos

Para la selección y mantenimiento de los transformantes de *Escherichia coli* XL1 Blue, los medios de cultivo fueron suplementados con ampicilina y tetraciclina, para lo cual se prepararon soluciones concentradas de los antibióticos según las indicaciones citadas en la bibliografía (Sambrook y col., 1989).

- **Ampicilina (Amp₁₀₀)**: Se preparó una solución concentrada de ampicilina (Sigma®) 100 mg/ml en H₂O bidestilada y se esterilizó por filtración. La concentración final de uso fue de 50-100 µg/ml.

- **Tetraciclina (Tc)**: Se preparó una solución concentrada de tetraciclina (Sigma®) 12,5 mg/ml en metanol al 50%. Se esterilizó por filtración. La concentración final de uso fue de 15 µg/ml.

3.4 Conservación de microorganismos

La conservación, para el uso cotidiano, de los microorganismos empleados para desarrollar el presente trabajo se realizó a temperatura de 4°C en medio sólido MY al 3% (p/v) de sales y pH de 7 – 7.3 (Moraine y Rogovin, 1966).

Para la conservación a largo plazo, los microorganismos se mantuvieron a –80°C utilizando el mismo medio de cultivo y glicerol al 40% (v/v) como crioprotector.

3.5 Genética y manipulación de ADN

3.5.1 Construcción de librería de clones

3.5.1.1 Plásmido utilizado

Como vector de clonación, se utilizó el plásmido p18GFP (Uchiyama y col., 2005), plásmido derivado de pUC18 que se representa en la siguiente **Figura 3.1**.

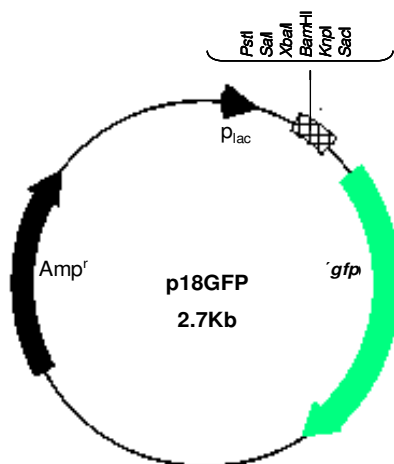


Figura 3.1. Esquema del plásmido p18GFP. La expresión del gen 'gfp' está bajo el control del promotor P_{lac}. Se muestran el sitio de clonación múltiple que incluye el sitio BamHI.

3.5.1.2 Aislamiento de ADN plasmídico: Método "Qiapreps"

Para el aislamiento y la preparación rápida del ADN plasmídico se utilizó el kit comercial "Qiapreps spin plasmid" (Qiagen®, ref. 27104) libre de ARN, partiendo de un volumen de cultivo de 3 ml y siguiendo las instrucciones del fabricante. Este ADN plasmídico se empleó para reacciones posteriores de secuenciación y/o clonación.

3.5.1.3 Extracción rápida de ADN bacteriano total

La extracción rápida del ADN total bacteriano se llevó a cabo mediante la lisis de las células empleando una solución de lisis cuya composición fue la siguiente: 200 µl de SDS (Sigma®) (10%), 150 µl de NaOH (2N) y agua bidestilada estéril hasta 1 ml. Esta solución fue de preparación extemporánea.

Se partió de un cultivo de 24 horas en medio sólido MY al 3 % (p/v) de sales (MY3%). Se resuspendió la biomasa en 20 µl de la solución de lisis y se incubó durante 15 minutos a 95°C. A continuación se añadieron 180 µl de agua bidestilada estéril y se centrifugó a 13.500 rpm durante 5 minutos, esta solución que contiene el ADN, se conservó a -20°C hasta su posterior uso.

3.5.1.4 Aislamiento a gran escala de ADN bacteriano total

Para la preparación de ADN total se utilizó el método modificado descrito por Kado y Liu (1981). Se partió de cultivos en medio TSB tras 24 horas a 28°C en agitación. Se recogieron 1,5 ml de las células de dicho cultivo por centrifugación a 14.500 rpm durante 15 minutos. Tras retirar el sobrenadante las células se resuspendieron en 425 µl de TE, al que se le añadieron 22 µl de SDS al 10% y 2 µl de proteína K (20 mg/ml). Las muestras se incubaron durante 1 hora a 37°C. Posteriormente se añadieron 225 µl de la solución de lisis, se homogenizaron y se les añadieron 4,5 µl de ARNasa (30 unidades). Seguidamente se trataron con un volumen de fenol, cloroformo y alcohol isoamílico en proporción 25:24:1(v/v), para eliminar proteínas, membranas y restos celulares. La fase acuosa se separó de la fase orgánica por centrifugación a 14.500 rpm durante 15 minutos y se volvió a tratar con fenol, cloroformo y alcohol isoamílico otras dos veces de forma análoga a la descrita anteriormente. Para eliminar los restos de fenol de la fase acuosa, ésta se trató con una mezcla de cloroformo y alcohol isoamílico en proporción 24:1 (v/v). Posteriormente a la fase acuosa se le añadió un décimo del volumen de acetato sódico 3M, pH 4,8 y un volumen de isopropanol frío. Las muestras se incubaron a -20°C durante 30 minutos y se centrifugaron a 14.500 rpm durante 15 minutos. El precipitado se lavó de sales con un volumen de etanol frío (70%). Tras decantar el sobrenadante y secar el precipitado, éste se resuspendió en 60 µl de TE. Las soluciones empleadas en este procedimiento fueron las siguientes:

- **TE:** Tris-HCl (pH 8), 10mM y EDTA 1mM. Esta solución se esterilizó en la autoclave y se almacenó a 4°C.
- **Solución de lisis:** 200 µl de SDS (10%), 150 µl de NaOH (2N) y agua bidestilada esterilizada hasta 1ml de volumen total. Esta solución fue de preparación extemporánea.
- **Acetato sódico 3M pH 4,8:** a 60 ml de una solución de acetato sódico 5M se le añadieron 11.5 ml de ácido acético glacial y H₂O destilada hasta 100 ml. Cuando fue necesario, el pH se ajustó a 4,8 con ácido acético glacial. La solución se esterilizó en autoclave y se conservó a 4°C.

3.5.1.5 Transferencia de plásmidos por electroporación

La transformación de células de *E coli* XL1 Blue se realizó mediante el método de Enderle y Farwell (1998). Para ello se partió de un cultivo saturado de *E coli* XL1 Blue en

medio líquido TSB suplementado con el antibiótico (Tc). De este preinóculo se utilizaron 2,5 ml para inocular 10 ml del mismo medio que se incubaron a 37°C hasta alcanzar la fase semilogarítmica, se recogieron las células del cultivo por centrifugación a 14.500 rpm durante 1 minuto, tras lo que se eliminó el sobrenadante. Las células presentes en el sedimento se resuspendieron en 0,5 ml de agua destilada estéril a 4°C. La suspensión bacteriana se centrifugó durante 30 segundos a 14.500 rpm. El precipitado se volvió a resuspender en 0,5 ml de H₂O destilada estéril, recogién dose en las mismas condiciones. Posteriormente se resuspendieron en 120 µl de H₂O destilada estéril y a partir de este momento todas las células se mantuvieron en hielo hasta el pulso eléctrico. Las células preparadas según se ha descrito, se mezclaron con 5-15 ng de ADN limpio de sales y esta mezcla se transfirió a una cubeta de electroporación de 0,1 cm de espacio entre electrodos (Bio-Rad cat. nº 1652089) donde recibieron un pulso eléctrico mediante un electroporador Gene Pulser (Bio-Rad, ref.165-2098). Tras el pulso eléctrico se añadieron 400 µl de TSB a temperatura ambiente. Posteriormente las células se incubaron a 37°C durante 1 hora en las cubetas de electroporación tras lo cual se sembró en TSA con el antibiótico Amp¹⁰⁰ selectivo para p18GFP.

Para eliminar las sales del ADN se realizó una diálisis de 20 µl de muestra utilizando membranas de tamaño de poro de 0,22 µm de Millipore (cat. nº GVWP02500) durante 1 hora en agua calidad milliQ a temperatura ambiente.

3.5.1.6 Restricción de ADN

Las digestiones de ADN se realizaron con enzimas de restricción en las condiciones óptimas para cada enzima fijadas por el fabricante. Las reacciones contenían habitualmente 0,5 µg de ADN, 0,1 volúmenes del tampón de restricción correspondiente suministrado por la casa comercial (10 veces concentrado), y 0,5-10 unidades del enzima de restricción, en volúmenes finales de 10-30 µl completados con H₂O bidestilada estéril. Las digestiones del plásmido p18GFP y sus derivados se llevaron a cabo empleando el enzima de restricción *Bam*HI e incubando la mezcla de reacción durante 3 horas a 37°C (temperatura óptima del enzima), mientras que para las restricciones de ADN total se realizaron restricciones parciales para lo que se emplearon diluciones seriadas del enzima de restricción *Sau*3AI y se incubaron las mezclas de reacción a 37°C durante 1 hora. Trascurrido el tiempo de reacción los enzimas se inactivaron por calor incubándolas a 65°C durante 20 minutos.

3.5.1.7 Desfosforilación de ADN plasmídico con fosfatasa alcalina

Con objeto de aumentar la eficiencia de clonación, rutinariamente se desfosforiló el ADN del vector linearizado con fosfatasa alcalina de gamba ártica (USB. Amersham, ref. 70092). Para ello el ADN ya digerido con enzimas de restricción se mezcló con entre 0,1 y 5 unidades de fosfatasa alcalina de gamba ártica, por cada 1 pmol de extremos de ADN. Tras una incubación de 1 hora a 37°C la fosfatasa se inactivó por calor, con una incubación adicional de la reacción a 65°C durante 5 minutos.

3.5.1.8 Ligación de ADN

Para la ligación de moléculas de ADN se partió de fragmentos lineales obtenidos por digestión con enzimas de restricción en sitios compatibles para la ligación. El vector linearizado y el fragmento de ADN obtenido por digestión con uno o varios enzimas de restricción y purificado (empleando el QIAquick PCR Purification Kit para la purificación de ADN), se mezclaron en una proporción de al menos el doble de inserto que de vector a los que se añadió 0,1 volumen de tampón de ligación (suministrado por el fabricante) y 1U de ADN-ligasa (ligasa Roch ref. 62309) en un volumen final de 15 µl completados con H₂O. La mezcla se incubó a 14°C durante 8-14 horas, tras lo que se transfirió a la cepa receptora por el método de electroporación descrito anteriormente.

3.5.1.9 Conservación de la librería de clones

La librería obtenida se conservó en glicerol al 20% a -20°C, adicionando 350 µl de glicerol al 80% a 400 µl de la librería a conservar.

3.5.2 Electroforesis de ADN en geles de agarosa

La separación y visualización tanto de fragmentos de PCR, así como de ADN cromosómico se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa. Por cada 5 µl de muestra a analizar se añadió 1 µl de tampón de carga, y esta mezcla se depositó en un pocillo de gel de agarosa al 0,7% (p/v) en TAE 1x, sumergido en una cubeta con el mismo tampón. La separación se realizó por electroforesis horizontal sometida a un voltaje constante de 70 V durante 40 minutos aproximadamente. Las moléculas de ADN se tiñeron con bromuro de etidio, del que se añadió 0,5 µl (bromuro de etidio al 1% (p/v)) a 30 ml de solución de agarosa en TAE 1x, previamente fundida. El ADN se visualizó mediante exposición del gel a luz

ultravioleta (254 nm). El registro fotográfico se realizó con un equipo de documentación de imágenes Volver Lourmat, modelo DOC-print II.

3.5.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

3.5.3.1 PCR-16S

Este método se utilizó para la amplificación del gen ADNr 16S partiendo de ADN de las cepas obtenidas mediante la lisis celular y disueltas en agua bidestilada. Las condiciones de reacción de PCR se efectuaron en un volumen final de 50 µl. Las condiciones de reacción, perfil de temperaturas y ciclos han sido descritos por Vinuesa y colaboradores (1998). Las reacciones se efectuaron utilizando 80 ng de ADN molde; 5 µl de tampón de PCR 10x y 3 µl MgCl₂ 25 mM (suministrado con la enzima Taq ADN polimerasa); 200 µM de cada uno de los desoxinucleótidos dATP, dGTP, dCTP y dTTP; 50-100 pmoles de cada uno de los cebadores; 0,5 U/100 µl de Taq ADN-polimerasa. Los cebadores se describen en la **Tabla 3.6**.

Tabla 3.6. Lista de los cebadores empleados en este estudio. Oligonucleótidos usados en la amplificación y la secuenciación del gen ADNr 16 S y los oligonucleótidos diseñados y usados en la amplificación y la secuenciación del gen que codifica para la expresión de la enzima catecol 2,3 dioxigenasa.

Cebador	Secuencia 5' → 3'	Referencia
fD ₁	CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	
rD ₁	GGCTGGATCACCTCCTTAAGCTTGGATCCCGGG	Weisburg y col., 1991
fD ₂	GTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC	
rD ₂	GGATTAGATACCCTGGTAGTC	
UP-F1	GTTTCCCAGTCACGAC	
RV	AACAGCTATGACCATG	(Lobet y col., 1989)
UP-F'2	CAGTGAAGAGTTCTTC	Cebador de 16 mer diseñado en este estudio

Las condiciones estándar para la reacción de amplificación fueron las siguientes: Fase de inicialización a 95°C durante 3 minutos, que fue seguida por 25 ciclos compuestos de fase de desnaturalización (30 segundos a 95°C), fase de hibridación con los cebadores (30 segundos a 56°C), y fase de elongación (2 minutos a 72°C). Finalmente se incluyó un paso de 10 minutos a 72°C para terminar de extender posibles cadenas incompletas. La conservación del producto de PCR en el termociclador Bioer xP ciclop® se realizó a 10°C, por tiempo indefinido. (**Figura 3.2**).

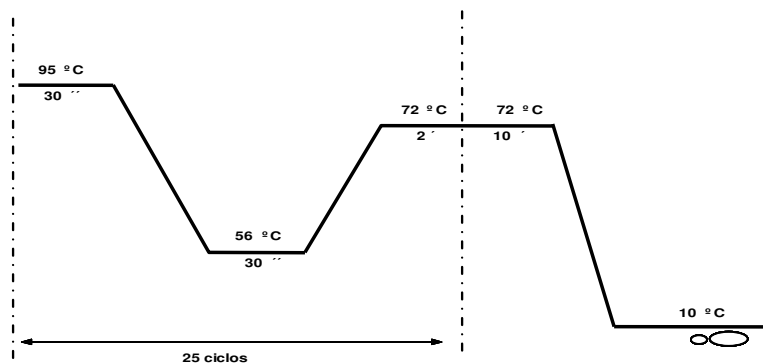


Figura 3.2. Esquema de la reacción de PCR-16S. Condiciones de amplificación del gen que codifica ADNr 16S.

Tras la reacción de PCR-16S se tomaron fracciones de alícuotas de 5 μ l para su electroforesis en gel de agarosa al 0,7%, con el objetivo de comprobar la presencia de bandas amplificadas del tamaño esperado (1,5 – 1,6 kb).

3.5.3.2 PCR-GFP

La amplificación del promotor del gen que codifica la expresión de la enzima catecol 2,3 dioxigenasa para la degradación de catecol, se realizó mediante una reacción de polimerización denominada PCR-GFP. Las reacciones de PCR se efectuaron de forma análoga a la descrita en el apartado anterior utilizando los cebadores UP-F1, RV y UP-F'2 (Tabla 3.6). El programa de PCR fue análogo al anteriormente descrito pero con una temperatura de hibridación de 43°C.

3.5.4 Purificación y secuenciación de fragmentos de ADN

Los productos de PCR se purificaron utilizando dos Kit comerciales. Para la purificación realizada directamente a partir del producto de PCR se empleó el Kit PCR QuiKClean (MBL), según las recomendaciones del fabricante. Mientras que para las bandas extraídas a partir del gel de agarosa, se empleó el Kit comercial QIAEX II Agarose Gel Extraction (QIAGEN®).

La secuenciación del producto final de PCR purificado se llevó a cabo en el servicio de secuenciación del Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra (C.S.I.C.) de Granada, utilizando un aparato Applied Biosystems (modelo 373 STRECHT). El método de secuenciación fue el comercializado por Perkin Elmer, ABI PRISM™ "Big Dye Terminators", que se basa en la reacción de extensión de la enzima AmpliTaq DNA polymerase (ref., 402122) y que emplea dideoxinucleótidos marcados con cromóforos

fluorescentes. Los oligonucleótidos empleados como iniciadores en la secuenciación, fueron los mismos cebadores usados en la reacción de amplificación.

3.5.5 Análisis filogenético

Los cromatogramas de las secuencias obtenidas fueron comprobados visualmente para corregir los posibles errores e indeterminaciones. Una vez inspeccionadas las secuencias, éstas se compararon con las secuencias de los genes ARNr 16S disponibles en la base de datos GenBank y EMBL obtenidas de la base del Centro Nacional para Información Biotecnológica (NCBI) usando el programa *BLASTsearch* (Altschul y col., 1990), cuyos resultados de similitud entre secuencias se basan en alineamientos locales de las mismas.

3.5.6 Construcción de árboles filogenéticos

Para establecer la relación filogenética procedimos en primer lugar al alineamiento múltiple de las secuencias de los genes ARNr 16S de los microorganismos objeto de estudio con las especies de referencia. Con este fin empleamos los programas informáticos Clustal_X (Thompson y col., 1997) y MEGA 4. (Kumar y col., 2004). El alineamiento obtenido por Clustal_X se utilizó en otro programa, MEGA 4, para generar el dendograma filogenético, tal y como propone Arahal y col. (2007), y la relación filogenética se estableció por la metodología de los “Vecinos próximos” más conocido como “Neighbour-Joining” (Nei y Kumar, 2000).

La consistencia de una determinada relación filogenética se evaluó, por un lado, por su permanencia independientemente del algoritmo usado (Chelo y col., 2007). Por otro lado, por el valor de replicas o “bootstrap” de la agrupación, mediante el cual se comprobó estadística y aleatoriamente si el orden en que se habían introducido las secuencias afectaba a las características del modelo empleado (Felsenstein, 1985). El valor de “bootstrap” fue calculado por el mismo programa MEGA 4 y se basó en 1000 réplicas.

3.6 Estudio fenotípico

Para realizar la caracterización metabólica de las cepas bacterianas objeto de estudio se utilizó el kit comercial Biolog MicroPlate™ Cat. No. 1014 empleando el GP2 MicroPlate™ para bacterias Gram positivas y el GN2 MicroPlate™ para las bacterias Gram negativas (**Figura 3.3**). Es un ensayo colorimétrico basado en la reducción del tetrazolium. Cada una de las microplacas incluye 95 fuentes de carbono, los metabolitos vienen ya depositados en la

microplaca (de A2 a H12) conteniendo cada pocillo una fuente de carbono distinta, siendo el pocillo A1 para el control.

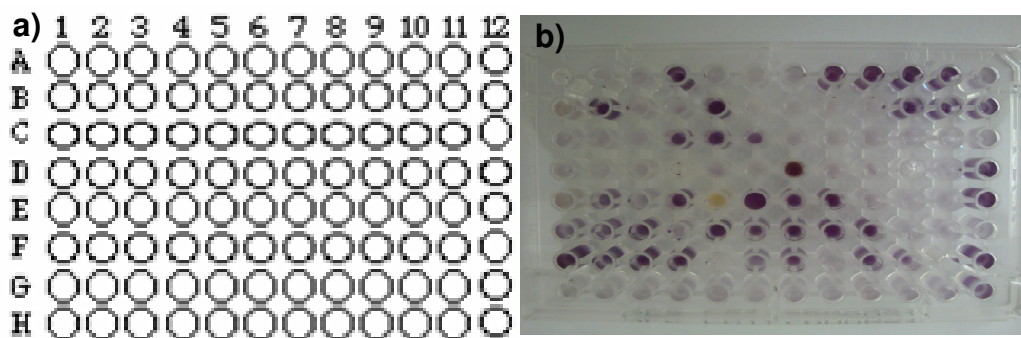


Figura 3.3. Microplacas MicroPlate™. (a) Microplacas GN2/GP2 empleadas en la cuantificación de la utilización de fuentes de carbono, (b) Fotografía de Microplaca con pocillos coloreados o no según el uso de la fuente de carbono, el cambio de coloración corresponde al uso de la fuente de carbono por el microorganismo.

Para preparar el inóculo y siguiendo las instrucciones del fabricante, se partió de un cultivo bacteriano en MY3% durante 12-16 horas, del cual se tomó una cantidad aproximada de 30 mg evitando arrastrar el agar del medio. Se resuspendió la masa celular en 15 ml de la solución GN/GP-IF proa. No. 72101, y se le adicionó 3 gotas de una suspensión concentrada de tioglicolato. Tras esto se ajustó la suspensión a un valor de transmitancia de $20\% \pm 2\%$. El tioglicolato actúa disminuyendo la producción de cápsulas para que las cepas bacterianas den patrones más consistentes. Una vez alcanzada dicha transmitancia se depositaron 150 μ l de la suspensión bacteriana en cada pocillo y se incubaron las placas a 28°C durante 24 horas. Transcurrido este periodo de incubación se procedió a la lectura de los resultados utilizando un lector de fluorescencia en microplacas BMG, modelo Fluostar Óptima a la longitud de onda de 585 nm, a las 24 horas. Los resultados de las cepas Tipo empleadas en este estudio fueron obtenidos a partir de la base de datos del Biolog™.

3.6.1 Metabolitos para microorganismos Gram positivos

Los metabolitos que constituyen la microplaca GP2 utilizada para los microorganismos Gram positivos son: α -ciclodextrina (A2), β -ciclodextrina (A3), dextrina (A4), glucógeno (A5), inulina (A6), manano (A7), tween 40 (A8), tween 80 (A9), N-acetil-D-glucosamina (A10), N-acetil-D-manosamina (A11), amigladina (A12), L-arabinosa (B1), D-arabitol (B2), D-arbutina (B3), D-celobiosa (B4), D-fructosa (B5), L-fructosa (B6), D-galactosa (B7), ácido D-galacturónico (B8), gentibiosa (B9), ácido D-glucónico (B10), α -D glucosa (B11),

m-inositol (B12), α -D-lactosa (C1), lactulosa (C2), maltosa (C3), maltotriosa (C4), D-manitol (C5), D-manosa (C6), D-melezitosa (C7), D-melibiosa (C8), α -metil D-galactosidasa (C9), β -metil D-galactosidasa (C10), 3-metil glucosa (C11), α -metil D-glucósida (C12), β -metil D-glucosida (D1), α -metil D-manosida (D2), palatinosa (D3), D-psicosa (D4), D-rafinosa (D5), L-ramnosa (D6), D-ribosa (D7), salicina (D8), pseudoheptulosa (D9), D-sorbitol (D10) estaquirosa (D11), sacarosa (D12), D-tagatosa (E1), D-trehalosa (E2), turanosa (E3), xilitol (E4), D-xilosa (E5), ácido acético (E6), ácido α -hidroxibutírico (E7), ácido β -hidroxibutírico (E8), ácido γ -hidroxibutírico (E9), ácido ρ -hidroxibutírico (E10), α -cetoglutárico (E11), ácido α -cetovalérico (E12), lactamida (F1), ácido metil éster D-láctico (F2), ácido L-láctico (F3), ácido D-málico (F4), ácido L-málico (F5), metil piruvato (F6), mono metil succinato (F7), ácido propiónico (F8), ácido pirúvico (F9), ácido succinámico (F10), ácido succínico (F11), ácido N-acetil-L-glutámico (F12), L-alaninamida (G1), D-alanina (G2), L-alanina (G3), L-alanil glicina (G4), L-asparagina (G5), ácido L-glutámico (G6), ácido glicil L-glutámico (G7), ácido L-proglutámico (G8), L-serina (G9), putrescina (G10), 2,3-butanadiol (G11), glicerol (G12), adenosina (H1), 2'-deoadenosina (H2), inopina (H3), timidina (H4), uridina (H5), adenosina 5'-monofosfato (H6), timidina-5'-monofosfato (H7), uridina 5'-monofosfato (H8), fructosa-6-fosfato (H9), glucosa-1-fosfato (H10), glucosa-6-fosfato (H11), D-L- α -glicerolfosfato (H12).

3.6.2 Metabolitos para microorganismos Gram negativos

La fuente de carbono que ocupa cada uno de los 95 pocillos de la microplaca GN2 son: α -ciclodextrina (A2), dextrina (A3), glucógeno (A4), tween 40 (A5), tween 80 (A6), N-acetil-D-galactosamina (A7), N-acetil-D-glucosamina (A8), adonitol (A9), L-arabinosa (A10), D-arabitol (A11), D-celobiosa (A12), eritritol (B1), D-fructosa (B2), L-fructosa (B3), D-galactosa (B4), gentibiosa (B5), α -D-glucosa (B6), m-inositol (B7), α -D-lactosa (B8), lactulosa (B9), maltosa (B10), manitol (B11), D-manosa (B12), D-melibiosa (C1), β -metil D-glucósida (C2), D-psicosa (C3), D-rafinosa (C4), L-ramnosa (C5), D-sorbitol (C6), sacarosa (C7), D-trehalosa (C8), turanosa (C9), xilitol (C10), ácido pirúvico metil éster (C11), ácido succínico mono-metil-éster (C12), ácido acético (D1), Cis-ácido aconítico (D2), ácido cítrico (D3), ácido fórmico (D4), ácido D-galactónico lactona (D5), ácido D-galacturónico (D6), ácido D-glucónico (D7), ácido D-glucosamínico (D8), ácido D-glucurínico (D9), ácido α -hidroxibutírico (D10), ácido β -hidroxibutírico (D11), ácido γ -hidroxibutírico (D12), ácido *p*-hidroxifenilacético (E1), ácido itacónico (E2), ácido α -ceto butírico (E3), ácido α -ceto glutarico

(E4), ácido α -ceto valérico (E5), ácido D,L- láctico (E6), ácido malónico (E7), ácido propiónico (E8), ácido quínico (E9), ácido D-sacárico (E10), ácido sebácico (E11), ácido succínico (E12), ácido bromosuccínico (F1), ácido succinámico (F2), glucoronamida (F3), L-alaninamida (F4), D-alanina (F5), L-alanina (F6), L-alanil-glicina (F7), L-aspargina (F8), ácido L-aspártico (F9), ácido glutámico (F10), ácido glicil-L- aspártico (F11), ácido glicil-L- glutámico (F12), L-histidina (G1), hidroxil-L-prolina (G2), L-leucina (G3), L-ornitina (G4), L-fenilalanina (G5), L-prolina (G6), ácido L- piroglutámico (G7), D-serina (G8), L-serina (G9), L-treonina (G10), D,L-carnitina (G11), γ -ácido amino butírico (G12), ácido urocánico (H1), inosina (H2), uridina (H3), timidina (H4), fenil-etil-amino (H5), putrescina (H6), 2-aminoetanol (H7), 2,3-butanediol (H8), glicerol (H9), D, L- α -fosfato glicerol (H10), α -D-glucosa 1-fosfato (H11), D-glucosa-6-fosfato (H12).

3.7 Estudio del espectro-salino y crecimiento en salinidad

El efecto de la concentración salina sobre el crecimiento microbiano se determinó en un rango de salinidad comprendido entre 0,5 y 30% (p/v) de sales (0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 10; 15; 20; 25 y 30% (p/v)). Para ello, se inoculó 1 ml de cultivo de 18 horas de cada una de las cepas objeto de estudio a 100 ml de medio líquido MY a la concentración de sal a estudiar, en matraz Erlenmeyer de 250 ml. Los matraces se incubaron a 28°C durante 72 horas con agitación constante de 100 rpm.

3.8 Producción de exopolisacáridos (EPS)

Los exopolisacáridos, recibieron como denominación las mismas siglas que los microorganismos que los producen, y se obtuvieron según la metodología descrita por Calvo y col. (2002). La producción de EPS se realizó en medio MY a aquellas concentraciones salinas a las que el microorganismo objeto de estudio presentó un crecimiento óptimo. Matraces Erlenmeyer de 500 ml que contenían 100 ml de medio MY fueron inoculados con 1 ml de un cultivo de 18 horas de cada una de las cepas a estudiar. Posteriormente los matraces fueron incubados a 28°C con agitación constante a 100 rpm., durante 7, 15, 21 y 30 días. Transcurrido el tiempo de incubación, los cultivos bacterianos se centrifugaron a 9.000 rpm durante 45 minutos (Centrifuga Beckman Avanti-J25). Al sobrenadante se le adicionaron tres volúmenes de etanol 96 % (v/v) frío (-80°C) y tras 24 horas se recogió el precipitado del material extracelular (EPS) mediante centrifugación a 7.500 rpm durante 15 minutos a 4°C

con el fin de eliminar los restos del alcohol. A continuación, se dejaron evaporar totalmente los posibles restos de etanol en el precipitado y este se solubilizó en agua destilada. Posteriormente, la solución se dializó empleando membranas de diálisis Midicell de 12-14 kDa de tamaño de poro durante 24 horas en agua destilada y por último, se liofilizó y se determinó la producción por gravimetría (Figura 3.4).

La productividad de cada cepa se expresó en gramos de EPS (producto final liofilizado) por litro de medio de cultivo.

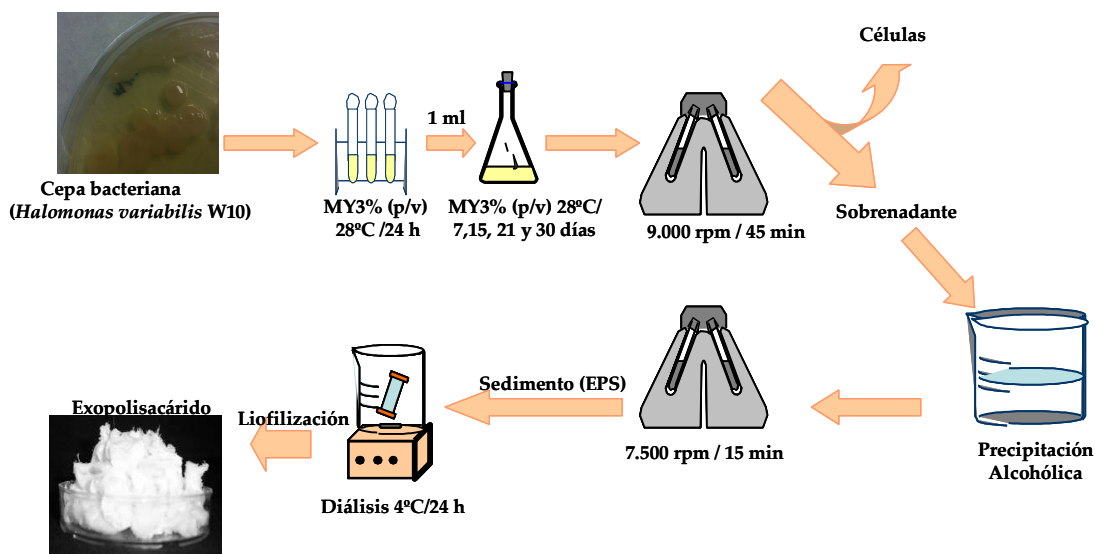


Figura 3.4. Esquema del proceso de extracción de los exopolisacáridos (EPS). Se muestran las distintas fases para el proceso de purificación.

3.8.1 Composición química de los EPS: Análisis colorimétrico

Los exopolisacáridos de las distintas cepas objeto de estudio, obtenidos bajo las condiciones de producción anteriormente citadas, fueron analizados químicamente. Estos estudios se llevaron a cabo mediante ensayos colorimétricos utilizando un espectrofotómetro HITACHI U-2000.

3.8.1.1 Contenido en carbohidratos totales

La determinación del contenido de carbohidratos totales se realizó siguiendo la metodología descrita por Dubois y col (1956). Este método se basa en la presencia de ésteres metílicos en los mono, oligo, y polisacáridos así como en sus derivados, los cuales son grupos potencialmente reductores que dan una coloración amarillo-anaranjada estable cuando se tratan con fenol y ácido sulfúrico. El ácido sulfúrico provoca la hidrólisis del polisacárido de modo que al quedar los monómeros libres reaccionan con el fenol y se obtiene la coloración que servirá para la cuantificación de los carbohidratos presentes en la muestra.

Los reactivos utilizados fueron:

- Ácido sulfúrico de pureza 95-98 % (v/v) (Panreac)
- Solución de fenol en agua al 5 % (p/v) (Sigma).

Así, a partir de una suspensión de 1 mg/ml de exopolisacárido en agua destilada, se tomaron 30 μ l y se completó hasta 200 μ l con agua destilada. A esta mezcla se adicionaron 200 μ l de fenol al 5 %, se agitó vigorosamente y se añadió bruscamente 1 ml de ácido sulfúrico, con objeto de que la solución entrara en ebullición para que la reacción transcurriera correctamente. Tras 10 minutos de incubación a temperatura ambiente se registró la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 490 nm. La curva patrón (Figura 3.5) se preparó a partir de una solución de glucosa (Sigma®) en agua destilada a concentración de 1 mg/ml a partir de la cual se realizaron una serie de diluciones (Tabla 3.7).

Tabla 3.7. Composición de las soluciones de la curva patrón de carbohidratos.

Tubo	1	2	3	4	Blanco
Solución madre (μ l)	10	15	20	30	0
Agua destilada (μ l) (p/v)	190	185	180	170	200
Fenol 5% (μ l) (p/v)	200	200	200	200	200
Ácido sulfúrico (ml)	1	1	1	1	1

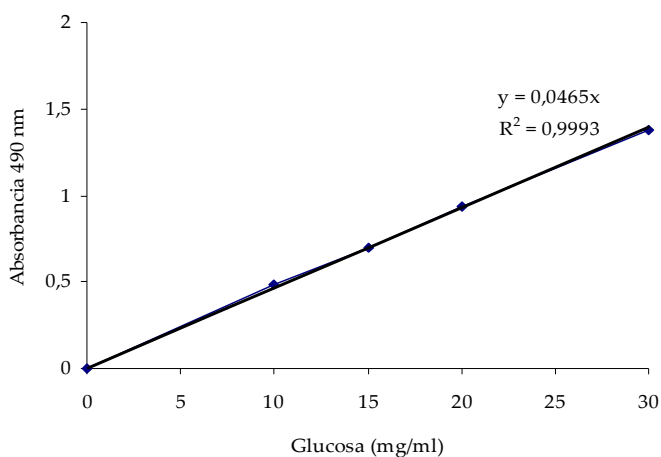


Figura 3.5. Representación de una de las curvas patrón de carbohidratos totales. En ordenadas se representa la absorbancia a 490 nm de 4 concentraciones distintas de Glucosa sometidas al ensayo con fenol y ácido sulfúrico.

3.8.1.2 Contenido en proteínas

Para la determinación del contenido en proteínas se siguió la metodología descrita por Bradford (1976), esta técnica está basada en la formación de un compuesto azulado

debido a la formación de un complejo entre proteínas y el reactivo colorante “Azul de coomassie”. Se trata de un método más sensible que el tradicional de Lowry (Lowry y col., 1951) que permite detectar pequeñas cantidades de proteínas. El reactivo utilizado fue: Reactivo de Bradford o Azul de coomassie (coomassie Brilliant Blue 250) (Sigma®).

Técnicamente se partió de una suspensión de 1 mg/ml de exopolisacárido en agua destilada, se tomaron 200 µl y se completaron hasta 800 µl con agua destilada. A esta solución se le añadieron 250 µl del reactivo de Bradford, agitando la muestra vigorosamente para finalmente medir la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 590 nm. El reactivo empleado origina una coloración azul con las proteínas que permanece estable al menos durante una hora, a partir de la cual el complejo tiende a agregarse pudiendo aparecer un precipitado que provoca la alteración de las medidas, Así, para mayor precisión de la determinación, la medida de absorbancia de las muestras debe realizarse entre 5 y 20 minutos siguientes de la adición del reactivo.

Se preparó una solución de 1 mg/ml de albúmina sérica bovina (Sigma®) (Tabla 3.8), a partir de la cual se realizó una dilución de 1/10 (100 mg/ml) que constituyó la solución madre para llevar a cabo la curva patrón (Figura 3.6).

Tabla 3.8. Composición de las soluciones de la curva patrón de proteínas.

Tubo	1	2	3	4	5	Blanco
Solución madre (µl)	20	30	50	70	80	0
Agua destilada (µl)	780	770	750	730	720	800
Reactivo Bradford (µl)	200	200	200	200	200	200

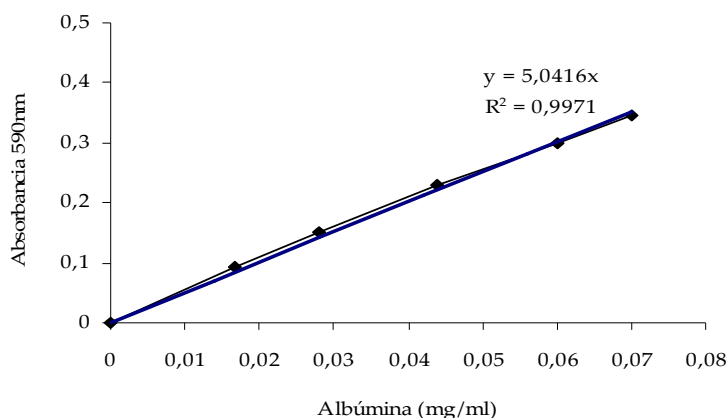


Figura 3.6. Representación de una de las curvas patrón de proteínas. En ordenadas se representa la absorbancia a 590 nm de 6 concentraciones distintas de albúmina sometidas al ensayo de Bradford.

3.8.2 Actividad emulgente

Para determinar la actividad emulgente del material extracelular se siguió la metodología descrita por Cooper y Goldenberg (1987). En el ensayo se utilizaron tubos con fondo plano, en los que se dispusieron 3 ml de la fase oleosa y 3 ml de la fase acuosa, que consiste en una preparación del biopolímero al 0,5 % (p/v). El ensayo se llevó a cabo a temperatura ambiente, y las sustancias hidrófobas estudiadas fueron:

- Hidrocarburos alifáticos: n-octano
- Hidrocarburos aromáticos: tolueno y xileno
- Aceites minerales: ligero y pesado.
- Mezclas complejas: crudo Kirkuk (Repsol)
- Mezclas de compuestos derivados del petróleo: Diesel

Para la determinación del porcentaje de emulsión, los tubos se agitaron vigorosamente durante un minuto en vortex para poner en contacto ambas fases, acuosa y oleosa. Tras la agitación las muestras se dejaron reposar, tomándose las medidas del porcentaje de la fase emulsionada a la hora y a las 24 horas, para determinar la actividad emulgente y la estabilidad de las preparaciones. La actividad emulgente representa la fracción emulsionada (la altura de la misma) respecto al volumen total de la muestra (altura en el tubo).

$$\% \text{ Actividad emulgente} = \frac{\text{Altura emulsión}}{\text{Altura mezcla}} \times 100$$

3.9 Degradación de hidrocarburos

3.9.1 Crecimiento en medio sólido con HPA

Para determinar el crecimiento de las cepas seleccionadas en presencia de HPA. Se utilizó el medio S4 suplementado del HPA al 1% (p/v), la composición del medio se describió anteriormente en *el apartado 3.2* de esta sección (**Tabla 3.4**). Para ello se partió de un cultivo bacteriano de 18 horas en el medio MY 3%, del cual se tomó una cantidad de la masa celular aproximada de 30 mg, y se resembró por triplicado en placas del medio S4 adicionado de naftaleno, fenantreno, antraceno o pireno al 1% (p/v). Las placas se incubaron a 28°C durante 48 horas, la aparición de colonias en la superficie del agar se evaluó como resultado positivo.

3.9.2 Crecimiento en medio líquido con naftaleno

La evaluación de la capacidad de utilización de naftaleno como única fuente de carbono por las 18 cepas seleccionadas se llevó a cabo siguiendo la metodología propuesta por Soeder y col (1996). Para la elaboración del medio mínimo marino sintético (MMS), cuya composición se ha descrito en *el apartado 3.2* de esta sección, se utilizó una solución stock de sales, de composición similar a la del agua del mar que se emplea de forma habitual en los estudios de bacterias marinas y halófilas, a una concentración del 1% (p/v) suplementada con NH_4NO_3 (Merk®) y Na_2HPO_4 (Merk®) para adecuar la relación C/N/P. La concentración de sal seleccionada fue del 1% (p/v) para evitar acumulaciones de sales que se puedan originar a nivel de la columna del cromatógrafo HP1050. Para ello, se utilizaron matraces Erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de medio mínimo marino sintético (MMS) que fueron inoculados con 0,5 ml de un cultivo de 18 horas (28°C, 100 rpm) de cada una de las cepas a estudiar, el naftaleno (HPA) se adicionó a una concentración de 1% (p/v) y los matraces Erlenmeyer se incubaron a 28°C con agitación constante de 100 rpm durante 72 horas. Los recuentos de microorganismos junto con las extracciones del naftaleno se realizaron, por triplicado, a las 0, 24, 48 y 72 horas. Para el recuento microbiano, se tomaron 0,1 ml de cada erlenmeyer y se sembró en placas de MY al 1% (p/v) de sales, las placas se incubaron a 28°C durante 48 horas.

3.9.2.1 Determinación de la cantidad óptima del disolvente para la extracción de naftaleno

El disolvente utilizado para la extracción de naftaleno en el medio mínimo marino sintético (MMS) al 1% de sales (p/v) fue metanol (calidad HPLC). Para la determinación de la cantidad óptima del mismo para la obtención del mayor rendimiento de extracción del hidrocarburo policíclico aromático (HPA) se utilizaron cantidades crecientes de disolvente en 50 ml de medio MMS al 1% (p/v) de sales y adicionado de naftaleno al 1 % (p/v). Las cantidades de metanol empleadas fueron: 25, 50, 75, 100, 150 y 175 ml. Los valores obtenidos se muestran en la **Figura 3.7**. Tras el estudio de los resultados obtenidos, se consideró la adición de 150 ml de metanol (disolvente) como cantidad óptima para realizar las extracciones del hidrocarburo.

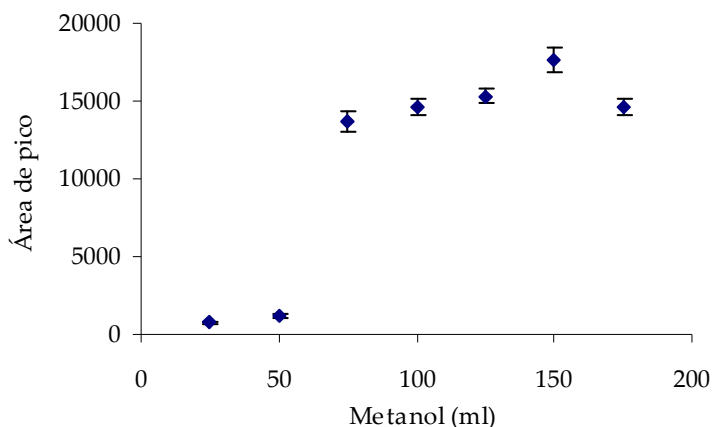


Figura 3.7. Cantidades de metanol adicionadas para una mayor extracción de naftaleno. Valores obtenidos mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

3.9.2.2 Curva patrón de naftaleno

Para la determinación cuantitativa de la concentración de naftaleno se elaboró una curva patrón a partir de soluciones de naftaleno en el medio MMS a las concentraciones de 0,05%; 0,125%; 0,25%; 0,5%; 0,75% y 1% (p/v).

La ecuación de la recta a partir de la cual se han interpolado los datos de este trabajo fue: $y=17459x$, siendo x la concentración de naftaleno expresada por los valores de las áreas obtenidas al someter las muestras a HPLC (**Figura 3.8**).

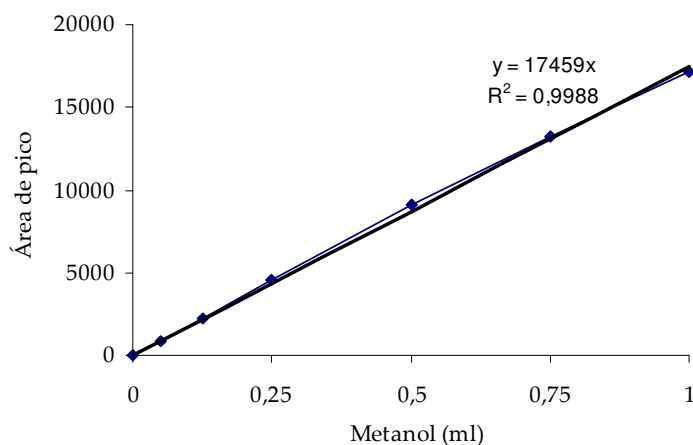


Figura 3.8. Representación de una de las curvas patrón de naftaleno. Valores obtenidos mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

3.9.2.3 Extracción y cuantificación de naftaleno

La determinación de la cantidad de naftaleno utilizada por los microorganismos seleccionados se realizó por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC), en un cromatógrafo HP1050 dotado de una columna de fase reversa C-18 Spherisob ODS-1 (125 x

4mm) y un detector diode array (DAD) (**Figura 3.9**). Como fase móvil se utilizó acetonitrilo 80% y agua bidestilada 20% mediante un flujo isocrático de 1 ml/min.



Figura 3.9. Fotografía de un cromatógrafo HP-1050.

Para realizar la extracción, se adicionaron 150 ml de metanol al matraz con 50 ml de cultivo, el conjunto se sometió a ultrasonidos durante 15 minutos para facilitar la solubilización del hidrocarburo. A continuación se centrifugaron durante 30 minutos a 6.000 rpm, tras lo que se tomó 1 ml del sobrenadante para el estudio en HPLC. Posteriormente se analizaron las áreas de los distintos picos obtenidos en los cromatogramas, tras su integración. La degradación del hidrocarburo policíclico aromático se determinó en base a la disminución producida en las áreas de los picos a los diferentes tiempos de incubación.

3.9.3 Crecimiento en presencia de crudo Kirkuk

Para evaluar la influencia de las mezclas complejas de hidrocarburos se determinó el efecto de crudo sobre el crecimiento microbiano siguiendo la metodología descrita por Déziel y colaboradores (1996). El crudo utilizado fue de tipo "Kirkuk", suministrado por la refinería Repsol de Puertollano (Ciudad Real), cuyas características más relevantes se presentan en la **Tabla 3.9**.

Tabla 3.9. Características más relevantes del crudo Kirkuk

Densidad 15 °C	0,848 g/ml
Viscosidad 20 °C	10,05 CST
Punto de congelación	-20 °C
Tipo	Parafinico
Procedencia	Irak

Para el estudio de la capacidad degradadora del crudo Kirkuk por las 18 cepas seleccionadas se empleó el medio MMS al 1% (p/v) de sales, para ello, se añadieron 100 ml de medio MMS al 1% de sales en matraces Erlenmeyer de 500 ml. A cada matraz se le adicionó

el crudo a una concentración del 1% (v/v). Los matraces se inocularon con 1 ml de un preinóculo de 18 horas de cada una de las cepas objeto de estudio en medio MY 1%. Los matraces Erlenmeyer se incubaron durante 15 días a 28°C con agitación constante de 100 rpm. Los recuentos de las unidades formadoras de colonias se realizaron por triplicado en placas de MY 1% a las 0h, 24h, 48h, 72h, 7 días y 15 días, y la extracción del crudo se realizó a tiempo inicial (0 horas) y tiempo final (15 días).

3.9.3.1 Extracción de crudo

La extracción de crudo se realizó empleando la mezcla hexano-acetona (1:1) siguiendo la metodología EPA 8015 (US EPA, 1996). La primera etapa consistió en la adición de 50 ml de la mezcla Hexano-Acetona (1:1) al matraz que contenía el cultivo en presencia de crudo que a continuación fue sometido a agitación durante 5 minutos, la segunda etapa consistió en la decantación de la mezcla mediante embudo de decantación para facilitar la separación de las dos fases oleosa y acuosa. El procedimiento se repitió un par de veces para extraer el resto de hidrocarburos que quedaba adherido a las paredes del matraz. Así, se recuperó la fase oleosa en matraces de bola y se llevó a un rotavapor a una temperatura de 50°C con agitación constante de 90 rpm. Por último se recuperó el crudo con 1 ml de cloroformo en un vial para su posterior análisis por Cromatografía de Gases/Espectrofotometría de Masas (GC/MS).

3.9.3.2 Determinación del contenido en hidrocarburos totales (TPH)

La determinación de hidrocarburos alifáticos, alicíclicos, bencénicos y policíclicos aromáticos se realizó mediante GC/MS con previa extracción con Hexano-Acetona y Cloroformo. Los análisis se realizaron en un cromatógrafo Hewlett Packard 6890, Espectrofotómetro de Masas Hewlett Packard HP 5973, utilizando una librería de espectros: Wiley 275. Las variaciones en la composición del hidrocarburo se establecieron en términos de variación del área respecto al experimento control.

3.10 Ensayo catecol-dioxigenasa

Las enzimas catecol-dioxigenasas catalizan la transformación de catecol a ácido cis, cis-mucónico de color amarillo. Para determinar si esta enzima estaba implicada en el metabolismo del naftaleno se siguió la metodología descrita por Patil y col (2004). Para este

ensayo se pulverizaron las placas con una solución de catecol a 0,5 M. Se seleccionaron como positivas aquellas colonias que mostraron un cambio de coloración hacia el amarillo-marrón después de 5 minutos. Posteriormente, en placa con medio TSA adicionado de Amp¹⁰⁰, se sembró la colonia que reaccionó con la solución de catecol debido a la expresión de la enzima catecol 2,3 dioxigenasa la placa sembrada a continuación se incubó a 37°C durante 24 horas.

3.11 Programas estadístico empleados

Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente, empleando los programas estadísticos: CANOCO 4,5, Primer 6 y SPSS15.0 para Windows. Los análisis realizado mediante estos programas estadísticos consistieron por una parte en calcular la media de las tres replicas analizadas y obtener su desviación estándar para todos los parámetros estudiados y por otra parte obtener comparaciones entre los distintos resultados obtenidos mediante conglomerados jerárquicos y los análisis multivariable de redundancia (RDA). Con cada uno de los tres programas estadísticos se realizaron los siguientes análisis:

❖ SPSS15.0 para Windows

- Cálculo de la media de las tres replicas de todos los parámetros estudiados.
- Test de DHS de Tukey entre las medias para la determinar las comparaciones múltiples de los parámetros estudiados así como determinar la influencia de los factores de variación en los análisis.

❖ CANOCO 4,5

- Análisis multivariable de redundancia (RDA) que permitió explicar de forma general los resultados obtenidos utilizando más de una variable independiente.

❖ Primer 6

- Análisis de los resultados obtenidos mediante un estudio multivariante y multidimensional que permite visualizar como se agrupan los diferentes variables dependientes de los parámetros estudiados.



4. RESULTADOS

4.1 CAPÍTULO I. CARACTERIZACIÓN FILOGENÉTICA Y FENOTÍPICA DE LAS CEPAS

La biorremediación de hidrocarburos es una de las líneas de investigación abordada por el grupo de Microbiología Ambiental de la UGR desde hace más de 10 años. En estos estudios y de forma rutinaria se realiza el aislamiento de cepas bacterianas potencialmente útiles para su aplicación biotecnológica en la recuperación de ecosistemas contaminados. En este sentido, la selección de las mismas se hizo de acuerdo con su capacidad para proliferar en presencia de diferentes hidrocarburos y para producir biopolímeros con actividad emulgente y/o biosurfactante, ya que, los microorganismos que son capaces de proliferar en presencia de hidrocarburos, frecuentemente producen biopolímeros con actividad emulgente, esta propiedad se atribuye a una estrategia biológica para facilitar la biodisponibilidad de compuestos hidrofóbicos. En este trabajo de investigación se han caracterizado 18 cepas bacterianas que habían sido seleccionadas en estudios previos por su capacidad para crecer en medios con hidrocarburos y/o producir exopolisacáridos con actividad emulgente, tal y como se ha mencionado anteriormente en *el apartado 3.1* de la sección de *Material y Métodos*.

4.1.1 Caracterización filogenética de las cepas

4.1.1.1 Identificación filogenética de las cepas seleccionadas

La amplificación del gen ARNr 16S se realizó siguiendo el protocolo mencionado en *el apartado material y métodos* para todas las cepas estudiadas en la presente memoria de tesis doctoral. Los resultados de la PCR y la electroforesis del ADN bacteriano se muestran en la **Figura 4.1**.

Como se puede apreciar en la **Figura 4.1**, la amplificación del ADNr 16S de las cepas originó fragmentos de ADN de aproximadamente 1.400-1.500 pb en consonancia con el tamaño esperado de 1.500 pb, estas reacciones se purificaron mediante el Kit comercial PCR Quick Clean (QIAGEN®) para las cepas W1, F2, W3, W4, W7, W12, W16, W18, F20, S21, S22, S24 y S27 y el kit comercial QIAEX II Agarose Gel Extraction (QIAGEN®) para las cepas W5, W8, W10, W15 y F17, el producto de PCR purificado fue secuenciado posteriormente.

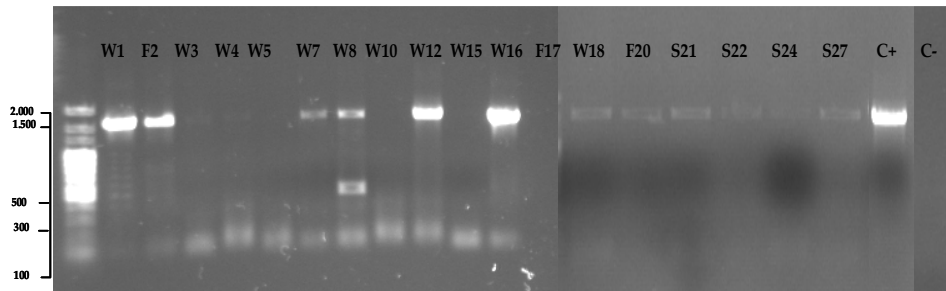


Figura 4.1. Producto de reacción de PCR tras la amplificación del fragmento del gen ADNr 16S de 1.500 pb. (C-: control negativo; C+: control positivo (ADN genómico de *Escherichia coli*)).

Tras la búsqueda en la base de datos GenBank mediante programa BLASTX search, las bandas secuenciadas de las 18 cepas objeto de este estudio presentaron porcentajes de identidad generalmente del 99% con las secuencias de las especies de referencia, lo que indica que estamos trabajando con los datos adecuados para el posterior análisis filogenético. La **Tabla 4.1** recoge la identificación taxonómica y los porcentajes de identidad de cada cepa incluida en este estudio.

Tabla 4.1. Porcentaje de identidad y longitud de los fragmentos del gen ADNr 16S secuenciados

Cepas	Secuencia del gen 16S ARNr	Identidad (%)	Secuencia (pb)
W1	CP000485 <i>Bacillus thuringiensis</i>	99	1448
W15	GU980767 <i>Bacillus pumilus</i>	99	1480
W16	EU869282 <i>Bacillus pumilus</i>	99	1428
F17	GU980767 <i>Bacillus pumilus</i>	99	1480
F20	EU660365 <i>Bacillus pumilus</i>	99	1511
S22	EU221329 <i>Bacillus pumilus</i>	99	1549
S27	EU221329 <i>Bacillus pumilus</i>	99	1549
F2	EU086802 <i>Brevibacterium casei</i>	99	1448
W3	AJ564880 <i>Halomonas alkantarctica</i>	99	1518
W4	AJ294347 <i>Halomonas variabilis</i>	99	1352
W10	AJ294347 <i>Halomonas variabilis</i>	98	1352
W12	EU864257 <i>Halomonas</i> spp	98	1495
W5	EU864264 <i>Thalassospira</i> sp.	99	1463
W7	EU864264 <i>Thalassospira</i> sp.	99	1463
W8	EF685677 <i>Marinobacter</i> sp.	99	1459
W18	DQ665792 <i>Pseudoalteromonas elyakovii</i>	98	1361
S21	EF552157 <i>Pseudomonas fluorescens</i>	98	1423
S24	AF268029 <i>Pseudomonas grimontii</i>	99	1501

4.1.1.2 Estudio de la relación evolutiva entre las cepas seleccionadas

Para establecer las relaciones evolutivas entre los distintos microorganismos caracterizados en este trabajo de investigación, realizamos un breve estudio filogenético cuyos resultados se muestran en la **Figura 4.2**.

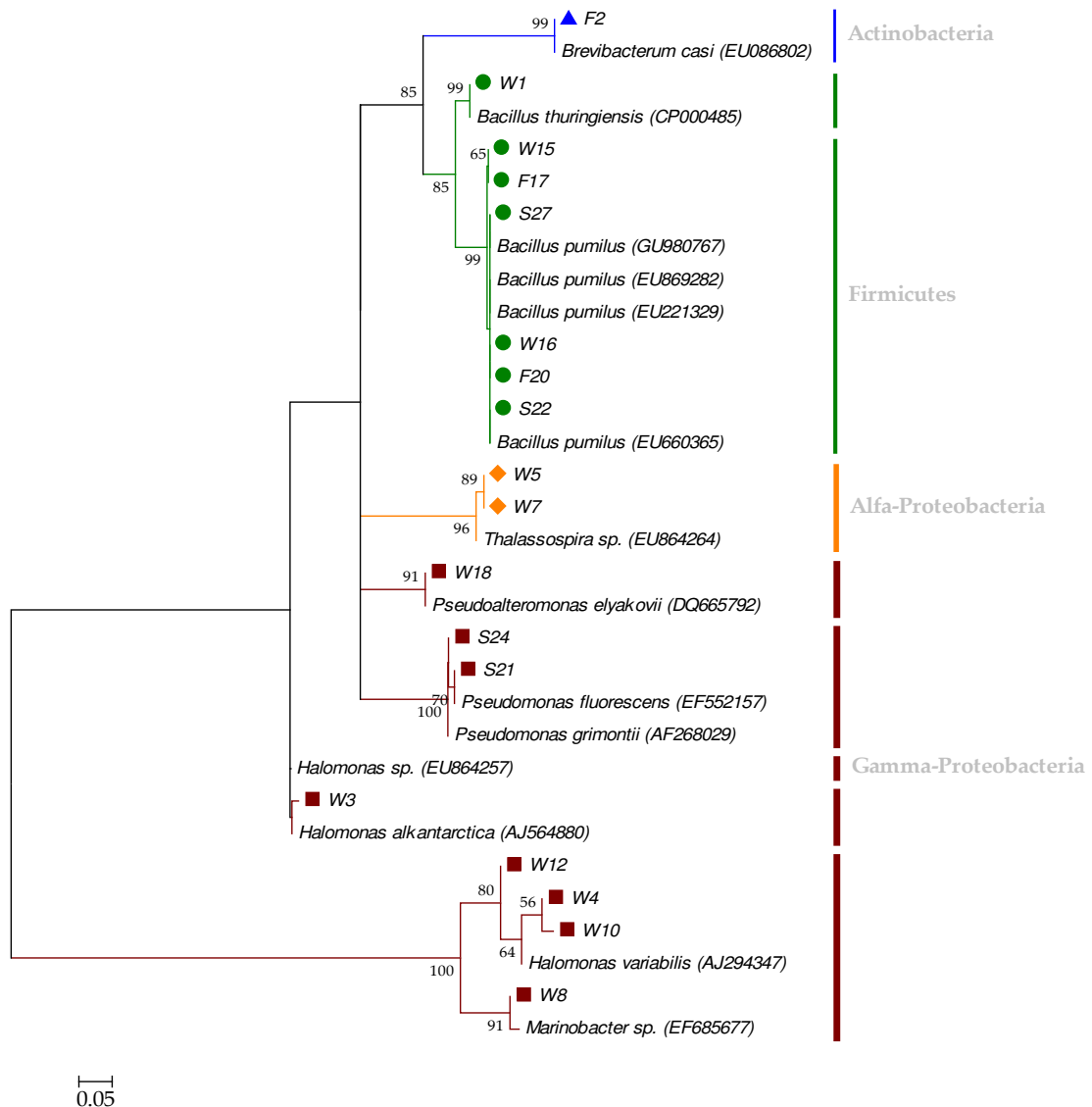


Figura 4.2. Árbol filogenético basado en la secuencia del gen ARNr 16S obtenido mediante el método Neighbour-Joining. Los números de acceso en la base de datos Gen Bank de las secuencias de las especies de referencia son dados entre paréntesis. La barra indica un 5% de divergencia. Se indican los valores de "bootstrap" mayores del 50%.

Basándonos en los resultados obtenidos, se puede observar que los microorganismos se encuadran en tres grupos taxonómicos: **i)** Firmicutes, **ii)** (α - y γ -) Proteobacteria y **iii)** Actinobacteria. El primer grupo incluyó siete cepas del género *Bacillus* incluyendo la cepa W1 identificada como *Bacillus thuringiensis* con 99% de identidad, y las

cepas W15, W16, F17, F20, S22 y S27 identificadas como *Bacillus pumilus* con 99% de identidad.

Por otra parte, dentro del grupo γ -proteobacteria, se identificaron 4 cepas pertenecientes al género *Halomonas*: W3 identificada como *Halomonas alkantarctica* con 99% de identidad, W4 y W10 como *Halomonas variabilis* con un porcentaje de identidad del 99% y 98%, respectivamente, y la cepa W12 que fue identificada como *Halomonas* sp. con un porcentaje de identidad del 98%. Asimismo, dentro de este grupo fueron incluidas las cepas W18 identificada como *Pseudoalteromonas elyakovii* con 98% de identidad, S21 clasificada como *Pseudomonas fluorescens* con 98% de identidad y S24 identificada como *Pseudomonas grimontii* con 99% de identidad y W8 identificada como *Marinobacter* sp. con 99% de identidad. Por otro lado, dentro del grupo α -proteobacteria se obtuvieron W5 y W7 identificadas como *Thalassospira* sp. con 99% de identidad. Por último, la cepa F2 fue identificada como *Brevibacterium casei* con 99% de identidad y perteneció al tercer grupo actinobacteria que incluye los microorganismos Gram positivos con alto G+C.

4.1.2 Caracterización fenotípica de las cepas

4.1.2.1 Utilización de metabolitos por las cepas seleccionadas

Durante este trabajo de investigación se realizó el estudio de la caracterización metabólica, tanto para los microorganismos Gram positivos como para aquellos Gram negativos incluidos en este estudio, frente a 95 fuentes de carbono utilizando el kit Biolog™ descrito anteriormente en *el apartado 3.6* de la sección de *Material y Métodos*. La interpretación de los resultados se realizó considerando como resultado positivo el cambio de coloración obtenida en cada pocillo de la microplaca GN2 y GP2 del sistema Biolog™, generado por los microorganismos Gram positivos y Gram negativos caracterizados. Los resultados del análisis colorimétrico basado en el uso del Kit comercial Biolog™, para las distintas cepas Gram positivas seleccionadas se reflejan en la **Tabla I, anexo I**. Estos datos indicaron que la cepa *Brevibacterium casei* F2 fue la única capaz de utilizar como fuente de carbono todos los compuestos ensayados. Por otro lado destacar que los compuestos α -D glucosa, Maltotriosa y D-ribosa fueron utilizados por las 8 cepas Gram positivas estudiadas.

Los compuestos utilizados por las bacterias Gram negativas como fuentes de carbono se resumen en la **Tabla II, anexo I**. Estos resultados mostraron la capacidad metabólica de las cepas Gram negativas seleccionadas en este estudio para utilizar los

distintos compuestos como fuente de carbono. Así, obtuvimos que de las 10 cepas Gram negativas ensayadas, solamente 2 de ellas (*Marinobacter* sp. W8 y *Pseudomonas fluorescens* S21) fueron capaces de utilizar todos los compuestos como fuente de carbono. De los resultados obtenidos cabe destacar el compuesto L-arabinosa que fue utilizado por todas las cepas Gram negativas seleccionadas.

4.1.2.2 Perfiles metabólicos obtenidos

Los patrones metabólicos para los microorganismos Gram positivos se obtuvieron a partir de la interpretación de la intensidad de la coloración obtenida en cada pocillo de la microplaca GP2, de la cual se realizaron las medidas de los niveles de coloración en un lector de placas de micro-titulación a una longitud de onda de 585 nm.

Las 7 cepas del género *Bacillus* (Figura 4.3) presentan un patrón metabólico homogéneo, dentro de los cuales se pudo diferenciar dos perfiles relativamente distintos: un primer perfil metabólico presentado por la cepa *Bacillus thuringiensis* W1 y el segundo perfil presentado por las cepas *Bacillus pumilus* W15, W16, F17, F20, S22 y S27.

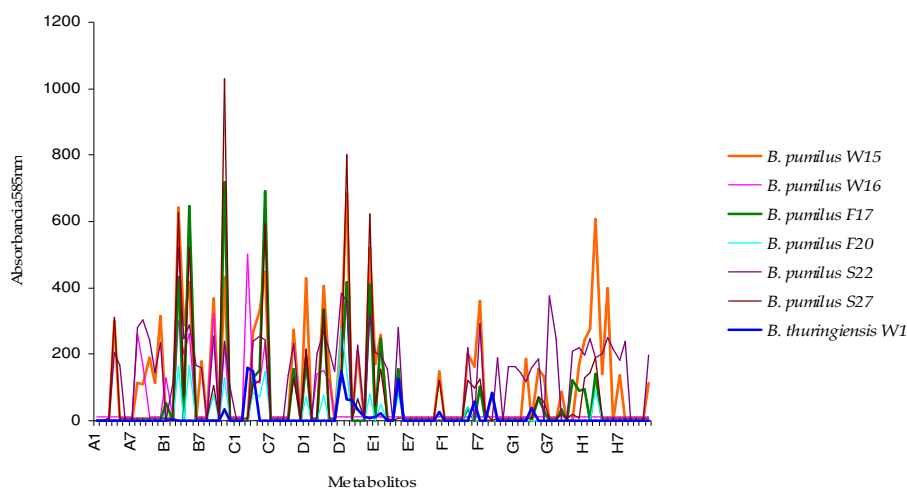


Figura 4.3. Patrón de absorbancia de las cepas W1, W15, W16, F17, F20, S22 y S27 del género *Bacillus*. Oxidación/fermentación de las distintas fuentes de carbono ensayadas en la microplaca GP2.

Por otra parte, dentro del mismo grupo de bacterias Gram positivas, la cepa *Brevibacterium casei* F2 (Figura 4.4) presentó un perfil metabólico totalmente distinto, ya que este microorganismo fue capaz de metabolizar todos los compuestos ensayados.

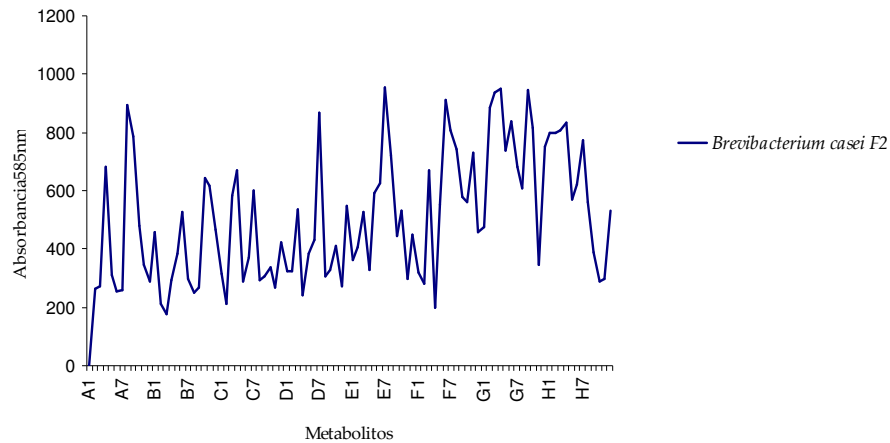


Figura 4.4. Patrón de absorbancia de la cepa F2 del género *Brevibacterium*. Oxidación/fermentación de las distintas fuentes de carbono ensayadas en la microplaca GP2.

En cuanto a los microorganismos Gram negativos, se obtuvieron perfiles metabólicos diferentes, debido fundamentalmente a que las cepas bacterianas pertenecían a 5 géneros distintos. Los patrones metabólicos obtenidos por las 4 cepas del género *Halomonas* (**Figura 4.5**) presentaron tres perfiles distintos, un perfil presentado por las cepas W4 y W10 identificadas como *Halomonas variabilis*, el segundo perfil metabólico fue presentado por la cepa *Halomonas* sp. W12 y el perfil metabólico presentado por la cepa *Halomonas alkantarctica* W3.

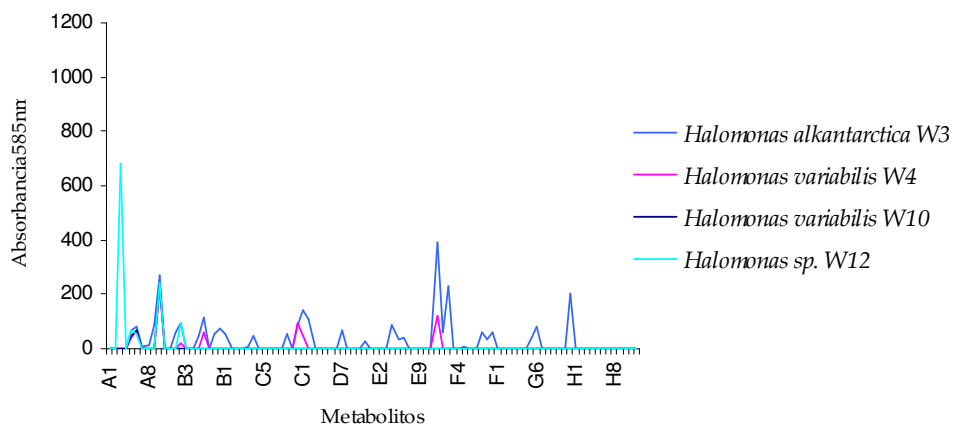


Figura 4.5. Patrón de absorbancia de las cepas W2, W4, W10 y W12 del género *Halomonas*. Oxidación/fermentación de las distintas fuentes de carbono ensayadas en la microplaca GN2.

Para las cepas W5 y W7 pertenecientes al género *Thalassospira*, los perfiles obtenidos fueron similares, mientras que el perfil metabólico obtenido por la cepa W8 del género *Marinobacter* se mostró diferente (**Figura 4.6**).

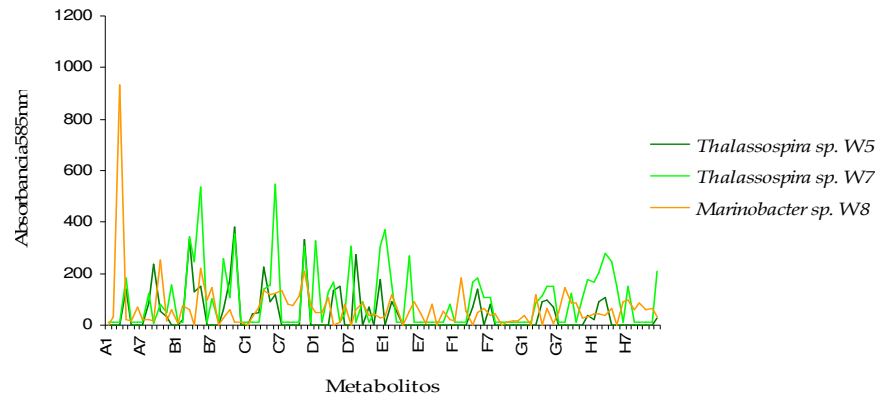


Figura 4.6. Patrón de absorbancia de las cepas W5, W7 del género *Thalassospira*, W8 del género *Marinobacter*. Oxidación/fermentación de las distintas fuentes de carbono ensayadas en la microplaca GN2.

Respecto a los perfiles metabólicos obtenidos para las cepas *Pseudomonas fluorescens* S21, *Pseudomonas grimontii* S24 y *Pseudoalteromonas elyakovii* W18 (**Figura 4.7**), indicar que los 3 perfiles metabólicos distintos indicativos de la diversidad metabólica descrita para estas especies bacterianas.

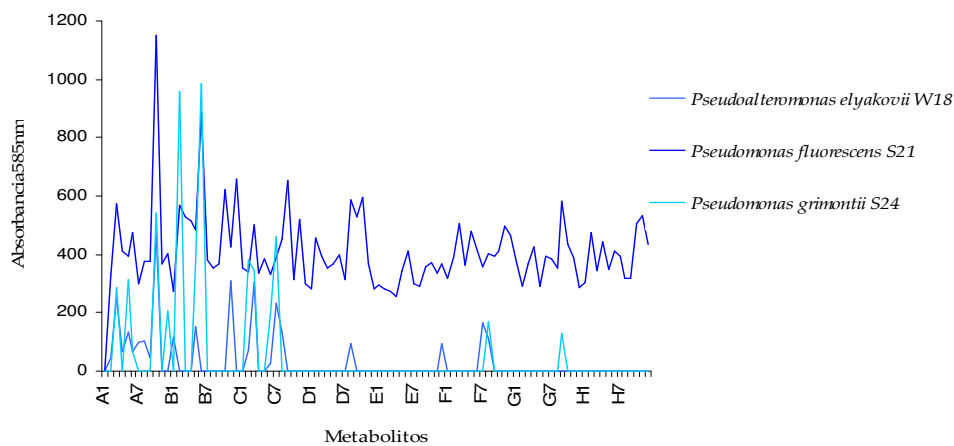


Figura 4.7. Patrón de absorbancia de las cepas W18 del *Pseudoalteromonas*, S21 y S24 del género *Pseudomonas*. Oxidación/fermentación de las distintas fuentes de carbono ensayadas en la microplaca GN2.

4.1.2.3 Interrelación de los distintos perfiles metabólicos de las cepas objeto de estudio y sus cepas tipo

Para representar la similitud entre los perfiles metabólicos obtenidos se realizó un análisis de conglomerados jerárquicos (SPSS14.0 para MS-Windows) que agrupa los resultados dependiendo de la distancia o diferencia entre los resultados de los perfiles metabólicos obtenidos. El resultado de este análisis para las bacterianas Gram positivas se presenta en la **Figura 4.8**. El análisis de agrupamientos de los patrones metabólicos para Gram positivos mostró 2 grandes agrupaciones, en la primera agrupación se englobaron las

cepas W1, W15, W16, F17, F20, S22 y S27 pertenecientes al género *Bacillus* y la segunda agrupación incluyó la cepa F2 perteneciente al género *Brevibacterium*.

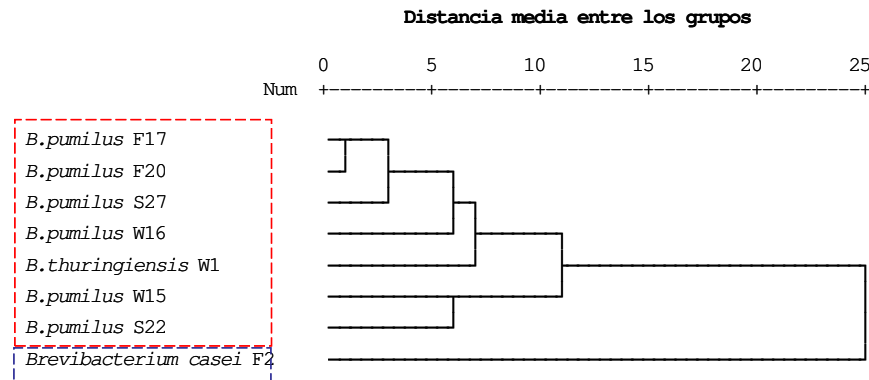


Figura 4.8. Dendrograma de análisis de clúster de los patrones metabólicos de microplaca GP2-Biolog™ de los microorganismos Gram positivos.

Respecto a los microorganismos Gram negativos, el dendrograma obtenido reflejó 3 grupos (Figura 4.9). El primero englobó las cepas *Marinobacter* sp. W8 y *Pseudomonas fluorescens* S21, la segunda agrupación incluyó las cepas W5 y W7 del género *Thalassospira* y el tercer grupo incluyó las cepas W3, W4, W10 y W12 del género *Halomonas* y las cepas S24 y W18 pertenecientes a los géneros *Pseudomonas* y *Pseudoalteromonas*, respectivamente.

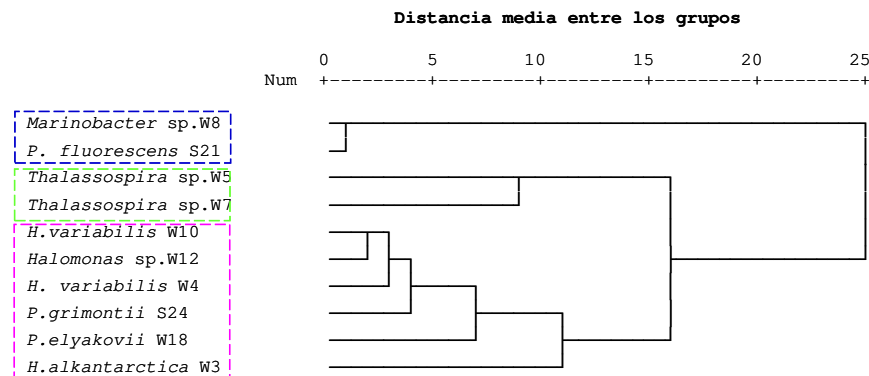


Figura 4.9. Dendrograma de análisis de clúster de los patrones metabólicos de la microplaca GN2-Biolog™ de los microorganismos Gram negativos.

Cuando se compararon los patrones metabólicos con la clasificación filogenética, se constató la concordancia entre ambos tipos de clasificación para los microorganismos Gram positivos. En Gram negativos se puso de manifiesto la mayor versatilidad del género *Pseudomonas*.

Por otro lado, con objeto de conocer la similitud de cada una de las cepas incluidas en este estudio con la cepa tipo representativa del fenón correspondiente, se realizó un estudio multivariante y multidimensional (Primer 6).

Respecto a los resultados obtenidos por los microorganismos Gram positivos incluidos en este estudio, se realizó el análisis multidimensional mencionado anteriormente para visualizar como se agruparon las diferentes cepas Gram positivas según los perfiles metabólicos obtenidos junto con los perfiles metabólicos para las cepas tipo correspondientes a cada especie. La representación en dos dimensiones obtenida en este caso se ilustra en la **Figura 4.10**.

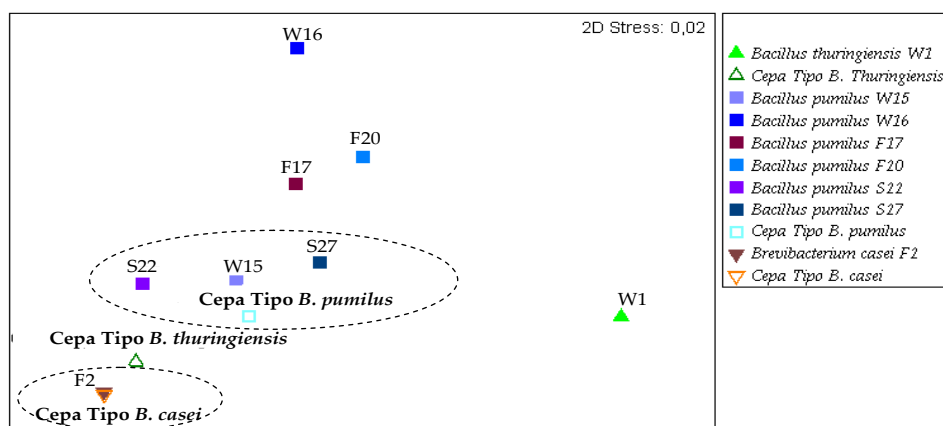


Figura 4.10. Representación gráfica en dos dimensiones de la correlación obtenida mediante el análisis multidimensional. Se muestran las agrupaciones de las cepas del género *Bacillus* y *Brevibacterium* juntos con las cepas tipo correspondientes.

Los resultados obtenidos mostraron que las cepas *Bacillus pumilus* W15, S22 y S27 se encuentran en el mismo grupo junto con la cepa tipo *Bacillus pumilus*. Lo que indica que dichas cepas metabolizan los mismos compuestos que la cepa tipo correspondiente. Por otra parte la cepa *Brevibacterium casei* F2 se encuentra en el mismo grupo con la cepa tipo correspondiente *Brevibacterium casei*, lo que indica el comportamiento similar de dicha cepa con su cepa tipo, en cuanto a la utilización de los metabolitos. Por el contrario, la cepa *B. thuringiensis* W1 y las cepas *B. pumilus* W16, F17 y F20 se encontraron en grupos distintos a las cepas tipo correspondientes.

Con respecto a los resultados del ensayo Biolog™ obtenidos por los microorganismos Gram negativos incluidos en este estudio, se realizó de forma análoga el análisis multidimensional que nos permitió visualizar como se agruparon las diferentes cepas Gram negativas para cada género junto con las cepas correspondientes. La

representación en dos dimensiones obtenida para las cepas del género *Halomonas* se ilustra en la **Figura 4.11**.

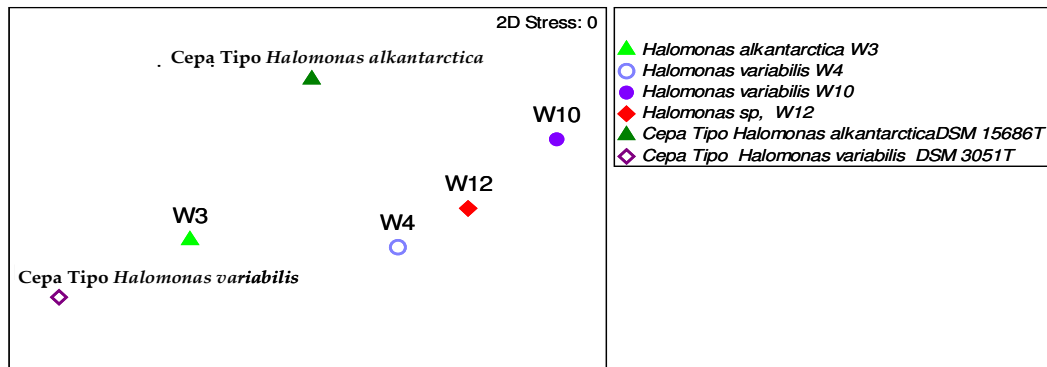


Figura 4.11. Representación gráfica en dos dimensiones de la correlación obtenida mediante el análisis multidimensional. Se muestran las agrupaciones de las cepas del género *Halomonas* junto con las cepas tipo correspondientes.

Los resultados obtenidos para las cepas del género *Halomonas* mostraron agrupamientos distintos, por un lado, entre las 4 cepas y por otro lado entre las cepas objeto de estudio y las cepas tipo correspondientes.

Asimismo, se realizó el mismo análisis para las cepas de los géneros *Thalassospira* y *Marinobacter* y se obtuvieron los resultados que se muestran en la **Figura 4.12**. Los resultados obtenidos mostraron que, según el perfil metabólico obtenido, de las tres cepas analizadas cabe destacar las cepas W5 y W7 del género *Thalassospira* que se encontraron en el mismo grupo que las cepas tipo correspondientes. Por el contrario la cepa *Marinobacter* se encontró en un grupo distinto a la cepa tipo *Marinobacter lipolyticus* empleada.

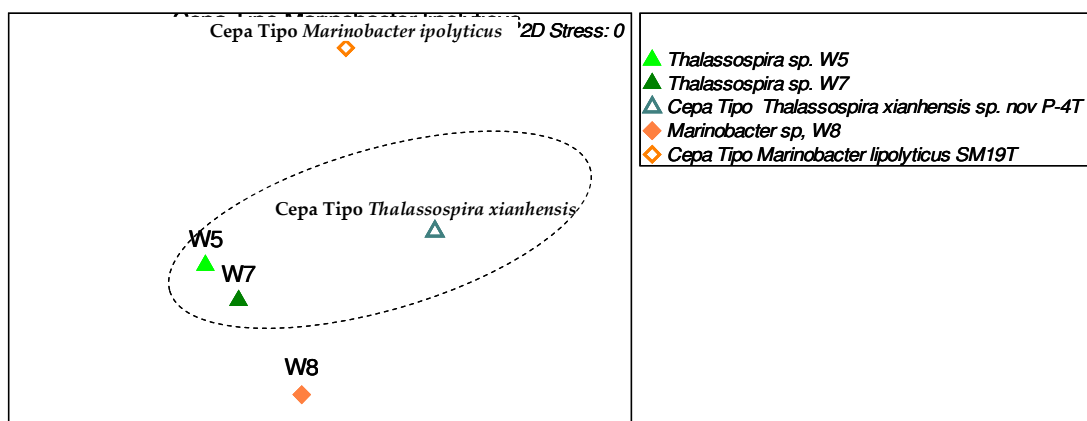


Figura 4.12. Representación gráfica en dos dimensiones de la correlación obtenida mediante el análisis multidimensional. Se muestran las agrupaciones de las cepas del género *Thalassospira* y *Marinobacter* junto con las cepas tipo correspondientes.

Por otra parte, se realizó el análisis para las cepas del género *Pseudomonas* y *Pseudoalteromonas* y se obtuvieron las agrupaciones que se muestran en la **Figura 4.13**. De los resultados obtenidos cabe destacar la cepa *Pseudomonas fluorescens* S21 que se agrupó con la cepa tipo correspondiente.

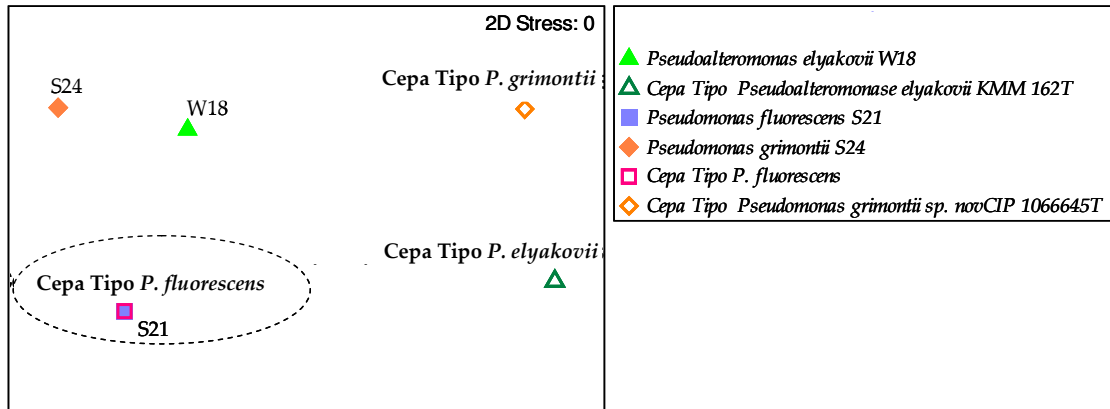


Figura 4.13. Gráfica en dos dimensiones de la correlación obtenida mediante el análisis de escalonamiento multidimensional. Se muestran las agrupaciones de las cepas del género *Pseudomonas* y *Pseudoalteromonas* juntos con sus cepas Tipo.

4.1.2.4 Crecimiento en salinidad

Las bacterias marinas generalmente están adaptadas a los rangos de salinidad que presenta su ambiente ($\pm 3,5\%$ (p/v) de sales). Cambios moderados en salinidad pueden generar cambios morfológicos y fisiológicos. Durante la presente investigación se realizó el estudio de crecimiento en presencia de distintas concentraciones de sales con el fin de evaluar la influencia de la salinidad sobre las 18 cepas incluidas en este trabajo. A continuación se presentan los resultados obtenidos.

En la **Figura 4.14** se reflejan los resultados del efecto de la concentración de sales sobre el crecimiento de la cepa *B. thuringiensis* W1. Se puede observar que se obtuvo la mínima influencia de la salinidad, ya que el crecimiento fue similar con todas las concentraciones de sales ensayadas, mostrándose un crecimiento máximo de 1,6 logaritmos, al 3% (p/v) de sales a las 48 horas de incubación.

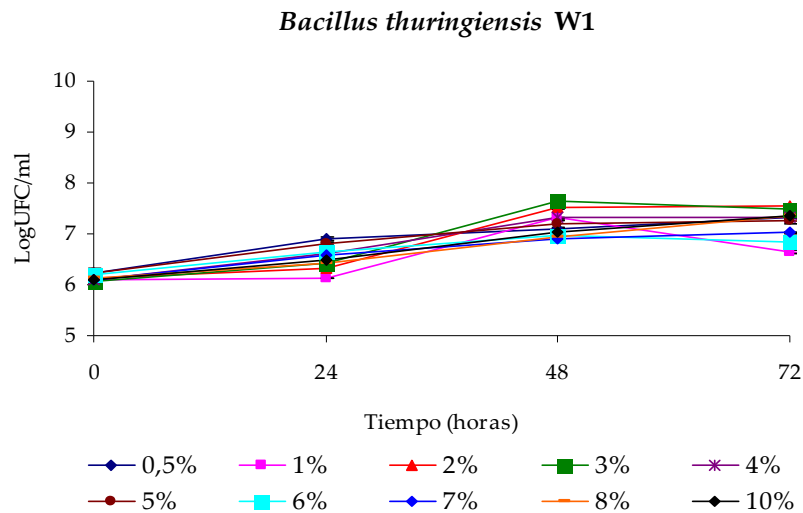


Figura 4.14. Crecimiento de *Bacillus thuringiensis* W1 a distintas concentraciones de sales ($p < 0,05$).

La cepa *B. casei* F2 (Figura 4.15) presentó un crecimiento similar para todas las concentraciones de sales ensayadas, mostrándose su máximo entre 3 y 4% (p/v) de sales a las 24 horas con un crecimiento de 1,77 y 1,63 logaritmos, respectivamente.

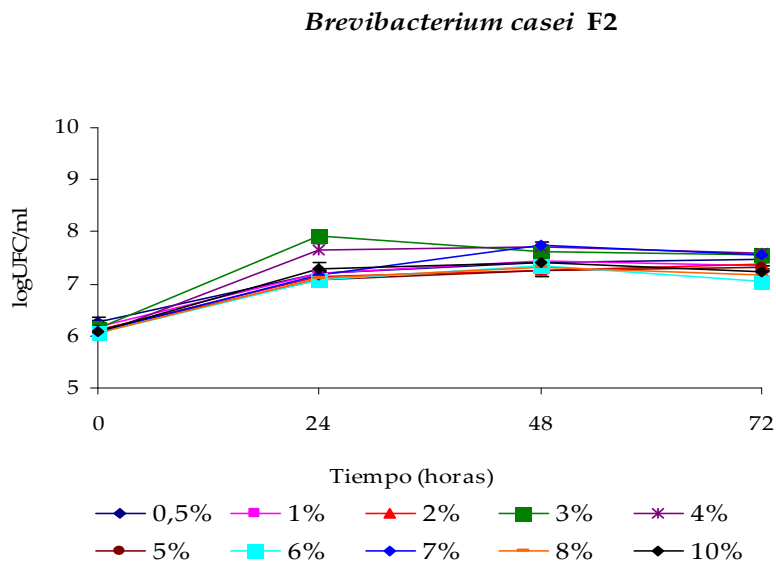


Figura 4.15. Crecimiento de *Brevibacterium casei* F2 a distintas concentraciones de sales ($p < 0,05$).

De las cepas *B. pumilus* W15, W16, F17, F20, S22 y S27 (Figura 4.16) destacamos la cepa W16, en cuyo crecimiento se observó la mayor influencia de la concentración de sales, con valores óptimos de salinidad comprendidos entre 2 y el 4%, tras 24 horas de incubación.

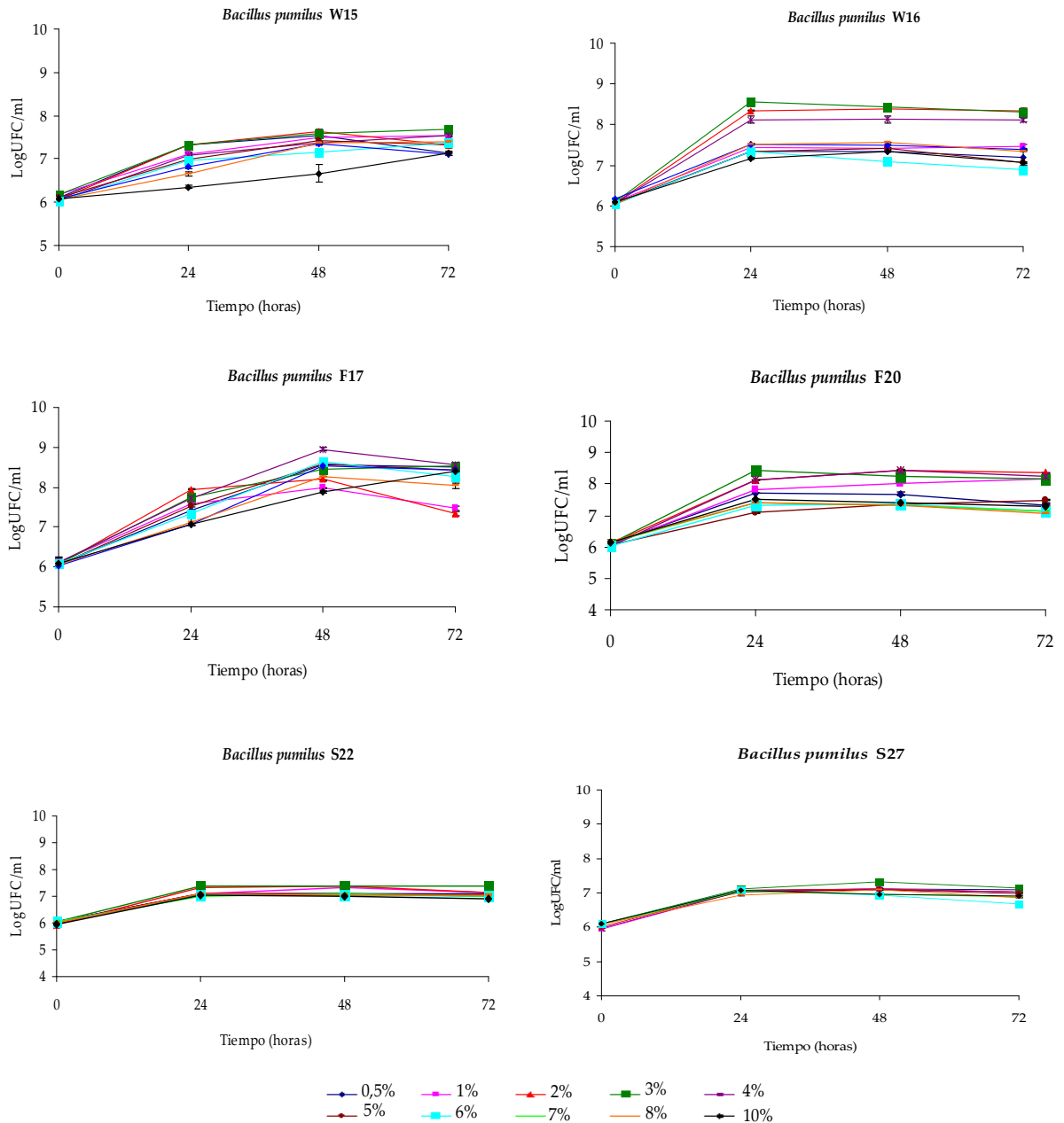


Figura 4.16. Crecimiento de *Bacillus pumilus* W15, W16, F17, F20, S22 y S27 a distintas concentraciones de sales ($p < 0,05$).

Los resultados del estudio del efecto de la concentración de sales sobre el crecimiento para las cepas del género *Halomonas* W3, W4, W10 y W12 (Figura 4.17), mostraron que la influencia de la concentración de sales fue mayor en comparación con las cepas del género *Bacillus* y *Brevibacterium*. Estos resultados mostraron que *H. alkantarctica* W3 y *H. variabilis* W10 alcanzan un máximo de crecimiento al 3% (p/v) de sales con un incremento de 2,8 y 3 logaritmos, respectivamente. *H. variabilis* W4 presentó un crecimiento superior a 2 logaritmos a las 48 horas de incubación a concentraciones de sales

comprendidas entre el 1 y el 4% (p/v). Asimismo, la cepa *Halomonas* sp. W12 mostró su máximo crecimiento a las 48 horas de incubación con las concentraciones 2, 3, 4 y 10% (p/v) de sales, presentando un crecimiento de 2,5 logaritmos.

Las 4 cepas seleccionadas del género *Halomonas* mostraron mayores tasas de crecimiento en un rango de salinidad que varió entre el 1 y el 4% (p/v) de sales con un óptimo al 3% (p/v) de sales.

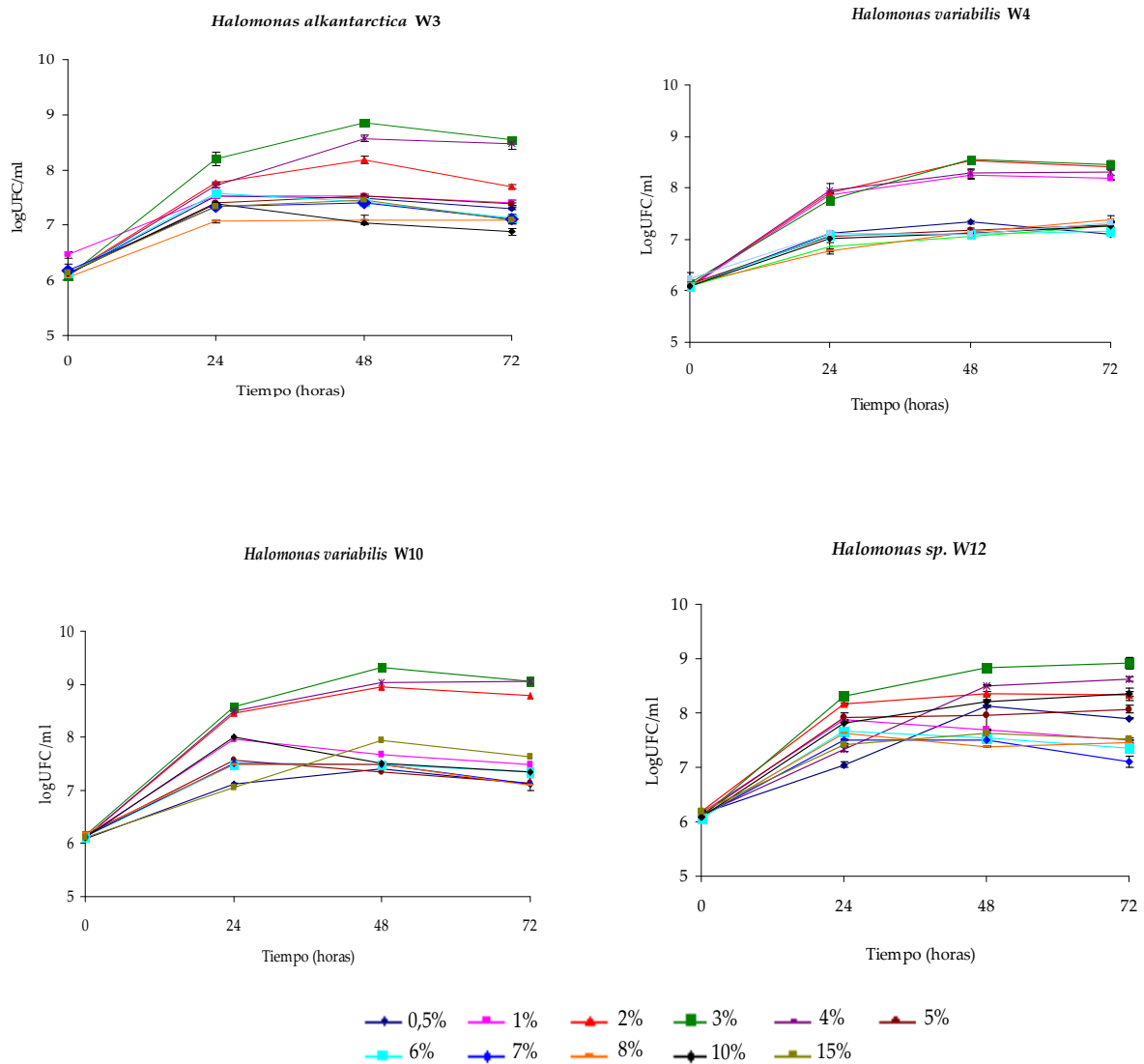


Figura 4.17. Crecimiento de W3, W4, W10 y W12 perteneciente al género *Halomonas* a distintas concentraciones de sales ($p < 0,05$).

Las cepas W5 y W7 pertenecientes al género *Thalassospira* mostraron el óptimo de crecimiento al 3% (p/v) de sales. En *Marinobacter* sp. W8 se destacó la mayor influencia de la concentración de sales en su cinética de crecimiento (Figura 4.18).

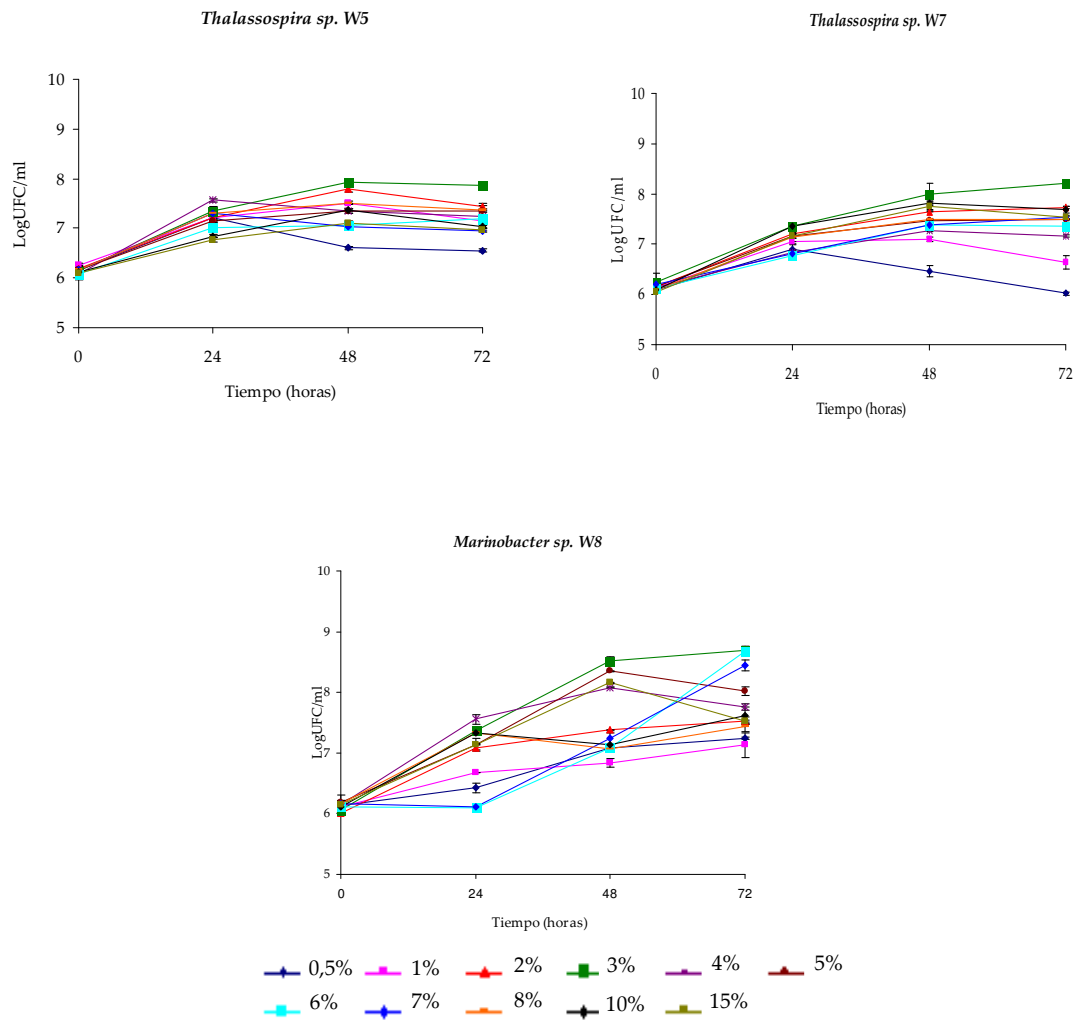


Figura 4.18. Crecimiento de *Thalassospira* sp. W5 y W7 y *Marinobacter* sp. W8 a distintas concentraciones de sales ($p < 0,05$).

Las cepas *P. fluorescens* S21 y *P. grimontii* S24 (Figura 4.19) presentaron crecimientos similares para todas las concentraciones ensayadas. Sin embargo la cepa *P. elyakovii* W18 (Figura 4.19) se caracterizó con un crecimiento influenciado por la salinidad, con óptimos al 2 y 3% (p/v) de sales.

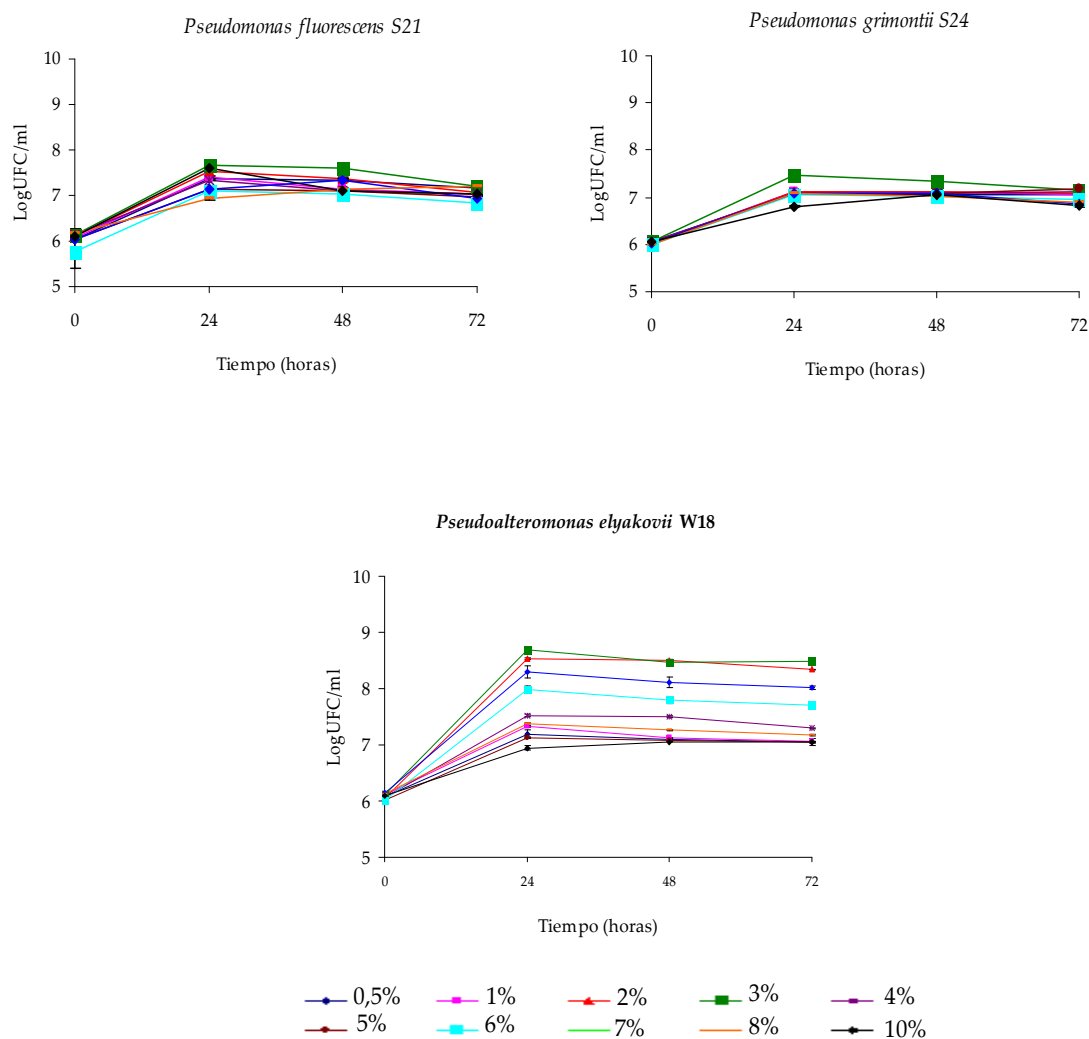


Figura 4.19. Crecimiento de W18 perteneciente al género *Pseudoalteromonas* y S21 y S24 pertenecientes al género *Pseudomonas* a distintas concentraciones de sales ($p < 0,05$).

4.2 CAPÍTULO II. CARACTERIZACIÓN Y PRODUCCIÓN DE BIOEMULGENTES (EXOPOLISACÁRIDOS)

4.2.1 Características de los bioemulgentes sintetizados

Las condiciones de cultivo influyen en la cantidad, las características y en las propiedades de los biopolímeros sintetizados. En este estudio analizamos la influencia de la concentración de sales y del tiempo de incubación en la producción y actividad emulgente de los biopolímeros obtenidos. Todos los microorganismos estudiados presentaron una capacidad de proliferar y de producir EPS en presencia de las distintas concentraciones de sales ensayadas.

Dada la importancia de esta etapa previa a una futura producción de exopolisacáridos con potencial biotecnológico, se estudió las condiciones óptimas de

producción para cada uno de los biopolímeros sintetizados durante este trabajo de investigación, teniendo en cuenta básicamente como criterios de selección, el tiempo de producción y la concentración de sales, como se ha descrito anteriormente. En las figuras que a continuación se presentan se muestra el efecto del tiempo de incubación y de la concentración de sales sobre la producción y la composición química del EPS sintetizado por cada una de las 18 cepas objeto de estudio. En total se han analizado 133 biopolímeros y se denominaron igual que las cepas productoras.

Los resultados obtenidos por la cepa *B. thuringiensis* W1 (Figura 4.20) mostraron que esta cepa fue capaz de producir bioemulgentes (BE) a las 3 concentraciones de sales ensayadas alcanzando producciones que variaron entre 0,5 y 1,69 g/l. El BE producido por W1 al 3% (p/v) de sales, se caracterizó por elevados porcentajes de carbohidratos y proteínas.

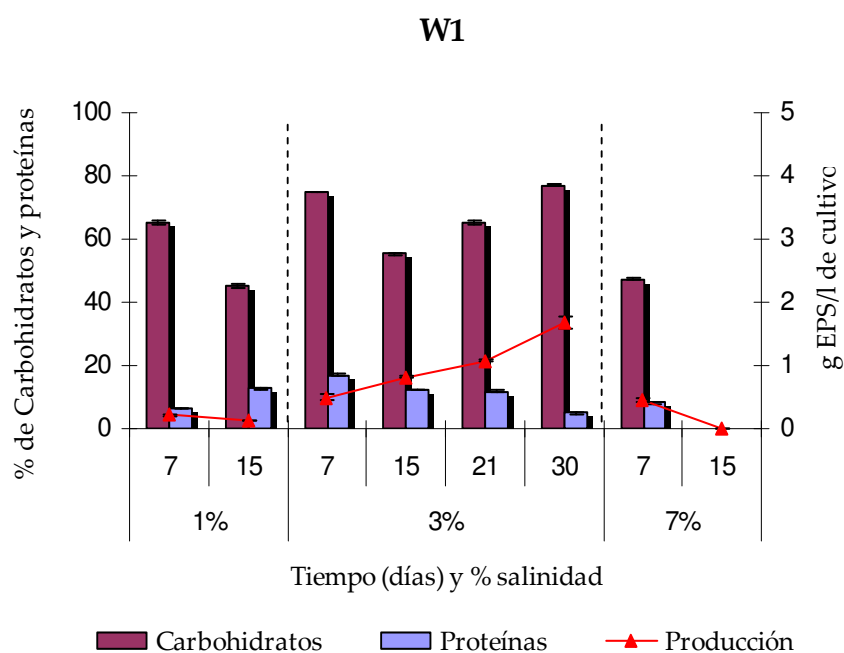


Figura 4.20. Efecto del tiempo de incubación y de la concentración de sales sobre la producción y la composición química del biopolímero W1 sintetizado por la cepa *B. thuringiensis* W1 ($p < 0,05$).

Los BE sintetizados por la cepa *B. casei* F2 (Figura 4.21), se caracterizaron por contener porcentajes de carbohidratos y proteínas relativamente elevados, con máxima producción al 3% (p/v) de sales de 1,04 g/l, a los 30 días de incubación.

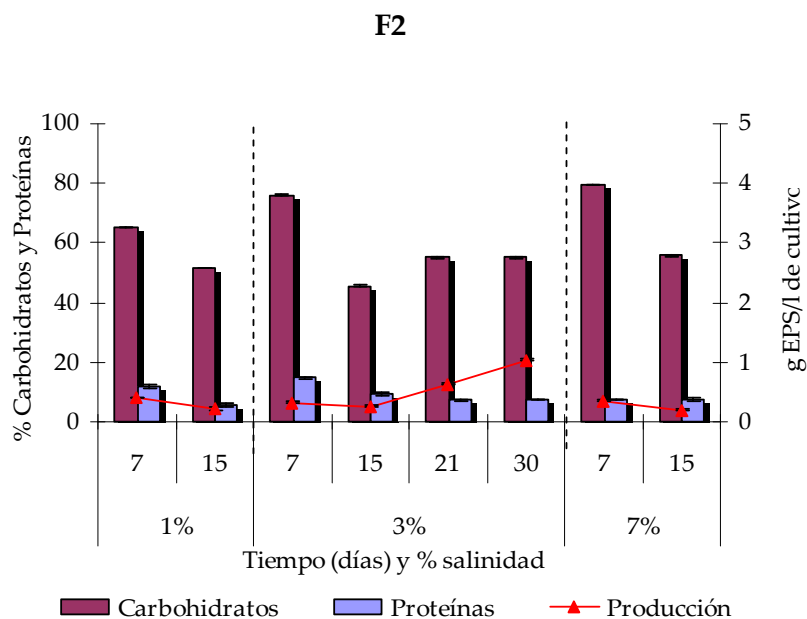


Figura 4.21. Efecto del tiempo de incubación y de la concentración de sales sobre la producción y la composición química del biopolímero F2 sintetizado por la cepa *B. casei* F2 ($p < 0,05$).

Respecto a las cepas *B. pumilus* W15, W16, F17, F20, S22 y S27 (Figura 4.22), destacamos el BE producido por la cepa S22 a los 7 días de incubación y al 3% (p/v) de sales que alcanzó máxima producción de 2,28 g/l, y el BE sintetizado por la cepa F20 que mostró su máximo de producción de 1,12 g/l al 7% (p/v) de sales y 7 días de incubación.

Asimismo, destacamos los BE sintetizados por las cepas W15, W16 y F17 que se caracterizaron por una composición química con valores de carbohidratos superiores a 30% (p/p) y de proteínas de alrededor de 15% (p/p).

En general se detectaron cambios importantes tanto en la producción como en el porcentaje de carbohidratos y proteínas, dependiendo de las condiciones de cultivo, asimismo la influencia de estos parámetros dependió de la cepa productora.

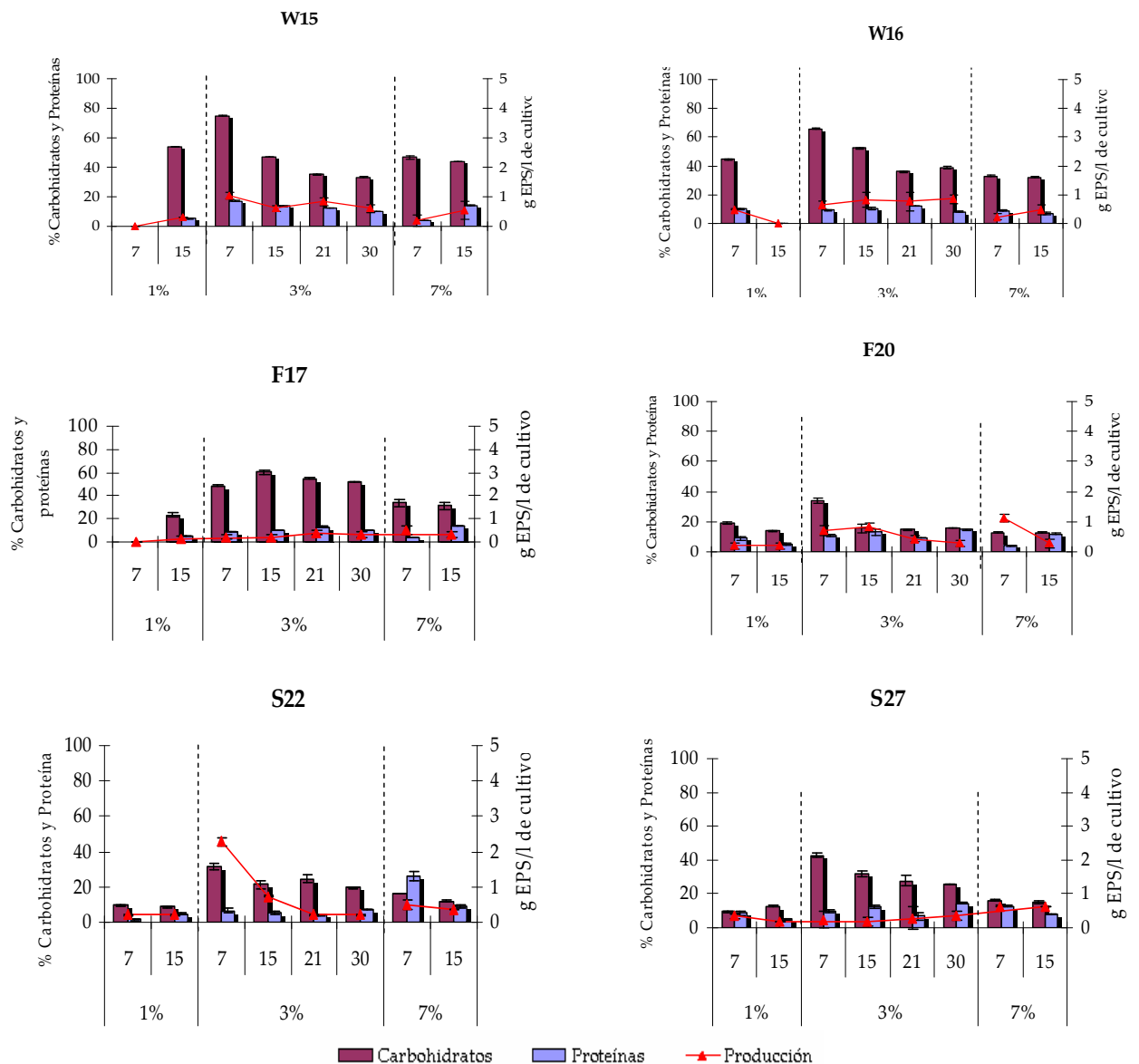


Figura 4.22. Efecto del tiempo de incubación y de la concentración de sales sobre la producción y la composición química de los biopolímeros W15, W16, F17, F20, S22 y S27 sintetizado por las cepas W15, W16, F17, F20, S22 y S27 del género *Bacillus* ($p < 0,05$).

En cuanto a las cepas W3, W4, W10 y W12 del género *Halomonas*, la Figura 4.23 muestra los resultados obtenidos, de los cuales destacamos los BE sintetizados por la cepa *H. variabilis* W10 a los 15 días de incubación al 1% (p/v) de sales que produjo 4,93 g/l de BE, y a los 30 días de incubación al 3% (p/v) de sales y que se caracterizó por contar con una producción de 3 g/l. Por otra parte destacamos los BE sintetizados por *H. variabilis* W4 a los 30 días en medio con 3% (p/v) de sales con una producción máxima de 3,08 g/l, así como el BE producido por la cepa *Halomonas* sp. W12 que alcanzó una producción de 2,44 g/l a los 21 días en presencia de 3% (p/v) de sales.

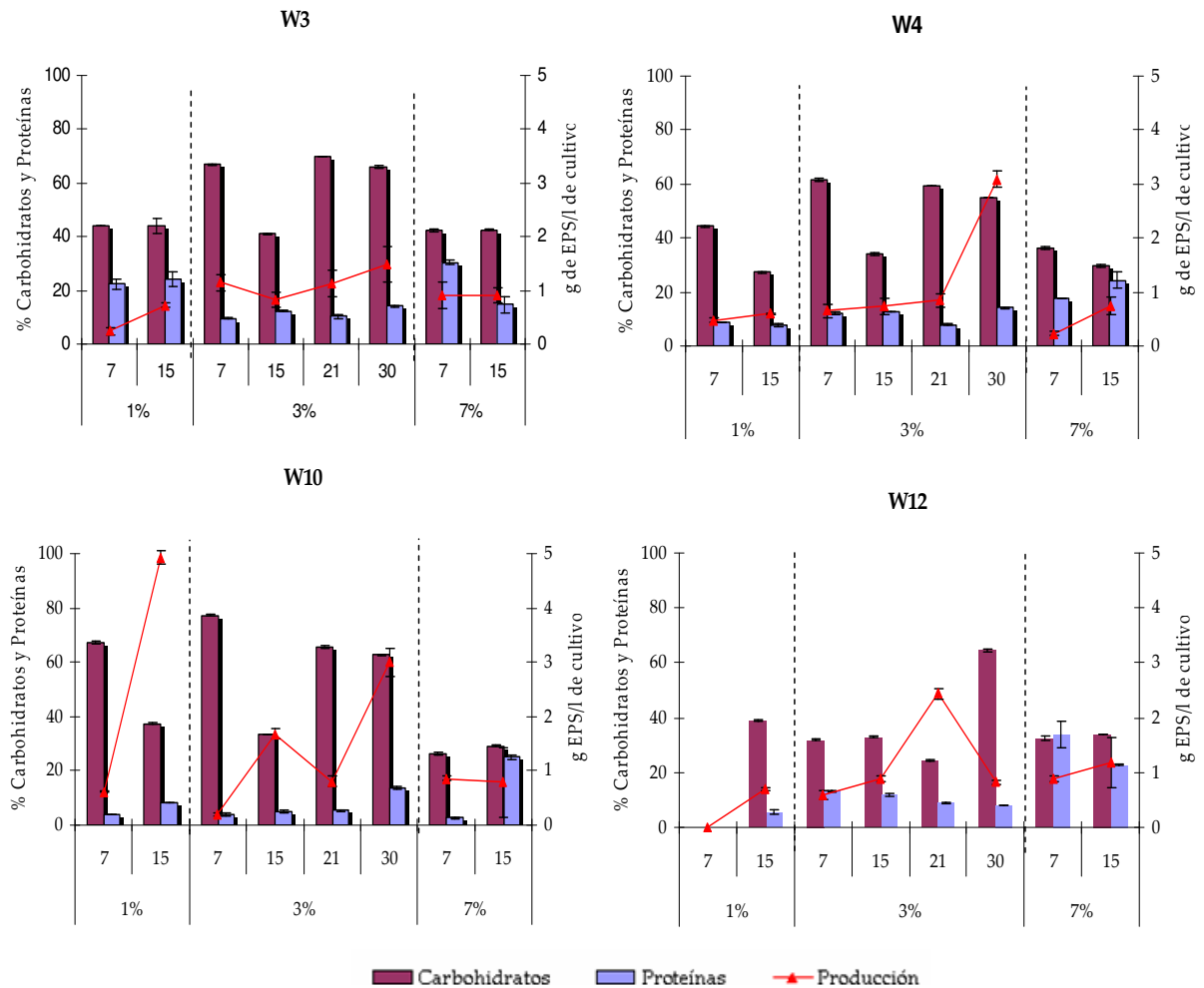


Figura 4.23. Efecto del tiempo de incubación y de la concentración de sales sobre la producción y la composición química de los biopolímeros W3, W4, W10 y W12 sintetizados por las cepas W3, W4, W10, W12 del género *Halomonas* ($p < 0,05$).

Respecto a las cepas del género *Thalassospira* W5 y W7 (Figura 4.24), hemos de destacar que mientras W5 sintetizó BE en todas las concentraciones de sales ensayadas, la cepa W7 solo sintetizó BE al 3% (p/v) de sales, señalando que para las dos cepas de este género bacteriano la máxima producción se detectó al 3% (p/v) de sales y tras 21 de incubación.

La cepa *Marinobacter* sp. W8 (Figura 4.24) sintetizó BE en todas las concentraciones de sales ensayadas y presentó máxima producción de 1,27 g/l, a los 21 días de incubación y en presencia de 3% (p/v) de sales.

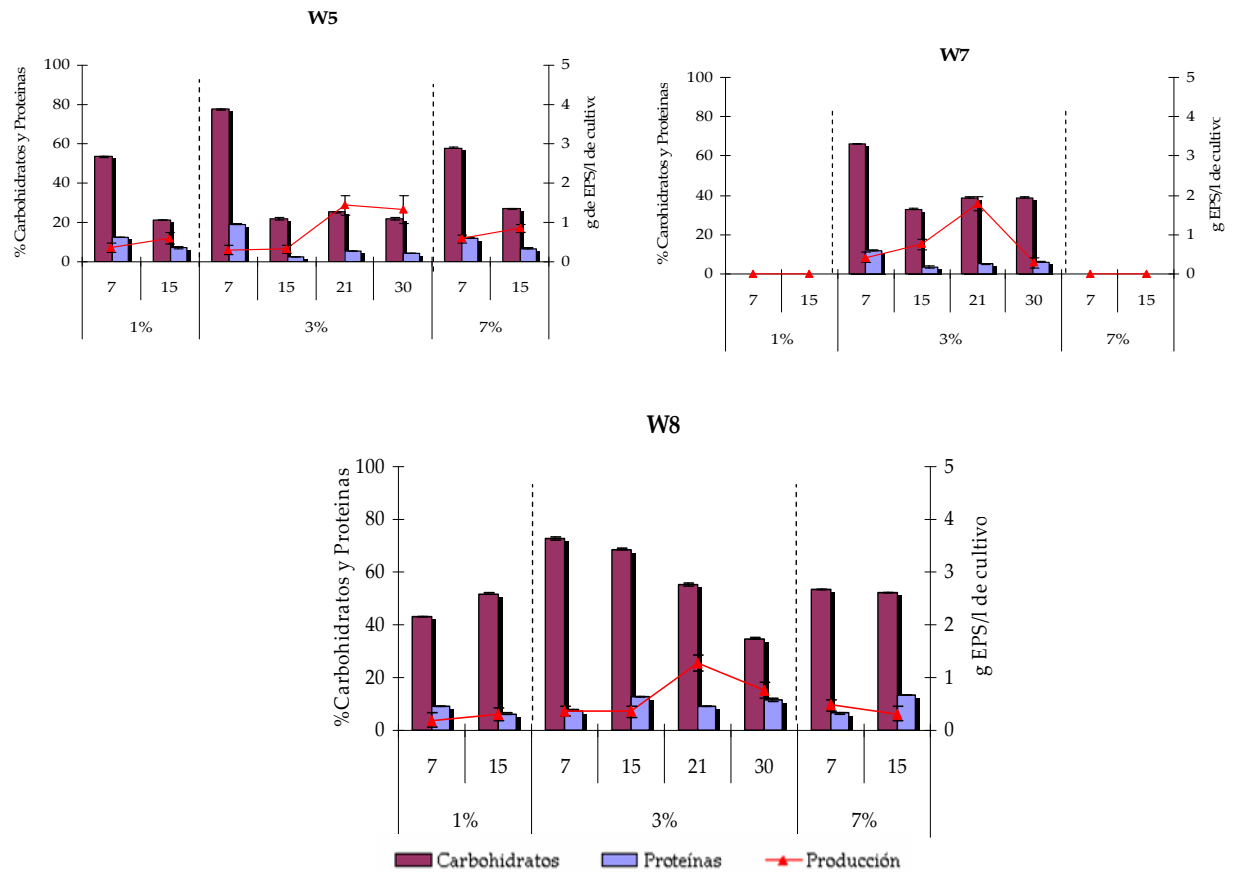


Figura 4.24. Efecto del tiempo de incubación y de la concentración de sales sobre la producción y la composición química de los biopolímeros W5, W7 sintetizados por *Thalassospira* sp. (W5 y W7) y el biopolímero W8 sintetizado por *Marinobacter* sp. W8 ($p < 0,05$).

Sin embargo, *P. elyakovii* W18, *P. fluorescens* S21 y *P. grimontii* S24 (Figura 4.25), produjeron BE con porcentajes bajos de carbohidratos aunque se obtuvieron altas tasas de producción, lo que parece indicar que la mayor parte de los mismos fueron impurezas. De forma similar, mencionar que la alta productividad del BE obtenido por la cepa W18 tras 21 días de incubación y en presencia de un 3% (p/v) de sales, estaba caracterizado por muy bajos porcentajes de carbohidratos y proteínas, lo que se atribuye a la acumulación de sales.

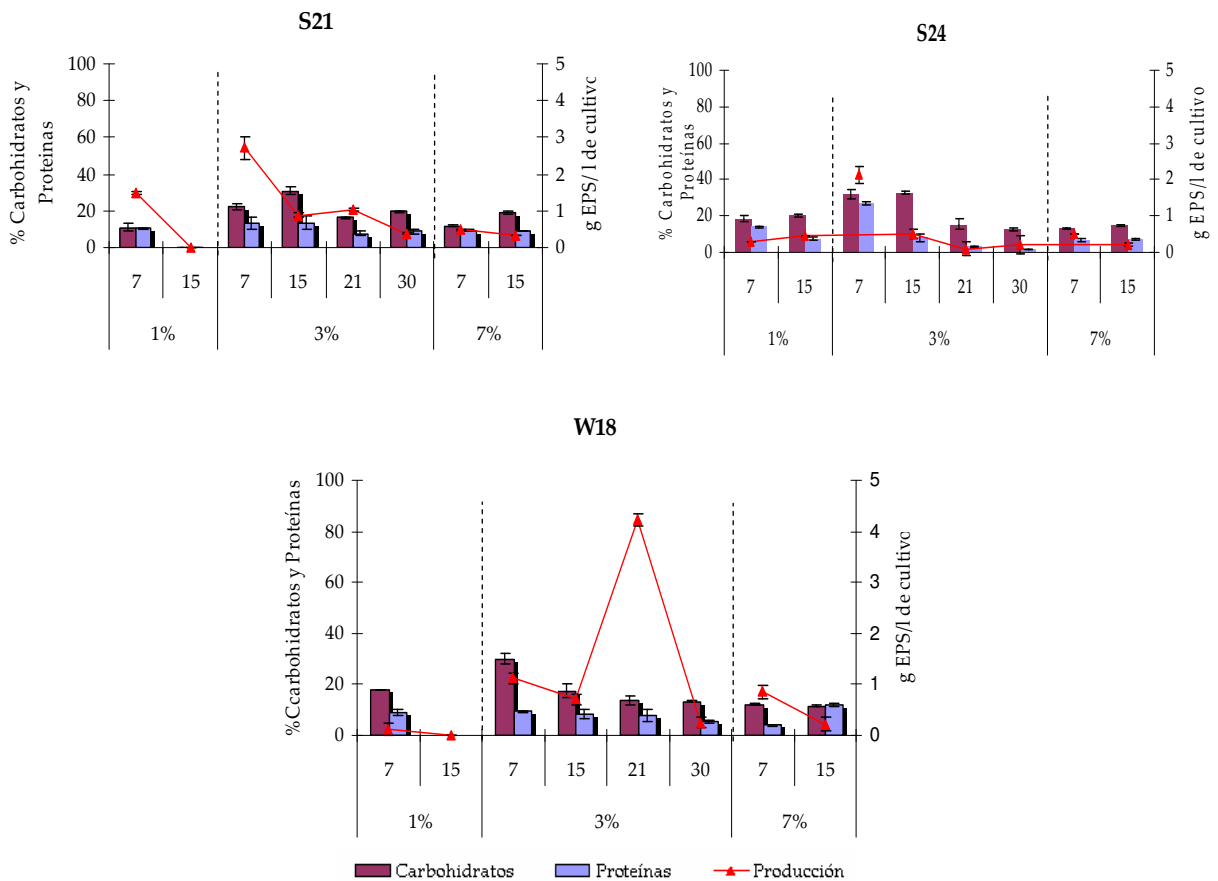


Figura 4.25. Efecto del tiempo de incubación y de la concentración de sales sobre la producción y la composición química de los biopolímeros W18, S21 y S24 sintetizados por las cepas de los géneros *Pseudoalteromonas* y *Pseudomonas* ($p < 0,05$).

4.2.2 Estudio de las propiedades emulgentes de los exopolisacáridos

Uno de los objetivos de esta investigación era la obtención de bioemulgentes que fueran útiles como herramienta para la biorremediación de zonas contaminadas con hidrocarburos. En consecuencia y una vez determinadas las condiciones de producción, se procedió a determinar la capacidad de los biopolímeros obtenidos para formar emulsiones estables frente a siete sustancias hidrófobas (xileno, octano, tolueno, diesel, crudo Kirkuk, aceite mineral ligero y aceite mineral pesado). Ya que esta propiedad sería de gran importancia para la utilización de estos microorganismos o sus bioproductos en los tratamientos de descontaminación de petróleo y productos derivados.

En las siguientes tablas se recogen las actividades emulgentes de los BE sintetizados, a una concentración de 0,5% (p/v), sobre las distintas fases oleosas ensayadas. Los resultados son la media de tres determinaciones e indican el porcentaje emulsionado de la mezcla agua-fase oleosa, las medidas fueron realizadas tras dejar la emulsión en reposo 24 horas a temperatura ambiente con el objetivo de evaluar la estabilidad de las mismas.

La **Tabla 4.2** muestra los porcentajes de emulsión obtenidos por los BE sintetizados por las cepas del género *Bacillus* incluidas en este estudio. Los resultados mostraron que dentro de los BE sintetizados por este género cabe destacar los BE: W16-1, W16-5, W16-6 y F17-2 por su capacidad para emulsionar el AML, xileno, tolueno, octano y crudo Kirkuk con porcentajes superiores al 40%. Por el contrario el AMP no fue emulsionado por ningún BE sintetizado por este grupo de bacterias.

Tabla 4.2. Actividad emulgente frente a AML, AMP, diesel, xileno, octano, tolueno y crudo Kirkuk, de los biopolímeros sintetizados por las cepas W1, W15, W16, F17, F20, S22 y S27 del género *Bacillus*. Expresada en porcentajes de emulsión ($p < 0,05$).

Denom.	BE	Sustratos							
		Cond. Cultivo	AML ^a	AMP ^b	Diesel	Xileno	Octano	Tolueno	Crudo
<i>Bacillus</i>	W1-1	W1(1%-7d ^c)	0	0	9.14±0,18	16.11±0.20	14.22±0.19	47.05±2.14	55.01±2.19
	W1-2	W1(1%-15d)	0	0	10.22±0,30	37.18±1.32	25.23±1.20	56.14±2.14	60.14±3.44
	W1-3	W1(3%-7d)	0	0	16.35±1,13	43.21±2.14	67.12±3.14	66.23±2.88	72.12±4.19
	W1-4	W1(3%-15d)	0	0	8.41±0,99	34.19±2.61	55.23±2.65	60.23±2.64	100.00±5.78
	W1-5	W1(3%-21d)	0	0	1.05±0,22	30.14±2.01	52.14±2.47	65.40±2.78	54.11±2.18
	W1-6	W1(3%-30d)	0	0	2.33±0,05	15.33±1.65	18.14±1.61	15.14±1.12	53.12±3.14
	W1-7	W1(7%-7d)	0	0	9.15±0.17	32.21±2.14	25.33±1.88	36.01±2.36	50.25±2.02
	W15-1	W15(1%-15d)	0	0	11.44±0.61	0	15.15±1.4	0	72.33±3.08
	W15-2	W15(3%-7d)	4.12±0.20	0	13.62±0.64	0	42.07±2.02	61.23±1.25	76.14±3.3
	W15-3	W15(3%-15d)	0	0	9.12±0.12	0	26.31±1.23	8.13±0.75	68.21±2.9
	W15-4	W15(3%-21d)	0	0	9.15±1.30	10.11±0.15	36.33±1.88	21.01±1.26	83.23±2.4
	W15-5	W15(3%-30d)	0	0	5.14±1.10	0	17.14±1.16	0	80.14±2.7
	W15-6	W15(7%-7d)	34.05±0.5	0	12.05±1.02	13.12±0.97	29.05±1.25	63.12±2.75	62.05±2.66
	W15-7	W15(7%-15d)	22.15±1.60	0	15.09±1.03	11.10±1.11	40.11±3.2	33.14±3.12	55.04±2.5
	W16-1	W16(1%-7d)	55.17±2.71	0	9.10±1.15	52.11±2.56	65.10±2.3	59.10±2.14	62.14±2.99
	W16-2	W16(3%-7d)	0	0	17.33±1.21	45.22±2.84	55.10±5.30	65.22±2.89	67.14±3.01
	W16-3	W16(3%-15d)	5.05±0.32	0	12.15±1.41	0	38.33±1.30	17.12±1.45	53.21±3.51
	W16-4	W16(3%-21d)	5.14±0.72	0	10.11±1.19	0	19.24±2.11	5.23±0.52	92.14±3.80
	W16-5	W16(3%-30d)	44.14±1.82	0	8.12±1.21	26.22±2.63	61.22±2.65	54.11±1.64	71.15±3.70
	W16-6	W16(7%-7d)	65.33±2.30	0	3.03±0.55	38.23±2.18	55.15±1.45	62.10±3.28	57.12±2.81
	W16-7	W16(7%-15d)	0	0	3.52±0.64	15.14±1.14	49.12±1.32	30.23±1.21	55.14±1.61
	F17-1	F17(1%-15d)	0	0	2.32±0.58	13.33±1.60	44.22±2.10	65.15±2.91	45.05±1.20
	F17-2	F17(3%-7d)	59.16±1.51	0	11.25±0.64	54.11±2.71	56.36±3.11	74.05±4.75	49.36±1.32
	F17-3	F17(3%-15d)	0	0	8.24±0.97	33.10±2.31	55.13±3.40	43.03±2.65	80.54±1.10
	F17-4	F17(3%-21d)	0	0	6.11±0.92	0	50.12±2.10	15.05±1.30	78.12±3.63
	F17-5	F17(3%-30d)	5.10±0.21	0	4.02±0.51	0	57.23±2.80	16.12±1.40	100.23±4.91
	F17-6	F17(7%-7d)	0	0	11.33±0.6	12±1.3	66.25±1.25	40.11±2.15	56.11±3.51
	F17-7	F17(7%-15d)	8.11±0.10	0	8.12±0.54	14±1.1	43.10±2.75	21±1.141	54.10±1.50
	F20-1	F20(1%-7d)	0	0	0	0	12.14±0.88	25.11±1.65	55.12±3.51
	F20-2	F20(1%-15d)	0	0	0	0	25.12±1.25	15.10±1.25	39.14±2.51
	F20-3	F20(3%-7d)	0	0	0	0	35.17±3.62	50.10±2.14	0
	F20-4	F20(3%-15d)	7.10±0.51	0	0	0	22.23±1.32	69.24±1.33	67.11±1.65
	F20-5	F20(3%-21d)	0	0	0	0	26.36±1.56	30.13±2.14	33.10±2.14
	F20-6	F20(3%-30d)	10.31±0.97	0	0	0	19.14±1.58	11.32±1.10	89.12±3.64
	F20-7	F20(7%-7d)	0	0	0	0	10.01±1.47	35.11±1.32	29.21±2.60

Tabla 4.2 (Continuación)

F20-8	F20(7%-15d)	0	0	0	0	15.11±1.12	16.05±1.11	15.13±1.30
S22-1	S22(1%-7d)	0	0	0	0	2.06±0.22	0	100.55±5.36
S22-2	S22(1%-15d)	0	0	0	0	5.14±0.51	3.11±0.12	87.00±2.69
S22-3	S22(3%-7d)	0	0	0	0	7.14±0.63	50.25±1.97	100.41±2.65
S22-4	S22(3%-15d)	0	0	0	0	2.12±0.72	14.33±0.88	55.22±3.14
S22-5	S22(3%-21d)	0	0	0	0	1.01±0.10	0	50.11±1.20
S22-6	S22(3%-30d)	0	0	0	0	0	42.14±2.55	65.28±1.65
S22-7	S22(7%-7d)	0	0	0	0	0	68.23±3.16	63.22±2.50
S22-8	S22(7%-15d)	0	0	0	0	0	0	49.15±1.65
S27-1	S27(1%-7d)	0	0	0	0	29.33±1.22	0	25.12±1.22
S27-2	S27(1%-15d)	0	0	0	0	30.12±1.91	7.33±0.86	92.33±1.65
S27-3	S27(3%-7d)	0	0	0	22.23±1.97	45.14±1.87	50.12±2.52	25.14±2.14
S27-4	S27(3%-15d)	0	0	0	0	35.22±1.25	14.05±0.15	63.23±1.65
S27-5	S27(3%-21d)	0	0	0	0	33.05±3.40	15.19±0.64	25.11±2.14
S27-6	S27(3%-30d)	0	0	0	20.31±1.54	54.33±3.12	36.33±1.2	100.12±5.65
S27-7	S27(7%-7d)	13.21±1.10	0	0	0	35.31±3.65	0	25.23±3.16
S27-8	S27(7%-15d)	16.11±1.63	0	0	25.21±1.64	31.22±3.43	61.21±2.56	23.15±1.54

^a, Aceite mineral ligero; ^b, Aceite mineral pesado, ^c, días.

Asimismo, la **Tabla 4.3** muestra los porcentajes de emulsión obtenidos por los BE sintetizados por la cepa *Brevibacterium casei* F2, esta cepa se caracterizó por producir 8 BE, los cuales emulsionaron el crudo kirkuk con porcentajes de emulsión superior a 45 %. Los aceites minerales ligero y pesado fueron los sustratos más difíciles de emulsionar por estos BE.

Tabla 4.3. Actividad emulgente frente a AMP, AML, diesel, xileno, octano, tolueno y crudo Kirkuk, de los biopolímeros sintetizados por la cepa *Brevibacterium casei* F2. Expresada en porcentajes de emulsión (p<0,05).

Denom.	BE	Sustratos							
		Cond. Cultivo	AML ^a	AMP ^b	Diesel	Xileno	Octano	Tolueno	Crudo
<i>Brevibacterium</i>	F2-1	F2(1%-7d ^c)	0	0	21.09±1.12	18.01±1.12	20.33±1.21	27.22±2.31	100.01±4.65
	F2-2	F2(1%-15d)	0	0	18.16±1.64	53.44±2.15	16.22±2.40	7.12±1.10	56.00±2.45
	F2-3	F2(3%-7d)	0	0	36.21±2.15	67.12±3.61	52.21±2.72	34.14±2.30	55.12±2.52
	F2-4	F2(3%-15d)	0	0	20.33±2.64	52.19±3.30	47.12±2.54	64.05±4.31	79.14±2.65
	F2-5	F2(3%-21d)	0	0	18.33±1.69	41.32±1.21	36.15±3.11	67.09±2.51	45.12±1.54
	F2-6	F2(3%-30d)	0	0	9.05±0.88	29.15±1.11	27.33±2.11	28.17±2.92	51.15±3.65
	F2-7	F2(7%-7d)	0	0	19.14±0.64	51.65±1.50	20.41±1.74	67.18±2.65	45.11±2.14
	F2-8	F2(7%-15d)	0	0	10.12±1.1	25.23±1.60	20.51±1.43	38.28±1.21	56.10±2.21

^a, Aceite mineral ligero; ^b, Aceite mineral pesado, ^c, días.

La **Tabla 4.4** muestra los resultados de emulsión obtenidos por los BE sintetizados por las cepas pertenecientes al género *Halomonas*, la actividad emulgente (AE) obtenida por los BE sintetizados por las cepas W3, W4, W10 y W12, frente a los 7 sustratos ensayados, se caracterizó con porcentajes de emulsión considerables.

Tabla 4.4. Actividad emulgente frente a AMP, AML, diesel, xileno, octano, tolueno y crudo Kirkuk, de los biopolímeros sintetizados por las cepas W3, W4, W10 y W12 del género *Halomonas*.
Expresada en porcentajes de emulsión ($p < 0,05$).

Denom.	BE		Sustratos						
	Cond. Cultivo		AML ^a	AMP ^b	Diesel	Xileno	Octano	Tolueno	Crudo
<i>Halomonas</i>	W3-1	W3(1%-7d ^c)	65.12±2.30	25.32±2.14	11.11±1.61	36.18±1.25	45.12±2.45	56.21±1.30	76.23±3.01
	W3-2	W3(1%-15d)	56.14±3.41	34.36±2.51	7.10±0.45	25.12±1.75	51.15±2.15	58.24±2.61	68.23±3.02
	W3-3	W3(3%-7d)	25.11±1.60	18.31±3.01	16.23±1.48	41.14±2.14	47.05±1.64	57.03±1.57	34.15±1.25
	W3-4	W3(3%-15d)	71.05±2.22	53.33±4.65	11.15±0.77	29.12±2.02	54.15±1.12	67.04±1.26	0
	W3-5	W3(3%-21d)	67.22±1.41	34.05±3.12	10.24±0.97	34.05±2.64	25.24±1.64	63.09±2.46	63.11±2.51
	W3-6	W3(3%-30d)	0	0	5.07±0.65	19.10±1.89	41.33±2.01	29.11±2.45	73.23±2.65
	W3-7	W3(7%-7d)	58.10±1.51	22.22±2.15	9.09±0.85	26.22±2.33	56.41±2.14	61.14±2.89	100.00±4.32
	W3-8	W3(7%-15d)	57.00±1.02	19.14±1.14	7.19±0.64	18.18±1.18	31.51±2.45	22.24±2.54	97.12±1.98
	W4-1	W4(1%-7d)	14.11±1.44	43.22±2.19	7.29±0.99	30.33±2.47	45.12±2.45	61.36±2.56	93.25±2.58
	W4-2	W4(1%-15d)	64.12±2.80	29.14±0.18	4.28±0.15	33.01±2.56	62.52±2.89	61.14±2.36	63.15±2.64
	W4-3	W4(3%-7d)	74.41±3.14	74.11±2.14	18.18±1.60	74.33±3.54	76.22±2.54	74.41±2.65	54.10±2.78
	W4-4	W4(3%-15d)	10.30±1.01	54.55±2.55	16.16±1.50	18.20±0.64	30.02±1.78	37.21±1.26	86.00±1.65
	W4-5	W4(3%-21d)	0	35.05±1.25	10.05±1.21	0	44.14±1.44	0	0
	W4-6	W4(3%-30d)	0	30.03±1.97	8.00±1.11	0	31.21±1.45	5.10±0.44	93.12±3.85
	W4-7	W4(7%-7d)	17.12±0.15	25.08±2.75	12.12±1.06	12.01±0.54	56.33±1.14	67.05±1.23	30.01±2.10
	W4-8	W4(7%-15d)	69.12±2.88	27.55±1.12	16.17±1.08	28.00±1.14	62.14±2.84	66.15±2.21	78.02±4.65
	W10-1	W10(1%-7d)	15.11±1.04	25.16±3.15	7.19±1.10	45.12±2.54	65.16±2.51	63.14±2.35	88.11±3.66
	W10-2	W10(1%-15d)	65.22±2.64	30.21±1.05	6.13±0.58	30.15±1.49	55.31±2.14	58.23±2.45	63.33±3.01
	W10-3	W10(3%-7d)	64.14±2.40	51.12±2.14	51.24±2.65	51.14±1.35	61.21±1.97	61.28±2.65	50.25±2.17
	W10-4	W10(3%-15d)	4.05±0.91	35.55±1.20	45.39±2.75	18.33±1.40	44.64±1.58	21.34±1.41	78.25±2.56
	W10-5	W10(3%-21d)	14.01±0.78	6.05±0.14	13.11±2.14	1.01±0.40	36.22±1.45	7.07±0.88	100.33±6.81
	W10-6	W10(3%-30d)	0	3.01±0.02	8.05±0.97	6.21±0.21	13.11±1.18	11.19±1.12	78.14±1.65
	W10-7	W10(7%-7d)	7.33±0.11	29.33±1.1	6.11±0.40	46.07±3.12	68.12±1.65	60.24±2.45	85.18±2.50
	W10-8	W10(7%-15d)	60.23±2.14	55.25±2.01	4.16±0.13	16.09±2.92	46.05±2.15	31.31±3.25	68.22±2.90
	W12-1	W12(1%-15d)	71.12±3.56	0	8.31±0.87	35.11±2.51	66.11±1.59	62.05±2.75	45.35±3.20
	W12-2	W12(3%-7d)	24.27±1.56	42.23±2.15	25.22±1.44	34.10±2.32	43.10±3.45	55.14±1.25	48.22±3.51
	W12-3	W12(3%-15d)	7.52±0.61	13.12±1.11	18.19±1.98	11.11±1.31	56.00±2.60	15.37±1.66	70.12±3.41
	W12-4	W12(3%-21d)	0	11.01±1.30	5±.050.91	34.21±2.14	73.54±1.78	63.41±3.41	100.12±2.65
W12-5	W12(3%-30d)	11.05±0.71	5.00±0.15	15.15±0.54	11.12±1.12	66.23±1.32	19.22±1.18	100.13±4.65	
W12-6	W12(7%-7d)	72.06±1.88	0	23.33±1.40	74.22±2.54	75.14±2.51	61.11±3.64	74.11±2.58	
W12-7	W12(7%-15d)	57.25±1.12	0	13.23±1.11	17.14±0.97	61.32±2.88	16.17±2.14	67.02±3.97	

^a, Aceite mineral ligero; ^b, Aceite mineral pesado, ^c, días.

La **Tabla 4.5** muestra los resultados de la capacidad de emulsión de los BE sintetizados por las cepas W5 y W7 pertenecientes al género *Thalassospira*, se puede observar que los sustratos xileno, octano y tolueno y crudo fueron los más fácilmente emulsionados por estos BE, los valores de emulsión en este caso alcanzaron el 70%, asimismo de estos BE destacamos el W5-2 capaz de emulsionar el AML con 40% de emulsión.

Tabla 4.5. Actividad emulgente frente a AMP, AML, diesel, xileno, octano, tolueno y crudo Kirkuk, de los biopolímeros sintetizados por las cepas W5 y W7 del género *Thalassospira*. Expresada en porcentajes de emulsión ($p < 0,05$).

Denom.		BE	Sustratos						
		Cond. Cultivo	AML ^a	AMP ^b	Diesel	Xileno	Octano	Tolueno	Crudo
<i>Thalassospira</i>	W5-1	W5(1%-7d ^c)	7.07±0.19	0	0	12.10±0.88	15.12±1.07	7.58±1.01	78.11±1.20
	W5-2	W5(1%-15d)	40.31±1.56	0	0	2.01±0.25	14.33±1.90	60.33±2.55	57.17±2.50
	W5-3	W5(3%-7d)	0	0	0	20.22±1.14	28.10±1.35	0	34.22±3.60
	W5-4	W5(3%-15d)	45.15±2.61	0	0	5.03±0.31	10.31±0.99	23.14±1.34	71.21±3.64
	W5-5	W5(3%-21d)	0	0	0	0	11.10±0.15	15.01±0.99	25.17±1.23
	W5-6	W5(3%-30d)	0	0	0	0	8.11±0.44	0	0
	W5-7	W5(7%-7d)	0	0	0	13.10±1.10	8.08±0.98	19.32±1.13	27.21±2.11
	W5-8	W5(7%-15d)	0	0	0	0	5.05±0.33	5.61±0.14	16.16±0.19
	W7-1	W7(3%-7d)	0	0	44.52±2.36	76.33±1.75	73.21±2.17	74±112.17	34.03±1.45
	W7-2	W7(3%-15d)	7.01±0.15	0	13.24±1.19	32.12±1.45	58.41±2.65	47.12±1.3	60.05±4.32
	W7-3	W7(3%-21d)	0	0	11.01±1.28	45.16±1.88	72.10±2.77	62.02±2.08	100.00±2.67
	W7-4	W7(3%-30d)	0	0	10.12±1.11	28.36±1.15	36.10±2.31	17.22±1.10	100.06±2.55

^a, Aceite mineral ligero; ^b, Aceite mineral pesado, ^c, días.

En cuanto a los BE sintetizados por la cepa del género *Marinobacter*, destacamos los BE: W8-2, W8-7 que fueron capaces de emulsionar el AML con porcentajes de emulsión superiores al 40% (Tabla 4.6).

Tabla 4.6. Actividad emulgente frente a AMP, AML, diesel, xileno, octano, tolueno y crudo Kirkuk, de los biopolímeros sintetizados por la cepa *Marinobacter* sp. W8. Expresada en porcentajes de emulsión ($p < 0,05$).

Denom.		BE	Sustratos						
		Cond. Cultivo	AML ^a	AMP ^b	Diesel	Xileno	Octano	Tolueno	Crudo
<i>Marinobacter</i>	W8-1	W8(1%-7d ^c)	0	0	0	45.25±1.88	62.17±3.01	60.07±2.54	0
	W8-2	W8(1%-15d)	57.10±1.45	0	0	12.00±1.31	55.01±3.42	27.05±1.22	72.17±2.61
	W8-3	W8(3%-7d)	0	0	11.02±1.62	76.05±2.16	76.12±3.56	74.41±2.64	59.11±2.84
	W8-4	W8(3%-15d)	7.02±0.55	0	9.11±1.31	31.01±0.15	56.30±2.52	31.23±2.51	100.01±2.98
	W8-5	W8(3%-21d)	0	0	9.00±1.07	0	45.30±1.64	0	0
	W8-6	W8(3%-30d)	0	0	5.40±0.57	0	56.24±1.32	14.23±0.22	85.12±2.15
	W8-7	W8(7%-7d)	61.05±3.30	0	5.12±0.66	18.12±1.60	66.12±1.85	20.20±1.01	0
	W8-8	W8(7%-15d)	44.04±1.88	0	3.12±0.55	29.22±0.12	56.22±2.17	30.10±2.17	0

^a, Aceite mineral ligero; ^b, Aceite mineral pesado, ^c, días.

Respecto a los BE sintetizados por las cepas S21, S24 del género *Pseudomonas*, los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.7. De estos BE sintetizados destacamos los BE; S21-3 y S21-4 que fueron capaces de emulsionar el AML con porcentajes de emulsión de 69%.

Tabla 4.7. Actividad emulgente frente a AMP, AML, diesel, xileno, octano, tolueno y crudo Kirkuk, de los biopolímeros sintetizados por las cepas S21 y S24 del género *Pseudomonas*. Expresada en porcentajes de emulsión ($p < 0,05$).

Denom.	BE		Sustratos						
	Cond. Cultivo	AML ^a	AMP ^b	Diesel	Xileno	Octano	Tolueno	Crudo	
<i>Pseudomonas</i>	S21-1	S21(1%-7d ^c)	0	0	0	0	33.41±2.70	14.22±1.45	0
	S21-2	S21(3%-7d)	0	0	0	12.22±0.99	34.32±3.10	25.10±1.31	95.14±2.21
	S21-3	S21(3%-15d)	69.31±1.80	0	0	10.00±0.21	33.01±1.64	75.10±2.87	89.28±2.64
	S21-4	S21(3%-21d)	69.57±1.11	0	0	0	38.23±2.11	67.11±2.54	88.12±2.20
	S21-5	S21(3%-30d)	33.13±2.21	0	0	0	28.15±1.14	41.02±1.64	0
	S21-6	S21(7%-7d)	0	0	0	0	0	30.00±1.25	5.10±1.01
	S21-7	S21(7%-15d)	5.01±0.21	0	0	0	0	11.01±0.33	43.33±1.26
	S24-1	S24(1%-7d)	11.14±0.30	0	0	0	22.22±1.33	5.28±0.12	51.10±2.51
	S24-2	S24(1%-15d)	0	0	0	12.11±0.30	14.10±1.12	37.14±3.14	74.12±1.75
	S24-3	S24(3%-7d)	0	0	0	14.44±0.12	45±2.11	25.47±2.41	73.22±2.25
	S24-4	S24(3%-15d)	13.04±0.50	0	0	0	11.00±0.33	13.54±1.30	100.01±3.75
	S24-5	S24(3%-21d)	0	0	0	0	0	20.11±1.84	45.55±2.31
	S24-6	S24(3%-30d)	0	0	0	0	0	6.01±1.42	39.45±1.12
	S24-7	S24(7%-7d)	0	0	0	0	12.14±0.81	0	55.12±1.15
	S24-8	S24(7%-15d)	6.12±0.85	0	0	0	9.41±1.03	0	50.05±1.11

^a, Aceite mineral ligero; ^b, Aceite mineral pesado, ^c, días.

Asimismo, la capacidad de los BE sintetizados por la cepa *Pseudoalteromonas elyakovii* W18 de emulsionar los siete sustratos ensayados se muestran en la **Tabla 4.8**. De estos BE cabe destacar el BE; W18-2 capaz que se caracterizó con valores de emulsión considerable frente al tolueno (50%) y el BE; W18-5 que fue capaz de emulsionar el crudo Kirkuk con 100% de emulsión.

Tabla 4.8. Actividad emulgente frente a AMP, AML, diesel, xileno, octano, tolueno y crudo Kirkuk, de los biopolímeros sintetizados por la cepa *Pseudoalteromonas elyakovii* W18. Expresada en porcentajes de emulsión ($p < 0,05$).

Denom.	BE		Sustratos						
	Cond. Cultivo	AML ^a	AMP ^b	Diesel	Xileno	Octano	Tolueno	Crudo	
<i>Pseudoalteromonas</i>	W18-1	W18(1%-7d ^c)	0	0	0	0	12.01±1.09	0	0
	W18-2	W18(3%-7d)	0	0	0	0	25.5±1.20	50.21±2.60	0
	W18-3	W18(3%-15d)	0	0	0	0	10.11±1.01	25.70±1.30	0
	W18-4	W18(3%-21d)	0	0	0	0	9.00±0.60	13.01±0.21	
	W18-5	W18(3%-30d)	0	0	0	0	5.10±0.40	0	100.03±3.45
	W18-6	W18(7%-7d)	0	0	0	0	6.00±0.30	0	0
	W18-7	W18(7%-15d)	0	0	0	0	4.01±0.12	0	0

^a, Aceite mineral ligero; ^b, Aceite mineral pesado, ^c, días.

4.2.3 Índice de calidad bioemulgente

El estudio de la caracterización de los biopolímeros microbianos para su posterior utilización a nivel industrial es un proceso que normalmente comienza con la producción del biopolímero en matraces de laboratorio. Según Sutherland (1994; 2001), el

microorganismo debe ser cultivado bajo diferentes condiciones, para seleccionar aquellas que determinan una producción óptima y rentable desde el punto de vista de los sustratos empleados, así como unas propiedades adecuadas del biopolímero que se correspondan con un producto final de calidad. En general, estos estudios requieren la comparación de numerosos datos que dificultan en ocasiones la selección de las condiciones más idóneas para obtener un biopolímero de interés.

Con objeto de realizar una selección de los BE sintetizados con mayor interés así como las condiciones idóneas de producción, se ha establecido un índice que hemos denominado índice de calidad bioemulgente (Ic), el cual está condicionado por la actividad emulgente, el número de sustratos emulsionados, la cantidad de polímeros sintetizados, el tiempo requerido para su producción y el medio de cultivo para la producción.

Para el desarrollo de este índice se valoró en primer lugar la actividad emulgente considerando todos los sustratos ensayados y determinando el valor de la media, así establecimos que aquellos BE con capacidad para emulsionar mayor números de sustrato presentaban un mayor interés dado su mayor potencial de aplicación. Para ponderar este factor desarrollamos ΣAE tal y como se refleja en la siguiente fórmula:

$$\Sigma AE = \frac{AE_{AML} + AE_{AMP} + AE_{Diesel} + AE_{Xileno} + AE_{Octano} + AE_{Tolueno} + AE_{Crudo}}{n}$$

donde n es el número de sustratos ensayados (en este caso n=7)

Puesto que otro factor importante es la producción (P), se ha considerado este valor teniendo en cuenta la cantidad de biopolímero sintetizado (expresado en g de biopolímero sintetizado / l de medio de cultivo) y la composición química del mismo (K) en términos de carbohidratos (C) y proteínas (Pr). Dado que la calidad de BE está condicionada por la presencia de carbohidratos y proteínas, de manera que los BE con mayor porcentaje de carbohidratos y proteínas tienen mayor calidad.

$$K = \frac{\%C + \%Pr}{100}$$

Como parámetros inversamente relacionados se han incluido el tiempo de incubación necesario (t) para producir el BE y la concentración de sales (S). Ya que desde el punto de vista industrial, es más rentable obtener la producción en el menor tiempo posible

y con el menor gasto de reactivos para la producción. Teniendo en cuenta todos estos parámetros se ha desarrollado la siguiente fórmula:

$$I_c = \left(\left(P \cdot K \right) + \left(\frac{\Sigma AE}{10} \right) - \left(\frac{t}{100} \right) + [S] \right) \cdot \delta$$

donde:

P: producción en g/l de BE

K: factor de composición química de BE

AE: porcentaje de la media de actividad emulgente de BE

δ : número de sustratos emulsionados por el BE

t: tiempo de incubación en días para la producción de BE

S: concentración de sales (p/v)

Se aplicó el índice I_c a todos los BE sintetizados en este estudio. Los resultados obtenidos se recogen en la **Tabla III, anexo I**, de estos resultados destacamos los biopolímeros sintetizados por las cepas del género *Halomonas*, de los cuales cabe mencionar aquellos sintetizados por las cepas *H. alkantarctica* W3, *H. variabilis* W4 y W10 y *Halomonas* sp. W12 (**Tabla 4.9**), estas cepas han mostrado ser capaces de sintetizar BE más eficientes, ya que los BE sintetizados por estas cepas originaron emulsiones estables frente a más de 5 sustratos, con porcentajes de emulsión que alcanzaron el 70%.

Tabla 4.9. Características más relevantes de los BE seleccionados según el índice de calidad bioemulgente

Grupo de cepas productoras	BE		I_c	AE		Producción g/l	Composición química (%)		
	Denom.	Cond. cultivo		E ^a (%)	n ^o Sustratos		C ^b	P ^c	ND
<i>Halomonas</i>	W3-7	7%-7d ^d	3,2	54	6	0,91	42	30	27
	W4-3	3%-7d	4,0	71	6	0,65	62	12	26
	W4-8	7%-15d	3,1	55	6	0,74	30	24	46
	W10-2	1%-15d	3,9	50	6	4,93	37	8	55
	W10-3	3%-7d	3,9	56	7	0,2	77	4	19
	W12-7	7%-7d	3,5	63	6	0,89	32	34	33

^a, Emulsión; ^b, Carbohidratos; ^c, Proteínas; ^d, días; ND: No determinado.

4.2.4 Análisis estadístico

Para establecer las posibles relaciones entre los biopolímeros sintetizados por las 18 cepas objeto de estudio y los distintos parámetros estudiados, se realizó el análisis multivariable de redundancia (RDA) (CANOCO 4.5) utilizando la salinidad y el tiempo de incubación como dos variables independientes.

El análisis de redundancia (RDA) presentado como gráfico triplot se muestra en la **Figura 4.26**. Este gráfico triplot representa la distribución de los resultados obtenidos en dos dimensiones. Así, los resultados obtenidos fueron caracterizados con una significancia de $p=0,05$. El primer eje (horizontal) describe un 2,4% de la variabilidad de los bioemulgentes sintetizados mediante las variables consideradas en el análisis y un 3,9% de variabilidad de todo el sistema. El parámetro más determinante este eje fue la fracción de los carbohidratos (C). El segundo eje (vertical) describe un 61,1% de la variabilidad de los bioemulgentes obtenidos explicable mediante los parámetros considerados en el análisis y un 100% de la variabilidad total del sistema. En este eje la fracción de proteínas (Pr) fue el parámetro más determinante.

El análisis realizado mostró que los bioemulgentes sintetizados se agruparon según las variables independientes, tiempo de incubación (t) y la concentración de sales (S). Los grupos (I) y (II) englobaron los bioemulgentes sintetizados al 1% (p/v) de sales a los 7 y 15 días de incubación, respectivamente. Los grupos (III), (IV), (V) y (VI) incluyeron los bioemulgentes sintetizados al 3% (p/v) de sales a los 7, 15, 21 y 30 días de incubación, respectivamente y los grupos (VII) y (VIII) agruparon los bioemulgentes sintetizados al 7% de sales durante 7 y 15 días de incubación, respectivamente.

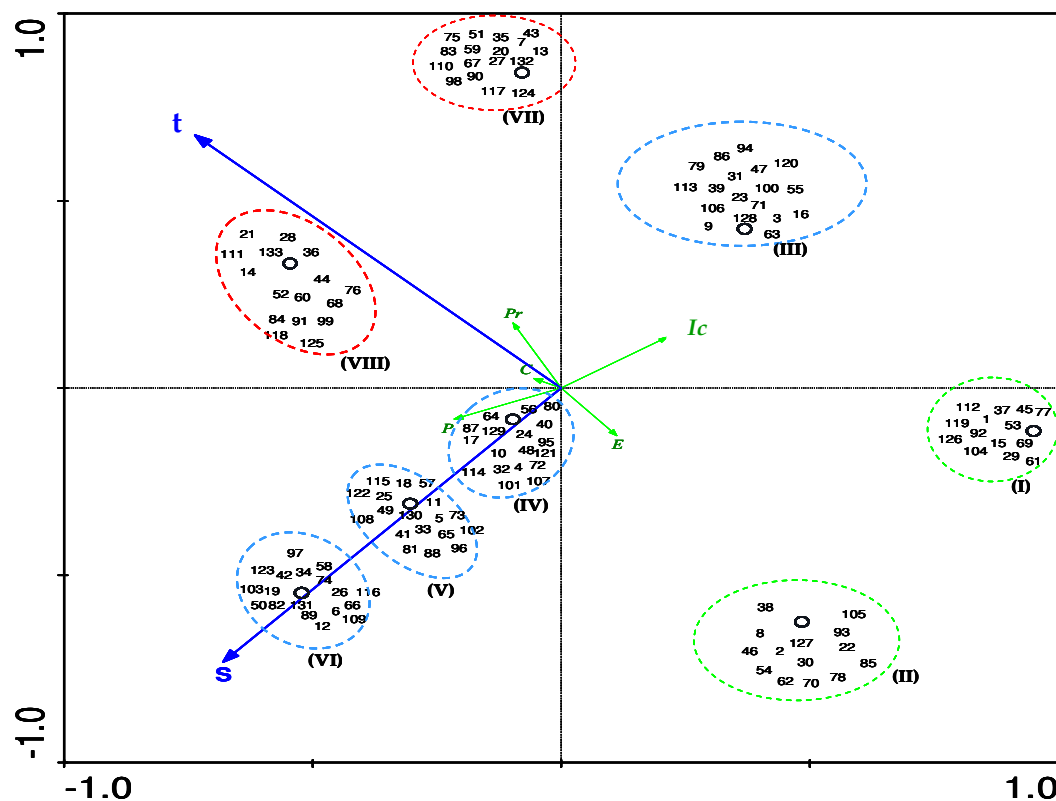


Figura 4.26. Gráfico triplot del análisis de redundancia (RDA) para los bioemulgentes producidos por las 18 cepas incluidas en este estudio. Se muestran las dos variables independientes: tiempo de incubación y salinidad.

El análisis de redundancia (RDA) reveló por un lado, que el tiempo de incubación (t) se correlacionó directamente y positivamente con las fracciones de carbohidratos (C) y proteínas (Pr) de los BE analizados, mientras que esta variable se correlacionó negativamente con la emulsión (E). La segunda variable estudiada fue la concentración de sales (S), esta última se correlacionó directamente y positivamente con la productividad (P) y negativamente con el índice de calidad bioemulgente propuesto (Ic). Por otro lado, los BE de los grupos (I) y (II) fueron influenciados directamente por la emulsión (E), los BE del grupo (III) fueron influenciados por el índice Ic. Asimismo, los BE de los grupos (IV), (V) y (VI) fueron influenciados por la productividad (P). Por último los BE de los grupos (VII) y (VIII) fueron influenciados por los carbohidratos (C) y proteínas (Pr).

Este análisis puso de manifiesto que tanto la concentración de sales (S) como el tiempo de incubación (t) fueron parámetros importantes, que influyeron en la síntesis y en las propiedades de los bioemulgentes sintetizados ($P < 0,05$).

4.3 CAPÍTULO III. DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS

4.3.1 Degradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs)

4.3.1.1 Crecimiento en medio sólido con HPAs

Para llevar a cabo este estudio se realizó el crecimiento de las 18 cepas seleccionadas en presencia de los HPAs al 1% (p/v), para determinar la capacidad de estas cepas para crecer en presencia de dichos HPAs. Los compuestos aromáticos empleados fueron: naftaleno ($C_{10}H_8$), fenantreno ($C_{14}H_{10}$), antraceno ($C_{14}H_{10}$) y pireno ($C_{16}H_{10}$). Se consideró como resultado positivo la formación de colonias en placas utilizando los compuestos aromáticos como única fuente de carbono. Los resultados obtenidos se recogen en la **Tabla 4.10**. Basándonos en los resultados obtenidos se pudo observar que las 18 cepas proliferaron en medio sólido adicionado de naftaleno, mientras que este número de cepas fue menor cuando el medio sólido contenía fenantreno, antraceno y pireno. Asimismo las cepas F2 del género *Brevibacterium*, W5 y W7 del género *Thalassospira* y W8 del género *Marinobacter* mostraron crecimiento positivo que fue interpretado por la aparición de colonias en la superficie del medio sólido adicionado del HPAs como única fuente de carbono. Por el contrario, las cepas W3, W4, W10 y W12 del género *Halomonas* proliferaron en presencia de naftaleno, fenantreno y pireno a una concentración del 1% (p/v).

Tabla 4.10. Capacidad de las cepas seleccionadas para crecer en presencia de 4 HPAs al 1% (p/v). Se indican los resultados positivos del crecimiento en placas con HPAs (+) y ausencia de crecimiento (-).

Cepas	Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos (HPAs)				
	Naftaleno	Fenantreno	Antraceno	Pireno	
<i>Bacillus</i>	W1	+	+	+	+
	W15	+	+	+	+
	W16	+	+	+	+
	F17	+	+	+	+
	F20	+	+	+	+
	S22	+	+	+	-
	S27	+	+	-	+
<i>Brevibacterium</i>	F2	+	+	+	+
<i>Halomonas</i>	W3	+	+	-	+
	W4	+	+	-	+
	W10	+	+	-	+
<i>Thalassospira</i>	W12	+	+	-	+
	W5	+	+	+	+
	W7	+	+	+	+
<i>Marinobacter</i>	W8	+	+	+	+
<i>Pseudomonas</i>	S21	+	-	-	-
	S24	+	-	-	-
<i>Pseudoalteromonas</i>	W18	+	+	-	-

4.3.1.2 Relación entre las cepas y su utilización de los HPAs

Los resultados de capacidad de crecimiento de las cepas en medio sólido adicionados de HPAs, obtenidos durante los experimentos realizados en este trabajo, fueron analizados mediante el estudio multivariante y multidimensional (Primer 6) que permite visualizar como se agrupan las 18 cepas incluidas en este estudio según sus capacidades de crecer en medio sólido S4 adicionado de HPAs como variables dependientes de los parámetros estudiados. Como resultado de este análisis obtuvimos la representación bidimensional que presenta la correlación de las variables. Dichos resultados representan las posibles agrupaciones entre las 18 cepas basándose en el crecimiento en presencia de los HPAs. En la **Figura 4.27** se muestran los resultados obtenidos.

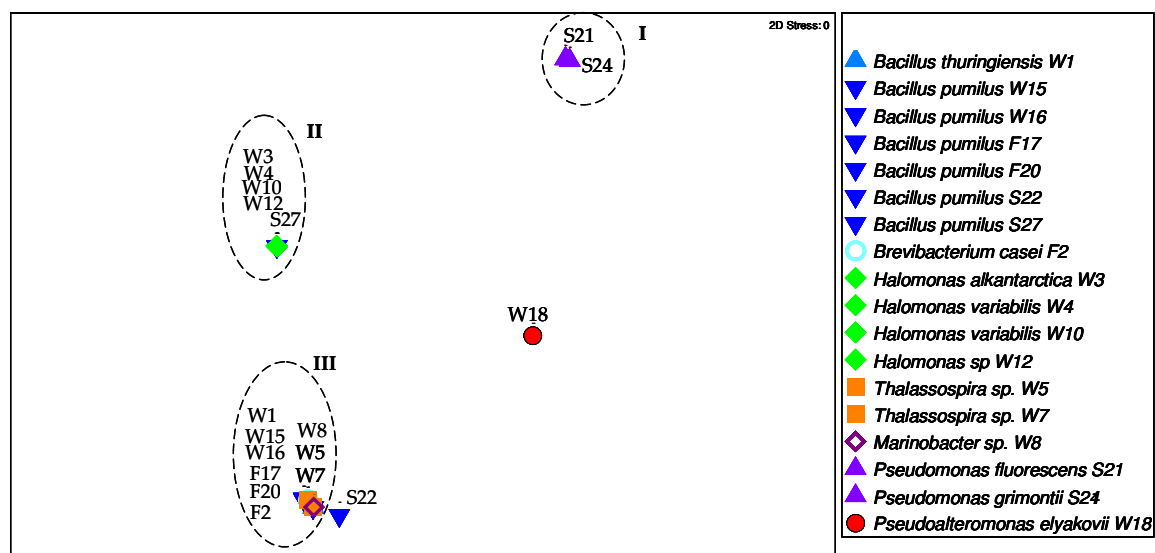


Figura 4.27. Representación gráfica en dos dimensiones de la correlación obtenida mediante el análisis de escalonamiento multidimensional.

Los resultados obtenidos mostraron 3 agrupaciones, en el primer grupo (I) incluyó las cepas con capacidad de utilizar un sólo HPA, en este grupo se encontraron las dos cepas S21 y S24 del género *Pseudomonas*, el grupo (II) incluyó las cepas con capacidad de utilizar tres HPAs, en este grupo encontramos las 4 cepas W3, W4, W10 y W12 pertenecientes al género *Halomonas* y la cepa S27 perteneciente al género *Bacillus*. En el grupo (III) se incluyeron las cepas con capacidad de utilizar cuatro HPAs, en este grupo se encontraron las cepas W1, W15, W16, F17, F20 pertenecientes al género *Bacillus*, W5 y W7 del género *Thalassospira*, *Marinobacter sp.* W8 así como *Brevibacterium casei* F2. De los tres grupos caracterizados destacamos las cepas del grupo (III) que se identificaron capaces de utilizar los HPAs naftaleno, fenantreno, antraceno y pireno como única fuente de carbono.

4.3.1.3 Crecimiento en medio líquido con naftaleno

Una vez seleccionadas las bacterias en función de su tolerancia a los HPAs anteriormente descritos, se procedió a determinar su crecimiento en medio líquido con naftaleno al 1% (p/v), realizando el estudio de forma comparativa entre la el crecimiento de las bacterias y la capacidad degradadora del naftaleno en el medio líquido MMS (mínimo marino sintético) donde el HPA fue la única fuente de carbono para el crecimiento. Los resultados obtenidos permitieron conocer qué cepas bacterianas desarrollarían un proceso de biodegradación y, por consiguiente, que cepas debían ser seleccionadas para posteriores estudios y caracterización.

Los resultados obtenidos mostraron que la cepa *B. thuringiensis* W1 presentaba el máximo de crecimiento en el medio mínimo (MMS) con naftaleno (1% (p/v)) a las 48 horas de incubación del orden de 1 logaritmo. Este crecimiento fue acompañado de una disminución de 0,74 g/l de naftaleno (Figura 4.28).

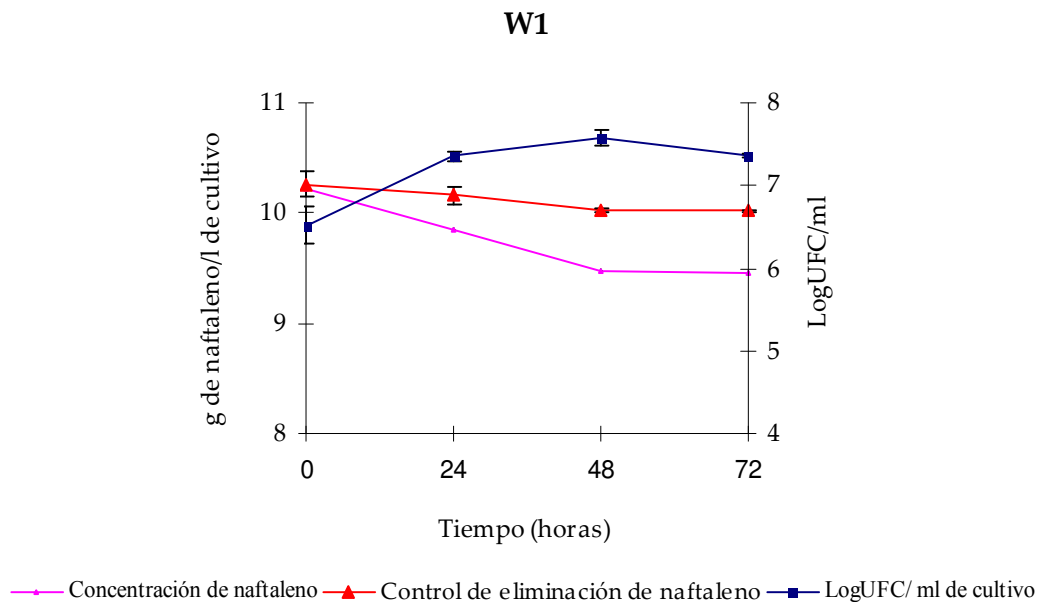


Figura 4.28. Crecimiento y capacidad degradadora de la cepa *Bacillus thuringiensis* W1 ($p < 0,05$).

La cepa *B. casei* F2 (Figura 4.29) mostró un máximo de crecimiento de 0,6 logaritmos a las 48 horas de incubación, este crecimiento fue acompañado de una eliminación de naftaleno de 0,62 g/l respecto a la concentración inicial del naftaleno en el medio de cultivo.

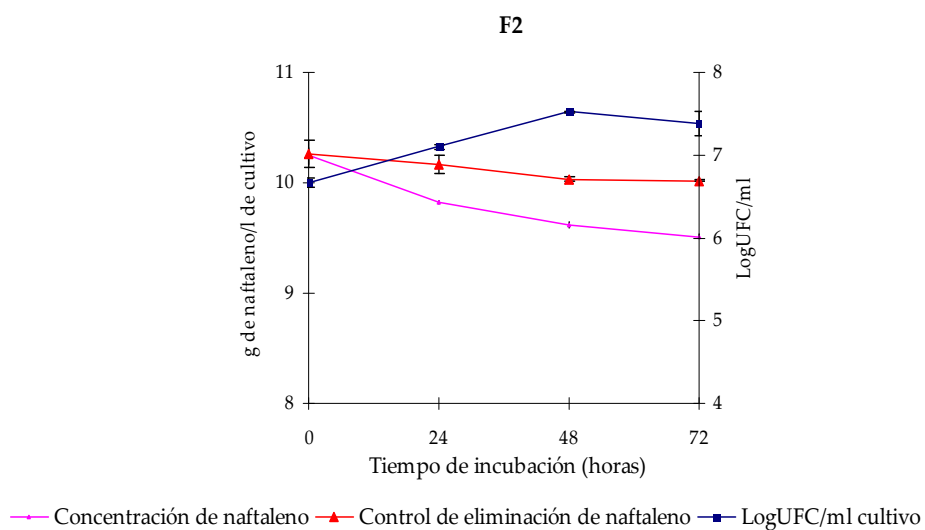


Figura 4.29. Crecimiento y capacidad degradadora de la cepa *Brevibacterium casei* F2 ($p < 0,05$).

Con respecto al crecimiento de las cepas *B. pumilus* W15, W16, F17, F20, S22 y S27 en presencia de 10 g/l de naftaleno (**Figura 4.30**), puede observarse que la cepa W15 presentó un crecimiento lento acompañado de una disminución de 0,86 g/l de la concentración de naftaleno a las 24 horas de incubación, mientras que la cepa W16 mostró un crecimiento superior a 1 logaritmo a las 24 horas de incubación, originando una eliminación de 0,73 g/l en la concentración de naftaleno. Respecto a la cepa F17 aunque el crecimiento fue de 0,65 logaritmos, el rendimiento de la eliminación de naftaleno fue similar a las otras cepas anteriormente comentadas. Por el contrario, las cepas F20, S22 y S27 mostraron menor capacidad de eliminación del hidrocarburo.

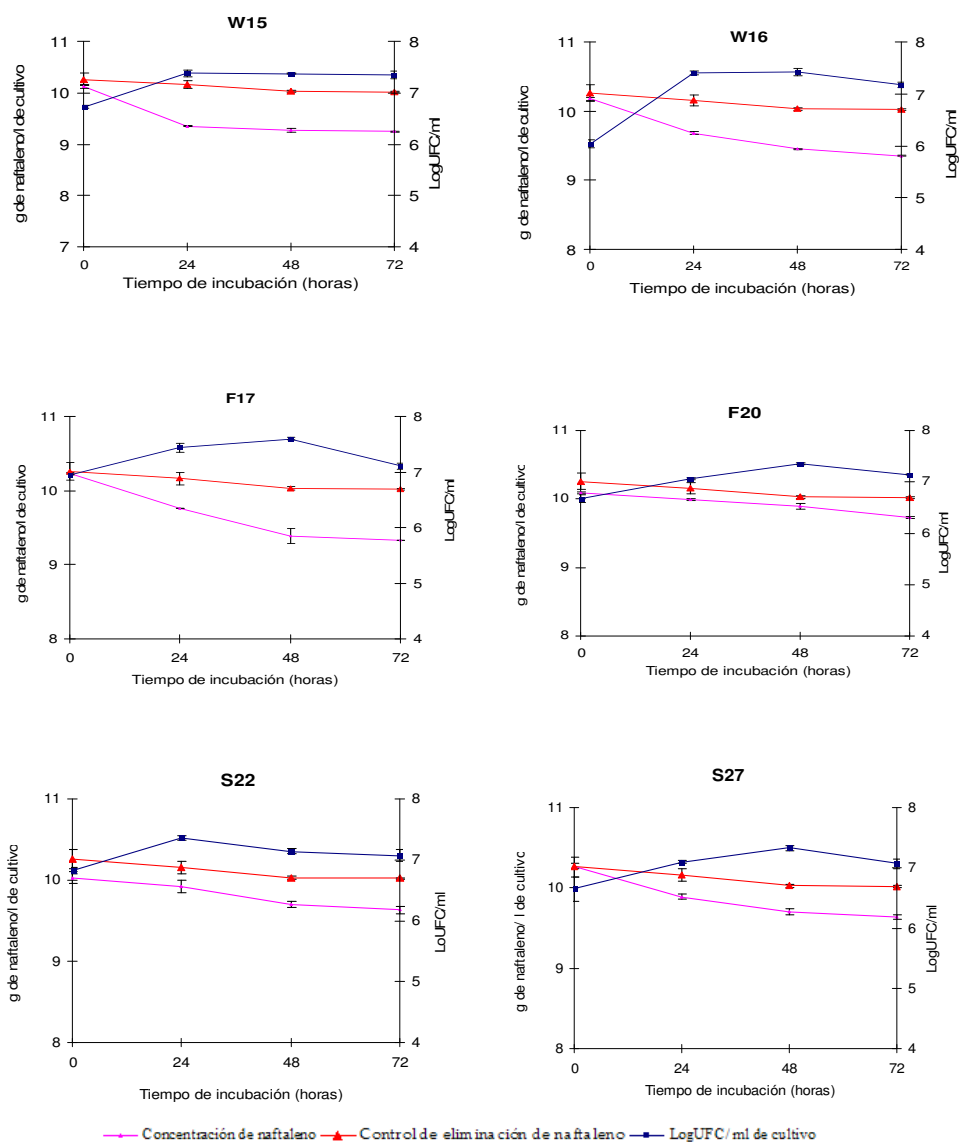


Figura 4.30. Crecimiento y capacidad degradadora de las cepas W15, W16, F17, F20, S22 y S27 pertenecientes al género *Bacillus* ($p < 0,05$).

Respecto al género *Halomonas* (Figura 4.31), se observó que *H. alkantarctica* W3 y *H. variabilis* W10 mostraron un máximo de crecimiento a las 48 horas de incubación, este crecimiento vino acompañado de una eliminación de naftaleno de 0,83 g/l para W3 y de 0,97g/l para W10. Por otra parte la cepa *H. variabilis* W4 mostró máximo crecimiento a las 48 horas de incubación acompañado de una disminución de 0,7 g/l de la concentración de naftaleno. Respecto a la cepa *Halomonas* sp. W12 presentó un crecimiento más lento y menor eficacia en la eliminación del HPA (0,53 g/l) (Figura 4.31).

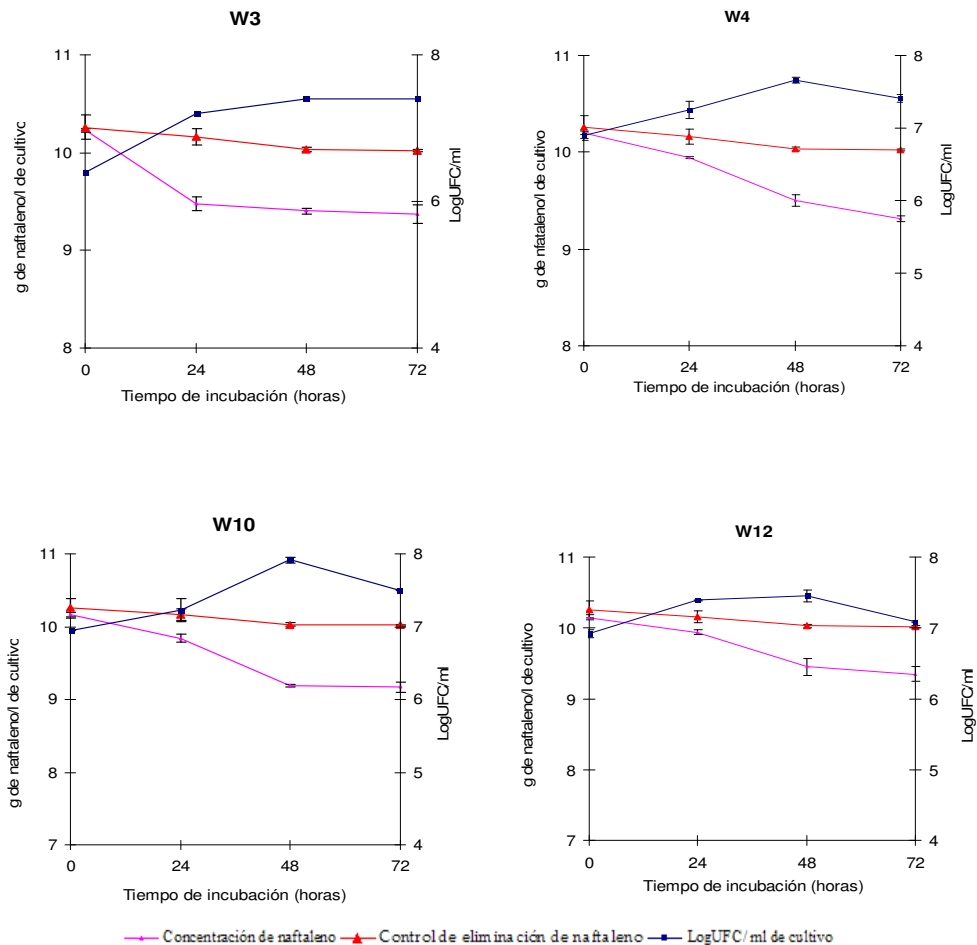


Figura 4.31. Crecimiento y capacidad degradadora de las cepas W3, W4, W10 y W12 pertenecientes al género *Halomonas* ($p < 0,05$).

Las cepas *Thalassospira* sp. W5 y W7 (Figura 4.32) mostraron menor crecimiento con una eliminación de 0,71 g/l de naftaleno obtenida por W7. Con respecto a la cepa *Marinobacter* sp. W8, se observó un buen crecimiento que alcanzó 1,41 logaritmos a las 24 horas de incubación, este crecimiento fue acompañado de una disminución de 1,44 g/l de la concentración del naftaleno en el medio de cultivo.

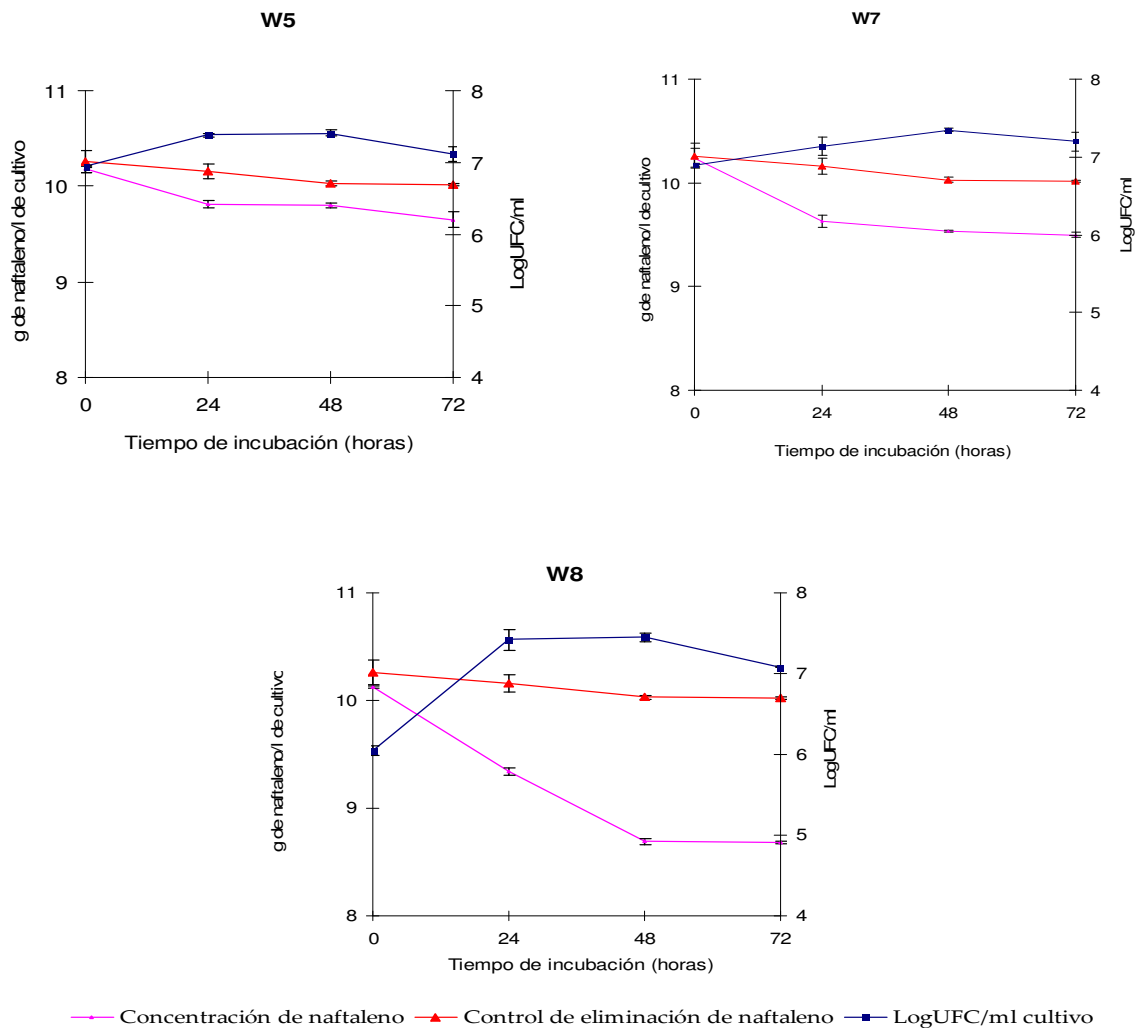


Figura 4.32. Crecimiento y capacidad degradadora de las cepas W5, W7 pertenecientes al género *Thalassospira* y la cepa W8 perteneciente al género *Marinobacter* ($p < 0,05$).

La Figura 4.33 representa el crecimiento en presencia de naftaleno de las cepas *Pseudoalteromonas elyakovii* W18, *Pseudomonas fluorescens* S21 y *Pseudomonas grimontii* S24 y la capacidad de dichas cepas para eliminar el HPA. De los resultados obtenidos destacamos la cepa *Pseudomonas grimontii* S24 con la cual se obtuvo una eliminación de 0,86 g/l de la concentración del naftaleno, dicha tasa de eliminación fue la concentración de eliminación más alta para este grupo de cepas.

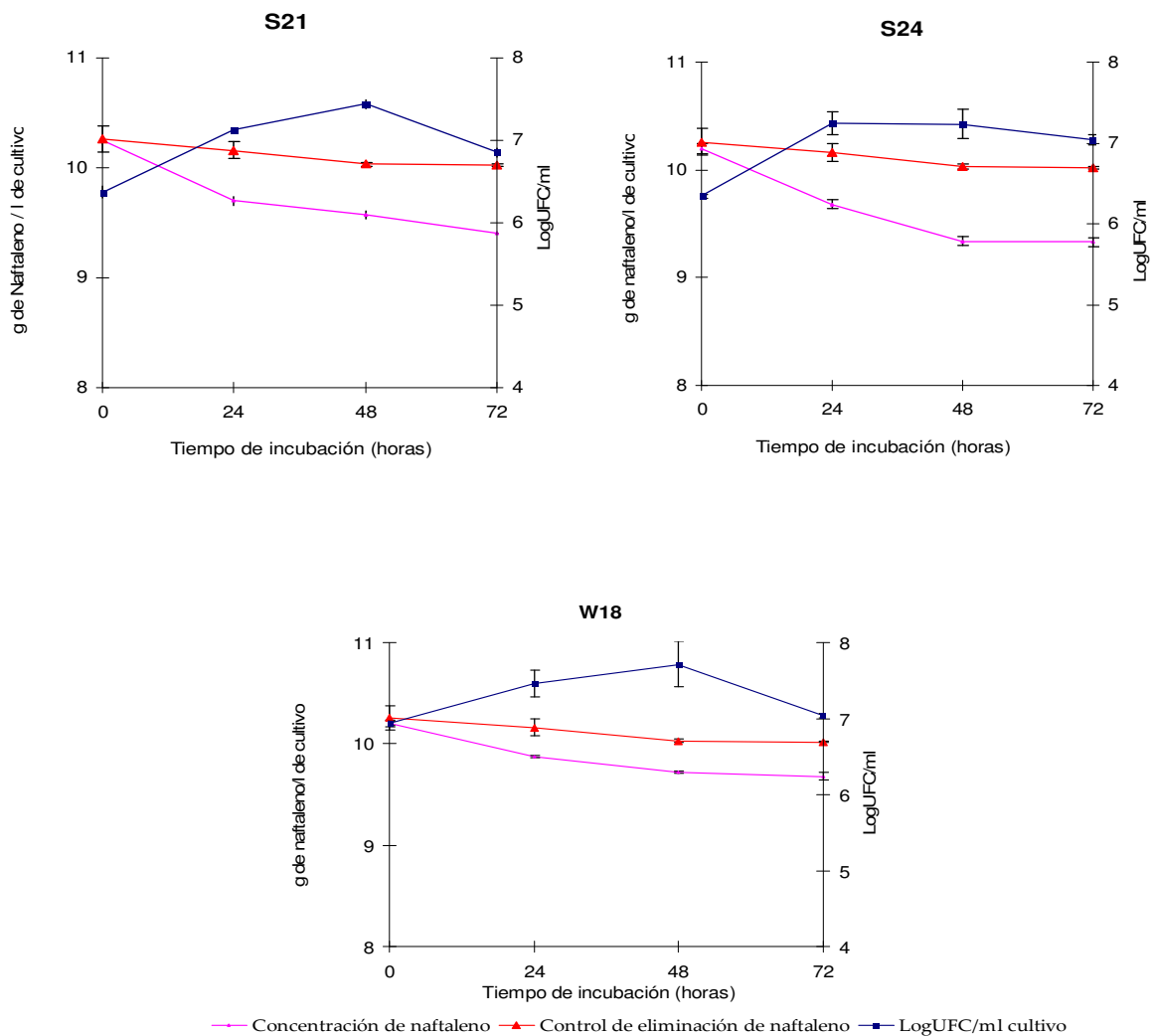


Figura 4.33. Crecimiento y capacidad degradadora de la cepa W18 perteneciente al género *Pseudoalteromonas* y las cepas S21 y S24 pertenecientes al género *Pseudomonas* ($p < 0,05$).

Como resumen de este primer apartado, puede concluirse que de las 18 cepas seleccionadas, las cepas *H. variabilis* W10 y *Marinobacter* sp. W8 fueron las dos cepas capaces de originar una eliminación del HPA superior a 1 g/l, tras 72 horas de incubación.

4.3.2 Degradación de crudo Kirkuk

Con objeto de estudiar la capacidad de las 18 cepas incluidas en este trabajo de investigación para utilizar el crudo como sustrato de crecimiento, se realizaron ensayos encaminados a estudiar el crecimiento en medio mínimo con crudo a una concentración del 1% (v/v).

4.3.2.1 Crecimiento en presencia de crudo Kirkuk

Se analizó la velocidad de crecimiento de las 18 cepas en presencia de crudo Kirkuk al 1% (p/v) como único sustrato de crecimiento, tal y como se describió en *el apartado 3.9.3* de la sección de *Material y Métodos*.

De los resultados obtenidos por las cepas W1, W15, W16, F17, F20, S22 y S27 (**Figura 4.34a**) pertenecientes al género *Bacillus*, destacamos que la cepa W16 desarrollo un crecimiento importante de 2,07 logaritmos a los 4 días de incubación. Las cepas F17 y F20 mostraron un máximo crecimiento a los 2 días de incubación mientras que para las otras cepas del género *Bacillus* el crecimiento fue menor que aquel obtenido por las tres cepas comentadas anteriormente. Asimismo, para la cepa F2 del género *Brevibacterium* se mostró un máximo crecimiento de 1,89 logaritmos a los 4 días de incubación.

Las cepas W3, W4, W10 y W12 (**Figura 4.34b**) pertenecientes al género *Halomonas*, mostraron un máximo de crecimiento, superior a 1 logaritmo en presencia de crudo a los 4 días de incubación.

Las cepas *Thalassospira* sp. W5 y W7 y la cepa *Marinobacter* sp. W8 (**Figura 4.34c**) mostraron un crecimiento similar en presencia del hidrocarburo. El crecimiento fue de 2 logaritmos a los 2 días de incubación.

Con respecto a las cepas *P. elyakovii* W18, *P. fluorescens* S21 y *P. grimontii* S24 (**Figura 4.34d**), el crecimiento en presencia de crudo Kirkuk al 1% (v/v) fue superior a 1 logaritmo para las cepas W18 y S21 mientras que el crecimiento de la cepa S24 en presencia del hidrocarburo fue mucho menor.

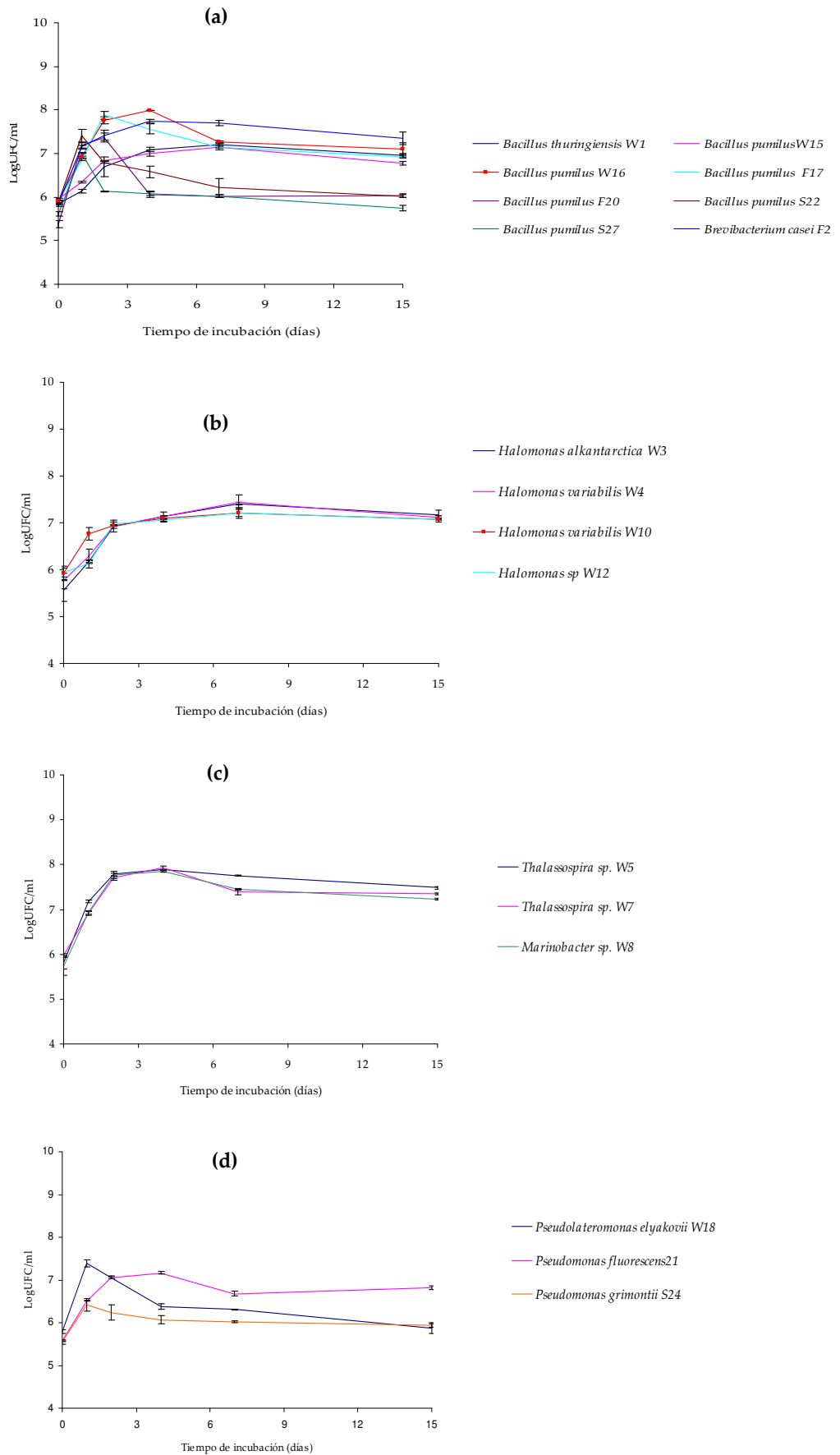


Figura 4.34. Crecimiento en presencia de crudo Kirkuk al 1% (p/v). Se muestra el crecimiento de las 18 cepas incluidas en este estudio, en medio MMS ($p < 0,05$).

4.3.2.2 Capacidad degradadora de las cepas

El rendimiento de la degradación de hidrocarburos fue evaluado mediante la determinación de Hidrocarburos Totales (TPH), alcanos lineales, alcanos ramificados y las fracciones aromáticas presentes en el crudo.

La **Figura 4.35** resume los porcentajes de eliminación de hidrocarburos totales (TPH) determinados por gravimetría para cada una de las 18 cepas objeto de estudio. Se puede observar que después de 15 días de incubación en el medio mínimo MMS adicionado de crudo Kirkuk al 1% (v/v) como único sustrato de crecimiento, las cepas *B. pumilus* F17, *H. alkantarctica* W3 y *Marinobacter* sp. W8 mostraron los porcentajes más altos de eliminación de TPH que fueron 42, 64 y 45%, respectivamente. Por otro lado, para el resto de las cepas los porcentajes de eliminación de TPH fueron comprendidos entre 7% (porcentaje de eliminación obtenido por *B. casei* F2) y el 34% (porcentaje obtenido por *H. variabilis* W4 y *B. thuringiensis* W1).

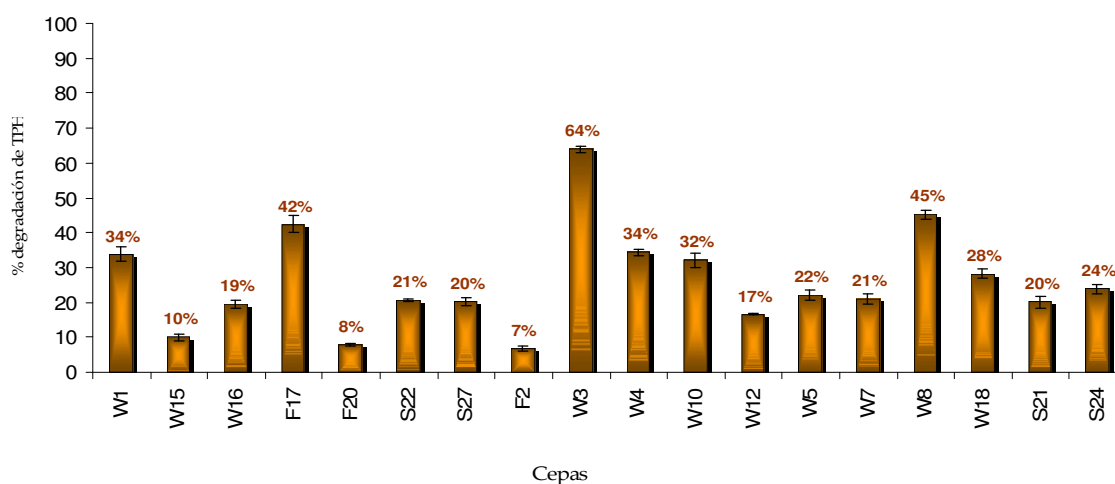


Figura 4.35. Porcentaje de degradación de hidrocarburos totales TPH obtenidos por las 18 cepas objeto de estudio después de 15 días de incubación ($p < 0,05$).

Durante la presente investigación se estudió la capacidad de las 18 cepas bacterianas seleccionadas para crecer sobre una mezcla compleja de hidrocarburos, como es el crudo tipo Kirkuk y determinar la actividad de los cultivos microbianos de eliminar las fracciones mayoritarias de dicho sustrato.

La **Tabla 4.11** refleja los porcentajes de eliminación de las distintas fracciones analizadas de crudo Kirkuk, obtenidos por las 18 cepas objeto de estudio.

Tabla 4.11. Porcentajes de eliminación de las fracciones de hidrocarburos después de la inoculación de cepas. ($p < 0,05$)

Cepas		Alcanos <C ₂₀	Alcanos >C ₂₀	Aromáticos	Alcanos ramificados	Alcanos cíclicos
<i>Bacillus</i>	W1	00.00	75.23±0.12	44.33±0.51	00.00	100.12±0.51
	W15	10.23±1.4	20.12±0.22	100.12±0.33	00.00	100.11±0.23
	W16	4.10±0.97	63.12±0.45	100.14±0.14	00.00	87.23±0.01
	F17	93.11±0.04	98.51±0.1	100.12±0.12	00.00	87.14±0.02
	F20	00.00	00.00	83.31±0.05	34.51±0.61	93.6±0.72
	S22	66.81±0.35	00.00	54.30±2.40	00.00	100.21±0.88
	S27	26.92±0.42	00.00	88.31±2.50	21.61±0.12	100.12±0.03
<i>Brevibacterium</i>	F2	00.00	82.33±0.14	74.11±0.03	00.00	100.33±0.05
<i>Halomonas</i>	W3	5.05±0.05	76.25±0.16	77.10±0.05	00.00	100.13±1.31
	W4	0.41±0.14	71.12±0.12	100.05±0.04	00.00	100.28±1.22
	W10	0.34±0.05	67.18±0.02	100.13±0.01	00.00	100.14±0.87
	W12	49.11±0.62	88.19±0.01	91.11±0.11	00.00	100.01±2.01
<i>Thalassospira</i>	W5	4.12±0.25	70.13±1.04	100.14±1.33	00.00	100.15±1.23
	W7	17.12±1.11	69.22±0.05	100.21±1.60	00.00	100.12±1.33
<i>Marinobacter</i>	W8	12.13±1.06	64.34±1.18	97.31±1.21	00.00	100.11±2.21
<i>Pseudoalteromonas</i>	W18	77.91±0.04	7.23±1.32	80.30±0.02	86.51±0.05	100.10±1.21
<i>Pseudomonas</i>	S21	37.41±0.18	00.00	91.81±1.41	25.50±0.54	100.11±0.41
	S24	40.29±0.24	00.00	88.80±0.03	73.61±1.2	94.71±0.78

^a, porcentaje inicial de las fracciones que constituyen el crudo Kirkuk

Se puede observar que el crudo Kirkuk se constituyó de alcanos C₁₀-C₂₀, alcanos >C₂₀, fracciones aromáticas, alcanos ramificados y alcanos cíclicos. Así, los compuestos aromáticos y los alcanos cíclicos que constituyen el crudo Kirkuk fueron las fracciones eliminadas por las 18 cepas con porcentajes de eliminación considerables, asimismo, las cepas *B. pumilus* F17 y S22, *Halomonas* sp. W12 y *P. elyakovii* W18 produjeron una eliminación superior al 50% en la fracción de alcanos <C₂₀, mientras que los alcanos >C₂₀ fueron eliminados también en porcentaje superior al 50% por las cepas *B. thuringiensis* W1, *B. pumilus* W16 y F17, *B. casei* F2, *H. alkantarctica* W3, *H. variabilis* W4 y W10, *Halomonas* sp. W12, *Thalassospira* sp. W5 y W7 y *Marinobacter* sp. W8. Por otro lado destacar que las fracciones aromáticas fueron eliminadas en más del 90% por las cepas *B. pumilus* W15, W16, F17, *H. variabilis* W4, W10, *Halomonas* sp. W12, *Thalassospira* sp. W5, W7, *Marinobacter* sp. W8 y *P. fluorescens* S21, siendo está la fracción de hidrocarburo más eficazmente eliminada. Los alcanos ramificados fueron eliminados por *P. grimontii* S24 y *P. elyakovii* W18 con porcentajes de eliminación superiores al 70%, y los alcanos cíclicos fueron eliminados por las 18 cepas estudiadas con porcentajes de eliminación superiores al 80%.

Los resultados obtenidos indicaron que de las 18 cepas estudiadas, cabe destacar las cepas *B. pumilus* F17, *Halomonas* sp. W12, *P. elyakovii* W18 y *P. grimontii* S24 que mostraron

porcentajes de eliminación considerables, de las distintas fracciones analizadas. Para ello podemos sugerir que estas cuatro cepas parecen ser de mayor interés en la degradación de hidrocarburos.

Asimismo, se realizó un análisis de comparaciones múltiples utilizando el estadístico Tukey con un grado de significancia de 0,05 para determinar si existía una diferencia estadísticamente significativa entre los resultados obtenidos. El método Tukey consiste en la ordenación de las medias de modo que todas las comparaciones son referidas a la misma diferencia mínima. Según este análisis de comparaciones múltiples (Diferencias Honestamente Significativas de Tukey) los resultados presentaron una significancia de $p < 0,05$ ($p = 0,00$). Así, cabe destacar que las fracciones aromáticas fueron totalmente eliminadas por las cepas *B. pumilus* W15, W16 y F17, *H. variabilis* W4 y W10 y *Thalassospira* sp. W5 y W7, con una significación de ($p < 0,05$). Las fracciones de alcanos ramificados fueron mejor eliminadas por las cepas *P. elyakovii* W18 y *P. grimontii* S24, siendo el 86,5% alcanzado por la cepa W18, el porcentaje de eliminación más elevado obtenido, este resultado presentó una significancia de $p = 0,00$ ($p < 0,05$). Los alcanos cíclicos fueron eliminados por todas las cepas con un porcentaje de eliminación superior al 87% ($p < 0,05$).

4.3.2.3 Relación entre los resultados obtenidos en los estudios de degradación de hidrocarburos

Durante el presente trabajo se analizaron los resultados obtenidos en los experimentos de crecimientos en presencia de crudo, con el fin de verificar el grado de eliminación de los TPH. Se realizó un análisis de conglomerados jerárquicos. El resultado de este análisis se muestra en el siguiente dendograma (**Figura 4.36**).

Se puede observar en el siguiente dendograma que se establecieron dos grupos de cepas, el primer grupo englobó las cepas W1, W15, W16, F20, S22, S27 del género *Bacillus*, las cepas W4, W10, W12 del género *Halomonas*, las cepas W5, W7 del género *Thalassospira*, las cepas S21, S24 del género *Pseudomonas*, las cepas F2 y W18 pertenecientes a los géneros *Brevibacterium* y *Pseudoalteromonas*, respectivamente. Este grupo de cepas resultó ser el grupo de cepas con menos porcentajes de eliminación de TPH, los porcentajes obtenidos en este caso fueron comprendidos entre el 7 y el 34%. El segundo grupo englobó las tres cepas con mayor porcentajes de eliminación de los TPH, que son las cepas *Halomonas alkantarctica* W3, *Marinobacter* sp. W8 y *Bacillus pumilus* F17.

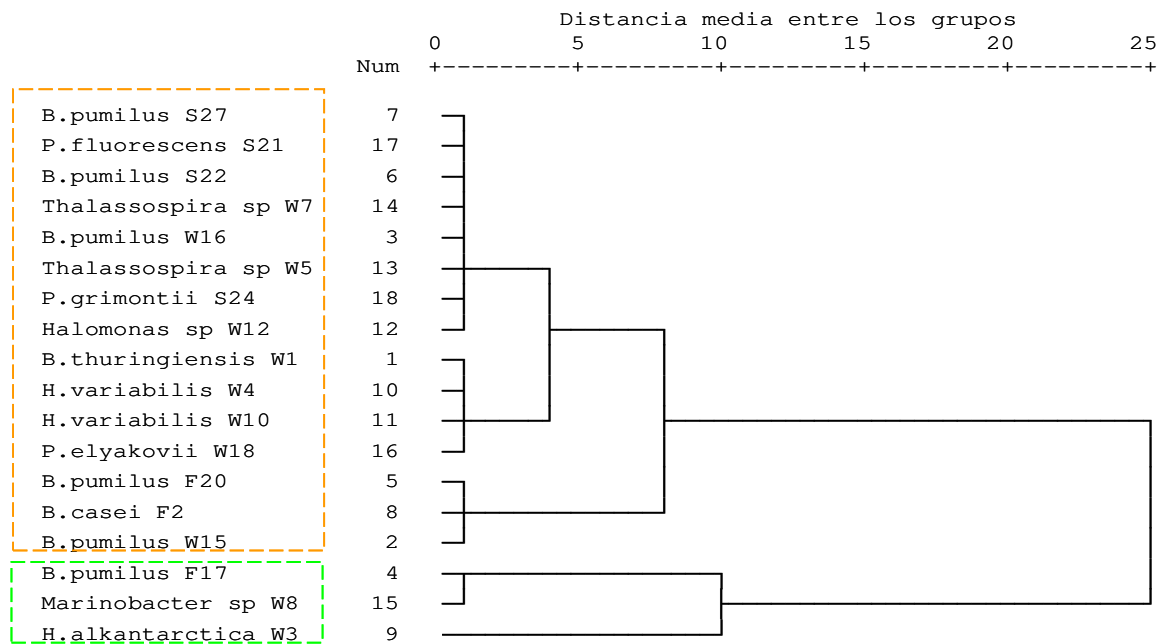


Figura 4.36. Dendrograma de análisis de clúster de los resultados de eliminación de los hidrocarburos totales TPH para las 18 cepas objeto de estudio.

Asimismo, se realizó otro análisis de conglomerados jerárquicos que agrupa los resultados dependiendo de la distancia o diferencia entre los resultados de eliminación de las fracciones de hidrocarburos obtenidos. El resultado de este análisis se representa a continuación en el dendrograma de la Figura 4.37.

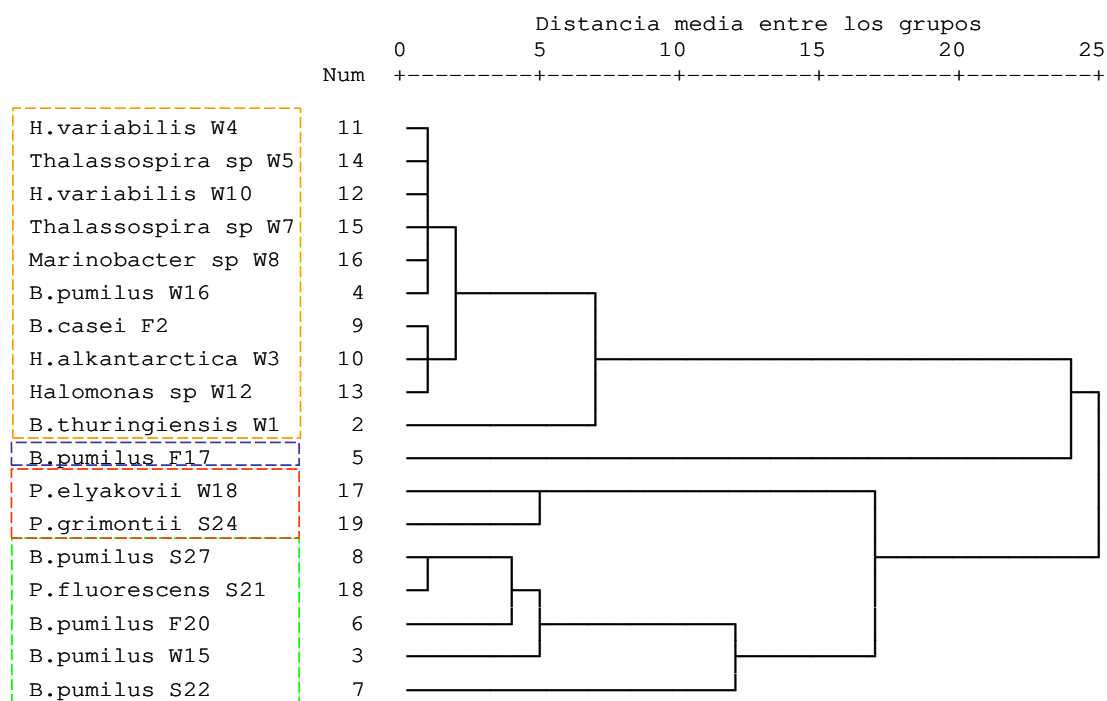


Figura 4.37. Dendrograma de análisis de clúster de los resultados de eliminación de las fracciones de hidrocarburos para las 18 cepas incluidas en este estudio

Se puede observar que el siguiente dendograma separa cuatro grupos de cepas, el primer grupo está constituido por W1, W16 del género *Bacillus*, W3, W4, W10, W12 del género *Halomonas*, W5, W7 del género *Thalassospira*, F2 del género *Brevibacterium* y W8 perteneciente al género *Marinobacter*. El segundo grupo representó la cepa *B. pumilus* F17, el tercer grupo se constituyó por las cepas *P. grimontii* S24 y *P. elyakovii* W18 y el último grupo incluyó las cepas W15, F20, S22, S27 del género *Bacillus* y S21 del género *Pseudomonas*.

Analizando estos resultados de degradación de crudo Kirkuk, destacar las cepas *Bacillus pumilus* F17, *Pseudomonas grimontii* S24 y *Pseudoalteromonas elyakovii* W18 por su mayor capacidad de eliminación de las distintas fracciones de hidrocarburo crudo Kirkuk.

4.4 CAPÍTULO IV. ESTUDIO DE GENES CATABÓLICOS

El empleo de microorganismos para la biorremediación de sitios contaminados con hidrocarburos es una opción viable por ser una tecnología sencilla y de bajo costo. Por otra parte, el estudio de genes catabólicos nos permite caracterizar el metabolismo y la respuesta a cambios en el medio ambiente así como realizar mejoras génicas en los microorganismos, para incrementar la eficiencia de los procesos de biorremediación.

4.4.1 Construcción de genoteca

En este capítulo hemos estudiado la caracterización genética de uno de los microorganismos aislados en este trabajo para su uso como modelo de búsqueda de promotores que respondan a la presencia de petróleo o de sus derivados. En esta búsqueda seguimos una estrategia análoga a la planteada por Uchiyama y col. (2005). Para dicho estudio se seleccionó la cepa *Halomonas variabilis* W10 (asilada a partir de muestras de agua de mar), por ser una cepa Gram negativa y similar al fondo que queríamos utilizar como herramienta molecular. Como fondo genético para la búsqueda de promotores que respondan a la presencia de naftaleno se utilizó la cepa *Escherichia coli* XL1Blue y como vector se utilizó el plásmido p18GFP que es un derivado del plásmido pUC18 y que contiene un sitio de clonación múltiple precedido de codones de parada de la transcripción, un promotor P_{lacZ} , corriente arriba, y el gen de expresión *'gfp* bajo control del promotor P_{lac} corriente abajo (Figura 4.38).

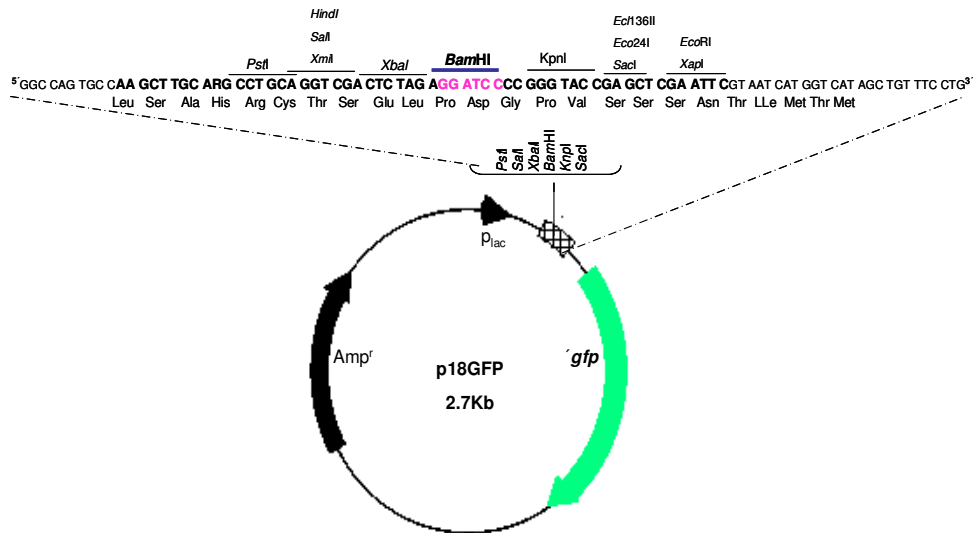


Figura 4.38. Plásmido p18GFP. Los sitios de restricción para las enzimas son únicos. Se señalan además el gen de resistencia a ampicilina y el gen *gfp* que se encuentra bajo control del promotor P_{lac} . Se muestra en detalle la secuencia de nucleótidos (5' → 3') así como la secuencia de los aminoácidos a la que da lugar la lectura de los correspondientes codones (cada aminoácido se indica debajo de la base central del codón que lo codifica). Las flechas indican el sentido de la transcripción de los genes.

Para la construcción de una genoteca basada en el ADN total de la cepa *H. variabilis* W10, se purificó el ADN total partiendo de un cultivo saturado en MY3%. La purificación se realizó siguiendo el método modificado descrito por Kado y Liu (1981) y el resultado de dicha purificación se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 0,7% en TAE 1x (**Figura 4.39a**). A continuación se digirió parcialmente 84 ng de este ADN con concentraciones decrecientes de la enzima de restricción *Sau3A1*. Para ello se realizaron restricciones a tiempo constante para lo que se emplearon diluciones seriadas; 1/2, 1/4, 1/6, 1/8, 1/10, 1/12, 1/16 y 1/32 de la enzima de restricción a una concentración inicial de 0,05 U/ μ l y se incubaron a 37°C durante 1 hora. Para comprobar el resultado de estas restricciones se analizó nuevamente por electroforesis cada una de las diluciones de las restricciones realizadas (**Figura 4.39b**). Se seleccionó la dilución 1/8 como la más adecuada al presentar el rango de tamaño requerido.

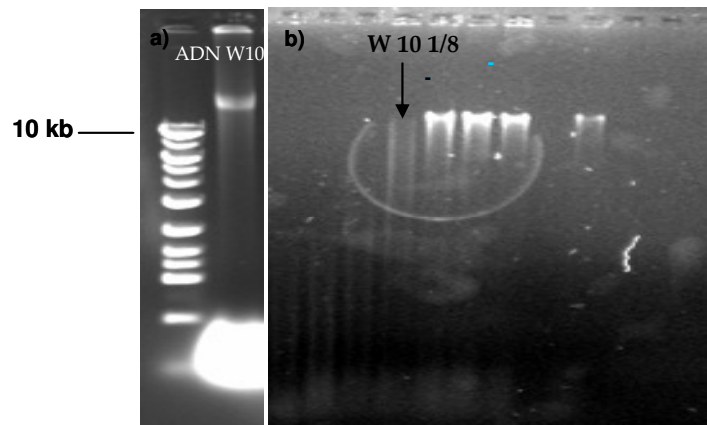


Figura 4.39. Electroforesis del ADN cromosómico de *Halomonas variabilis* W10. Se muestra el estado del ADN antes (a) y después (b) de la restricción con *Sau3A1*.

Para la correcta inserción de los insertos, se linealizó p18GFP con *Bam*HI Para ello se tomaron 4 μ l del plásmido p18GFP y se digirieron con 0,5 U de la enzima de restricción *Bam*HI durante 3 horas de incubación a 37°C (**Figura 4.40a**). A continuación el vector, tras el protocolo de restricción, fue desfosforilado con 1U de la fosfatasa alcalina de gamba ártica (**Figura 4.40b**). La reacción de defosforilación se inactivó por calor a 65°C durante 5 minutos de incubación.

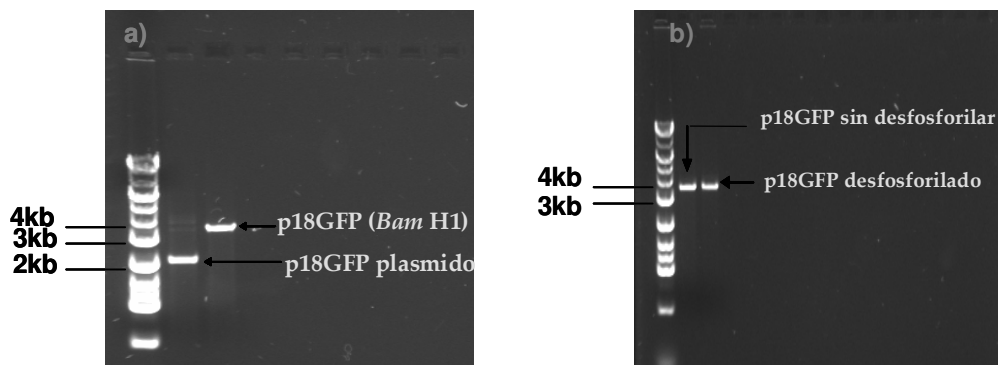


Figura 4.40. Electroforesis del plásmido p18GFP restringido con *Bam* HI y defosforilado con fosfatasa alcalina.

Una vez preparadas las restricciones del ADN total de *H. variabilis* W10 y del plásmido p18GFP, se procedió a la ligación de los dos tipos de fragmentos de ADN para obtener el plásmido transformado con el material genético de la cepa *Halomonas variabilis* W10 utilizando 1U de ADN-ligasa como se ha descrito anteriormente en *el apartado 3.5.1.8* de la sección de material y métodos. Tras el periodo de reacción de ligación se dializaron 15 μ l de ligación utilizando membranas de 0,22 μ m de Millipore (cat. n° GVWP02500) durante 1 hora en agua calidad milliQ a temperatura ambiente.

Del producto de la reacción de diálisis se transformaron 60 μ l de células competentes de *E. coli* XL1 Blue con 0,5 μ l del producto mediante choque eléctrico tal y como se ha descrito en el apartado 3.5.1.5 de la sección material y métodos. Las células resultantes de esta transformación se incubaron 1 hora a 37°C y se conservaron en glicerol al 40% para su posterior uso. A esta librería se le denominó "I1".

Para conocer la calidad de la librería obtenida se sembraron 100 μ l del producto de la transformación en placa con medio TSA adicionado de Ap₁₀₀. Tras incubación a 37°C durante 24 horas, se tomaron 40 colonias que se cultivaron en 3 ml de TSB con Ap₁₀₀ durante 24 horas y a las cuales se les realizó una extracción de ADN plasmídico mediante el método Miniprep con el fin de estudiar la variabilidad de los clones y así determinar la calidad de la librería construida (Figura 4.41).

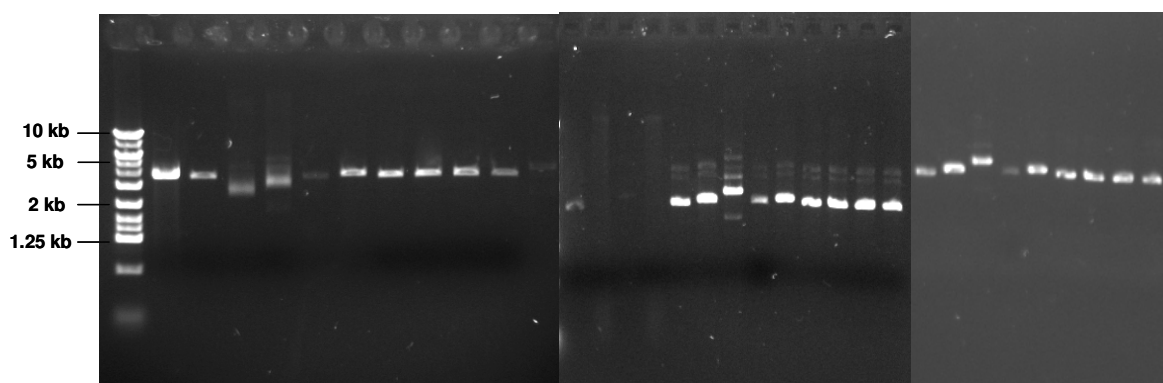


Figura 4.41. Electroforesis de ADN plasmídico de 40 clones de la librería I1. Se muestra el marcador de peso molecular ladder 10Kb (a la izquierda) y el producto de los aislamientos plasmídicos de las 40 colonias.

Los resultados obtenidos mostraron que de los 40 clones seleccionados, al menos 15 clones presentaban plásmidos con distintos tamaños, lo que parecía indicar una suficiente variabilidad en los insertos de los distintos clones obtenidos. En base a estos resultados se estimó una variabilidad de al menos 37,5% para la librería construida.

4.4.2 Selección de clones con potencial inserto para eliminación de aromáticos

Dada la capacidad de *Halomonas variabilis* W10 para proliferar en hidrocarburos policíclicos aromáticos, supusimos que una de las rutas potenciales para la eliminación de estos sustratos podría pasar por la conversión de catecol en ácido cis, cis- mucónico, cuyo

color marrón puede servir como indicador de la presencia de enzimas como la catecol 2,3 dioxigenasa.

En este trabajo se procedió a estudiar algunas características que pudiese presentar los clones de la librería construida. Se realizó un estudio para la selección de clones con potencial inserto de eliminar aromáticos. Así pretendíamos estudiar si en algunos de los clones de la genoteca I1 se podría identificar la capacidad para transformar catecol.

Para poner de manifiesto la capacidad de los clones para transformar catecol realizamos un estudio previo para conocer si la cepa *H. variabilis* W10 en medio MY3% sólido adicionado de 0,5 M de catecol era capaz de producir ácido cis, cis- mucónico, como ya se ha descrito en *el apartado 3.10* de la sección *Material y Métodos*. Así se utilizó *E. coli* XL1 Blue como control negativo y *P. putida* KT2440 con TOL (pWW0) como control positivo. Como se puede observar en la **Figura 4.42** y como resultado de este ensayo se observó cambio a coloración marrón para las cepas *P. putida* y *H. variabilis* W10, pero no así para *E. coli* XL1 Blue, lo que parece indicar la presencia de catecol 2,3 dioxigenasa en *H. variabilis* W10.

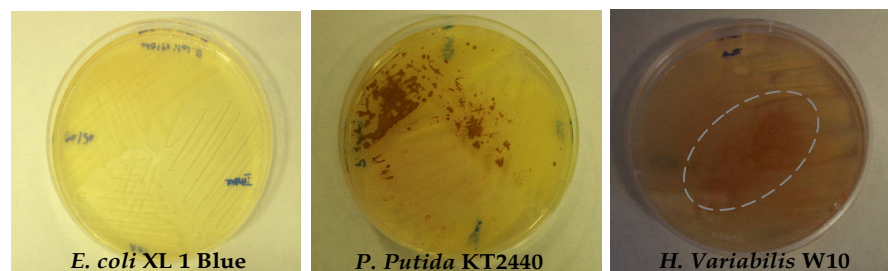


Figura 4.42. Fotografías de placas con medio sólido rociado con 0,5 M de catecol. Se muestran las reacciones de las cepas *H. variabilis* W10 junto con los dos controles *P. putida* KT2440 (+) y *E. coli* XL1 Blue (-).

Para identificar si se había clonado el gen codificante para la catecol 2,3 dioxigenasa en la genoteca I1, se realizaron diluciones seriadas de la librería de clones obtenida (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}) y se sembraron en placas de medio TSA adicionado de Amp₁₀₀, con el fin de identificar la dilución donde se obtendrían aproximadamente 1.000 colonias por placa. Así se escogió la dilución 10^{-4} , debido al número de colonias obtenido en la placa con el medio TSA adicionado de Amp₁₀₀.

Una vez obtenidas 10 placas con aproximadamente 1.000 colonias, cada una de las placas se rociaron con una solución de catecol al 0,5 M. Transcurridos 5 minutos se observaron dos colonias (de dos clones), las cuales presentaron un cambio de color a

“marrón”. Posteriormente se les realizó una PCR-GFP para caracterizar el inserto donde los resultados de esta amplificación se muestran en la **Figura 4.43**.

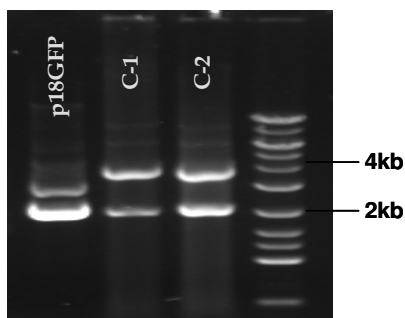


Figura 4.43. Electroforesis de la reacción PCR-GFP de los dos clones que dieron reacción positiva con el catecol. De izquierda a derecha se indica en la primera calle el plásmido p18GFP sin inserto, las calles 2 y 3 indican el plásmido que contiene los insertos de las dos colonias obtenidas y la última calle contiene el marcador de peso molecular Ladder 10Kb.

Los resultados obtenidos en este capítulo representan un estudio preliminar para la caracterización de los microorganismos con capacidad de catabolizar los compuestos aromáticos, ya que la librería construida **I1** presentaba una variabilidad de 37,5% y algunos clones de la misma presentaron características de inducir operones para la degradación de aromáticos. Así sería conveniente realizar estudios futuros para una mejor caracterización de la genoteca **I1** en base a citometría de flujo con SORTER como se propone por Uchiyama y col. (2005). Estos estudios se están llevando acabo en estos momentos por el Lcdo. Luca Bianchi en nuestro grupo.

A microscopic image of a plant stem cross-section. The image shows several vascular bundles arranged in a ring. Each bundle consists of a central pith, surrounded by a ring of small, dark-stained cells (likely sclerenchyma), and an outer ring of larger, lighter-stained cells (likely xylem). The surrounding tissue is composed of various types of parenchyma cells, some of which are arranged in radial files. The overall appearance is that of a dicot stem.

5. DISCUSIÓN GENERAL

Los vertidos de fuel al mar debidos a accidentes de grandes petroleros causan importantes daños ecológicos, que no se limitan a las zonas del derrame, la contaminación puede alcanzar las zonas costeras y afectar grandes extensiones del litoral. Se ha demostrado que los microorganismos degradadores de hidrocarburos y compuestos relacionados del petróleo son ubicuos en los ambientes marinos (Sutiknowati y col., 2007). Asimismo, se ha puesto de manifiesto que cuando llega una contaminación por hidrocarburos, se producen cambios en las poblaciones microbianas autóctonas con un enriquecimiento de los microorganismos degradadores (Syakti y col., 2008).

En noviembre del 2002, el petrolero Prestige que transportaba 77.000 toneladas de petróleo, se partió en dos y derramó unas 50.000 toneladas de fuel al mar (Fernández-Álvarez y col., 2006). Este desastre, unido a las implicaciones políticas por el accidente, provocó una movilización masiva en la opinión pública y en la comunidad científica. El gobierno español encargó a la empresa Repsol YPF el estudio y ejecución del proyecto de la recuperación del fuel que quedó en los contenedores del petrolero Prestige. Dentro de este gran proyecto, la empresa Repsol YPF consideró como última fase del mismo evaluar la viabilidad de biorremediación del fuel que pudiera quedar como remanente en el interior del barco hundido una vez realizadas todas las tareas de extracción. Dicho estudio fue realizado en el Instituto Universitario de Investigación del Agua de la Universidad de Granada, por investigadores del grupo de investigación de Microbiología Ambiental (RNM 270).

Teniendo en cuenta la gran diversidad microbiana de los mares y océanos y el gran potencial biotecnológico descrito para los microorganismos de origen marino, uno de los primeros objetivos del proyecto de “viabilidad de biorremediación del fuel del Prestige” fue el aislamiento y caracterización de bacterias degradadoras de hidrocarburos a partir de muestras obtenidas en las proximidades de la zona del hundimiento del petrolero (Uad y col., 2010).

En el presente trabajo de investigación, los microorganismos incluidos en este estudio se seleccionaron por presentar dos características de gran importancia para su posterior aplicación, de forma individualizada o en consorcio, en técnicas de bioaumentación para la remediación de ecosistemas contaminados con hidrocarburos. Estas propiedades fueron la capacidad para crecer en presencia de distintos hidrocarburos y la capacidad de la mayoría de ellas de producir biopolímeros con actividad emulgente. Así, destacamos que estas cepas

fueron aisladas de muestras de aguas y sedimentos con bajos niveles de contaminación, extraídas de la zona del hundimiento, así como de muestras de fuel de los contenedores del pecio donde la concentración de hidrocarburos era muy elevada.

Los resultados del análisis comparativo de la secuenciación del gen ADNr 16S pusieron de manifiesto que las 18 cepas seleccionadas pertenecían a los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Pseudoalteromonas*, *Marinobacter*, *Thalassospira*, *Halomonas* y *Brevibacterium*, géneros que en la bibliografía han sido frecuentemente relacionados con la degradación de hidrocarburos y aislados de hábitats diversos (Melcher y col., 2002; Pavitran y col., 2004; Wongesa y col., 2004; Liu y col., 2007; Roh y col., 2008). El 38,9% (7 de 18 cepas) de las cepas seleccionadas pertenecieron al género *Bacillus*; una cepa identificada como *B. thuringiensis* y 6 como *B. pumilus*. El género *Bacillus* se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, siendo aislado con frecuencia de ambientes contaminados (Ijah y Antai, 2003), este género bacteriano se ha demostrado nuevamente con capacidad de colonizar ecosistemas contaminados con hidrocarburos (Yousefi-Kebira y col., 2009), además, se han descrito cepas del género *Bacillus* aisladas de aguas y sedimentos marinos (Bull y col., 2000; Zhuang y col., 2003).

Respecto a la cepa F2 aislada de muestras de fuel, se identificó como *B. casei*. De este género bacteriano han sido descritos bacterias aisladas a partir de muestras contaminadas con diesel, aceites hidráulicos o efluentes altamente contaminados y han mostrado su eficacia en la biodegradación de efluentes contaminados (Pavitran y col., 2004; Vieira y col., 2007).

Por otra parte, el género *Halomonas* se caracterizó por colonizar suelos y aguas salinos, pudiendo tolerar desde concentraciones inferiores al 1% (p/v) hasta valores próximos al 30% (p/v). Dentro de este género es importante resaltar, que se ha descrito la capacidad de estos microorganismos de producir exopolisacáridos con actividad emulgente sobre hidrocarburos del petróleo (Calvo y col., 2002; Martínez-Checa y col., 2002; 2007). En este estudio 4 de las cepas estudiadas (22%) pertenecieron al género *Halomonas*, y fueron identificadas como *H. alkantarctica* W3, *H. variabilis* W4 y W10 y *Halomonas* sp. W12, con un porcentaje de identidad superior a 98% (Uad y col., 2010), todas se aislaron de muestras de agua de mar obtenida a 4.000 m de profundidad.

El género *Thalassospira* fue descrito por primera vez por López-López y col (2002). En el presente estudio se caracterizaron las cepas W5 y W7 como *Thalassospira* sp. con un

porcentaje de identidad de 99%. Kodama y col (2008) aislaron de agua de mar contaminada con hidrocarburos, una nueva especie degradadora de HPA, la cual fue identificada como *T. tepidiphila*, asimismo Liu y col (2007) describieron otras bacterias; *T. xiamenensis* y *T. profundiamaris* que fueron aisladas de agua superficial contaminada y de sedimentos marinos contaminados con hidrocarburos, respectivamente.

Así, W8 aislada de muestras de agua, identificada como *Marinobacter* sp., mostró una elevada capacidad para eliminar HPAs. El género *Marinobacter* fue descrito por primera vez como género característico de microorganismos marinos degradadores de HPAs, en este sentido, se describió una nueva especie *M. goseongensis*, halotolerante, capaz de proliferar en presencia de hidrocarburos Policíclicos aromáticos. Esta especie fue aislada de agua de mar del este de Corea (Gauthier y col., 1992; Roh y col., 2008).

Por otra parte, el género *Pseudomonas* se encuentra frecuentemente asociado a ambientes contaminados con hidrocarburos (Norman y col., 2002). Se conoce por su capacidad para crecer sobre una amplia variedad de hidrocarburos del petróleo como benceno, naftaleno, tolueno (Haigler y col., 1992), gasolina, queroseno y diesel (Wongesa y col., 2004). También se han estudiado los complejos enzimáticos y los plásmidos relacionados en la asimilación y degradación de estos hidrocarburos (Smits y col., 2002). Las cepas del género *Pseudomonas* incluidas en este estudio fueron aisladas de sedimentos marinos e identificadas como *P. fluorescens* (S21) y *P. grimontii* (S24) con porcentajes de identidad superiores al 98%, estas cepas mostraron gran eficacia en la degradación de distintas fracciones de crudo Kirkuk.

Asimismo, se identificó la cepa W18 como *P. elyakovii* con un 99% de identidad, esta cepa fue aislada de muestras de agua. Los microorganismos de este género bacteriano fueron descritos por su capacidad de utilizar hidrocarburos (Melcher y col., 2002; Pucci y col., 2009), asimismo los ensayos realizados por Röling y col (2002) demostraron la alta capacidad de las cepas del género *Pseudoalteromonas* de mantenerse durante 26 días en microcosmos construidos con sedimentos marinos.

Durante el presente trabajo de investigación se realizó la caracterización fenotípica de las 18 cepas incluidas en este estudio. Los resultados obtenidos mostraron la variabilidad metabólica dentro de las cepas del género *Bacillus*, así destacamos las cepas *B. casei* F2, *Marinobacter* sp. W8 y *P. fluorescence* S21, como las únicas capaces de utilizar los 95

metabolitos como fuente de carbono, además cabe mencionar que las cepas *B. casei* F2 y *P. fluorescens* S21 presentaron resultados de patrones metabólicos similares a aquellos obtenidos por las cepas tipo correspondientes, consultadas en la base de datos del sistema Biolog™ (www.biolog.com). Mientras que las cepas W8 de *Marinobacter*, W3, W4, W10 y W12 de *Halomonas*, S24 de *Pseudomonas* y W18 de *Pseudoalteromonas* se alejaron de los patrones metabólicos de las cepas tipo de referencia, ello sugiere que alguna de estas cepas podría ser clasificada como especie nueva.

En este trabajo de investigación se ha estudiado también la capacidad de las 18 cepas objeto de estudio, de sintetizar exopolisacáridos y la eficacia de los mismos sobre la emulsión de diferentes hidrocarburos. Los biosurfactantes y bioemulgentes son sustancias de origen biológico que facilitan la solubilización de compuestos hidrófobos y presentan un creciente interés para la industria del petróleo debido a su diversidad, características funcionales y baja toxicidad en comparación con otros sintéticos (Kumar y col., 2007; Nerurkar y col., 2009; Satpute y col., 2010). Teniendo en cuenta que las características de los biopolímeros sintetizados dependen no solo de los microorganismos productores, sino también de las condiciones de producción, en este estudio se evaluó la influencia de dos parámetros: tiempo de incubación y concentración de sales sobre la cantidad y la calidad de los biopolímeros sintetizados.

Los resultados obtenidos en este trabajo, pusieron de manifiesto que las 18 cepas incluidas en este estudio fueron capaces de producir biopolímeros en un rango de salinidad comprendido entre el 1 y el 7% de sales (p/v), si bien el 3% (p/v) fue en la mayoría de los casos el óptimo, tanto en cantidad de polímero sintetizado como en calidad del mismo. Esta propiedad supondría una ventaja a la hora de utilizar estos microorganismos o sus biopolímeros en la descontaminación de ambientes salinos.

Respecto a la actividad emulgente de los biopolímeros obtenidos, tras el análisis de los valores de emulsión alcanzados por los BE sintetizados por las 18 cepas, hay que destacar que los sustratos: crudo Kirkuk, xileno, octano y tolueno fueron los sustratos mejor emulsionados, mientras que el AML y el AMP fueron los sustratos más difíciles de emulsionar, asimismo se puso de manifiesto que los BE sintetizados en este estudio, alcanzaron valores elevados de la actividad emulgente frente al crudo Kirkuk, en comparación con la actividad emulgente obtenida por los surfactantes químicos tween 80 y

triton x100 según los datos referenciados por Martínez-Checa y col (2002). Esto supone igualmente una ventaja importante, teniendo en cuenta que la contaminación sobre todo por derrames accidentales suele estar producida por mezclas complejas de hidrocarburos como son los crudos o el fuel (Atlas y col., 1995b; Pavitran y col., 2004).

En cuanto al estudio de la productividad, en el presente trabajo de investigación, se constató que la producción de los biopolímeros sintetizados por las cepas del género *Bacillus*, osciló entre 0,14 y 2,28 g/l de cultivo. La cantidad de los polímeros sintetizados fue muy variable. Así, destacamos los biopolímeros W1-5, W15-3 y S22-3 sintetizados al 3% (p/v) de sales con una producción superior al 1 g/l, siendo esta concentración de sal el óptimo de crecimiento para dichos microorganismos productores de EPS. Estos polímeros se caracterizaron con una media de 57% (p/p) de carbohidratos y 12% (p/p) de proteínas así, se obtuvieron valores elevados de actividad emulgente frente a más de un sustrato ($\geq 50\%$). Estos resultados concuerdan con aquellos referenciados por numerosos autores quienes describieron que las cepas pertenecientes al género *Bacillus* se caracterizaron por producir biopolímeros con elevada actividad emulgente (Maugeri y col., 2002; Toledo y col., 2008; Liu y col., 2010; Mnif y col., 2011).

Para el género *Brevibacterium*, se ha descrito una cepa Met-1 perteneciente al género *Brevibacterium*, con capacidad de producir bioemulgente con elevada actividad emulgente (Pavitran y col., 2004). Así, en el presente estudio se ha mostrado que los biopolímeros sintetizados por la cepa F2 del género *Brevibacterium* se caracterizaron igualmente por producciones muy variables que no superaron 1,04 g/l de cultivo (producción del biopolímero F2-6). Los 8 biopolímeros sintetizados por F2 se caracterizaron con alto contenido en carbohidratos, alcanzando 80% (p/p) de carbohidratos para el biopolímero F2-7, mientras que los porcentajes de proteínas oscilaron entre 7 y 15% (p/p). Para este grupo de biopolímeros la actividad emulgente varió entre 34 y 55% frente a menos de 5 hidrocarburos.

Respecto al género bacteriano *Halomonas*, se ha descrito que este género se aísla de una gran diversidad de hábitat salinos y ha sido caracterizado por su capacidad para producir exopolisacáridos con aplicaciones biotecnológicas, entre ellas la actividad emulgente de esos biopolímeros y su uso potencial en la biorremediación de ambientes contaminados con hidrocarburos (Béjar y col., 1998; Calvo y col., 2002, Martínez-Checa y col., 2002, 2007). En este estudio se ha mostrado que las cepas del género *Halomonas* se caracterizaron por valores

elevados de producción, hay que destacar la producción máxima de 4,93 g/l de cultivo, del biopolímero W10-2 sintetizado por *H. variabilis* W10, al 1% (p/v) de sales y 15 días de incubación. Y como se ha descrito en la bibliografía, la composición química de estos biopolímeros estuvo fuertemente influenciada por las condiciones de cultivo (Martínez-Checa 2002; 2007; Kumar y col., 2007), así, el porcentaje de carbohidratos osciló entre 27 y 77% (p/p) y el valor de proteínas varió entre el 2 y el 34 % (p/p). En cuanto a la actividad emulgente, se alcanzaron valores elevados frente a más de 6 sustratos, así destacamos los BE W4-3 y W10-3 por su capacidad de emulsionar con más de 50% de emulsión, los sustratos AML y AMP que como se ha comentado en esta memoria han sido los más difícilmente emulsionables. En este contexto se han descrito numerosas cepas pertenecientes al género *Halomonas*, con capacidad de producir bioemulgentes con elevada actividad emulgente (Martínez-Checa, 2002; 2007; Satpute y col., 2010; Mnif y col., 2009; 2011)

Respecto al género *Thalassospira*, existe poca bibliografía referenciada en cuanto a la producción de los bioemulgentes sintetizados por este género bacteriano, así en el presente estudio se demostró que las cepas W5 y W7 pertenecientes al género *Thalassospira* fueron capaces de producir biopolímeros y la producción de los mismos osciló entre 0,28 y 1,78 g/l de cultivo, la composición química, en términos de carbohidratos y proteínas presentó valores elevados. Estos biopolímeros fueron capaces de emulsionar octano, tolueno y crudo Kirkuk, de ellos, hay que destacar el biopolímero W7-5 con 1,78 g/l de cultivo de producción y que alcanzó valores de 70% de emulsión frente a xileno, octano, tolueno y crudo Kirkuk.

Asimismo, se ha demostrado que la cepa *Marinobacter* sp. W8 fue capaz de producir biopolímeros con actividad emulgente, la producción de estos biopolímeros se caracterizó por valores bajos que no superaron 1,27 g/l de cultivo. La composición química osciló entre 35 y 73% (p/p) de carbohidratos y entre 6 y 13% (p/p) de proteínas, no obstante, los biopolímeros sintetizados por la cepa W8 emulsionaron el octano con valores que alcanzaron 76% de emulsión, estos resultados concuerdan con otros referenciados por Al-Mallah y col (1990) y Satpute y col (2010), quienes describieron cepas del género *Marinobacter* con capacidad de producir biopolímeros con actividad emulgentes.

Para el género *Pseudomonas*, Bonilla y col (2005) describieron el primer exopolisacárido con propiedades emulgentes producido por la cepa *Pseudomonas putida* ML2. Así, se ha descrito un bioemulgente con actividad emulgente sintetizado por la cepa CAM025

del género *Pseudoalteromonas* aislada de agua marinas (Mancuso Nichols y col., 2004). En el presente estudio, se ha demostrado que las cepas S21, S24 y W18 pertenecientes a los géneros *Pseudomonas* y *Pseudoalteromonas*, fueron capaces de producir biopolímeros que, en general, se caracterizaron con una producción que osciló entre 0,1 y 2,71 g/l de cultivo. De ellos, destacamos los biopolímero W18-3, S21-3 y S24-3, todos ellos producidos al 3% (p/v) de sales y 7 días de incubación con más de 1g/l de cultivo, además estos biopolímeros se caracterizaron con porcentajes de carbohidratos elevados, y valores de 9, 13 y 27 % (p/p) del contenido en proteínas, respectivamente, así, se pudo constatar que W18-3 emulsionó solo el tolueno mientras que S21-3 y S24-3 emulsionaron el octano, tolueno y crudo Kirkuk.

Respecto a la composición química de los biopolímeros obtenidos, en el presente estudio se caracterizaron los carbohidratos y proteínas de los 133 biopolímeros sintetizados. Se constató que los BE W3-1, W3-2, W3-7, W4-8, W10-8, W12-7, W12-8 y S24-3, alcanzaron valores elevados de actividad emulgente, lo cual podría explicarse por el alto contenido en proteínas presente en estos biopolímeros, en este contexto, se ha descrito que la calidad del BE está relacionada directamente con su composición proteica (Shepherd y col., 1995; Rosenberg y Ron, 1999), asimismo, los ensayos realizados por Kavita y col (2011) señalaron que la naturaleza proteica de los bioemulgentes sintetizados por bacterias marinas aisladas de costa Tamil Nadu (India) podría influir en la actividad emulgente de dichos biopolímeros. Así, hay que señalar que los biopolímeros sintetizados por las cepas F20, S22 del género *Bacillus*, W18 del género *Pseudoalteromonas*, S21 y S24 del género *Pseudomonas*, se caracterizaron con valores de carbohidratos relativamente bajos, lo cual nos llevó a pensar que estos biopolímeros podrían contener otras fracciones no determinadas en el presente estudio. Por otra parte, pudo comprobarse que el tiempo de incubación y la salinidad influyeron en las características de los biopolímeros sintetizados y esta respuesta dependía del microorganismo productor. En general los BE sintetizados a los 7 días de incubación y 3% (p/v) de sales se caracterizaron con porcentajes de carbohidratos y proteínas relativamente elevados. Asimismo los resultados obtenidos del análisis estadístico RDA mostraron que la calidad de los BE sintetizados, en términos de carbohidratos y proteínas fue directamente influenciada por el tiempo de incubación y la concentración de sales.

Con objeto de facilitar la selección de los bioemulgentes con posibles aplicaciones biotecnológica, se ha propuesto un índice de calidad bioemulgente (Ic) cuyo objetivo es

identificar aquellos biopolímeros que presentan una actividad emulgente elevada y valores óptimos de producción. Los resultados obtenidos mostraron que de los 133 bioemulgentes incluidos en este estudio, seis de ellos presentaron valores de I_c superiores a 3. Los biopolímeros W3-7, W4-3, W4-8, W10-2, W10-3 y W12-7 fueron sintetizados por especies del género *Halomonas*, produjeron emulsiones estables con la mayoría de los sustratos ensayados y su producción fue superior a la de otros biopolímeros referenciados (Martínez-Checa y col., 2002; 2007; Calvo y col., 1998).

Diversos autores han descrito la producción de bioemulgentes por especies de *Halomonas* bajo distintas condiciones de cultivo, demostrando al igual que en nuestra investigación, la influencia de las condiciones de producción en la composición química y en las características de los polímeros sintetizados. En este mismo sentido, si comparáramos nuestros resultados con otros referenciados en la bibliografía (Calvo y col 1998, Martínez-Checa y col 2007; 2002) podríamos comprobar que el índice I_c propuesto en esta memoria puede ser un criterio útil para el establecimiento previo de utilidad bioemulgente. Podemos sugerir por tanto, que el índice de calidad bioemulgente desarrollado en el presente estudio, puede facilitar la selección de los biopolímeros ya que nos permitió evaluar la calidad de los bioemulgentes sintetizados por las 18 cepas incluidas en este estudio y por lo tanto evaluar la posible aplicación biotecnológico de los mismos. No obstante es necesario establecer que este criterio debe de ser mas ampliamente contrastado en posteriores estudios.

Respecto a la degradación de HPAs, en la presente memoria se muestran los resultados obtenidos, en primer lugar se realizó el estudio de la capacidad de las 18 cepas de crecer en presencia de los HPAs al 1% (p/v) en medio sólido S4. En este sentido, se ha descrito que los géneros bacterianos como *Pseudomonas* y *Bacillus* son capaces de utilizar a la vez más de un hidrocarburo (Zhuang y col., 2002; Toledo y col., 2006). Los resultados obtenidos en este estudio mostraron que todas las cepas seleccionadas resultaron capaces de proliferar en presencia de naftaleno al 1% (p/v), cabe mencionar que las cepas W1, W15, W16, F17 y F20 del género *Bacillus*, la cepa F2 del género *Brevibacterium*, las cepas W5, W7 del género *Thalassospira* y la cepa W8 del género *Marinobacter* se mostraron con capacidad de crecer en presencia de naftaleno, antraceno, fenantreno y pireno como única fuente de carbono.

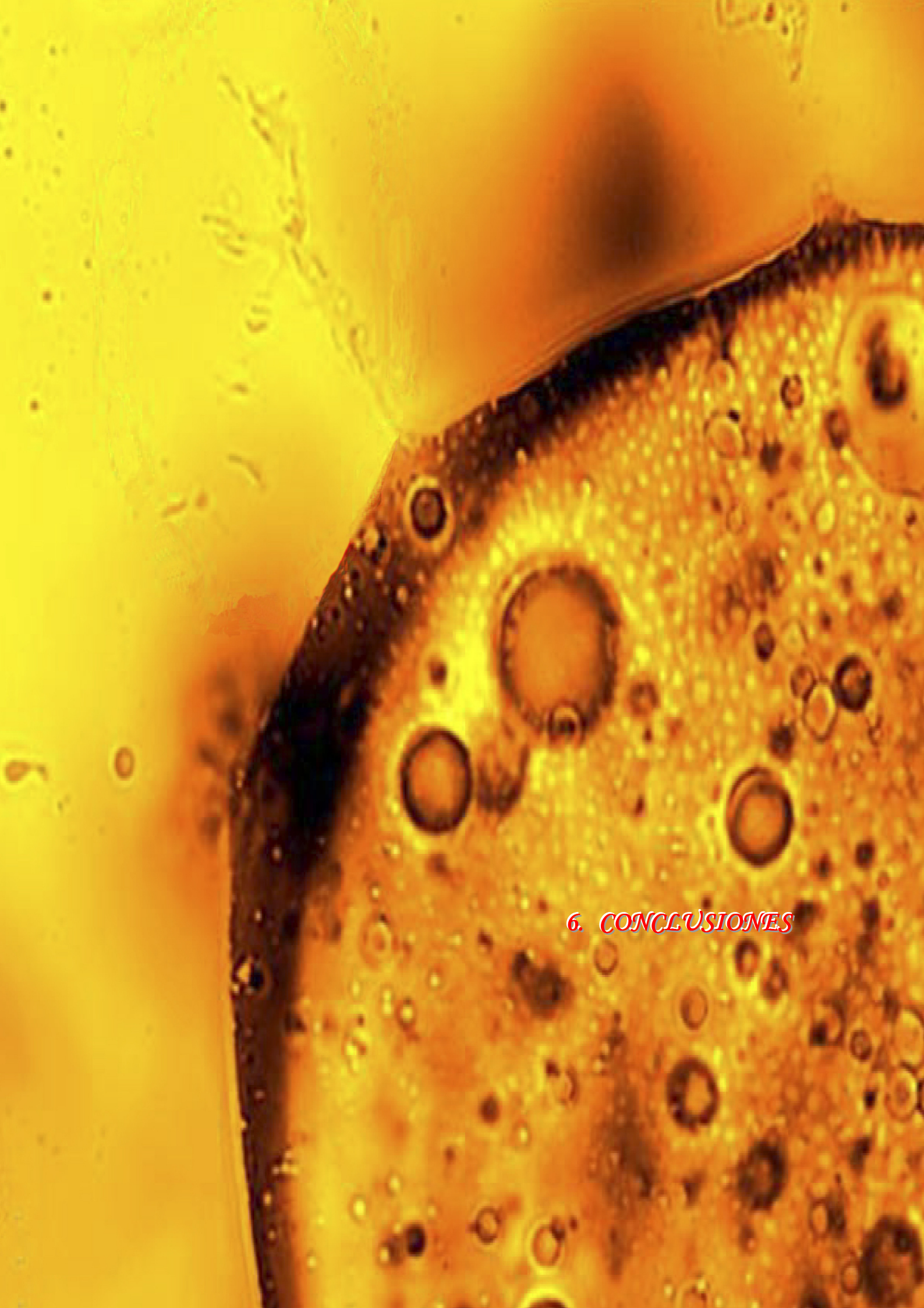
Por otra parte se realizó el estudio de la capacidad de las 18 cepas para crecer en medio líquido MMS adicionado de naftaleno al 1% (p/v) como única fuente de carbono. Este compuesto aromático es el menos complejo de los HPAs, por lo que es más fácilmente degradable, en general, la tasa de biodegradación disminuye a medida que aumenta el número de átomos de carbono y el número de radicales (Toledo y col., 2006). Asimismo, los géneros *Halomonas* y *Marinobacter* han sido descritos como grupos de microorganismos marinos degradadores de HPAs (Calvo y col., 2002; Melchor y col., 2002; Rho y col., 2008; Mnif y col., 2009). En esta memoria se ha demostrado que las cepas *Marinobacter* sp. W8 y *H. variabilis* W10 alcanzaron valores considerables de eliminación de naftaleno, 10% para W10 y 14 % para W8. Estos resultados concuerdan con los ensayos realizados por Vila y col (2010) quienes describieron una cepa *Marinobacter* aislada de un consorcio obtenido de un cultivo enriquecido en agua marina artificial con el fuel del Prestige, y que se caracterizó por presentar alta capacidad de eliminar hidrocarburos de ambientes marinos contaminados. Para concluir, basándonos en estos resultados obtenidos se pudo sugerir que *Marinobacter* sp. W8 y *H. variabilis* W10 podrían tener una aplicación en la recuperación de zonas contaminadas con altas concentraciones de HPAs.

Durante el presente trabajo de investigación se realizó también el estudio de la capacidad de las 18 cepas de crecer en medio líquido MMS adicionado de crudo Kirkuk al 1% (v/v) como única fuente de carbono. Este compuesto es una mezcla compleja de hidrocarburos, por lo que su estudio permite una mayor aproximación al modelo experimental que pueda derivarse de una contaminación real. Los resultados obtenidos, en este estudio, mostraron que los valores de eliminación de los TPH oscilaron entre 7 y 64%. No obstante, analizando los resultados de la degradación de crudo, cabe mencionar que las cepas *B. pumilus* F17, *Halomonas* sp. W12, *P. elyakovii* W18 y *P. grimontii* S24 fueron capaces de eliminar valores considerables de las distintas fracciones de hidrocarburo que constituyen el crudo Kirkuk. Así, en los estudios realizados por Calvo y col (2004), se ha aislado de residuos de petróleo una cepa *B. pumilus* con capacidad de crecer en presencia de crudo, asimismo Yousefi-Kebira y col. (2009), describieron *B. cereus* y *B. thuringiensis* con capacidad de degradar el diesel por, estas dos cepas fueron aisladas de suelos iraníes contaminados con hidrocarburos. También se ha descrito una cepa P29 perteneciente al género *Pseudoalteromonas* que fue capaz de eliminar los alcanos de cadena corta con un porcentaje de

eliminación próximo al 90% (Lin y col., 2009), y otra cepa ZJU perteneciente al género *Pseudomonas* fue descrita por Tang y col (2007), como microorganismo con capacidad considerable de degradar el crudo, asimismo Mnif y col (2011) describieron una cepa perteneciente al género *Halomonas* con capacidad de degradar con porcentajes considerables el hidrocarburo crudo.

Como resumen de este apartado puede concluirse que las cepas *Halomonas variabilis* W10, *Marinobacter* sp. W8, *Bacillus pumilus* F17, *Halomonas* sp. W12, *Pseudoalteromonas elyakovii* W18 y *Pseudomonas grimontii* S24 presentaron un comportamiento óptimo y que podrían tener aplicación en distintos ámbitos de la industria petrolera como la limpieza de tanques y la recuperación de zonas contaminadas.

Por último, en este trabajo de investigación se abordó el estudio de genes catabólicos, estos avances se han logrado gracias al desarrollo de nuevas técnicas en genética molecular (Song y Ward, 2005; Breinig y col., 2000; Heinaru y col., 2000). Para ello, hemos iniciado el estudio de algunas características genéticas de uno de los microorganismos aislados en este estudio, y como resultado de dicho estudio, se construyó la librería de clones la cual está basada en el ADN total de la cepa *H. variabilis* W10 utilizando *Escherichia coli* XL1Blue y el vector p18GFP, para la búsqueda de promotores que respondan a la presencia de naftaleno. Cabe mencionar que librería de clones construida presentó una variabilidad de 37,5% y algunos clones presentaron características de inducir operones para la degradación de compuestos aromáticos. No obstante, según los resultados obtenidos en nuestra investigación, sería conveniente futuros estudios para una mejor caracterización de la genoteca construida (I1). Estos estudios nos permitirán por una parte comprender los mecanismos que regulan la expresión de las rutas involucradas en la eliminación de estos compuestos y por otra parte realizar mejoras génicas en estos microorganismos, para incrementar los procesos de biorremediación. Así pues, la construcción de genotecas con sistemas de identificación de la respuesta de los promotores ante señales ambientes puede ser un nuevo reto para la biología molecular, ayudando de esta forma al desarrollo de herramientas biotecnológicas para poder, de esta forma, utilizar estas cepas de la manera más adecuada.



6. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación, permiten establecer las siguientes conclusiones:

1. El aislamiento de microorganismos a partir de muestras de agua y sedimentos, obtenidos de fondos marinos donde en la actualidad se localiza el petrolero Prestige, a 4.000 m de profundidad, nos ha permitido disponer de una colección de bacterias degradadoras de hidrocarburos y productoras de bioemulgentes. Esto sugiere la capacidad de estos hábitats para la biotransformación natural de hidrocarburos.
2. De las 18 cepas seleccionadas el 61% fueron aisladas de muestras de agua y fueron clasificadas dentro de los géneros *Bacillus*, *Halomonas*, *Thalassospira*, *Marinobacter* y *Pseudoalteromonas*. El 22% de los aislados se realizó de muestras de sedimentos y fueron clasificados como *Bacillus* y *Pseudomonas*. Finalmente de las muestras de fuel se aislaron sólo bacterias Gram positivas, pertenecientes a los géneros *Bacillus* y *Brevibacterium*. Podemos concluir por tanto la amplia biodiversidad de microorganismos degradadores de hidrocarburos presente en las muestras analizadas.
3. Las cepas degradadoras de hidrocarburos aisladas en las muestras obtenidas del entorno del Prestige son capaces de crecer en un amplio rango de salinidad, pudiéndose establecer su óptimo próximo al 3% (p/v) de sales.
4. Los perfiles metabólicos obtenidos mediante el estudio fenotípico en base al kit Biolog™, demuestran importantes diferencias metabólicas entre las cepas objeto de estudio y sus cepas tipo. Ello sugiere la existencia de nuevas especies bacterianas entre los aislamientos realizados.
5. Todas las cepas aisladas presentaron la capacidad de producir bioemulgentes a distintas concentraciones salinas y a distintos tiempos de incubación. No obstante, mientras que el rendimiento de producción está directamente relacionado con la cepa, la calidad del biopolímero obtenido expresado depende directamente de los parámetros: tiempo de incubación y salinidad.
6. El índice de calidad bioemulgente (Ic) propuesto en este estudio, puede ser de utilidad en la selección preliminar de bioemulgentes sintetizados por bacterias.
7. Todas las cepas crecieron en medio sólido y líquido adicionado de HPAs al 1% (p/v). Ello indica el interés de estos microorganismos para su uso como herramientas en

procesos de bioaumentación para el tratamiento de ambientes contaminados con hidrocarburos.

8. El crudo Kirkuk, es un sustrato fácilmente asimilable por las bacterias objeto de estudio, destacando que *B. pumilus* F17, *Halomonas* sp. W12, *P. elyakovii* W18 y *P. grimontii* S24 consiguieron tasas de degradación de las distintas fracciones del hidrocarburo superiores al 50% después de 15 días de incubación. Lo que sugiere el uso de estas bacterias para la construcción de consorcios microbianos para futuros estudios de degradación de hidrocarburos.
9. La librería de clones construida I1 presenta una variabilidad suficiente para proponer su uso en la caracterización de promotores con capacidad de responder a presencia de hidrocarburos, ello permitirá el futuro diseño de biosensores y la caracterización de las rutas de degradación de estos compuestos.



7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abril, M.A., Back, M., and Ramos, J.L.** (1991). Activation of the *Pseudomonas* TOL plasmid upper pathway operon. Identification of binding sites for the positive regulator XylR and for integration host factor protein. *J. Biol. Chem.* 266: 15832-15838
- Alajbeg, I., Krnjevic-Pezic, G., Smeh-Skrbin, A., and Vrzogic, P.** (2000). Comparison of the composition of some petroleum samples which may be applied for skin and mucous membrane treatment. *J. Pharm. & Biom. An.* 22: 75-84
- Allredge, A.** (2000). Interstitial dissolved organic carbon (DOC) concentrations within sinking marine aggregates and their potential contribution to carbon flux. *Limnol. Oceanogr.* 45: 1245-1253
- Al-Mallah, M., Goutx, M., Mille, G., and Bertrand, J.C.** (1990). Production of emulsifying agents during growth of a marine *Alteromonas* in seawater with eicosane as carbon source, a solid hydrocarbon. *Oil Chem. Pollut.* 6: 289-305
- Alonso-Álvarez, C., Pérez, C., and Velando, A.** (2007). Effect of acute exposure to heavy fuel oil from the Prestige spill on seabird. *Aq. Toxic.* 84: 103-110
- Alquati, C., Papacchin, M., Riccardi, Spicaglia, C. and Bestetti, G.** (2005). Diversity of naphthalene degrading bacteria from a petroleum contaminated soil. *An. Microbiol.* 55: 237-242
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E., and Lipman, D. J.** (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410
- Anton, J., Meseguer, I., and Rodriguez-Valera, F.** (1988). Production of an extracellular polysaccharide by *Haloferax mediterranei*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 2381-2386
- Arahal, D.R., Vreeland, R.H., Litchfield, C.D., Mormile, M., Tindall, B.J., Oren, A., Bejar, V., Qedada, E., and Ventosa, A.** (2007). Recommended minimal standards for describing new taxa of the family Halomonadaceae. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57: 2436-2446
- Arias, S., Del Moral, A., Ferrer, M.R., Quesada, E., and Béjar, V.** (2003). Mauran, an exopolysaccharide produced by the halophilic bacterium *Halomonas maura*, with a novel composition and interesting properties for biotechnology. *Extrem.* 7: 319-326
- Arena, A.** (2004). Exopolysaccharides from marine thermophilic *bacilli* induce a Th1 cytokine profile in human PBMC. *Clin. Microbiol. Infect.* 10: 336
- Atlas, R.M.** (1981). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiol. Rev.* 45: 180-209
- Atlas, R.M.** (1995a). Bioremediation of petroleum pollutants. *International Biodeterioration. & Biodegradation.* 35: 317-327

- Atlas, R.M.** (1995b). Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation. *Marine Pollution Bulletin*. 31: 178-182
- Atlas, R.M., and Unterman, R.** (1999). Bioremediation. En: Domain AL & Davies JE (Eds) Manual of industrial microbiology and biotechnology 2nd ed (pp: 666-681), ASM Press, Washington D.C.
- Atlas, R.M., and Bartha, R.** (2006). Ecología microbiana y microbiología ambiental. Ed. Prentice Hall. 4^a Edición. Pearson Addison Wesley (pp: 567-568). España
- Austin, B.** (1989). Novel pharmaceutical compounds from marine bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* 67: 461-470
- Baldwin, B.R., Nakatsu, C.H., and Nies. L.** (2005). Detection and numeration of aromatic oxygenases genes by multiplex and real time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 3350-3358
- Banat, I.M., Samarah, N., Murad, M., Horne, R., and Banergee, S.** (1991). Biosurfactant production and use in oil tank clean-up. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 7: 80-88
- Banat, I.M.** (1995)a. Biosurfactants characterization and use in pollution removal: state of the art. A review. *Acta. Biotechnol.* 15: 251-267
- Banat, I.M.** (1995)b. Biosurfactants production and use in microbial enhanced oil recovery and pollution remediation: A review. *Bioresour. Technol.* 51: 1-12
- Banat, I.M., Makkar, S.R., and Cameotra, S.S.** (2000). Potential commercial application of microbial surfactants. A review article. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53: 495-508
- Banks, A.N., Sanderson, W.G., Hughes, B., Granswick, P.A., Smith, L.E., Whitehead, S., Musgrove, A.J., Haycock, B., and Fairney, N.P.** (2008). The sea Empress oil spill (Wales, UK): Effects on Common Scoter *Melanitta nigra* in Carmathen Bay and status ten years later. *Marine Pol. B.* 56: 895-902
- Béjar, V., Llamas, I., Calvo, C., and Quesada, E.** (1998). Characterization of exopolysaccharides produced by 19 halophilic strains of the species *Halomonas eurihalina*. *J. Biotechnol.* 61: 135-141
- Bonilla, M., Olivaro, M., Vazquez, A., and Soubes, M.** (2005). Production and characterization of a new bioemulsifier from *Pseudomonas putida* LM2. *J. Appl. Microbiol.* 98: 456-463
- Bognolo, G.** (1999). Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. *Colloids and Surfaces. Physicochem. & Eng. Asp.* 152: 41-52
- Bouchez, T., Patureau, D., Dabert, P., Juretschko, S., Dore, J., Delgenes, P., Moletta, R., and Wagner, M.** (2000). Ecological study of bioaugmentation failure. *Environ. Microbiol.* 2 : 179-190

- Bouchotroch, S., Quesada, E., Del Moral, A., Llamas, I., Béjar, V.** (2001). *Halomonas maura* sp. nov., a new moderately halophilic, exopolysaccharide-producing bacteria. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 1625-1632
- Boyd, T.J., Montgomery, M.T., Spargo, B.J., Smith, D.C., Coffin, R.B., Kelley, C.A. and Mueller, J.G.,** (2001). Effects of oxygenation on hydrocarbon biodegradation in a hypoxic environment. *Bioremed. J.* 5: 145-157
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantity of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254
- Bull, A.T., Ward, A.C., and Goodfellow, M.** (2000). Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64: 573-606
- Breed, R.S.** (1953). The families developed from Bacteriaceae Cohn with a description of the family Bacteriaceae. *Riass common VI Congr. Int. Microniol. Roma.* 1: 10-15
- Breinig, S., Schiltz, E., and Fuchs, G.** (2000). Genes involved in anaerobic metabolism of phenol in the bacterium *Thauera aromatica*. *J. Bacteriol.* 182: 5849-5863
- Bullock, W. O., Fernandez, J. M., and Short, J. M.** (1987). XL-Blue, high efficiency plasmid transforming rec A *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase section. *Biotech.* 5: 376-379
- Calvo C., Martínez-Checa F., Mota A., and Quesada, E.** (1998). Effect of cations, pH and sulfate content on the viscosity and emulsifying activity of the *Halomonas eurihalina* exopolysaccharide. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 20: 205-209
- Calvo, C., Martínez-Checa, F., Toledo, F.L., Porcel, J., and Quesada, E.** (2002). Characteristic of bioemulsifiers synthesized in crude oil media by *Halomonas eurihalina* and their effectiveness in the isolation of bacteria able to grow in the presence of hydrocarbons. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60: 347-351
- Calvo, C., Toledo, F.L., and González-López, J.** (2004). Surfactant activity of a naphthalene degrading *Bacillus pumilus* strain isolated from oil sludge. *J. Biotechnol.* 109: 255-262
- Calvo, C., Silva-Castro, G.A., Uad, I., García-Fandiño, C., Laguna, J. González-Lopez, J.** (2008). Efficiency of the EPS emulsifier produced by *Ochrobactrum anthropi* in different hydrocarbon bioremediation assays. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35: 1493-1501
- Calvo C., Manzanera, M., Silva-Castro, G.A., Uad, I., Gonzalez-Lopez, J.** (2009). Application of bioemulsifiers in soil oil bioremediation processes. Future prospects. A review. *Sc. Total Environ.* 407: 3634-3640
- Chelo, I. M., Zé-Zé, L., and Tenreiro, R.** (2007). Congruence of evolutionary relationships inside the *Leuconostoc-Oenococcus-Weissella* clade assessed by phylogenetic analysis of the 16 S rDNA gene, *dnaA*, *gyrB*, *rpoC* and *dnaK*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57: 276-286

- Colwell, R.R.** (1977). Ecological aspects of microbial degradation of petroleum in the marine environment. *Critical Rev. Microbiol.* 5: 423-445
- Cooper, D.J. and Goldenberg, B.G.** (1987). Surface active agents from two *Bacillus* species, *Appl. & Environ. Microbiol.* 54: 224-22
- Das, N. and Chandran, P.** (2011). Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview *Biotechnol. Resear. Inter.* doi:10.4061/2011/941810
- Davis, J.B.** (1956). Microbial decomposition of hydrocarbons. *Ind. Eng. Chem.* 48: 1444-1448
- Darvishi, P., Ayatollah, S., Mowla, D., and Nazi, A.** (2011). Biosurfactant production under extreme environmental conditions by an efficient microbial consortium, ERCPPI-2. *Colloids and Surfaces B. Biointerfaces.* 84: 292-300
- Decho, A.W.** (1990). Microbial exopolymer secretions in ocean environments: their role(s) in food webs and marine processes. In *Oceanography and Marine biology: an Annual Rev.* Barnes, M., Ed.; *Aberdeen Univ Press*: Aberdeen, UK. 73-153.
- Decho, A.W., and Herndl, G.J.** (1995). Microbial activities and the transformation of organic matter within mucilaginous material. *Sci. Total Environ.* 165: 33-42
- Deizel, E., Paquette, G., Villemur, R., Lepine, F. and Bisailon, J.G.** (1996). Biosurfactant production by a soil *Pseudomonas* strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl. & Environ. Microbiol.* 62: 1905-1912
- Del Corral, A., Morro, A., Luppi, A., Daly, R.** (2005). Prestige fuel-oil confinement and recovery alternative. Offshore Technology Conference, OTC 17560 Houston, TX, U.S.A., 2e5 May 2005.
- Delille, D., Duval, A., and Pelletier, E.,** (2008). Highly efficient pilot biopiles for on site fertilization treatment of diesel oil contaminated sun-Antartic soil. *Cold Regions. Sc. Technol.* 54: 7-18
- Desai, J.D., Banat, I.M.** (1997). Microbial production of surfactant and their commercial potential. *Microbol. Mol. Biol. Rev.* 61: 47-64.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., and Smith, F.** (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28: 350-356
- Enderle, P.J., and Farwell, M.A.** (1998). Electroporation of freshly plated *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* cells. *Biotechniques.* 25: 954-956
- Esin, E., and Ayten, K.** (2011). Bioremediation of Crude Oil Polluted Soils. *Asian J. Biotechnol.* 3: 206-213

- EPA-8270C. (1996). Semivolatile organic compounds by gas chromatography/mass spectrometry GS/MS; Revision 3
- Eweis, J.B., Ergas, S.J., Chang, D.P.Y., and Schroeder, E.D. (1999). Principios de biorrecuperación: tratamientos para descontaminación y regeneración de suelos y aguas subterráneas mediante procesos biológicos y físico-químicos. McGraw-Hill, Madrid
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evol.* 39: 783-791
- Fernández-Álvarez, P., Vila, J., Garrido-Fernandez, J.M., Grifoll, M., Feijoo, G., and Lema, J.M (2007). Evaluation of biodiesel as bioremediation agent for the treatment of the shore affected by the heavy fuel oil spill of the Prestige. *J. Haz.Mat.* 137: 1523-1531
- Fernández-Álvarez, P., Vila, J., Garrido-Fernandez, J.M., Grifoll, M., and Lema, J.M (2006). Trials of bioremediation on a beach affected by the heavy oil spill of the Prestige. *J. Haz.Mat.* 137: 1523-1531
- Fernández-Valera, R., Andrade, J.M., Muniategui, S., Prada, D., and Ramírez-Villalobos, F. (2008). The comparison of two heavy fuel oils in composition and weathering pattern, based on IR, GC-FID and GC-MS Analyses: Application to the Prestige wreckage. *Water Res.* 43: 1015-1026
- Franco, I., Contin, M., Bragato, G., and De Nobili, M. (2004). Microbiological resilience of soils contaminated with crude oil. *Geoderma.* 121: 17-30
- Franklin, F.C.H., Bagdasarian, M., Bagdasarian, M.M., and Timmis, K.N. (1981). Molecular and functional analysis of the TOL plasmid PWW0 from *Pseudomonas putida* and cloning the genes for the entire regulated aromatic ring-cleavage pathway. *Proc. Acad. Sci. USA.* 78: 4758-4762
- Fusetani, N. Introduction. In: Fusetani N. Editor. (2000). *Drugs from the sea*. Basel: Karger. 1-5
- Gauthier, M. J., Lafay, B., Christen, R., Fernandez, L., Acquaviva, M., Bonin, P., and Bertrand, J. C. (1992). *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* gen. nov., sp. nov. A new extremely halotolerant, hydrocarbon degrading marine bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42: 568-576
- Gavriš, E.Y., Krauzova, V.I., Potekhina, N.V., Karasev, S.G., Plotnikova, E.G., Altyntseva, O.V., Korosteleva, L.A., and Evtushenko, L.I. (2004). Three new species of Brevibacteria, *Brevibacterium antiquum* sp. nov. *Brevibacterium auranticacum* sp. nov. And *Brevibacterium premense* sp. nov. *Microbiol.* 73: 176-183
- Gentili, A.R., Cubitto, M.A., Ferrero, M., and Rodríguez, M.S. (2006). Bioremediation Of crude oil polluted seawater by a Hydrocarbon-degrading strain immobilized on chitin and chitosan flakes. *I. Biodeter. & Biodegr.* 57: 222-228

- Georgius, G., Lin, S.C., and Sharma, M. (1992). Surface active compounds from microorganisms. *Biotechnol.* 10: 60-65
- Gómez Gesteira, J.L., Dauvin, J.C., and Salvande Fraga, M. (2003). Taxonomic level for assessing oil spill effects on soft-bottom sublittoral benthic communities. *Marine Pol.* B.46: 562-572
- Giavasis, I., Harvey, L.M., and McNeil, B. (2000). Gellan gum. *Crit. Rev. Biotechnol.* 20: 177-211
- Gómez Gesteira and Dauvin, J.C. (2005). Impact of the Aegean Sea oil spill on the subtidal fine sand macrobenthic community of the Ares-Betanzos Ria (Northwest Spain). *Marine Environ. Res.* 60: 289-316
- González-Doncel, M., González, L., Fernández-Torrija, C., Navas, J.M., and Tarazona, J.V. (2008). Toxic effects of an oil spill on fish early life stage may not be exclusively associated to PAHs: Studies with Prestige oil and medaka (*Oryzias Latipes*). *Aq. Toxicol.* 87: 280-288
- Gutiérrez, T., Shimmield, T., Haidon, C., Black, K., and Green, H.D. (2008). Emulsifying and metal ion binding activity of a glycoprotein exopolymer produced by *Pseudoalteromonas* sp. strain TG12. *Appl Environ Microbiol.* 74(15):4867-4876.
- Haigler, B., Pettigrew, C., and Spain, J. (1992). Biodegradation of mixtures of substituted benzenes by *Pseudomonas* sp. strain JS150. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2237-2244
- Haramaya, S., Kishira, H., Kasai, Y., and Shutsubo, K. (1999). Petroleum biodegradation in marine environments. *J. Mol. Microbiol. & Biotechnol.* 1: 63-70
- Harayama, S., Kasai, Y., and Hara, A. (2004). Microbial communities in oil-contaminated seawater. *Curr. Opin. Biotechnol.* 15: 205-214
- Head, I.M., and Swannell, R.P. (1999). Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in marine habitats. *Current Opinion in Biotechnol.* 10: 234-239
- Head, I.M., Jones, D.M., and Larter, S.R. (2003). Biological activity and the deep subsurface and the origin of heavy oil. *Nature.* 426: 344-352
- Hedlund, B.P., and Staley, J.T. (2006). Isolation and characterization of *Pseudoalteromonas* strains with divergent polycyclic aromatic hydrocarbon catabolic properties. *Env. Microbiol.* 8(1): 178-182
- Heinaru E., Truu, J., Stottmeister, U., and Heinaru, A. (2000). Three types of phenol and *p*-cresol catabolism in phenol and *p*-cresol.degrading bacteria isolated from river water continuously polluted with phenolic compounds. *FEMS Microbiol. Ecol.* 31: 195-205
- Henry, J.A. (1998). Composition and toxicity of petroleum products and their additives. *Human& Eperiem. Toxicol.* 17: 111-123

- Holmstrom, C., and Kjelleberg, S. (1999). Marine *Pseudoalteromonas* species are associated with higher organisms and produce biologically active extracellular agents. *FEMS. Microbiol. Ecol.* 30: 285-293
- Hughes, B.J., Neale, C.N. y Ward, C.H. (2000). Biorremediation. In: Lederberg J (Ed) *Encyclopedia of Microbiology* 2nd ed, Vol. 1, (pp: 587-609). Academic Press, NY
- Ielpi L., Couso R.O., Dankert M.A. (1981). Pyruvic acid acetal residues are transferred from phosphoenolpyruvate to the pentasaccharide-P-P-lipid. *Biochem. Bioph. Res. Co.* 12: 1400-1408
- Ielpi L., Couso R.O., and Dankert M.A. (1983). Xhantam gum biosynthesis: acetylthion occurs at the prenyl phosphor sugar state. *Biochem. Int.* 6: 323-333
- Ielpi L., Couso R.O., and Dankert M.A. (1993). Sequential assembly and polymerization of the prenyl-linked pentasaccharide repeating unit of the xanthan polysaccharide in *Xanthomonas campestris*. *J. Bacteriol.* 175: 2490-2500
- Ijah, U. J. J. and Antai, S. P. (2003). Removal of Nigerian light crude oil in soil over a 12 month period. *Int. Biodeterior. Biodegr.* 51: 93-99
- Igwo-Ezikepe, M.N., Gbenle, O.G., Ilori, M.O., Okpuzor, J., and Osuntoki, A.A. (2010). High Molecular Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Biodegradation by Bacteria Isolated from Contaminated Soils in Nigeria. *Resear.J. Environ. Sc.* 4: 127-137
- Iyer, A., Mody, K., and Jha, B. (2005). Characterization of an exopolysaccharide produced by a marine *Enterobacter cloacae*. *Indian. J. Exp. Biol.* 43: 467-471
- Jarayaman, M., and Seetharaman, J. (2003). Physicochemical analysis of the exopolysaccharides produced a marine biofouling bacterium, *Vibrio alginolyticus*. *Proceess biocehm.* 38(6): 841-847
- Jensen, P.R., and Fenical, W. (1994). Strategies for the discovery of secondary metabolites from marine bacteria: ecological perspectives. *Annu. Rev. Microbiol.* 48: 559-84
- Joly-Turquin, G., Dubois, P., Coteur, G., Danis, B., Leyzour, S., Le Menach, K., Budzinski, H., and Guillou, M. (2009). Effects of the Erika oil spill on the common starfish *Asterias rubens*, evaluated by field and laboratory studies. *Arch. Environ. Cont. Toxic.* 56: 209-220
- Junge, K., Eicken, H., and Deming, J.W. (2004). Bacterial activity at -2 to -20°C in Arctic Wintertime sea ice. *App.l Environ. Microbiol.* 70: 550-557
- Kado, C.I. and Liu, S.T. (1981). Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* 145: 1365-1373
- Kanally, R.A., and Harayama, S. (2000). Biodegradation of high molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *J.Bacteriol.* 182: 2059-2067
- Kang, K.S., Cottrell, I.W. (1979). Polysaccharides. *Microbiol. Tech.* Peppler H.J. And Pertman, D. 2nd ed. Academic Press. 1: 471-481. London

- Kavita, K., Mishra, M., and Jha, B.** (2011). Isolation and physico-chemical characterisation of extracellular polymeric substances produced by the marine bacterium *Vibrio parahaemolyticus*. *Biofouling*. 27(3): 309-317
- Kelecom, A.** (2002). Secondary metabolites from marine microorganisms. *An. Acad. Bars. Cienc.* 74: 150-170
- Kenne, L., Lindeberg, B.** (1983). Bacterial polysaccharides. In *The polysaccharide, Aspinall, G.O.* 2: 287-363
- Kenney, J.F., Kutcherov, V.A., Bendeliani, N.A., and Alekseev, V.A.** (2002). The evolution of multicomponent systems at high pressures: VI. The thermodynamic stability of the hydrogen-carbon system: the genesis of hydrocarbons and origine of petroleum . *Proc. Nat. Acad. Sc. USA.* 99: 10976-10981
- King, R.W.** (1988). Petroleum: its composition, analysis and processing. *Occup. Med.* 3: 409-430
- Ko, S.H, Lee, H.S, Park, S.H., and Lee, H.K.** (2004). Optimal conditions for the production of exopolysaccharide by marine microorganism *Hahella chenjuensis*. *Biotechnol. Bioproc. Eng.* 5: 181-185
- Kodama, Y., Stiknowati, L.I., Ueki, A., Ueki, K., and Watanabe, K.** (2008). *Thalassospira tepidipjila* sp. nov., a polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacterium isolated from seawater. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58: 711-715
- Kumar, S., Tamura, K., and Nei, M.** (2004) MEGA 3: Intergated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief.Bioinf.* 5: 150-163
- Kumar, A.S., Mod, K., and Jha, B.** (2007). Bacterial exopolysaccharides, a perception. *J. Bas. Microbiol.* 47: 103-107
- Krembs, C., Eicken, H., Junge, K., and Deming, J.W.** (2002). High concentrations or exopolymeric substances in Arctic winter sea ice: implication for the polar ocean carbon cycle and cryoprotection of diatoms. *Deep-Sea Res. Part I* 49:2163-2181.
- Lang, S, and Wagner, F.** (1993). Biosurfactants from marine microorganisms. In: Kosaric N, editor. *Biosurfactatns: production, properties, applications* (Surfactant Science Series). New York: Marcel Dekker; 48: 391-417
- Lang, S, and Wullbrandt, D.** (1999). Rhamnose lipids-biosynthesis, microbial production and application potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51: 22-32
- Leahy, J. G., and Colwell, R.R.** (1990). Microbal degradation of Hydrocarbons in the Environment. *Microbiol. Rev.* 54: 305-315

- Lee, S.D. (2006). *Brevibacterium samyangense* sp nov., an actinomycete isolated from a beach sea sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56: 1889-1892
- Leigh, J.A. and Coplin, D.L. (1992). Exopolysaccharides in plant bacterial interactions. *Annual Rev. Microbiol.* 46: 307-346
- Li, W.W., Zhou, W.Z., Zhang, Y.Z, Wang, J., and Zhu, X.B. (2008). Flocculation behaviour and mechanism of an exopolysaccharide from deep-sea psychrophilic bacterium *Pseudomonas* sp. SM9913. *Bioresour. Technol.* 99(15): 6893-6899
- Lim, D.J., Kim, J.D., Kim, M.Y., Yoo, S.H., and Kong, J.Y. (2007). Physicochemical properties of the exopolysaccharides produced by marine bacterium *Zoogloea* sp. KCCM10036. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17: 979-984
- Lin, X., Yang, B., Shen, J., and Du, N. (2009). Biodegradation of crude oil by an Arctic Psychrotrophic bacterium *Pseudomonas* sp. P29. *Curr. Microbiol.* 59: 341-345
- Linderberg, B., Lindquist, B., Lönngren, J., and Nimmich, W. (1976). 4-O-[(S)-1-carboxyethyl]-D-glucuronic acid: a component of the *Klebsiella* type 37 capsular polysaccharide. *Carbohydr. Res.* 49: 411-417
- Lindberg, B. (1990). Components of bacterial polysaccharides. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 48: 279-318
- Liu, C.L., Wu, U., Li, L., Ma, Y., and Shao, Z. (2007). *Thalassospira xiamenensis* and *Thalassospira profundimaris* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57: 316-320
- Liu, C.W., Chang, W.N., and Liu, H.S. (2009). Bioremediation of alkanes and the formation of bioflocules by *Rhodococcus erythropolis* NTU-1 under various saline concentration and sea water. *Biochem. Eng. J.* 45: 69-75.
- Liu, X., Ren, B., Ming, C., Wang, H., Kokare, C.R., Zhou, X., Wang, J., Dai, H., Song, F., Liu, F., Wang, J., Wang, S., and Zhang, L. (2010). Production and characterization of a group of bioemulsifiers from the marine *Bacillus velezensis* strain H3. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87:1881-1893
- Loaec, M., Olier, R., Guezennec, J. (1998). Chelating properties of bacterial exopolysaccharides from deep-sea hydrothermal vents. *Carbohydr. Polym.* 35: 65-70
- Loaec, M., Olier, R., Guezennec, J. (1997). Uptake of lead, cadmium and zinc by a novel bacterial exopolysaccharide. *Water Res.* 31: 1171-1179
- Lobet, Y., Peacock, M., and Cieplak, W. Jr. (1989). Frame-shift mutation in the lacZ gene of certain commercially available pUC18 plasmids. *Nucl. Acids Res.* 17: 4897

Lobon, C.M., Fernández, C., Arrontes, J., Rico, J.M., Acuna, J.L., Anadon, R, and Monteoliva, J.A. (2008). Effects of the Prestige oil spill on macroalgal assemblages: large scale comparison. *Marine Pol. B.* 56: 1192-1200

López-López, A., Pujalte, M.J., Benlloch, S., Mata-Roig, M., Rosselló-Mora, R., Garay, E., and Rodríguez-Valera, F. (2002). *Thalassospira lucentensis* gen. nov., sp. Nov., a new marine member of the α -Proteobacteria. I. *J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 1277-1283

Logan, B.E., Hunt, J.R. (1987). Advantages to microbes of growth in permeable aggregates in marine systems. *Limnol. Ocenogr.* 32: 1034-1048

Lowry, O.H., Rosebrought, N.J., Farr, A. L., and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193-265

Madigan, M.T., Martinko, J.M., and Parker, J. (2004). *Biología de los microorganismos*, 10^a ed. Prentice Hall Iberia, Madrid

Mancuso Nichols, C., Garon, S., Bowman, J.P., Raguénès, G., Guézennec, J. (2004). Production of exopolysaccharides by Antarctic marine bacterial isolates. *J. Appl. Microbiol.* 96 (5): 1057-66

Mancuso Nichols, C.A., Guezennec, J., and Bowman, J.P. (2005)a. Bacterial exopolysaccharides form extreme marine environments with special consideration of the southern ocean, sea ice, and deep-sea Hydrothermal Vents: a review. *Mar. Biotechnol.* 7: 253-271

Mancuso Nichols, C.A., Garon, S., Bowman, J.P., Nichols, P.D., Gibson, J.A., and Guezennec, J. (2005)b. Chemical characterization of exopolysaccharides form Antarctic marine bacteria. *Microbiol. Ecol.* 49: 578-589

Margesin, R., and Schinner, F. (2001). Bioremediation (natural attenuation and biostimulation) of diesel oil-contaminated soil in an alpine glacier skiing area. *Appl. Environ. Microb.* 67: 3127-3133

Martin-Skilton, R., Saborido-Rey, F., and Porte, C. (2008). Endocrine alteration and other biochemical responses in juvenile turbot exposed to the Prestige fuel oil. *Sc. Total Environ.* 404: 68-76

Martínez-Cánovas, M.J., Quesada, E., Llamas, I., Béjar, V. (2004)c. *Halomonas ventosae* sp. nov, a moderately halophilic, denitrifying, exopolysaccharide-producing bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 733-737

Martínez-Checa, F., Toledo, F.L., Vilchez, R., Quesada, E., and Calvo, C. (2002). Yield production, chemical composition and functional properties of emulsifier H-28 in media containing various hydrocarbons. *Appl. Microbiol. Botechnol.* 58: 358-363

- Martinez-Checa, F., Toledo, F.L., El Mabrouki, K., Quesada, E., and Calvo C.** (2007). Characteristics of Bioemulsifier V2-7 synthesized in culture media added of hydrocarbons, chemical composition, emulsifying activity and rheological properties. *Biotechnol. Resour.* 98: 3130-3135
- Mata, J.A.** (2006). Caracterización de los exopolisacáridos producidos por microorganismos halófilos pertenecientes a los géneros *Halomonas*, *Alteromonas*, *Idiomarina*, *Palleronia* y *Salipiger*. Tesis doctoral, Universidad de Granada.
- Matsuda, M., Hasmi, M., and Okutani, K.** (1993). Structural análisis of sulfated polysaccharide from a marine *Pseudomonas*. *Nippon Suisan Gakk.* 59: 535-538
- Maugeri T.I., Gugliandolo C., Caccamo D., Panico A., Lama I., Gambacorta A.** (2002). Halophilic thermotolerant *Bacillus* isolated from a marine hot spring able to produce a new exopolysaccharide. *Biotechnol. Lett.* 24: 515-519
- Meintanis, C., Chalkou, K.I., Kormas, K.A., and Karagouri, A.D.** (2006). Biodegradation crude oil by thermophilic bacteria isolated from a volcano island. *Biodegrad.* 17: 105-111
- McCarthy, M., Hedges, J., and Benner, R.** (1996). Major biochemical composition of dissolved high molecular weight organic matter in sea water. *Mar Chem.* 55: 281-297
- McKew, B.A., Coulon, F., Yakimov, M.M., Denaro, R., Genovese, M., Smith, C.J., Osborn, A.M., Timmis, K.N., and McGenity, T.J.** (2007). Efficacy of intervention strategies for bioremediation of crude oil in marine systems and effects on indigenous hydrocarbonoclastic bacteria. *Environ. Microbiol.* 9: 1562-1571
- Melcher, R.J., Apitz, S.E. and Hemmingsen, B.B.** (2002). Impact of irradiation and polycyclic aromatic hydrocarbon spiking on microbial populations in marine sediment for future aging and biodegradability studies. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 2858-2868
- Michaud, L., Giudice, A.I., Saitta, M., de Domenico, M., and Bruni, V.** (2004). The biodegradation efficiency on diesel oil by two psychrotrophic Antarctic marine bacteria during a two month log experiment. *Marine Poll. Bult.* 49: 405-409
- Mirdamadian, S.H., Emtiazi, G., and Golabi, M.H.** (2010). Biodegradation of petroleum and aromatic hydrocarbons by bacteria isolated from petroleum contaminated soil. *J. Pet. Environ. Biotechnol.* 1: 102
- Mnif, S., Chamkh, M., and Sayadi, S.** (2009). Isolation and characterization of *Halomonas* sp. Strain C2SS100, a hydrocarbon degrading bacterium under hypersaline conditions. *J. Appl. Microbiol.* 107: 785-794
- Mnif, S., Chamkha, M., Labat, M., and Sayadi, S.** (2011). Simultaneous hydrocarbon biodegradation and biosurfactant production by oilfield-selected bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 111 (3): 525-36

- Moraine, R.A., and Rogovin, P.** (1966). Kinetics of exopolisaccharides B-1459 fermentation. *Biotechnol. & Bioeng.* 8: 511-524
- Nei, M., and Kumar, S.** (2000). Molecular evolution and phylogenetics. Oxford University Press, New York
- Nerurkar, A.S., Hingurao, K.S., and Suthar, H.G.** (2009). Bioemulsifiers from marine microorganisms. *J.Sci. Ind. Res.* 68: 273-277
- Nicolaus, B., Panico, A., Manca, M.C., Lama, I., Gambacorta, A., and Maugeri T.I.** (2000). A thermophilic *Bacillus* isolated from an Eolian shallow hydrothermal vent, able to produce exopolysaccharides. *Sust. Appl. Microbiol.* 23: 426-432
- Nikolopoulou, M., and Kalogeratis, N.** (2009). Biostimulation strategies for fresh and chronically polluted marine environments with petroleum hydrocarbons. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 84: 802-807
- Norman, R., Frontera-Suau, R., and Morris, P.** (2002). Variability in *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide expression during crude oil degradation. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5096-5103
- Olivera, N.I., Commendatore, M.G., Delgado, O., and Esteves J.L.** (2003). Microbial characterization and hydrocarbon biodegradation potential of natural bilge waste microflora. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30: 542-548
- Oguntoyinbo, F.A.** (2007). Monitoring of marine *Bacillus* diversity among the bacteria community of sea water. *African J. Biotechnol.* 6(2): 163-166
- Pavitrn, S., Balasubramanian, S., Kumar, P., and Bisen, P.S.** (2004). Emulsification and utilization of high speed diesel by a *Brevibacterium* species isolated from hydraulic oil. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 20: 811-816
- Patil, K.R., Akesson, M., and Neilsen, J.** (2004). Use of genome-scale microbial models for metabolic engineering. *Curr. Opin. Biotechnol.* 15: 64-69
- Perfumo, A., Smyth, T.J.P., Marchant, R., and Banat, I.M.** (2010). Production and roles of biosurfactants and bioemulsifiers in accessing hydrophobic substrates. In: Kenneth N, Timmis, editor. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* 47(7): 1501-1512. Springer, UK
- Plaza, G.A., Ulfing, K., Brigmon, R.L.** (2005). Surface Active properties of bacterial strains isolated from petroleum hydrocarbon-bioremediated soil. *Pol. J. Microbiol.* 54: 161-162
- Poli, A., Esposito, E., Orlando, P., Lama, L., and Giordano, A.** (2007). *Halomonas alkantarctica* sp. nov., isolated from saline lake caoe Russell in Antartica, an alkalophilic moderately halophilic, exopolysaccharide-production bacterium. *Syst. Appl. Microbiol.* 30: 31-38

- Postanogova, G.V. (1991). Determination of the fractional composition of petroleum products in the soil. *Gigiena i Sanitaria*, 47-48
- Pucci, N.G., Adrián, J.A., and Llanes, M.L. (2009). Identificación de bacterias marinas cultivables de la ciudad costera Comodoro Rivadavia, argentina. *Rev. Biol. Marina. Ocean.* 44(1): 49-85
- Quintero, E.J., and Weiner, R.M. (1995). Evidence for the adhesive function of the exopolysaccharide of *Hyphomonas strain MHS-3* in its attachment to surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(5): 1897-1903
- Ramos, J.L., and Rojo. F. (1990). Biodegradación e ingeniería genética. *Investigación y Ciencia.* 164: 72-79
- Reuber T.L., and Walker, G.C. (1991). Biosynthesis of succinoglycan, a symbiotically important exopolysaccharide of *Rhizobium melilot.* *Cel.* 74 (2): 269-280
- Rodríguez, L., Banat, I.M., Teixeira, G., and Oliveira, O. (2006). Biosurfactants: potential applications in medicine. *J. Antimicrob. Chem.* 57: 609-618
- Rodríguez-Trigo, G., Zock, J.P., and Montes, I.I. (2007) Health effects of exposure to oil Spills. *Arch. Broncon.* 43: 628-635
- Rodríguez-Valera, F., Ruíz-Berraquero, F., and Ramos-Cormenzana, A. (1981). Characteristics of the heterotrophic bacterial population in hypersaline environments of different salt concentrations. *Microbial. Ecol.* 7: 325-243
- Rojo, F. (2009). Degradation of alkanes by bacteria. *Environ. Microbiol.* 11: 2477-2490
- Roh, S.W., Quan, Z.X., Nam, Y.D., Chang, H.W., Kim, K.H., Rhee, S.K., Oh, H.M., Jeon, C.O., Yoom, J.H., and Bae, J.W. (2008). *Marinobacter goseongensis* sp. nov., from seawater. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58: 2866-2870
- Röling, W.F, Milner, M.G., Jones, D.M., Lee, K., Daniel, F., Swannell, R.P., and Head I.M. (2002). Robust hydrocarbon degradation and dynamics of bacterial communities during nutrient-enhanced oil spill bioremediation. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (11): 5537- 5548
- Romanenko, L.A., Kalinovskaya, N.I., and Mikhailov, V.V. (2001). Taxonomic composition and biological activity of microorganisms associated with a marine ascidian *Halocynthia aurantium*. *Russian J. Marine Biol.* 27: 291-95
- Rosenberg, E., Zuckerberg, A., Rubinovitz, C., and Gutnick, D.L. (1979). Emulsifier *Arthrobacter* RAG-1: isolation and emulsifying properties. *Appl. Environ. Microbiol.* 37: 402-408
- Rosenberg, E., and Ron, E.Z. (1999). High and low molecular mass microbial surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52: 154-162

- Sambrook, J. Fritsch, E.F., and Maniatis, T.** (1989). Molecular cloning: A laboratory Manual. CSHL Press USA 2d edition
- Sanpera, C., Valladares, S., Moreno, R., Ruiz, X. and Jover, L.** (2008). Assessing the Effects of the Prestige oil spill on the European shag (*Phalacrocorax aristotelis*): Trace Elements and stable isotopes. *Sc. Total Environ.* 407: 242-249
- Satpute, S.K., Banat, I.M., Dhakephalkar, P.K., Banpurkar, A.G., and Chopade, B.A.** (2010). Biosurfactants, bioemulsifiers and exopolysaccharides from marine microorganisms. *A review. Biotechnol. Adv.* 28: 436-450
- Shepherd, R., Rockey, R., Sutherland, I.W., Rollers, S.** (1995). Novel bioemulsifiers from microorganism for use in food. *J. Biotechnol.* 40: 207-217
- Singh, S., Kang, S.H., Mulchandani, A., and Chen, W.** (2008). Bioremediation: environmental clean up through pathway engineering. *Current Opinion Biotechnol.* 19: 437-444
- Scow, K.M., and Hicks, K.A.** (2005). Natural attenuation and enhanced Bioremediation of organic contaminants in groundwater. *Current Opinion in Biotechnology.* 16: 246-253
- Soeder, C. J., Papaderos, A., Kleespies, M., Kneifel, H., Haegel, F.H., and Webb, L.** (1996). Influence of phytogenic surfactants (quillaya saponin and soja lecithin) on bio-stimulation of phenanthrene and fluoranthene by three bacteria. *Appl. Microbiol. & Biotechnol.* 44: 654-659
- Sharma, S.L., and Pant, A.** (2000) Biodegradation and conversion of alkanes and crude oil by a marine *Rhodococcus* sp. *Biodegr.* 11. 289-294
- Skayti, A.D., Hidayati, N.V., Yani, M., and Suidiana, I.M.** (2008). PHA degraders marine bacteria isolated from chronically contaminated sediment by petroleum hydrocarbons. P.E.R.M.I. 22-23 August. Purwokerto.
- Song, B., and Ward, B. B.** (2005). Genetic diversity of benzoyl coenzyme A reductase genes detected in denitrifying isolates and estuarine sediment communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 2036-2045
- Smith, M.** (1990). The biodegradation of aromatic hydrocarbons by bacteria. *Biodegrad.* 1: 191-206
- Smits, T., S. Balada, B. Witholt and J. Beilen.** (2002). Functional analysis of alkane hydroxylases from Gram-negative and Gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.* 184: 1733-1742
- Sutherland, I.W.** (1972). Bacterial exopolysaccharides. *Adv. Microb. Phys.* 8: 143-213
- Sutherland, I.W.** (1977). Microbial exopolysaccharide synthesis. In *Extracellular Microbial Polysaccharides*. Sanford, P.A., Laskin, A., Eds. ; American Chemical Society: Washington, DC, USA. 45: 40-57

- Sutherland, I.W.** (1988). Bacterial surface polysaccharides: structure and function. *Int. Rev. Cytol.* 113: 187-231
- Sutherland I.W.** (1994). Structure-function relationship in microbial exopolysaccharides. *Biotechnol. Adv.* 12: 393-448
- Sutherland, I.W.** (2001). Microbial polysaccharides from Gram-negative bacteria. *Int. Dairy. J.* 11: 663-674
- Sutiknowati, L.I.** (2007). Hydrocarbon degrading bacteria: Isolation and identification. *Makara. Sains.* 11: 98-103
- Swannell, R.P., Lee, K., and Mc Donagh, M.** (1996). Field evaluations of marine oil spill bioremediation. *Microbiol. Rev.* 60: 342-365
- Tang, X., Zhu, Y., and Meng, Q.** (2007). Enhanced crude oil biodegradability of *Pseudomonas aeruginosa* ZJU after preservation in crude oil-containing medium. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23: 7-14
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., and Higgins, D.G.** (1997). The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research.* 25: 4876-4882
- Toledo, F.L., Calvo, C., Rodelas, B., and González-López, J.** (2006). Selection and identification of bacteria Isolated from waste crude oil with polycyclic aromatic hydrocarbons removal capacities. *Syst. & Appl. Microbiol.* 29: 244-252
- Toledo, F.L., González-López, J., and Calvo, C.** (2008). Production of bioemulsifier by *Bacillus subtilis*, *Alcaligenes faecalis* and *Enterobacter* species in liquid culture. *Bios. Technol.* 99: 8470-8475
- Uad, I., Silva-Castro, G.A., Pozo, C., González-López, J., and Calvo, C.** (2010). Biodegradative potential and characterization of bioemulsifiers of marine bacteria Isolated from samples of seawater, sediments and fuel extracted at 4000 m of depth (Prestige wreck). *Int. Biodeter. & Biodegr.* 64: 511-518
- Uchiyama, T., Abe, T., Ikemura, T. and Waranabe, K.** (2005). Substrate- induces gene-expression screening of environmental metagenome libraries for isolation of catabolic genes. *Nature Biotechnol.* 23: 88-93
- Uchiyama, T., and Waranabe, K.** (2007). The SIGEX scheme: High throughput screening of environmental metagenomes for the isolation of novel catabolic genes. *Biotechnol. & Engin. Rev.* 24: 107-116
- Umezawa, H.Y., Okami, Y., Kuarsawa, S., Ohnuki, T., Ishizuka, M., and Takeushi, T.** (1983). Marinactin, antitumor polysaccharide produced by marine bacteria. *J Antibiot;* 5: 471-475

- Urai, M., Yoshizaki, H., Anzai, H., Ogihara, H., Iwabuchi, N., and Harayama, S. (2007). Structural analysis of an acidic fatty acid ester-bonded extracellular polysaccharide produced by a pristane-assimilating marine bacterium *Rhodococcus erythropolis* PR4. *Carbohydr. Res.* 342: 933-942
- Uz, I., Duan, Y.P., and Ogram, A. (2000). Characterization of the naphthalene-degrading bacterium, *Rhodococcus opacus* M213. *FEMS Microbiology Letters.* 185(2): 231-238
- van Bailsen, J.B., Li, Z., Duetz, W.A., Smit, T.H.M. and Witholt, B. (2003). Diversity of alkane hydroxylase systems in the environment. *Oil & Gas Sc. Technol.* 58: 427-440
- van Bailsen, J.B., and Funhoff, E.G. (2007). Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74: 13-21
- Van hooren, P.T. and Van damme, E.J. (1998). Biosynthesis, physiological role, use and fermentation process characteristics of bacterial exopolysaccharides. *Rec. Res. Devel. Ferment. Bioeng;* 1: 253-299
- Varela, M., Bode, A., Lorenzo, J., Álvarez-Ossorio, M.T., Miranda, A., Patrocinio, T., Anadón, R., Viesca, L., Rodríguez, N., Valdés, L., Cabal, J., Urrutia, A., García-Soto, C., Rodríguez, M., Álvarez-Salgado, X.A., and Groom, S. (2006). The effect of the Prestige oil spill on the plankton of the N-NW Spanish coast. *Marine Pol. B.* 53: 272-286
- Vieira, P. A., Vieira, R. B., de França, F. P., and Cardoso, V. I. (2007). Biodergradtion of effluent contaminated with diesel fuel and gasoline. *J. Hazard. Mater.* 140: 52-59
- Vicent, P., Jeanthon, C., and Prieur, D. (1991). Production of exopolysaccharides by bacteria form deep-sea hydrothermal vents. *Kiel Meeresforsch.* 8: 188-192
- Vicent, P., Pignet, P., Talmont, F., Bozzi, I., Fournet, B., and Guezennec, J. (1994). Production and characterization of an exopolysaccharide excreted by a deep-sea hydrothermal bacterium isolated from the polyschaete annelid *Alvinella pompejana*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 4134-4141
- Vila, J., Nieto, J.M., Mertens, J., Springael, D., and Grifoll, M. (2010). Microbial community structure of a heavy fuel oil degrading marie consortium: linking microbial dynamics with polycyclic aromatic hydrocarbon utilization. *Microbiol. Ecol.* 73: 349-362
- Vinuesa, P., Rademaker, J.L.W., De Bruijin, F.J., and Werner, D. (1998) Genotypic charactrization of *Bradyrhizobium* strains nodulating endemic woody legumes of the canary Islands by PCR restriction fragment lenth polymorphism analysis of genes encoding 16S rRNA (16S rDNA) and 16S-23S rDNA integric spacers, repetitive extragenic palindromic PCR genomic fingerprinting, and partial 16S rDNA sequencing. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2096-2104

- Wolfaardt, G.M., Lawrence, J.R., and Korbe, D.R.** (1999). Function of EPS in Microbial Extracellular Polymeric Substances: Characterization, Structure and Function; *Wingender, J., Neu, T.R., Fleming H-C., Eds.; Springer-Verlag: 171-200; New York, NY, USA*
- Watanabe, K.** (2001). Microorganisms relevant to bioremediation. *Current opinion in Biotechnol.* 12: 237-241
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., and Lane, D.J.** (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173: 697-703
- Wingender, J., Neu, T.R., and Fleming, H.C.** (1999). What are bacterial extracellular polymer substances? In *Microbial Extracellular Polymer Substance; Wingender, J., Neu, T.R., Fleming, H. C., Eds.; Springer: Berlin, Germany; 1-19*
- Whitfield, C.** (1998). Bacterial extracellular exopolysaccharides. *Can. J. Microbiol.* 34: 415-419
- Wongesa, P., Tanaka, M., Ueno, A., Hasanuzzaman, M., Yumoto, I. and 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. *Curr. Microbiol.* 49: 415-422
- Xia, Y., Min, H., Rao, R., Lv, Z., Liu, J., Ye, Y., and Duan, X.** (2005). Isolation and characterization of phenanthrene-degrading *Sphingomonas paucimobilis* strain ZX4. *Biodeg.* 16: 393-402
- Yakimov, M.M., Timmis, K.N., and Golyshin, P.N.** (2007). Obligate oil degrading marine bacteria, *Curr. Opin. Biotechnol.* 18: 257-266
- Yousefi Kebira, D., Khodadadi, A., Ganjidoust, H., Badkoubi, A., and Amoozega, M.A.** (2009). Isolation and characterization of a novel native *Bacillus* strain capable of degrading diesel fuel. *Int. J. Environ. Sci. Tech.* 6(3): 435-442
- Yun, J., Ryu, S.** (2005). Screening for novel enzymes from metagenome and SIGEX, as a way to improve it. *Microbial Cell Factories.* 4:8
- Yuste, L., Corbella, M.E., Turiégano, M.J., Karlson, U., Puyet, A., and Rojo, F.** (2000). Characterization of bacterial strains able to grow on high molecular mass residues from crude oil processing. *FEMS. Microbiol. Ecol.* 32: 69-75
- Zaho, B., Wang, H., Li, R., and Mao, X.** (2010). *Thalassospira xianhensis* sp. nov., a polycyclic aromatic hydrocarbon degrading marine bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60: 1125-1129
- Zobell, C.E.** (1946). Action of microorganisms in hydrocarbons. *Bact. Rev.* 10: 1-49
- Zobell, C.E., and Upham, H.C.** (1944). A list of marine bacteria including description of sixty new species. *Bull. Scripps Inst. Oceanogr. Univ. Calif.* 5: 239-292

Zhou, M., Wu, Z. and Dahui, W. (2001), Promoted UV/Fe³⁺ process for p-nitrophenol degradation by electrocatalysis. In: Proceedings of The International Water Association Conference on Water and Wastewater Management for Developing Countries, PWTC, Kuala Lumpur, Malaysia, 29-31 October 2001. 1: 222-237

Zhuang, W.Q., Tay, J.H., Maszenan, A.M., and Tay, S.T. (2002). *Bacillus naphthovorans* sp. nov. from oil- contaminated tropical marine sediments and its role in naphthalene biodegradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58: 547-553

Zhuang, W.Q., Tay, J.H., Maszenan, A.M., Krumholz, L.R., and Tay, S.T. (2003). Importance of Gram-positive naphthalene degrading bacteria in oil contaminated tropical marine sediments. *Letters in Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36: 251-257

<http://www.biolog.com/newsite/bibliography.php> *GEN III MicroPlate™ Database. Biolog's powerful carbon source utilization and chemical sensitivity assay technology accurately identifies aerobic bacteria by production of a characteristic pattern or "Phenotypic Fingerprint" from discrete test reactions performed within a 96 well microplate.*

A microscopic image of a plant stem cross-section, showing vascular bundles arranged in a ring. The bundles are surrounded by a cortex and pith. The image is stained, likely with safranin and fast green, to highlight the cellular structures.

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Lista de Figuras

Figura 1.1. Algunos ejemplos de hidrocarburos saturados que forman parte de la mezcla de hidrocarburos de petróleo. Se muestran ejemplos de hidrocarburos tanto lineales como ramificados. -----	27
Figura 1.2. Algunos ejemplos de hidrocarburos presentes en la fracción aromática del petróleo. -----	28
Figura 1.3. Ejemplos de asfalteno y resinas. -----	28
Figura 1.4. Ruta metabólica de degradación de naftaleno por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Smith, 1990). El último paso en la degradación de poliaromáticos finaliza en ciclo de ácidos tricarboxílicos (CAT) vía catecol como compuesto intermediario. -----	37
Figura 1.5. Estructura del heteropolisacárido xantano producido por <i>Xanthomonas campestris</i> . -----	43
Figura 1.6. Etapas generales de la biosíntesis de exopolisacáridos (EPS), cápsulas y lipopolisacáridos en bacterias Gram negativas. -----	44
Figura 3.1. Esquema del plásmido p18GFP. La expresión del gen <i>gfp</i> está bajo el control del promotor P_{lac} . Se muestran el sitio de clonación múltiple que incluye el sitio <i>Bam</i> HI. -----	61
Figura 3.2. Esquema de la reacción de PCR-16S. Condiciones de amplificación del gen que codifica ADNr 16S. -----	66
Figura 3.3. Microplacas MicroPlate™. (a) Microplacas GN2/GP2 empleadas en la cuantificación de la utilización de fuentes de carbono, (b) Fotografía de Microplaca con pocillos coloreados o no según el uso de la fuente de carbono, el cambio de coloración corresponde al uso de la fuente de carbono por el microorganismo. -----	68
Figura 3.4. Esquema del proceso de extracción de los exopolisacáridos (EPS). Se muestran las distintas fases para el proceso de purificación. -----	71
Figura 3.5. Representación de una de las curvas patrón de carbohidratos totales. En ordenadas se representa la absorbancia a 490 nm de 4 concentraciones distintas de Glucosa sometidas al ensayo con fenol y ácido sulfúrico. -----	72
Figura 3.6. Representación de una de las curvas patrón de proteínas. En ordenadas se representa la absorbancia a 590 nm de 6 concentraciones distintas de albúmina sometidas al ensayo de Bradford. -----	73
Figura 3.7. Cantidades de metanol adicionadas para una mayor extracción de naftaleno. Valores obtenidos mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). -----	76
Figura 3.8. Representación de una de las curvas patrón de naftaleno. Valores obtenidos mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). -----	76
Figura 3.9. Fotografía de un cromatógrafo HP-1050. -----	77
Figura 4.1. Producto de reacción de PCR tras la amplificación del fragmento del gen ADNr 16S de 1.500 pb. (C-: control negativo; C+: control positivo (ADN genómico de <i>Escherichia coli</i>)). -----	84
Figura 4.2. Árbol filogenético basado en la secuencia del gen ARNr 16S obtenido mediante el método Neighbour-Joining. Los números de acceso en la base de datos Gen Bank de las	

secuencias de las especies de referencia son dados entre paréntesis. La barra indica un 5% de divergencia. Se indican los valores de “bootstrap” mayores del 50%.-----	85
Figura 4.3. Patrón de absorbancia de las cepas W1, W15, W16, F17, F20, S22 y S27 del género <i>Bacillus</i> . Oxidación/fermentación de las distintas fuentes de carbono ensayadas en la microplaca GP2. -----	87
Figura 4.4. Patrón de absorbancia de la cepa F2 del género <i>Brevibacterium</i> . Oxidación/fermentación de las distintas fuentes de carbono ensayadas en la microplaca GP2.88	
Figura 4.5. Patrón de absorbancia de las cepas W2, W4, W10 y W12 del género <i>Halomonas</i> . Oxidación/fermentación de las distintas fuentes de carbono ensayadas en la microplaca GN2. - -----	88
Figura 4.6. Patrón de absorbancia de las cepas W5, W7 del género <i>Thalassospira</i> , W8 del género <i>Marinobacter</i> . Oxidación/fermentación de las distintas fuentes de carbono ensayadas en la microplaca GN2. -----	89
Figura 4.7. Patrón de absorbancia de las cepas W18 del <i>Pseudoalteromonas</i> , S21 y S24 del género <i>Pseudomonas</i> . Oxidación/fermentación de las distintas fuentes de carbono ensayadas en la microplaca GN2. -----	89
Figura 4.8. Dendograma de análisis de clúster de los patrones metabólicos de microplaca GP2- Biolog™ de los microorganismos Gram positivos.-----	90
Figura 4.9. Dendograma de análisis de clúster de los patrones metabólicos de la microplaca GN2-Biolog™ de los microorganismos Gram negativos.-----	90
Figura 4.10. Representación gráfica en dos dimensiones de la correlación obtenida mediante el análisis multidimensional. Se muestran las agrupaciones de las cepas del género <i>Bacillus</i> y <i>Brevibacterium</i> juntos con las cepas tipo correspondientes.-----	91
Figura 4.11. Representación gráfica en dos dimensiones de la correlación obtenida mediante el análisis multidimensional. Se muestran las agrupaciones de las cepas del género <i>Halomonas</i> juntos con las cepas tipo correspondientes. -----	92
Figura 4.12. Representación gráfica en dos dimensiones de la correlación obtenida mediante el análisis multidimensional. Se muestran las agrupaciones de las cepas del género <i>Thalassospira</i> y <i>Marinobacter</i> juntos con las cepas tipo correspondientes.-----	92
Figura 4.13. Grafica en dos dimensiones de la correlación obtenida mediante el análisis de escalonamiento multidimensional. Se muestran las agrupaciones de las cepas del género <i>Pseudomonas</i> y <i>Pseudoalteromonas</i> juntos con sus cepas Tipo.-----	93
Figura 4.14. Crecimiento de <i>Bacillus thuringiensis</i> W1 a distintas concentraciones de sales (p<0,05). -----	94
Figura 4.15. Crecimiento de <i>Brevibacterium casei</i> F2 a distintas concentraciones de sales (p<0,05). -----	94
Figura 4.16. Crecimiento de <i>Bacillus pumilus</i> W15, W16, F17, F20, S22 y S27 a distintas concentraciones de sales (p<0,05).-----	95
Figura 4.17. Crecimiento de W3, W4, W10 y W12 perteneciente al género <i>Halomonas</i> a distintas concentraciones de sales (p<0,05).-----	96

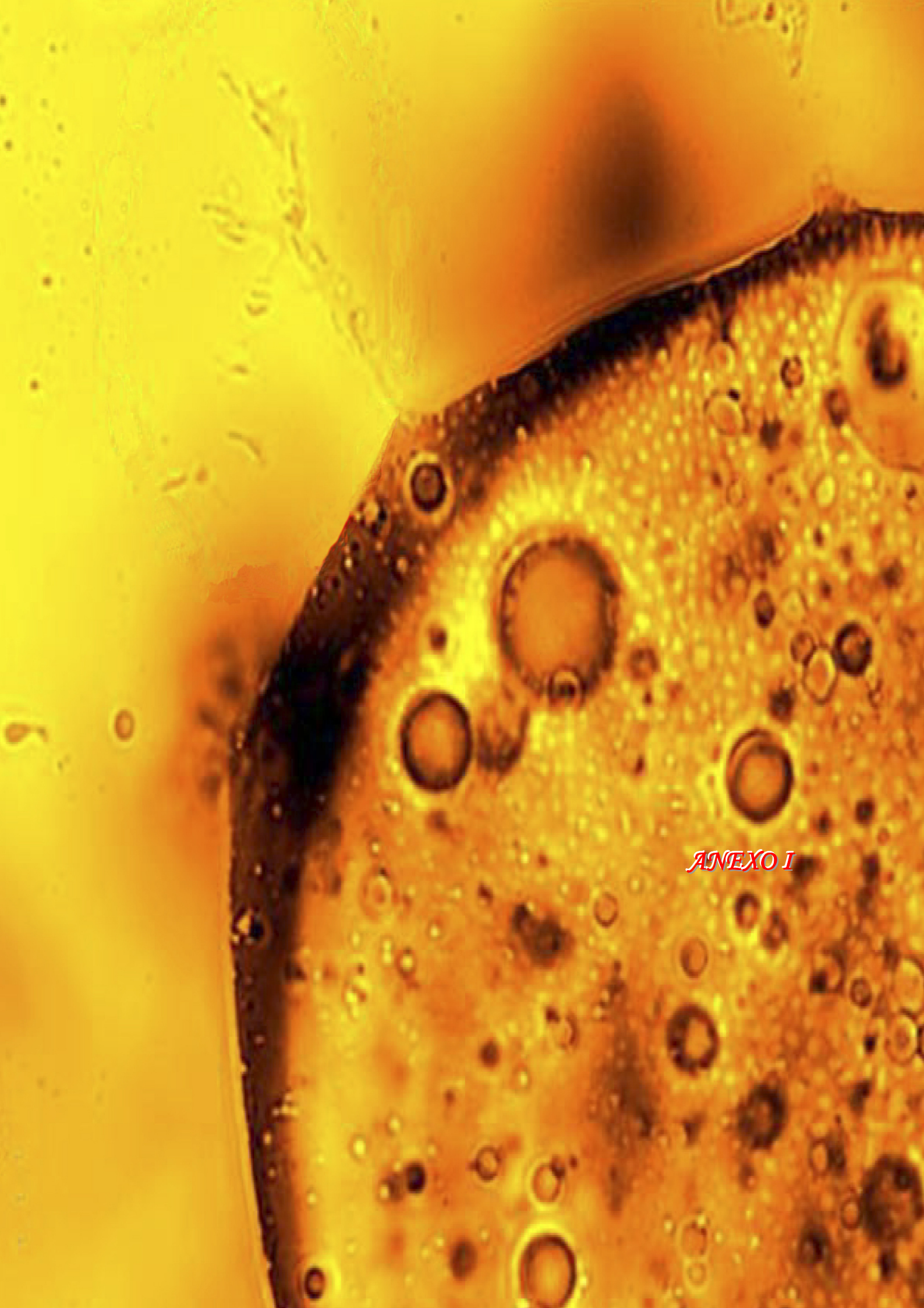
Figura 4.18. Crecimiento de <i>Thalassospira</i> sp. W5 y W7 y <i>Marinobacter</i> sp. W8 a distintas concentraciones de sales (p<0,05).-----	97
Figura 4.19. Crecimiento de W18 perteneciente al género <i>Pseudoalteromonas</i> y S21 y S24 pertenecientes al género <i>Pseudomonas</i> a distintas concentraciones de sales (p<0,05). -----	98
Figura 4.20. Efecto del tiempo de incubación y de la concentración de sales sobre la producción y la composición química del biopolímero W1 sintetizado por la cepa <i>B. thuringiensis</i> W1 (p<0,05).-----	99
Figura 4.21. Efecto del tiempo de incubación y de la concentración de sales sobre la producción y la composición química del biopolímero F2 sintetizado por la cepa <i>B. casei</i> F2 (p<0,05). -----	100
Figura 4.22. Efecto del tiempo de incubación y de la concentración de sales sobre la producción y la composición química de los biopolímeros W15, W16, F17, F20, S22 y S27 sintetizado por las cepas W15, W16, F17, F20, S22 y S27 del género <i>Bacillus</i> (p<0,05). -----	101
Figura 4.23. Efecto del tiempo de incubación y de la concentración de sales sobre la producción y la composición química de los biopolímeros W3, W4, W10 y W12 sintetizados por las cepas W3, W4, W10, W12 del género <i>Halomonas</i> (p<0,05). -----	102
Figura 4.24. Efecto del tiempo de incubación y de la concentración de sales sobre la producción y la composición química de los biopolímeros W5, W7 sintetizados por <i>Thalassospira</i> sp. (W5 y W7) y el biopolímero W8 sintetizado por <i>Marinobacter</i> sp. W8 (p<0,05).- -----	103
Figura 4.25. Efecto del tiempo de incubación y de la concentración de sales sobre la producción y la composición química de los biopolímeros W18, S21 y S24 sintetizados por las cepas de los géneros <i>Pseudoalteromonas</i> y <i>Pseudomonas</i> (p<0,05). -----	104
Figura 4.26. Gráfico triplot del análisis de redundancia (RDA) para los bioemulgentes producidos por las 18 cepas incluidas en este estudio. Se muestran las dos variables independientes: tiempo de incubación y salinidad.-----	112
Figura 4.27. Representación gráfica en dos dimensiones de la correlación obtenida mediante el análisis de escalonamiento multidimensional. -----	115
Figura 4.28. Crecimiento y capacidad degradadora de la cepa <i>Bacillus thuringiensis</i> W1 (p<0,05). -----	116
Figura 4.29. Crecimiento y capacidad degradadora de la cepa <i>Brevibacterium casei</i> F2 (p<0,05). - -----	116
Figura 4.30. Crecimiento y capacidad degradadora de las cepas W15, W16, F17, F20, S22 y S27 pertenecientes al género <i>Bacillus</i> (p<0,05).-----	117
Figura 4.31. Crecimiento y capacidad degradadora de las cepas W3, W4, W10 y W12 pertenecientes al género <i>Halomonas</i> (p<0,05).-----	118
Figura 4.32. Crecimiento y capacidad degradadora de las cepas W5, W7 pertenecientes al género <i>Thalassospira</i> y la cepa W8 perteneciente al género <i>Marinobacter</i> (p<0,05). -----	119
Figura 4.33. Crecimiento y capacidad degradadora de la cepa W18 perteneciente al género <i>Pseudoalteromonas</i> y las cepas S21 y S24 pertenecientes al género <i>Pseudomonas</i> (p<0,05).-----	120

Figura 4.34. Crecimiento en presencia de crudo Kirkuk al 1% (p/v). Se muestra el crecimiento de las 18 cepas incluidas en este estudio, en medio MMS (p<0,05). -----	122
Figura 4.35. Porcentaje de degradación de hidrocarburos totales TPH obtenidos por las 18 cepas objeto de estudio después de 15 días de incubación (p<0,05). -----	123
Figura 4.36. Dendograma de análisis de clúster de los resultados de eliminación de los hidrocarburos totales TPH para las 18 cepas objeto de estudio.-----	126
Figura 4.37. Dendograma de análisis de clúster de los resultados de eliminación de las fracciones de hidrocarburos para las 18 cepas incluidas en este estudio-----	126
Figura 4.38. Plásmido p18GFP. Los sitios de restricción para las enzimas son únicos. Se señalan además el gen de resistencia a ampicilina y el gen <i>'gfp</i> que se encuentra bajo control del promotor P _{lac} . Se muestra en detalle la secuencia de nucleótidos (5'→3') así como la secuencia de los aminoácidos a la que da lugar la lectura de los correspondientes codones (cada aminoácido se indica debajo de la base central del codón que lo codifica). Las flechas indican el sentido de la transcripción de los genes. -----	128
Figura 4.39. Electroforesis del ADN cromosómico de <i>Halomonas variabilis</i> W10. Se muestra el estado del ADN antes (a) y después (b) de la restricción con <i>Sau3A1</i> . -----	129
Figura 4.40. Electroforesis del plásmido p18GFP restringido con <i>Bam</i> HI y defosforilado con fosfatasa alcalina.-----	129
Figura 4.41. Electroforesis de ADN plasmídico de 40 clones de la librería I1. Se muestra el marcador de peso molecular ladder 10Kb (a la izquierda) y el producto de los aislamientos plasmídicos de las 40 colonias.-----	130
Figura 4.42. Fotografías de placas con medio sólido rociado con 0,5 M de catecol. Se muestran las reacciones de las cepas <i>H. variabilis</i> W10 junto con los dos controles <i>P. putida</i> KT2440 (+) y <i>E. coli</i> XL 1 Blue (-). -----	131
Figura 4.43. Electroforesis de la reacción PCR-GFP de los dos clones que dieron reacción positiva con el catecol. De izquierda a derecha se indica en la primera calle el plásmido p18GFP sin inserto, las calles 2 y 3 indican el plásmido que contiene los insertos de las dos colonias obtenidas y la última calle contiene el marcador de peso molecular Ladder 10Kb.-	132

Lista de Tablas

Tabla 1.1. Algunos ejemplos de bioemulgentes y sus microorganismos productores. (Banat y col., 2000; Sutherland, 2001; Calvo y col., 2004) -----	47
Tabla 1.2. Relación de algunos microorganismos marinos productores de EPS. -----	50
Tabla 3.1. Cepas bacterianas empleadas en el presente trabajo. Se indica el nombre y el origen de cada cepa objeto de estudio y sus referencias. También se indican las características más relevantes de las cepas aisladas así como las cepas <i>Escherichia coli</i> y <i>Pseudomonas putida</i> utilizadas como control en otros ensayos. -----	57
Tabla 3.2. Composición del medio de cultivo MY. Se indica la composición del medio MY en gramos por litro de agua destilada c.s.p. -----	58
Tabla 3.3. Solución de sales al 30% (p/v). Se indica la composición de stock de sales gramos por litro de agua destilada c.s.p. -----	58
Tabla 3.4. Medio Mínimo S4 (Abril y col., 1991) -----	59
Tabla 3.5. Medio Marino Sintético (MMS). Se indica la composición en gramos por litro de agua destilada c.s.p. -----	60
Tabla 3.6. Lista de los cebadores empleados en este estudio. Oligonucleótidos usados en la amplificación y la secuenciación del gen ADNr 16 S y los oligonucleótidos diseñados y usados en la amplificación y la secuenciación del gen que codifica para la expresión de la enzima catecol 2,3 dioxigenasa. -----	65
Tabla 3.7. Composición de las soluciones de la curva patrón de carbohidratos. -----	72
Tabla 3.8. Composición de las soluciones de la curva patrón de proteínas. -----	73
Tabla 3.9. Características más relevantes del crudo Kirkuk -----	77
Tabla 4.1. Porcentaje de identidad y longitud de los fragmentos del gen ADNr 16S secuenciados -----	84
Tabla 4.2. Actividad emulgente frente a AML, AMP, diesel, xileno, octano, tolueno y crudo Kirkuk, de los biopolímeros sintetizados por las cepas W1, W15, W16, F17, F20, S22 y S27 del género <i>Bacillus</i> . Expresada en porcentajes de emulsión ($p < 0,05$). -----	105
Tabla 4.3. Actividad emulgente frente a AMP, AML, diesel, xileno, octano, tolueno y crudo Kirkuk, de los biopolímeros sintetizados por la cepa <i>Brevibacterium casei</i> F2. Expresada en porcentajes de emulsión ($p < 0,05$). -----	106
Tabla 4.4. Actividad emulgente frente a AMP, AML, diesel, xileno, octano, tolueno y crudo Kirkuk, de los biopolímeros sintetizados por las cepas W3, W4, W10 y W12 del género <i>Halomonas</i> . Expresada en porcentajes de emulsión ($p < 0,05$). -----	107
Tabla 4.5. Actividad emulgente frente a AMP, AML, diesel, xileno, octano, tolueno y crudo Kirkuk, de los biopolímeros sintetizados por las cepas W5 y W7 del género <i>Thalassospira</i> . Expresada en porcentajes de emulsión ($p < 0,05$). -----	108
Tabla 4.6. Actividad emulgente frente a AMP, AML, diesel, xileno, octano, tolueno y crudo Kirkuk, de los biopolímeros sintetizados por la cepa <i>Marinobacter sp.</i> W8. Expresada en porcentajes de emulsión ($p < 0,05$). -----	108

Tabla 4.7. Actividad emulgente frente a AMP, AML, diesel, xileno, octano, tolueno y crudo Kirkuk, de los biopolímeros sintetizados por las cepas S21 y S24 del género <i>Pseudomonas</i> . Expresada en porcentajes de emulsión ($p < 0,05$).-----	109
Tabla 4.8. Actividad emulgente frente a AMP, AML, diesel, xileno, octano, tolueno y crudo Kirkuk, de los biopolímeros sintetizados por la cepa <i>Pseudoalteromonas elyakovii</i> W18. Expresada en porcentajes de emulsión ($p < 0,05$).-----	109
Tabla 4.9. Características más relevantes de los BE seleccionados según el índice de calidad bioemulgente-----	111
Tabla 4.10. Capacidad de las cepas seleccionadas para crecer en presencia de 4 HPAs al 1% (p/v). Se indican los resultados positivos del crecimiento en placas con HPAs (+) y ausencia de crecimiento (-). -----	114
Tabla 4.11. Porcentajes de eliminación de las fracciones de hidrocarburos después de la inoculación de cepas. ($p < 0,05$)-----	124



ANEXO I

Tabla I. Fuentes de carbono utilizadas por las cepas Gram positivas seleccionadas. W1: *Bacillus thuringiensis*; F2: *Brevibacterium casei*; W15; W16; F17, F20; S22; S27: *Bacillus pumilus*.

METABOLITOS	W1	W15	W16	F17	F20	S22	S27	F2
α -ciclodextrina	-	-	-	-	-	-	-	+
β -ciclodextrina	-	-	-	-	-	-	-	+
Dextrina	-	+	-	-	-	+	+	+
Glicógeno	-	-	-	-	-	+	-	+
Inulina	-	-	-	-	-	-	-	+
Manan	-	-	-	-	-	-	-	+
Tween40	-	+	+	-	-	+	-	+
Tween80	-	+	+	-	-	+	-	+
N-acetil-D-glucosamina	-	+	-	-	-	+	-	+
N-acetil-D-manosamina	-	+	-	-	-	+	-	+
Amigladina	-	+	-	-	-	+	-	+
L-arabinosa	-	-	+	+	+	+	-	+
D-arabitol	+	-	-	-	-	-	-	+
D-arbutina	-	+	+	+	+	+	+	+
D-celobiosa	-	+	+	-	-	+	+	+
D-fructosa	-	+	+	+	+	+	+	+
L-fructosa	-	-	-	-	-	+	-	+
D-galactosa	-	+	-	-	-	+	-	+
Acido D- galacturónico	-	-	-	-	-	-	-	+
gentiobiosa	-	+	+	+	+	+	+	+
Acido D- gluconico	-	-	-	-	-	-	-	+
α -D glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+
m-inositol	-	-	-	-	-	-	-	+
α -D-lactosa	-	-	-	-	-	-	-	+
Lactulosa	-	-	-	-	-	-	-	+
Maltosa	+	-	+	-	-	-	-	+
Maltotriosa	+	+	+	+	+	+	+	+
D-manitol	-	+	+	+	+	+	+	+
D-manosa	-	+	+	+	+	+	+	+
D-melezitosa	-	-	-	-	-	-	-	+
D-melibiosa	-	-	-	-	-	-	-	+
α -metil D-galactosida	-	-	-	-	-	-	-	+
β -metil D-galactosida	-	-	-	-	-	-	-	+

Tabla I. (Continuación)

3-metil glucosa	-	+	+	+	-	+	+	+
α -metil D-glucósido	-	-	-	-	-	-	-	+
β -metil D-glucosida	-	+	+	+	+	+	+	+
α -metil D-manosida	-	-	-	-	-	-	-	+
Palatinosa	-	-	+	-	-	+	-	+
D-psicosa	-	+	+	+	+	+	+	+
D-rafinosa	-	+	+	-	-	+	-	+
L-ramnosa	-	-	-	-	-	+	-	+
D-ribosa	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicina	-	+	+	+	+	+	+	+
Sedoheptulosa	-	-	+	-	-	-	-	+
D-sorbitol	-	+	-	-	+	+	+	+
Estaquirosa	-	-	+	-	-	-	-	+
Sacarosa	-	+	-	+	+	+	+	+
D-tagatosa	-	+	-	-	-	+	+	+
D-trehalosa	+	+	-	+	+	+	+	+
Turanosa	-	-	-	-	-	+	-	+
Xilitol	-	-	-	-	-	-	-	+
D-xilosa	+	+	+	+	+	+	-	+
Acido acético	-	-	-	-	-	-	-	+
Acido α -hidroxibutirico	-	-	-	-	-	-	-	+
Acido β -hidroxibutirico	-	-	-	-	-	-	-	+
Acido γ -hidroxibutirico	-	-	-	-	-	-	-	+
Acido ρ -hidroxibutirico	-	-	-	-	-	-	-	+
α -cetoglutárico	-	-	-	-	-	+	-	+
Acido α -cetovalérico	+	+	-	-	-	+	+	+
lactamida	-	-	-	-	-	-	-	+
Acido metil ester D-láctico	-	-	-	-	-	-	-	+
Acido L-láctico	-	-	-	-	-	-	-	+
Acido D-málico	-	-	-	-	-	-	-	+
Acido L-málico	-	+	-	+	+	+	+	+
Metil pirúvato	+	+	-	-	-	-	+	+
Mono metil succinato	-	+	-	+	-	+	+	+
Acido propiónico	-	-	-	-	-	-	+	+
Acido pirúvico	+	+	-	-	-	-	+	+

Tabla I. (Continuación)

Acido succinámico	-	-	-	-	-	+	-	+
Ácido succínico	-	-	-	-	-	-	-	+
Acido N-acetil- L-glutámico	-	-	-	-	-	+	-	+
L-alaninamida	-	-	-	-	-	+	-	+
D-alanina	-	-	-	-	-	+	-	+
L-alanina	-	+	-	-	-	+	-	+
L-alanil glicina	+	-	-	-	-	+	-	+
L-asparagina	-	+	-	+	+	+	+	+
Acido L-glutámico	-	+	-	-	-	-	+	+
Acido glicil L-glutámico	-	-	-	-	-	+	-	+
Acido L-proglutámico	-	-	-	-	-	+	-	+
L-serina	-	+	-	+	-	-	+	+
Putrescina	-	-	-	-	-	-	-	+
2,3-butanadiol	-	-	-	+	-	+	+	+
Glicerol	-	+	-	+	-	+	-	+
Adenosina	-	+	-	+	-	+	+	+
2'-deoxiadenosina	-	+	-	-	-	+	+	+
Inopina	-	+	-	+	+	+	+	+
Timidina	-	+	-	-	-	+	-	+
Uridina	-	+	-	-	-	+	-	+
Adenosina 5'-monofosfato	-	-	-	-	-	+	-	+
Timidina-5'-monofosfato	-	+	-	-	-	+	-	+
Uridina 5'-monofosfato	-	-	-	-	-	+	-	+
Fructosa-6-fosfato	-	-	-	-	-	-	-	+
Glucosa-1-fosfato	-	-	-	-	-	-	-	+
Glucosa-6-fosfato	-	-	-	-	-	-	-	+
D-L- α -glicerolfosfato	+	+	-	-	-	+	-	+

Tabla II. Fuentes de carbono utilizadas por las cepas Gram negativas seleccionadas. W3: *Halomonas alkantarctica*; W4, W10: *Halomonas variabilis*; W12: *Halomonas* sp.; W5, W7: *Thalassospira* sp.; W8: *Marinobacter* sp.; W18: *Pseudoalteromonas elyakovii*; S21: *Pseudomonas fluorescens*; S24: *Pseudomonas grimontii*.

METABOLITOS	W3	W4	W10	W12	W5	W7	W8	W18	S21	S24
α-ciclodextrina	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-
Dextrina	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+
Glucógeno	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
Tween40	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
Tween80	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
D-galactosamina	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-
N-acetil-D-glucosamina	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
Adonitol	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
L-arabinosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-arabitol	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-
D-celobiosa	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+
i-eritritol	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
D-fructosa	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+
L-fructosa	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-
D-galactosa	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-
Gentibiosa	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
α-D-glucosa	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+
m-inositol	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
α-D-lactosa	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
Lactulosa	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-
Maltosa	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-
Manitol	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
D-manosa	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
D-melibiosa	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
β-metil D-glucósido	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+
D-psychose	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+
D-rafinosa	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-
L-ramnosa	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-
D-sorbitol	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Sacarosa	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
D-trehalosa	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
Turanosa	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-

Tabla II. (Continuación)

Xilitol	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-
A. pirúvico metil ester	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-
A. succínico metil- ester	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-
Acido acético	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-
Cis-acido acético	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
Acido cítrico	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
Acido fórmico	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-
D-a. galactónico lactona	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-
D-a. galacturónico	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
D-a. glucónico	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-
D-a. glucosamínico	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
D-a. glucurínico	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
α -A. hidroxibutírico	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-
β -A. hidroxibutírico	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-
γ -A. hidroxibutírico	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-
p-A. hidroxifenilacético	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-
A. itacónico	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-
α -keto a. butírico	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-
α -keto a. glutárico	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-
α -keto a. valérico	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-
D,L- A.lactico	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-
A. malónico	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
A. propiónico	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
A. quínico	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
D-a. sacárico	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
A. sebácico	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
A. succínico	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-
A. bromosuccínico	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-
A. succinámico	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-
Glucoronamide	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
L-alaninamide	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-
D-alanina	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-
L-alanina	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-
L-alanil-glicina	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
L-aspargina	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+

Tabla II. (Continuación)

L-a. aspartico	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-
Acido glutámico	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-
Glicil-L-a. aspartico	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
Glicil-L-a. glutámico	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
L-histidina	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
hidroxi-L-prolina	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
L-leucina	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-
L-ornitina	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-
L-fenilalanina	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-
L-prolina	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-
L-acido piroglutámico	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
D-serina	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
L-serina	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+
L-treonina	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
D,L-carnitina	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-
γ -A.amino butirico	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-
A. urocanico	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-
Inosina	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-
Uridina	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-
Timidina	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-
fenil-etil-amino	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-
2-aminoetanol	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-
D-6 fosfato glucosa	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-

Tabla III. Índice de utilidad biotecnológica y características más relevantes de los bioemulgentes sintetizados por las 18 cepas seleccionadas

BE		Ic	AE		Producción g/l	Composición química (%)		
Denom.	Cond. cultivo		E (%)	n° Sustratos		C ^a	P ^b	ND
W1-1	W1(1%-7d ^e)	0,4	51	2	0,22	65	6	28
W1-2	W1(1%-15d)	1,0	45	4	0,132	45	13	42
W1-3	W1(3%-7d)	1,6	62	4	0,5	75	17	8
W1-4	W1(3%-15d)	1,6	62	4	0,82	55	12	33
W1-5	W1(3%-21d)	1,4	50	4	1,08	65	12	23
W1-6	W1(3%-30d)	0,3	53	1	1,69	77	5	18
W1-7	W1(7%-7d)	0,9	36	4	0,45	47	8	44
W15-2	W15(1%-15d)	0,1	72	1	0,3	54	5	41
W15-3	W15(3%-7d)	1,1	60	3	1,05	75	17	8
W15-4	W15(3%-15d)	0,4	47	2	0,61	47	13	39
W15-5	W15(3%-21d)	0,7	47	3	0,84	35	12	53
W15-6	W15(3%-30d)	0,1	80	1	0,6	33	10	57
W15-7	W15(7%-7d)	1,2	47	4	0,2	47	4	49
W15-8	W15(7%-15d)	1,0	37	4	0,54	44	14	42
W16-1	W16(1%-7d)	2,2	59	5	0,49	45	10	45
W16-3	W16(3%-7d)	1,6	58	4	0,65	66	9	25
W16-4	W16(3%-15d)	0,4	46	2	0,81	52	10	38
W16-5	W16(3%-21d)	0,4	55	2	0,76	36	12	52
W16-6	W16(3%-30d)	1,9	51	5	0,85	39	8	53
W16-7	W16(7%-7d)	2,0	55	5	0,23	33	9	58
W16-8	W16(7%-15d)	0,6	45	3	0,47	32	7	61
F17-2	F17(1%-15d)	0,7	51	3	0,14	23	5	72
F17-3	F17(3%-7d)	2,2	58	5	0,22	49	9	42
F17-4	F17(3%-15d)	1,2	53	4	0,2	60	10	30
F17-5	F17(3%-21d)	0,4	64	2	0,4	55	13	32
F17-6	F17(3%-30d)	0,5	79	2	0,3	52	10	38
F17-7	F17(7%-7d)	0,8	54	3	0,51	34	4	62
F17-8	F17(7%-15d)	0,6	39	3	0,3	31	14	55
F20-1	F20(1%-7d)	0,3	40	2	0,19	19	9	72
F20-2	F20(1%-15d)	0,2	32	2	0,2	14	5	81
F20-3	F20(3%-7d)	0,3	43	2	0,7	34	10	55
F20-4	F20(3%-15d)	0,7	53	3	0,81	15	13	72
F20-5	F20(3%-21d)	0,3	30	3	0,42	15	9	76
F20-6	F20(3%-30d)	0,3	54	2	0,27	16	14	70
F20-7	F20(7%-7d)	0,2	32	2	1,12	13	4	83
F20-8	F20(7%-15d)	-	0	0	0,27	13	12	75
S22-1	S22(1%-7d)	0,1	100	1	0,21	10	2	89
S22-2	S22(1%-15d)	0,1	87	1	0,22	9	5	86
S22-3	S22(3%-7d)	0,6	75	2	2,28	32	7	62
S22-4	S22(3%-15d)	0,1	55	1	0,74	21	5	74
S22-5	S22(3%-21d)	0,1	50	1	0,21	25	4	71
S22-6	S22(3%-30d)	0,3	54	2	0,22	20	7	73
S22-7	S22(7%-7d)	0,4	65	2	0,5	16	26	58
S22-8	S22(7%-15d)	0,1	49	1	0,36	12	9	79
S27-1	S27(1%-7d)	0,2	27	2	0,34	9	9	82

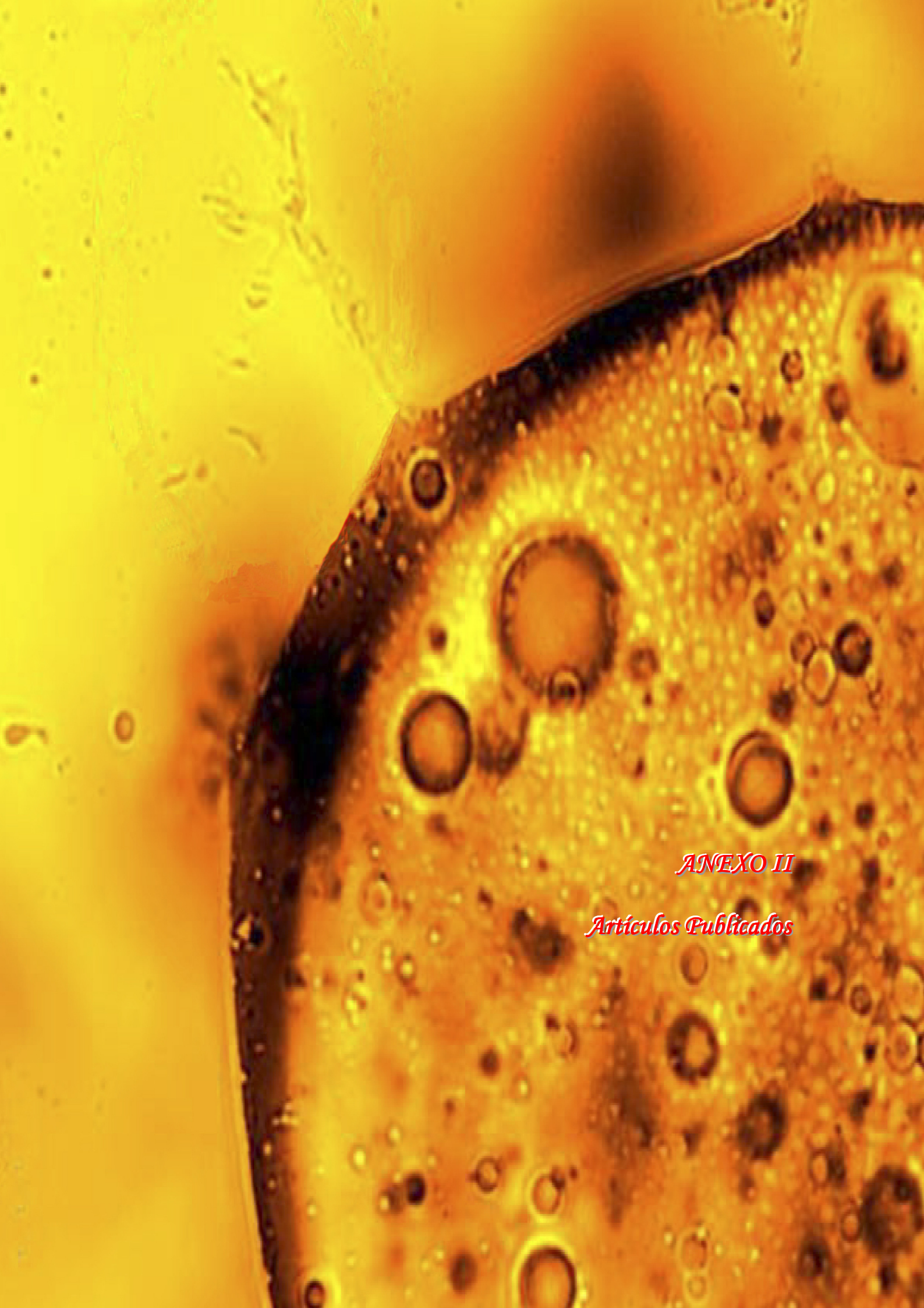
Tabla III. (Continuación)

S27-2	S27(1%-15d)	0,3	61	2	0,16	13	5	82
S27-3	S27(3%-7d)	0,8	36	4	0,24	43	10	47
S27-4	S27(3%-15d)	0,3	49	2	0,17	32	12	56
S27-5	S27(3%-21d)	0,2	29	2	0,28	28	7	65
S27-6	S27(3%-30d)	1,1	52	4	0,36	26	14	60
S27-7	S27(7%-7d)	0,2	30	2	0,64	16	12	71
S27-8	S27(7%-15d)	0,9	35	4	0,62	15	8	78
F2-1	F2(1%-7d)	0,9	49	3	0,405	65	12	23
F2-2	F2(1%-15d)	0,4	55	2	0,23	51	6	43
F2-3	F2(3%-7d)	1,8	49	5	0,32	76	15	9
F2-4	F2(3%-15d)	1,5	35	4	0,26	46	10	45
F2-5	F2(3%-21d)	1,2	47	4	0,63	55	7	38
F2-6	F2(3%-30d)	1,0	34	4	1,04	55	7	38
F2-7	F2(7%-7d)	1,5	41	5	0,35	80	7	13
F2-8	F2(7%-15d)	0,8	35	4	0,2	56	8	37
W3-1	W3(1%-7d)	2,7	50	6	0,24	44	23	34
W3-2	W3(1%-15d)	2,8	49	6	0,72	44	24	32
W3-3	W3(3%-7d)	2,1	41	5	1,15	67	10	24
W3-4	W3(3%-15d)	2,2	55	5	0,82	41	12	47
W3-5	W3(3%-21d)	2,9	48	6	1,13	70	10	20
W3-6	W3(3%-30d)	1,3	41	4	1,49	66	14	20
W3-7	W3(7%-7d)	3,2	54	6	0,91	42	30	27
W3-8	W3(7%-15d)	2,3	41	6	0,9	43	15	43
W4-1	W4(1%-7d)	2,2	54	5	0,48	44	9	47
W4-2	W4(1%-15d)	2,7	52	6	0,6	27	8	65
W4-3	W4(3%-7d)	4,0	71	6	0,65	62	12	26
W4-4	W4(3%-15d)	1,9	45	5	0,74	34	13	53
W4-5	W4(3%-21d)	0,3	39	2	0,84	59	8	33
W4-6	W4(3%-30d)	1,3	51	3	3,08	55	14	31
W4-7	W4(7%-7d)	1,2	45	4	0,23	36	17	46
W4-8	W4(7%-15d)	3,1	55	6	0,74	30	24	46
W10-1	W10(1%-7d)	2,4	57	5	0,61	67	4	29
W10-2	W10(1%-15d)	3,9	50	6	4,93	37	8	55
W10-3	W10(3%-7d)	3,9	56	7	0,2	77	4	19
W10-4	W10(3%-15d)	2,4	40	6	1,68	33	5	62
W10-5	W10(3%-21d)	0,6	68	2	0,8	66	5	29
W10-6	W10(3%-30d)	0,4	78	1	3	63	14	24
W10-7	W10(7%-7d)	2,2	57	5	0,86	26	2	71
W10-8	W10(7%-15d)	2,1	52	5	0,78	29	25	46
W12-2	W12(1%-15d)	2,1	56	5	0,69	39	6	56
W12-3	W12(3%-7d)	2,8	39	7	0,59	32	13	55
W12-4	W12(3%-15d)	0,9	48	3	0,88	33	12	55
W12-5	W12(3%-21d)	1,9	67	4	2,44	24	9	67
W12-6	W12(3%-30d)	1,0	62	3	0,82	64	8	28
W12-7	W12(7%-7d)	3,5	63	6	0,89	32	34	33
W12-8	W12(7%-15d)	1,1	62	3	1,19	34	23	44
W5-1	W5(1%-7d)	0,2	78	1	0,36	53	12	34
W5-2	W5(1%-15d)	0,7	52	3	0,6	21	7	72
W5-3	W5(3%-7d)	0,4	27	3	0,3	77	19	3
W5-4	W5(3%-15d)	0,6	46	3	0,31	22	2	76

Tabla III. (Continuación)

W5-5	W5(3%-21d)	0,03	25	1	1,43	25	5	70
W5-6	W5(3%-30d)	-	0	0	1,32	22	4	74
W5-7	W5(7%-7d)	0,2	23	2	0,58	58	12	30
W5-8	W5(7%-15d)	-	0	0	0,84	27	7	67
W7-3	W7(3%-7d)	2,3	60	5	0,42	66	12	22
W7-4	W7(3%-15d)	1,3	49	4	0,75	33	4	64
W7-5	W7(3%-21d)	1,9	70	4	1,78	39	5	56
W7-6	W7(3%-30d)	1,0	45	4	0,28	39	6	55
W8-1	W8(1%-7d)	0,7	56	3	0,19	43	9	48
W8-2	W8(1%-15d)	1,3	53	4	0,29	52	6	42
W8-3	W8(3%-7d)	1,8	71	4	0,36	73	7	20
W8-4	W8(3%-15d)	1,4	54	4	0,35	69	13	19
W8-5	W8(3%-21d)	0,1	45	1	1,27	55	9	36
W8-6	W8(3%-30d)	0,5	71	2	0,76	35	12	53
W8-7	W8(7%-7d)	1,0	41	4	0,47	53	7	40
W8-8	W8(7%-15d)	0,9	40	4	0,31	52	13	34
W18-1	W18(1%-7d)	-	0	0	0,13	18	9	73
W18-3	W18(3%-7d)	0,3	38	2	1,12	30	9	61
W18-4	W18(3%-15d)	0,05	25	1	0,7	17	8	74
W18-5	W18(3%-21d)	-	0	0	4,24	14	8	78
W18-6	W18(3%-30d)	0,1	100	1	0,25	13	5	81
W18-7	W18(7%-7d)	-	0	0	0,85	12	4	84
W18-8	W18(7%-15d)	-	0	0	0,22	12	12	77
S21-1	S21(1%-7d)	0,1	33	1	1,48	11	11	78
S21-3	S21(3%-7d)	1,0	51	3	2,71	22	13	65
S21-4	S21(3%-15d)	1,7	67	4	0,88	31	13	56
S21-5	S21(3%-21d)	1,5	65	4	1,03	16	8	76
S21-6	S21(3%-30d)	0,4	34	3	0,39	20	9	72
S21-7	S21(7%-7d)	0,05	30	1	0,48	12	9	79
S21-8	S21(7%-15d)	0,1	43	1	0,32	19	9	72
S24-1	S24(1%-7d)	0,3	37	2	0,3	18	14	68
S24-2	S24(1%-15d)	0,4	55	2	0,45	20	8	72
S24-3	S24(3%-7d)	1,0	48	3	2,13	32	27	41
S24-4	S24(3%-15d)	0,2	100	1	0,51	33	8	59
S24-5	S24(3%-21d)	0,1	33	2	0,1	15	3	82
S24-6	S24(3%-30d)	0,03	39	1	0,22	13	2	85
S24-7	S24(7%-7d)	0,1	55	1	0,5	13	7	80
S24-8	S24(7%-15d)	0,1	50	1	0,22	15	7	78

^a, días ^b; Carbohidratos; ^c, Proteínas



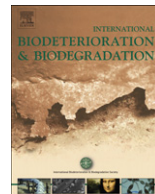
ANEXO II

Artículos Publicados



Contents lists available at ScienceDirect

International Biodeterioration & Biodegradation

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ibiod

Biodegradative potential and characterization of bioemulsifiers of marine bacteria isolated from samples of seawater, sediment and fuel extracted at 4000 m of depth (Prestige wreck)

I. Uad, G.A. Silva-Castro, C. Pozo, J. González-López, C. Calvo*

Environmental Microbiology Group, Department of Microbiology, Institute of Water Research, University of Granada, Ramón y Cajal no 4, Edificio Fray Luis de Granada, 18071 Granada, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 May 2010

Received in revised form

26 May 2010

Accepted 1 June 2010

Available online 8 July 2010

Keywords:

Bioemulsifiers

Hydrocarbon-degrading marine bacteria

Biodegradation

*Bacillus**Brevibacterium**Pseudomonas**Halomonas*

ABSTRACT

Seawater, sediments and fuel samples extracted from a small area of the Prestige wreck (4000 m deep) were studied to check the microbial activity of the area, the occurrence of indigenous hydrocarbon-degrading bacteria and the presence of bacteria able to produce bioemulsifiers. Twenty-one strains with the capacity to degrade hydrocarbons and/or produce useful bioemulsifiers were selected. Phylogenetic affiliation of these isolates placed them in the genus *Bacillus* (8 strains), *Pseudomonas* (3 strains), *Halomonas* (4 strains), *Pseudoalteromonas* (1 strain), *Brevibacterium* (2 strains), and *Marinobacter* (1 strain) and 2 strains were identified as marine bacterium. Hydrocarbon degradation was established by determining the amount of alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons by GC/MS analyses. In this study, *Pseudomonas*, *Bacillus* and *Brevibacterium* strains were the most efficient hydrocarbon-degrading marine bacteria. In contrast, *Halomonas* strains produced the highest amount of efficient biopolymers with emulsifying activity. The yield, chemical composition and functional properties of these bioemulsifiers were affected by the incubation time required for production. In addition, supplementation of the hydrocarbon culture medium with bioemulsifiers (S22-BE, S24-BE and AD2-BE) clearly stimulated the growth of strains S25, S28 and S29 and enhanced the ability of these strains to biodegrade alkanes, alkenes and aromatic compounds.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Marine environments are frequently contaminated with hydrocarbons as a result of industrial activity (Oren, 2000; Margesin and Schinner, 2001). Contamination of these habitats constitutes a serious environmental problem mainly due to the high toxicity exhibited by some petroleum compounds. Thus, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), which are prevalent in many fuel mixtures, exhibit toxic, mutagenic and/or carcinogenic properties. They are listed by the US Environmental Protection Agency as priority pollutants (Sudip et al., 2002; Zeinali et al., 2008).

Remediation processes include treating petroleum pollutants with hydrocarbon-degrading microorganisms that are generally ubiquitous in nature and are able to use different types of hydrocarbons as a carbon and energy source (Liu et al., 2009). Some

indigenous bacteria from contaminated ecosystems also produce biosurfactants. Biosurfactants produced by hydrocarbon-degrading bacteria can emulsify hydrocarbon–water mixtures, which enables them to grow on the oil droplets. Emulsification properties have also been demonstrated to enhance hydrocarbon degradation in the environment, making such bacteria potential tools for oil spill pollution-control (Krepsky et al., 2007).

In 2002, the Prestige accident polluted thousands of kilometres of coastline and more than one thousand beaches on the Spanish and French coast. This accident represents one of the largest environmental catastrophes to have occurred in European waters. The breakage of the Prestige tanker and its sinking at a depth of 3850 m led to the spillage of large quantities of fuel oil for several months afterwards. Repsol YPF was appointed by the Spanish Government to recover the fuel oil remaining in the wreck, via the “Prestige wreck fuel recovery project” (Del Corral et al., 2005). The final phase of this project was bioremediation for the remaining Prestige fuel oil, during which Repsol YPF planned to enhance the natural process of bioremediation in order to neutralize the oil remaining after extraction, which was coating the internal walls of

* Corresponding author. Tel.: +34 958 248 021/243 093; fax: +34 958 243 094.
E-mail address: ccalvo@ugr.es (C. Calvo).

the tank (Hernán et al., 2005). Experiments to evaluate the viability of bioremediation of the remaining Prestige fuel were conducted at the Institute of Water Research of the University of Granada by our research group (Environmental Microbiology). These studies were developed in three phases: the first one included characterization of the native microbiota to establish the presence of active bacteria at the site; in the second stage, bioremediation tests were carried out in controlled conditions to assess the ability of indigenous bacteria to biodegrade the Prestige fuel; and in the third phase different stimulation systems were studied to select the most adequate nutrient conditions to accelerate the biodegradation process. In the current study we have characterized 21 bacterial strains isolated during the first stage of the above-mentioned research, and we describe their hydrocarbon-degrading capabilities as well as the characteristics of bioemulsifiers synthesized by some of these bacteria.

2. Materials and methods

2.1. Sampling sites and bacterial strains

Seawater and sediment samples were taken by Repsol YPF from the surroundings of the Prestige wreck at 4000 m of depth along with samples of fuel from a fuel container from the wreck. These samples were sent to our laboratory to be preserved and analysed.

The 21 bacterial strains included in this study were selected from 133 strains isolated from the above-mentioned sediment, seawater and fuel samples, due to their capacity to grow on the surface of Prestige fuel agar plates.

Strains were maintained on MY solid medium slopes (Moraine and Rogovin, 1966) supplemented with 3% (w/v) NaCl at 4 °C and routinely streaked on agar plates from tubes every two months to control purity and viability. Selected bacteria were also preserved by freezing cell suspensions at –80 °C in MY broth to which 80% (v/v) glycerol was added.

2.2. Identification of strains

PCR amplification, sequencing and phylogenetic analysis of 16S rDNA from active bacterial isolates were carried out as previously described by Weisburg et al. (1991). The full length of each amplification product was sequenced using universal primers fD₁, rD₁, fD₂ and rD₂. A fresh cultured colony of each strain grown on MY agar medium supplemented with 3% salt was lysed by the addition of 20 µl of a mixture of NaOH–2N and SDS–5% (w/v) and then boiling for 15 min at 95 °C. The lysates were adjusted to 200 µl with sterile bidistilled water and centrifuged at 13,000 rpm for 5 min in a tabletop centrifuge. Cleared lysates (4 µl) were used as a template for amplification. The PCR reactions were set up by adding the lysate to 10× PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs (Roche Molecular Biochemicals, Germany), 20 pmol of each primer and 1 U of Taq polymerase (Genecraft, Germany). The final volume of the reaction tubes was adjusted to 50 µl (Vinueza et al., 1998). Reactions were run in a BIOER XP cyler. The PCR products were purified with a Quick cleaner extraction kit (MBL) according to the manufacturer's instructions. Each sequence was then used as a query in a BLASTn search (Pearson and Lipman, 1988) and further aligned to the most similar orthologous sequences retrieved from the database using the program Clustal X (Thompson et al., 1994). Alignments were checked manually, corrected and then analysed using the neighbour-joining method (Saitou and Nei, 1987) according to the model of Jukes–Cantor distances. A phylogenetic tree was constructed using the MEGA 3.1 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) software (Kumar et al., 2004).

2.3. Growth on polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) solid media

To evaluate the growth of isolated strains on naphthalene, phenanthrene, anthracene and pyrene, aliquots of each bacterial culture were spread on solid minimal medium amended with 1% (w/v) of PAHs. The composition per litre of M9 medium was as follows: 10× M9 solution (100 ml), A9 solution (“Goodies”) (2.5 ml), MgSO₄ 1 M (1 ml) and ferric ammonium citrate 6% (w/v) (1 ml) (April et al., 1991).

The 10× M9 solution was composed of g L⁻¹: 70 Na₂HPO₄ × 7H₂O, 30 KH₂PO₄, 10 NH₄Cl and 5 NaCl. The A9 (“Goodies”) solution was composed of (mg L⁻¹): 300 H₂BO₃, 50 ZnCl₂, 30 MnCl₂ × 4H₂O, 200 CoCl₂, 10 CuCl₂ × 2H₂O, 20 NiCl₂ × 6H₂O, 30 NaMoO₄ × 2H₂O. Inoculated agar plates were incubated at 28 °C for 48 h.

2.4. Production and characterization of bioemulsifiers

EPS biopolymer production with bioemulsifier activity from isolated bacterial strains was tested according to the method previously reported by Calvo et al. (2002). To collect the extracellular polysaccharides (EPS), isolated strains were grown in MY broth medium (Moraine and Rogovin, 1966) with 3% salt, for 7, 15, 21 and 30 days under agitation (100 rpm) at 28 °C. Cultures were centrifuged at 9000 rpm in a Beckman Avanti-J25 refrigerated centrifuge at 4 °C for 45 min. Supernatants were precipitated with cold ethanol. The biopolymer precipitated from the supernatant was dissolved in distilled water, dialyzed against distilled water, lyophilized and weighed. The protein and carbohydrate content of the biopolymer obtained was determined by colorimetric analyses following the methodology proposed by Bradford (1976) and Dubois et al. (1956), respectively.

2.5. Emulsification measurement

The emulsification activity of the biopolymer was detected by a modified version of the procedure described by Cooper and Goldenberg (1987). Test tubes (105 × 15 mm) were amended with 3 ml of exopolymer diluted in distilled water (0.5%, w/v) and 3 ml of a hydrophobic substrate (n-octane, xylene, toluene, light mineral oil, heavy mineral oil, diesel or Prestige fuel oil). Then, the tubes were shaken vigorously to ensure homogeneity and left to stand for 24 h. Emulsification activity was defined as the height of the emulsion layer divided by the total height and expressed as a percentage.

2.6. Growth in Prestige fuel oil liquid media

Growth in oil media was determined in 250 ml Erlenmeyer flasks containing marine synthetic medium (marine broth Difco®) amended with 0.1% (v/v) Prestige fuel oil. These flasks were inoculated with 1 ml of an overnight culture and incubated at 28 °C with gentle agitation (100 rpm) for 28 days. Viable cells were counted using the dilution-plate technique on Marine Agar medium (Difco). The inoculated agar plates (three replicates) were incubated at 28 °C for 48 h. The Prestige fuel oil used was obtained from the Prestige wreck and was provided by Repsol YPF.

In addition, to evaluate the effect of different bioemulsifiers (BE) on bacterial growth, Prestige fuel oil culture media were supplemented with 0.05% of bioemulsifier S22-BE, S24-BE and AD2-BE. Bioemulsifiers S22-BE and S24-BE were isolated during this investigation (Table 3), and AD2-BE was previously isolated in our laboratory (Calvo et al., 2008).

2.7. TPH, n-alkanes and PAH determinations

Total petroleum hydrocarbons were extracted from bacterial cultures with a mixture of hexane:acetone 1:1 (v/v) and determined using a modified version of the gravimetric analysis procedure described by Aguilera-Vazquez et al. (2001). Analysis of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons was carried out using a Hewlett–Packard 6890 GC system equipped with an HP-5-MS-capillary column (30 × 0.32 mm I.D.). Helium (1.6 ml/min) was utilized as the carrier gas. N-alkanes and PAH were detected using a mass detector 5872 (Hewlett–Packard) and the Wiley 275 library.

3. Results and discussion

Microbial biodegradation is known to be an efficient process in the decontamination of oil-polluted environments. Common steps in establishing *in situ* bioremediation processes include the search for hydrocarbon-degrading indigenous microorganisms and the optimization of conditions promoting biodegradation *in situ* by indigenous microbiota.

In order to determine the viability of biodegradation of the remaining fuel adhering to the tank walls and the top of the Prestige wreck and identify the best process for accelerating the natural biodegradation of fuel, samples of fuel from the Prestige tank container, and samples of seawater and sediments extracted by Repsol YPF from the area were sent to our laboratory to be conserved and analysed. The study of these samples demonstrated that the area around the wreck had an active and diverse microbiota (data not shown). More than 300 colonies were picked from the agar surface

layer and cultured on Prestige fuel agar plates with the objective of recovering indigenous microorganisms able to degrade Prestige fuel.

In this step, 133 bacterial strains were selected according to their ability to grow on the surface of Prestige fuel agar plates and their ability to produce mucous colonies. In a second step, these microorganisms were grown in Prestige fuel liquid media and analysed for bioemulsifier production. The results obtained led us to select 21 bacterial strains for further identification and characterization. Three of these were obtained from fuel samples, 11 from seawater samples and 7 from sediment samples.

With regards to the phylogenetic results, the strategy used to sequence the 16S rDNA gene of each strain produced a continuous stretch of nucleotides representing >95% of the primary 16S rDNA sequence. The similarity values were obtained after pair-wise alignment of 16S rDNA sequences of studied strains and EMBL database sequences, and the sequences giving the highest scores were retrieved to construct the phylogenetic tree.

Phylogenetic identification showed affiliation of the selected strains obtained from deep seawater, fuel and sediment samples to three bacterial phylogenetic branches: the γ -subdivisions of Proteobacteria, Firmicutes and the gram-positive branch (high G + C content Actinobacteria) (Fig. 1).

The majority of the isolated strains (8 strains) belonged to the genus *Bacillus*; W1 was identified as *Bacillus thuringiensis*, with 98% sequence identity. The other 7 strains (W15, W16, F17, F20, S22, S25 and S27) were identified as *Bacillus pumilus* and the sequence homology ranged from 96 to 100%. Strains F2 and S28 were affiliated to *Brevibacterium casei* and *Brevibacterium sanguinis*, respectively, with 99% sequence homology. Strain W3 was identified as *Halomonas alkantarctica* and W4 was identified as *Halomonas*



Fig. 1. Phylogenetic relationship based on 16S rDNA sequences of 21 selected marine strains.

Table 1
Identity and 16S rDNA gene sequence affiliation of 21 bacterial strains to their closest phylogenetic neighbours.

Strain number	Next relative by Gen Bank alignment (AN, Organism) ^a	(%) Identity
W1	CP000485 <i>Bacillus thuringiensis</i>	98
F2	EU086802 <i>Brevibacterium casei</i>	99
W3	AJ564880 <i>Halomonas alkantarctica</i>	98
W4	AJ294347 <i>Halomonas variabilis</i>	98
W5	AF359545 Marine bacterium	99
W7	AF359545 Marine bacterium	99
W8	AJ294359 <i>Marinobacter</i> spp.	98
W10	AJ294347 <i>Halomonas variabilis</i>	97
W12	EU864257 <i>Halomonas</i> spp.	97
W15	AY741720 <i>Bacillus pumilus</i>	97
W16	EU869282 <i>Bacillus pumilus</i>	99
F17	EU874254 <i>Bacillus pumilus</i>	98
W18	DQ665792 <i>Pseudoalteromonas elyakovii</i>	99
F20	EU660365 <i>Bacillus pumilus</i>	96
S21	AF268968 <i>Pseudomonas brennerii</i>	98
S22	EU221329 <i>Bacillus pumilus</i>	99
S24	AF268029 <i>Pseudomonas grimontii</i>	100
S25	EU221329 <i>Bacillus pumilus</i>	100
S27	EU221329 <i>Bacillus pumilus</i>	99
S28	AJ564859 <i>Brevibacterium sanguinis</i>	99
S29	AF268968 <i>Pseudomonas brennerii</i>	99

^a AN:Accession number.

variabilis, the sequence identity of both being 98%. W10 was identified as *H. variabilis* and W12 was identified as *Halomonas* spp. with 97% sequence identity. W8 was identified as *Marinobacter* spp. with 98% sequence identity. S21 and S29 were identified as *Pseudomonas brennerii* with 98% and 99% sequence identity, respectively. W18 was identified as *Pseudoalteromonas elyakovii* with 99% sequence identity. Finally, S24 was affiliated with *Pseudomonas grimontii* with 100% sequence identity. Only W5 and W7 were affiliated to marine bacteria with 99% sequence identity. The different bacterial genera identified in this study are shown in Table 1. The direct isolation method is often used to isolate the dominant members in a microbial community. *Bacillus*, *Pseudomonas* and *Brevibacterium* are frequently isolated from hydrocarbon-contaminated environments and many strains belonging to

Table 3
Yield of biopolymers synthesized by isolated strains after different periods of production at 3% salt concentration.

Strain	Yield (g l ⁻¹) ^a			
	3% (w/v) salinity			
	7 Days	15 Days	21 Days	30 Days
W1	0.5 ± 0.12	0.8 ± 0.13	1.08 ± 0.23	1.69 ± 0.15
F2	0.32 ± 0.02	0.26 ± 0.01	0.63 ± 0.02	1.04 ± 0.01
W3	1.15 ± 0.15	0.82 ± 0.14	1.13 ± 0.24	1.49 ± 0.33
W4	0.65 ± 0.13	0.74 ± 0.15	0.84 ± 0.13	3.08 ± 0.15
W5	0.3 ± 0.12	0.31 ± 0.25	1.43 ± 0.25	1.32 ± 0.35
W7	0.42 ± 0.13	0.75 ± 0.14	1.78 ± 0.18	0.28 ± 0.14
W8	0.36 ± 0.1	0.35 ± 0.1	1.27 ± 0.16	0.76 ± 0.16
W10	0.2 ± 0.03	1.68 ± 0.09	0.8 ± 0.1	3 ± 0.26
W12	0.59 ± 0.19	0.88 ± 0.16	2.44 ± 0.23	0.82 ± 0.1
W15	1.05 ± 0.12	0.61 ± 0.1	0.84 ± 0.14	0.6 ± 0.14
W16	0.65 ± 0.14	0.81 ± 0.26	0.76 ± 0.31	0.85 ± 0.16
F17	0.22 ± 0.1	0.2 ± 0.14	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.12
W18	0.1 ± 0.11	0.72 ± 0.01	4.24 ± 0.12	0.25 ± 0.21
F20	0.70 ± 0.16	0.81 ± 0.14	0.42 ± 0.11	0.27 ± 0.11
S21	2.71 ± 0.3	0.88 ± 0.16	1.03 ± 0.15	0.39 ± 0.11
S22	2.28 ± 0.98	0.74 ± 0.23	0.21 ± 0.1	0.22 ± 0.23
S24	2.13 ± 0.22	0.51 ± 0.14	0.1 ± 0.2	0.22 ± 0.25
S27	0.24 ± 0.23	0.17 ± 0.12	0.28 ± 0.34	0.36 ± 0.13

^a Grams of EPS per litre of culture medium. Each value is the mean of three determinations.

these genera have been demonstrated to be efficient hydrocarbon degraders (Stapleton et al., 2000; Zhuang et al., 2002; Pavitrans et al., 2004).

In this investigation, we also studied the capacity of selected strains to grow in the presence of various PAHs (naphthalene, phenanthrene, anthracene and pyrene) as the sole carbon and energy source; the results are depicted in Table 2. Eighteen strains grew well on naphthalene media, 14 of them on phenanthrene and pyrene and 12 on anthracene media. It was noted that 18 of the 21 studied strains were able to use more than three PAHs. Prestige oil is classified as fuel oil No 6, containing 50% aromatic hydrocarbons (PAH), 22% saturated hydrocarbons and 28% resins and asphaltenes (Laffon et al., 2006). Some of the PAH contained in Prestige oil (naphthalene, anthracene and pyrene) have been catalogued by the IARC as possible or probable human carcinogens and are part of the

Table 2
Characterization of bacterial strains isolated from seawater, sediments and fuel samples.

Strains	Source	Bioemulsifiers	Growth on PAH solid media			
			Naphthalene	Phenanthrene	Anthracene	Pyrene
<i>Bacillus thuringiensis</i> W1	Seawater	+	+	+	+	+
<i>Brevibacterium casei</i> F2	Prestige fuel	+	+	+	+	+
<i>Halomonas alkantarctica</i> W3	Seawater	+	+	–	+	+
<i>Halomonas variabilis</i> W4	Seawater	+	+	–	+	+
Marine bacterium W5	Seawater	+	+	+	+	+
Marine bacterium W7	Seawater	+	+	+	+	+
<i>Marinobacter</i> spp. W8	Seawater	+	+	+	+	+
<i>Halomonas variabilis</i> W10	Seawater	+	+	+	–	+
<i>Halomonas</i> spp. W12	Seawater	+	+	+	+	+
<i>Bacillus pumilus</i> W15	Seawater	+	+	+	+	+
<i>Bacillus pumilus</i> W16	Seawater	+	+	+	+	+
<i>Bacillus pumilus</i> F17	Prestige fuel	+	+	+	+	+
<i>Pseudoalteromonas elyakovii</i> W18	Seawater	+	+	+	–	–
<i>Bacillus pumilus</i> F20	Prestige fuel	+	+	+	+	+
<i>Pseudomonas brennerii</i> S21	Sediment BC1	+	+	–	–	–
<i>Bacillus pumilus</i> S22	Sediment BC1	+	+	+	–	–
<i>Pseudomonas grimontii</i> S24	Sediment BC4	+	+	–	–	–
<i>Bacillus pumilus</i> S25	Sediment BC4	–	+	+	+	+
<i>Bacillus pumilus</i> S27	Sediment 200146	+	+	–	–	+
<i>Brevibacterium sanguinis</i> S28	Sediment 200146	–	+	+	+	+
<i>Pseudomonas brennerii</i> S29	Sediment BC1	–	+	+	+	+

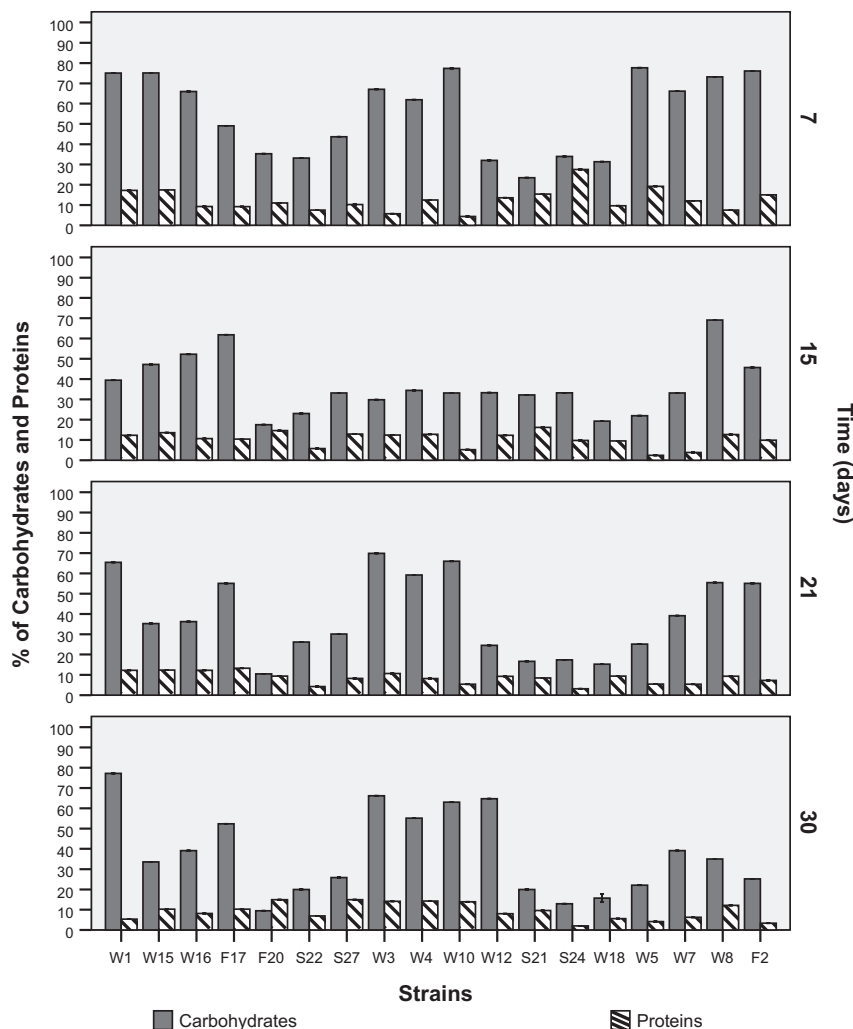


Fig. 2. Carbohydrate and protein composition of biopolymers synthesized by isolated strains at different incubation times in MY medium at 3% (w/v) salt concentration. Error bars represent one standard deviation.

Table 4
Stability of emulsifying activity of bioemulsifiers (0.5% w/v) with various hydrophobic substrates.

BE	Hydrophobic substrates						
	Xylene	Toluene	Octane	Heavy oil	Light oil	Prestige fuel	Diesel
W1-BE	43.3 ^a ± 2.89 ^a	65.8 ± 2.3	66.6 ± 2.8	0	0	71.6 ± 1.1	16.5 ± 1.25
F2-BE	56 ± 1.25	34 ± 2.25	0	0	0	60 ± 1.25	0
W3-BE	56.3 ± 1.25	56.9 ± 0.6	8.1 ± 0.6	45 ± 0.2	25 ± 0.28	33.7 ± 1.2	66.6 ± 0.34
W4-BE	73.7 ± 1.25	73.7 ± 1.2	76.2 ± 1.2	73.7 ± 1.2	73.7 ± 1.2	53.7 ± 1.2	73.7 ± 1.25
W5-BE	0	0	0	0	0	34 ± 1.75	0
W7-BE	76 ± 1.25	74 ± 1.75	73 ± 2.25	0	0	34 ± 1.25	44 ± 0.74
W8-BE	76 ± 1.25	74 ± 1.75	6 ± 0.55	0	0	59 ± 2.75	11 ± 1.25
W10-BE	51.2 ± 1.25	61.2 ± 1.2	61.2 ± 1.2	61.2 ± 1.2	63.7 ± 1.2	50 ± 2.5	51.2 ± 1.25
W12-BE	34 ± 1.5	55 ± 2.5	43.4 ± 0.9	42.2 ± 2.2	23.7 ± 0.9	47.5 ± 2.5	25.1 ± 0.6
W15-BE	0	61 ± 1.25	42 ± 2.25	0	4 ± 0.99	76 ± 1.25	13 ± 1.12
W16-BE	45 ± 1.25	65 ± 1.25	55 ± 1.75	0	0	67 ± 2.25	17 ± 0.87
F17-BE	66 ± 1.75	74 ± 1.25	11 ±	0	59 ± 2.25	49 ± 1.25	26 ± 1.75
W18-BE	0	50 ± 1.2	25 ± 0.7	0	0	0	0
F20-BE	50 ± 0.75	50 ± 0.7	50 ± 0.7	0	0	0	0
S21-BE	0	25 ± 0.2	0	0	0	95 ± 1.2	50 ± 0.7
S22-BE	50 ± 0.75	50 ± 0.7	0	0	0	100 ± 0.2	25 ± 0.7
S24-BE	50 ± 0.75	25 ± 0.2	25 ± 0.25	0	0	73.3 ± 0.2	25 ± 0.7
S27-BE	25 ± 0.25	50 ± 1.2	0	0	0	25 ± 0.25	0

^aValues are mean ± standard error of three replicates. BE: Bioemulsifier.

^a Results are expressed as percentages of total height occupied by the emulsion; values are means of three determinations.

16 PAH designated by the United States Environmental Protection Agency (USEPA) as primary contaminants (IARC, 1989; USEPA, 2000). Our study showed that all isolated strains grew on naphthalene, 81% of them on phenanthrene, 76% on anthracene and 81% on pyrene. In addition, 62% of strains were able to grow on the four PAH tested and 24% were capable of using three of them.

It is well known that microorganisms growing on hydrocarbons frequently produce biopolymers with emulsifying activity. This property is considered to be a biological strategy to facilitate the availability of hydrophobic compounds (Toledo et al., 2008). These can stimulate the growth of hydrocarbon-degrading bacteria and improve their ability to utilize these substances. These biopolymers can either be low molecular weight polymers such as glycolipids (Rosenberg and Ron, 1999) or high molecular weight polymers such as alasan (Navon-Venezia et al., 1995). We found that 18 isolates were able to produce an exopolymer with emulsifying activity, with 3% (w/v) salt being the most suitable concentration for bioemulsifier (BE) production.

It is well known that the culture conditions of biopolymer production generally modify both the yield and chemical composition of the polymer obtained (Sutherland, 2001; Toledo et al., 2008). In this study, the chemical composition in terms of carbohydrates and proteins and the amount of biopolymer synthesized varied not only with the incubation time for production (Fig. 2) but also with the selected strain (Table 3). Thus, the highest amount of BE produced by strain W4 after 30 days of incubation was 3.08 g/l, while strains S21, S22 and S24 showed the highest production rate after 7 days of culture. Also, as mentioned earlier, the BE recovered after shorter incubation times had a higher percentage of carbohydrates than proteins; however some strains of *Halomonas* (W3, W4 and W10) produced a high amount of biopolymer with more than 70% of carbohydrates and only 10% of proteins at 30 days.

The growth of microorganisms on oil hydrocarbons has often been related to their capacity to produce polymers with surfactant or emulsifying activity. However, the synthesis of exopolysaccharides (EPS) with surfactant and emulsifying activity is not always a consequence of microbial growth in hydrocarbons; for example *Halomonas eurihalina* produces the maximal EPS yield in media with glucose as the carbon and energy source and these biopolymers efficiently emulsify oil hydrocarbons (Calvo et al., 1998, 2002, 2009; Martinez-Checa et al., 2002). Our results showed that 85.7% (18 out of 21) of isolates produced exopolymers with emulsifying activity (BE), all were synthesized with glucose as the carbon source, and they were mainly composed of carbohydrates and proteins.

The BE-producing strains belonged to the genus *Bacillus*, *Halomonas*, *Pseudoalteromonas*, *Marinobacter* and *Pseudomonas*. Several authors have reported that strains isolated from marine environments belong to these genera and have the capacity to produce efficient bioemulsifiers (Calvo et al., 2002; Zhuang et al., 2002; Maneerat and Phetrong, 2007; Das et al., 2008).

Our results have demonstrated that the BE produced by strains W1 (*B. thuringiensis*), W3 (*H. alkantarctica*), W4 and W10 (*H. variabilis*), W5 and W7 (marine bacterium), W8 (*Marinobacter*), W12 (*Halomonas* sp.), W15, W16 and F17 (*B. pumilus*) contain substantial amounts of carbohydrates and proteins (Fig. 2). Toledo et al. (2008) reported that bioemulsifiers of high molecular weight, which are produced by a large number of bacteria, are highly efficient as emulsifiers, exhibiting considerable substrate specificity. Toluene, xylene, n-octane, mineral oil (heavy and light) diesel and Prestige fuel oil were used to evaluate the emulsifying capacity of BE produced by bacterial strains isolated in this research. Our data showed that all the BE assayed produced stable emulsions with the majority of hydrocarbons tested (Table 4), especially exopolymers synthesized by *Halomonas* strains W3, W4, W10 and W12. Previous reports have

demonstrated the ability of species of *Halomonas* to produce exopolymers with emulsifying activity (Calvo et al., 1998, 2002; Martinez-Checa et al., 2002).

Prestige fuel was one of the more easily emulsified substrates, with remarkably stable emulsions formed by the BE synthesized by *P. brennerii* S21, *B. pumilus* S22 and *P. grimontii* S24. For this reason S21-BE, S22-BE and S24-BE were added to Prestige fuel liquid medium to determine if these polymers would enhance the biodegradation of Prestige oil hydrocarbons.

To evaluate the bioremediation of Prestige fuel by indigenous bacteria, the isolated strains were grown in liquid media amended with Prestige fuel as the sole carbon and energy source. The results showed that the majority of strains were able to grow and degrade fuel hydrocarbons. Moreover, it was observed that the biodegradation capacity was generally enhanced by the addition of bioemulsifiers. Fig. 3 shows the behaviour of *B. pumilus* S25, *B. sanguinis* S28 and *P. brennerii* S29, the most efficient degrading bacteria.

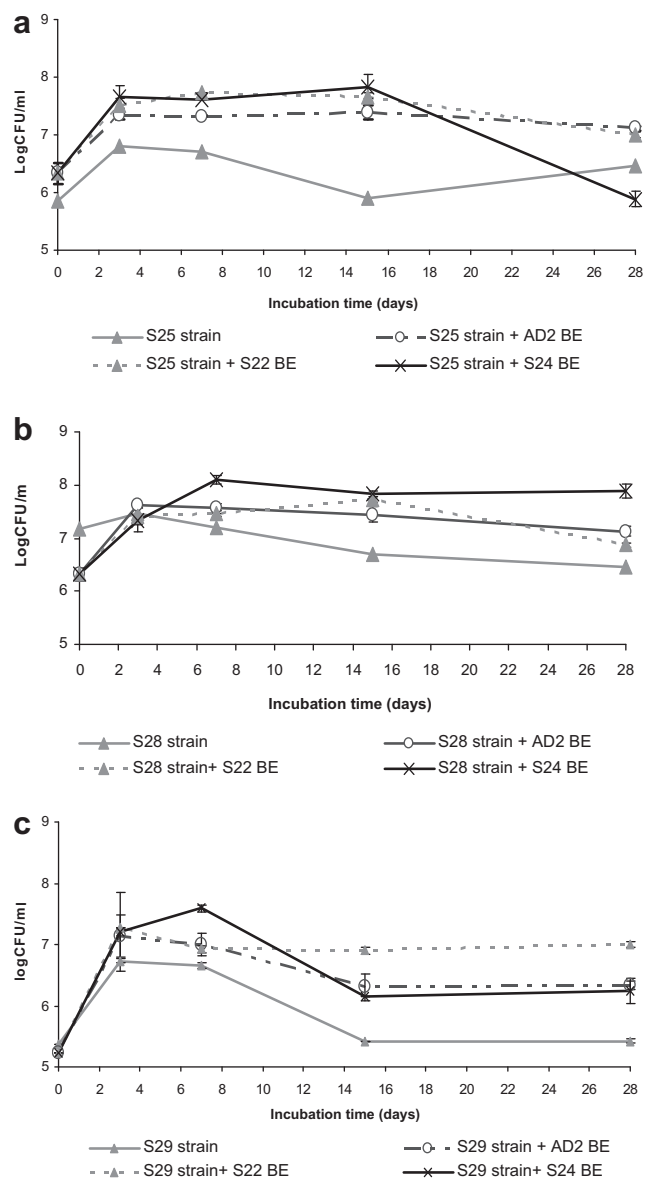


Fig. 3. Cell growth of strains S25, S28 and S29 combined with AD2-EPS, S22-EPS and S24-EPS and in un-combined condition (control) in synthetic marine liquid medium amended with 0.1% (v/v) Prestige fuel oil as the sole source of carbon and energy. Error bars represent one standard deviation.

The growth curves of these strains cultured in Prestige fuel liquid medium showed that the addition of efficient bioemulsifiers, such as S22-BE, S24-BE and AD2-BE, successfully enhanced their growth. Also, as can be seen in Fig. 4, the hydrocarbon removal capacity was enhanced in culture when BE were added. In this context, *Pseudomonas*, *Bacillus* and *Brevibacterium* have frequently been found at sites polluted by petroleum and petroleum derivatives, suggesting that these genera effectively metabolize hydrocarbon molecules and that they are an effective agent for the degradation of hydrocarbons (Zhuang et al., 2002; Pavitrana et al., 2004; Calvo et al., 2004; Vieira et al., 2007).

In summary, the biodegradation of petroleum and other hydrocarbons in the environment is a complex process, the quantitative

and qualitative aspects of which depend on the nature and amount of the oil or hydrocarbons present, the ambient and seasonal environmental conditions, and the composition of the autochthonous microbial community. The present work has shown that indigenous bacteria isolated from the deep sea ocean are capable of growing on and degrading hydrocarbons, particularly *B. pumilus* S25, *B. sanguinis* S28 and *P. brennerii* S29, which were able to remove high percentages of different hydrocarbons fractions of Prestige fuel, suggesting that bioremediation of Prestige fuel remaining in the container of the wreck would be carried out by indigenous microorganisms. Furthermore, this study has established the remarkable ability of isolated microorganisms to synthesize biopolymers with emulsifying activity, which increases the bioavailability of the hydrocarbons in order to use them as a carbon and energy source. For example, strains W3, W4 and W10 of *Halomonas* were efficient bioemulsifier-producing bacteria with potential application in industry. Thus, the BE produced by *Halomonas* strains could potentially be used in biotechnology applications within extreme environmental conditions, such as the bioremediation of oil pollution within soil and marine environments.

Acknowledgements

This work was supported by the Technological Centre of Repsol YPF (CTR), and by a grant from the Spanish Environmental Ministry (MMA.A4872007/20-01.1). Additional partial support came from the Spanish Agency of International Cooperation (A.E.C.I.).

References

- April, M.A., Back, M., Ramos, J.L., 1991. Activation of the *Pseudomonas* TOL plasmid upper pathway operon. Identification of binding sites for the positive regulator XylR and for integration host factor protein. *J. Biol. Chem.* 266, 15832–15838.
- Aguilera-Vazquez, L., Soto-Cruz, N.O., Saucedo-Castañeda, G., Gutiérrez-Rojas, M.A., 2001. Model system for composting hydrocarbon contaminated soil by using water activity and porosity as response variables. *Chem. Eng. J.* 81, 197–202.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Calvo, C., Martínez-Checa, F., Mota, A., Quesada, E., 1998. Effect of cations, pH and sulfate content on the viscosity and emulsifying activity of the *Halomonas eurihalina* exopolysaccharide. *J. Ind. Microbiol. Biot.* 20, 205–209.
- Calvo, C., Martínez-Checa, F., Toledo, F.L., Porcel, J., Quesada, E., 2002. Characteristics of bioemulsifiers synthesized in crude oil media by *Halomonas eurihalina* and their effectiveness in the isolation of bacteria able to grow in the presence of hydrocarbons. *Appl. Microbiol. Biot.* 60, 347–351.
- Calvo, C., Toledo, F.L., González-López, J., 2004. Surfactant activity of a naphthalene degrading *Bacillus pumilus* strain isolated from oil sludge. *J. Biotechnol.* 109, 255–262.
- Calvo, C., Silva-Castro, G.A., Uad, I., García-Fandiño, C., Laguna, J., González-López, J., 2008. Efficiency of the EPS emulsifier produced by *Ochrobactrum anthropi* in different hydrocarbon bioremediation assays. *J. Ind. Microbiol. Biot.* 35, 1493–1501.
- Calvo, C., Manzanera, M., Silva-Castro, G.A., Uad, I., González-Lopez, J., 2009. Application of bioemulsifiers in soil oil bioremediation processes. *Future prospects. Sci. Total Environ.* 407, 3634–3640.
- Cooper, D.G., Goldenberg, B.G., 1987. Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Appl. Environ. Microb.* 53, 224–229.
- Das, P., Mukherjee, S., Sen, R., 2008. Antimicrobial potential of a lipopeptide bio-surfactant derived from a marine *Bacillus circulans*. *J. Appl. Microbiol.* 104, 1675–1684.
- Del Corral, A., Morro, A., Luppi, A., Daly, R., 2005. Prestige fuel-oil confinement and recovery alternative. *Offshore Technology Conference, OTC 17560 Houston, TX, U.S.A., 2–5 May 2005.*
- Dubois, M., Guilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Biochem.* 28, 350–355.
- Hernán, R., Del Corral, A., Brerenguer, C., Páez, R., Sparrowe, J., Morro, J., 2005. The prestige wreck fuel recovery project. *Offshore Technology Conference OTC-17534 Houston, TX, U.S.A., 2–5 May 2005.*
- I.A.R.C., 1989. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. In: *Some organic solvents, resin monomers and related compounds, pigments and occupational exposures in paint manufacture and painting*, vol. 47, Lyon, pp. 237–261.

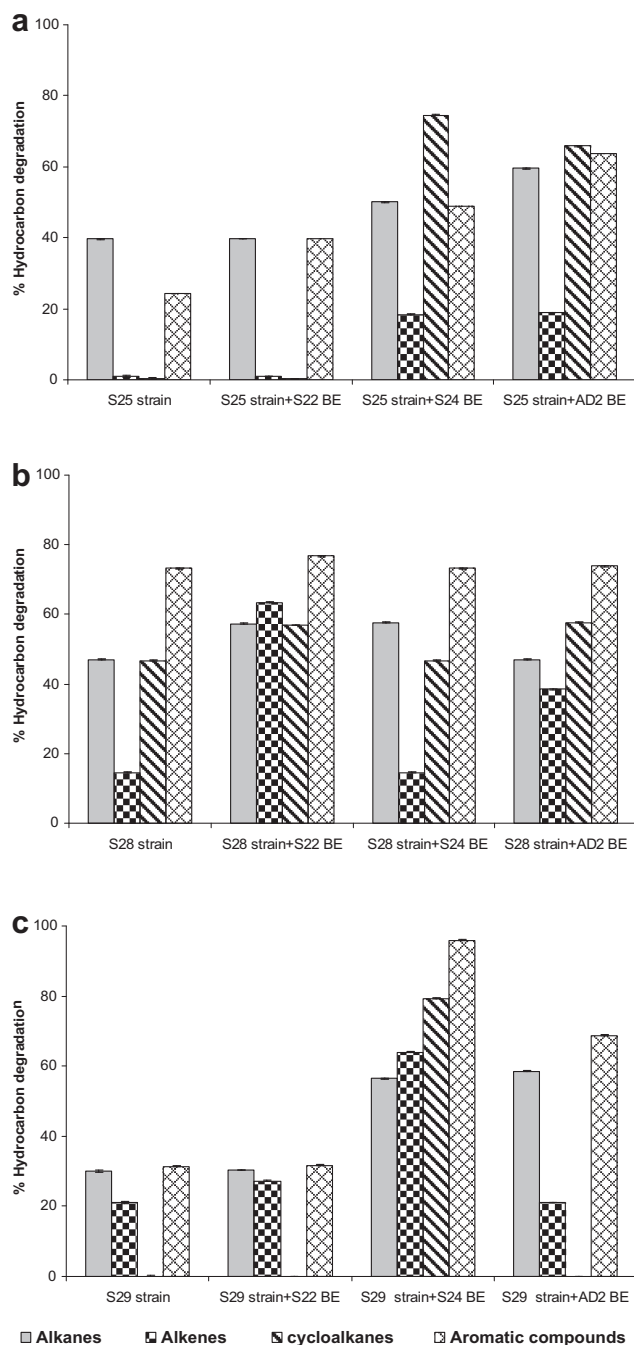


Fig. 4. Efficiency of hydrocarbon removal after 28 days of inoculation with strains S25 (a), S28 (b) and S29 (c) in marine liquid medium amended with 0.1% (v/v) Prestige fuel oil.

- Krepesky, N., Da Silva, F.S., Fontana, L.F., Crapez, M.A.C., 2007. Alternative methodology for isolation of biosurfactant-producing bacteria. *Braz. J. Biol.* 67, 117–124.
- Kumar, S., Tamura, K., Nei, M., 2004. MEGA. molecular evolutionary genetics analysis, version 1.2. The Pennsylvania State University, University Park, PA 16802.
- Laffon, B., Rábade, T., Pásaro, E., Méndez, J., 2006. Monitoring of the impact of Prestige oil spill on *Mytilus galloprovincialis* from Galician coast. *Environ. Int.* 32, 342–348.
- Liu, C.W., Chang, W.N., Liu, H.S., 2009. Bioremediation of n-alkanes and the formation of bioflocules by *Rhodococcus erythropolis* NTU-1 under various saline concentrations and sea water. *Biochem. Eng. J.* 45, 69–75.
- Maneerat, S., Phetrong, K., 2007. Isolation of biosurfactant-producing marine bacteria and characteristics of selected biosurfactant. *J. Sci. Technol.* 29, 781–791.
- Margesin, R., Schinner, F., 2001. Bioremediation (natural attenuation and bio-stimulation) of diesel oil-contaminated soil in an alpine glacier skiing area. *Appl. Environ. Microb.* 67, 3127–3133.
- Martinez-Checa, F., Toledo, F.L., Vilchez, R., Quesada, E., Calvo, C., 2002. Yield production, chemical composition and functional properties of emulsifiers H28 synthesized by *Halomonas eurihalina* strain H28 in media containing various hydrocarbons. *Appl. Microbiol. Biot.* 58, 358–363.
- Moraine, R.A., Rogovin, P., 1966. Kinetics of polysaccharide B-1459 fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 8, 511–524.
- Navon-Venezia, S., Zosim, Z., Gottlieb, A., Legmann, R., Carmeli, S., Ron, E.Z., Rosemberg, E., 1995. Alsan, a new bioemulsifier from *Acinetobacter radio-resistens*. *Appl. Environ. Microb.* 61, 3240–3244.
- Oren, A., 2000. Estimation of the contribution of the halobacteria to the bacterial biomass and activity in solar salterns by the use of bile salts. *FEMS Microbiol. Ecol.* 73, 41–48.
- Pavitrans, S., Balasubramanian, S., Kumar, P., Bisen, P.S., 2004. Emulsification and utilization of high-speed diesel by a *Brevibacterium* species isolated from hydraulic oil. *World J. Microb. Biot.* 20, 811–816.
- Pearson, W.R., Lipman, D.J., 1988. Improved tools for biological sequence comparison. *Proceedings of the National Academy of Science, United States of America* 85, pp. 2444–2448.
- Rosenberg, E., Ron, E.Z., 1999. High and low molecular mass microbial surfactant. *Appl. Microbiol. Biot.* 52, 154–162.
- Saitou, M., Nei, M., 1987. The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 5, 406–425.
- Sudip, K.S., Om, V.S., Rakesh, K.J., 2002. Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *Trends Biotechnol.* 20, 243–248.
- Sutherland, I.W., 2001. Microbial polysaccharides from Gram-negative bacteria. *Int. Dairy J.* 11, 663–674.
- Stapleton, R.D., Bright, N.G., Saylor, G.S., 2000. Catabolic of genetic diversity of degradative bacteria from fuel-hydrocarbon contaminated aquifers. *Microb. Ecol.* 39, 211–221.
- 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. *Nucl. Acids Res.* 22, 4673–4680.
- Toledo, F.L., González-López, J., Calvo, C., 2008. Production of bioemulsifiers by *Bacillus subtilis*, *Alcaligenes faecalis* and *Enterobacter* species in liquid culture. *Bioresour. Technol.* 99, 8470–8775.
- USEPA (United States Environmental Protection Agency), 2000. Determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in industrial and municipal wastewater EPA-600/4-00-025. Environmental Monitoring. Systems Laboratory, Cincinnati.
- Vieira, P.A., Vieira, R.B., de França, F.P., Cardoso, V.L., 2007. Biodegradation of effluent contaminated with diesel fuel and gasoline. *J. Hazard. Mater.* 140, 52–59.
- Vinuesa, P., Rademaker, J.L.W., De Bruijn, F.J., Werner, D., 1998. Genotypic characterisation of *Bradyrhizobium* strains modulating endemic woody legumes of the Canary Islands by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis genes encoding 16S rRNA and 16S-23S rDNA intergenic spacers. Repetitive extragenic palindromic PCR genomic fingerprinting and partial 16S rDNA sequencing. *Appl. Environ. Microb.* 64, 2096–2104.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J., 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173, 697–703.
- Zeinali, M., Vossoughli, M., Ardestani, S.K., 2008. Naphthalene metabolism in *Nocardia otidiscaviarum* strain TSH1, a moderately thermophilic microorganism. *Chemosphere* 72, 905–909.
- Zhuang, W.Q., Tay, J.H., Maszenan, A.M., Tay, S.T.L., 2002. *Bacillus naphhtovorans* sp. nov. from oil contaminated tropical marine sediments and its role in naphthalene biodegradation. *Appl. Microbiol. Biot.* 58, 547–553.

available at www.sciencedirect.comwww.elsevier.com/locate/scitotenv

Review

Application of bioemulsifiers in soil oil bioremediation processes. Future prospects

C. Calvo*, M. Manzanera, G.A. Silva-Castro, I. Uad, J. González-López

Environmental Microbiological Research Group, Department of Microbiology, Institute of Water Research, University of Granada, C/ Ramón y Cajal no. 4. 18071, Granada, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 April 2008

Received in revised form 7 July 2008

Accepted 8 July 2008

Available online 22 August 2008

Keywords:

Bioemulsifier

Biodegradation

Hydrocarbon

Bioremediation

ABSTRACT

Biodegradation is one of the primary mechanisms for elimination of petroleum and other hydrocarbon pollutants from the environment. It is considered an environmentally acceptable way of eliminating oils and fuel because the majority of hydrocarbons in crude oils and refined products are biodegradable. Petroleum hydrocarbon compounds bind to soil components and are difficult to remove and degrade. Bioemulsifiers can emulsify hydrocarbons enhancing their water solubility and increasing the displacement of oily substances from soil particles. For these reasons, inclusion of bioemulsifiers in a bioremediation treatment of a hydrocarbon polluted environment could be really advantageous.

There is a useful diversity of bioemulsifiers due to the wide variety of producer microorganisms. Also their chemical compositions and functional properties can be strongly influenced by environmental conditions.

The effectiveness of the bioemulsifiers as biostimulating agent in oil bioremediation processes has been demonstrated by several authors in different experimental assays. For example, they have shown to be really efficient in combination with other products frequently used in oil bioremediation such as they are inorganic fertilizer (NPK) and oleophilic fertilizer (i.e. S200C). On the other hand, the bioemulsifiers have shown to be more efficient in the treatment of soil with high percentage of clay. Finally, it has been proved their efficacy in other biotechnological processes such as *in situ* treatment and biopiles. This paper reviews literature concerning the application of bioemulsifiers in the bioremediation of soil polluted with hydrocarbons, and summarizes aspects of the current knowledge about their industrial application in bioremediation processes.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	3635
2. Chemical composition	3635
3. Use of biosurfactant in oil bioremediation	3636
4. Future prospects.	3638

* Corresponding author. Tel.: +34 958 248021/243874; fax: +34 958 243094.
E-mail address: ccalvo@ugr.es (C. Calvo).

Acknowledgments	3639
References	3639

1. Introduction

Bioremediation involves the acceleration of natural biodegradation processes in contaminated environments. It usually consists of the application of nitrogenous and phosphorous fertilizers, adjusting the pH and water content, and is often accompanied with the addition of bacteria. Besides, when the pollutants have poor water solubility, addition of emulsifiers and surface-active agents enhances the biodegradation rate by increasing the bioavailability of the pollutant.

Biological treatment techniques fall into two categories, biostimulation and bioaugmentation. Biostimulation refers to the addition of specific nutrients to a waste situation with the hope that the correct, naturally indigenous microbes were present in sufficient numbers and types to break down the waste effectively. This assumes that every organism needed to accomplish the desired treatment results is present. But how can we be certain that these organisms present are the most suitable to degrade all the materials present? And, if the naturally occurring organisms present were truly effective in achieving complete waste (i.e. hydrocarbons) breakdown, then why are there problems at sites?

An alternative approach is to use bioaugmentation, which is the scientific approach to achieve controlled, predictable, and programmed biodegradation. Bioaugmentation involves the addition of specifically formulated microorganisms to a waste situation. It is done in conjunction with the development and monitoring of an ideal growth environment, in which these selected bacteria can live and work.

Hydrocarbons are hydrophobic compounds with low water solubility, thus microorganisms have developed several mechanisms to increase the bioavailability of these compounds in order to use them as carbon and energy source. Therefore one of the major factors limiting the degradation of hydrocarbons such as *n*-alkanes is their low availability to the microbial cells. Microorganisms employ several strategies to enhance availability of those hydrophobic pollutants, such as biofilm formation and biosurfactant production (Bognolo, 1999; Christofi and Ivshina, 2002).

In this sense, growth of microorganisms on oil hydrocarbons has often been related to their capacity of producing polymers with surfactant activity named biosurfactant. These biopolymers can either be low molecular weight polymers such as glycolipids (Guerra-Santos et al., 1986; Rosenberg and Ron, 1999) and lipopeptide (Javaheri et al., 1985; Wilkinson and Galbraith, 1975) or high molecular weight polymers such as emulsan (Zuckerberg et al., 1979), alasin (Navon-Venezia et al., 1995) or biodispersan (Rosenberg et al., 1988).

The first description of a biotechnological application of bioemulsifiers in hydrocarbon bioremediation processes reported by Itoh and Suzuki (1972) showed that a rhamnolipid producing strain of *Pseudomonas aeruginosa* stimulated the growth of this microorganism when grown in hydrocarbon culture media. Similar results have been described for microorganisms such as

Corynebacterium (MacDonald et al., 1981) *Candida* (Kawashima et al., 1983) or *Rhodococcus* (Martin et al., 1991). However, the synthesis of exopolysaccharides (EPS) with surfactant and emulsifying activity is not always consequence of microbial growth in hydrocarbons, for example the synthesis of EPS with emulsifying activity by strains of *Halomonas eurihalina* is not a consequence of their growth on hydrophobic substances since maximal EPS yields are obtained when cultured in media with glucose as sole carbon source (Calvo et al., 1998; Martínez-Checa et al., 2002, 2007).

The main objective of this article was to review the basic concept of the application of bioemulsifiers as biostimulating in oil bioremediation processes, with particular emphasis on the current knowledge of its importance in biological treatment techniques.

2. Chemical composition

Microbial bioemulsifiers are produced by a wide variety of diverse microorganisms and have very different chemical structures and surface properties. Table 1 shows some example of bioemulsifiers and the producing microorganisms. Microorganisms are capable of making two different types of bioemulsifiers, one type consists of low molecular weight molecules that efficiently lower surface tension and interfacial tension, the other type consists of high molecular weight polymers that bind tightly to surfaces. Within the first group it is worth mentioning the rhamnolipids (see below) produced by *Pseudomonas* species, composed of two molecules of rhamnose and two molecules of 3-hydroxyacides. Also remarkable are the trehalolipids produced by several species of *Rhodococcus*, *Arthrobacter* and *Mycobacterium* composed of trehalose, non hydroxylated fatty acid and mycolic acids and the sophorolipids produced by *Candida* and *Torulopsis*, in which sophorose is combined with long-chain hydroxyacid. The second group of biopolymers with high molecular weight consists of highly efficient emulsifiers that work at low concentration, exhibiting considerable substrate specificity. Among other molecules, this group is composed of polysaccharides, proteins, lipopolysaccharides, lipoproteins or complex mixture of these biopolymers (Banat et al., 2000; Sutherland, 2001). Biopolymers containing polysaccharides, polysaccharides attached to lipids; or polysaccharides attached to proteins have been described as efficient emulsifying agents of numerous hydrocarbon compounds (Plaza et al., 2005; Iyer et al., 2006; Ashtaputre and Shah, 1995; Calvo et al., 2002; Toledo et al., in press). These high molecular weight microbial bioemulsifiers are synthesized by a wide variety of microorganisms. Examples of both types of polymers are depicted in Fig. 1.

Summarizing, according to their chemical structure, bioemulsifiers may be classified into the following main groups:

1. The glycolipids, in which carbohydrates such as sophorose, trehalose or rhamnose are attached to a long-chain aliphatic

Table 1 – Some of the most important bioemulsifiers and their producing microorganisms (Calvo et al., 2004).

Biosurfactant	Producing microorganisms
Glycolipids	Rhamnolipids Trehalolipids
Lipopeptides and lipoproteins	Sphorolipids Peptide–lipid Viscosin Surfactin
Polymeric surfactants	Phospholipids RAG-1 emulsan BD4 emulsan Alasan Biodispersan Liposan Protein complex Thermophilic emulsifier Acetylheteropolysaccharide Food emulsifier Sulfated polysaccharide
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Rhodococcus erythropolis</i> <i>Arthrobacter</i> sp. <i>Mycobacterium</i> sp. <i>Torulopsis bombicola</i> <i>Bacillus licheniformis</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Acinetobacter</i> sp. <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> RAG-1 <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> BD413 <i>Acinetobacter radioresistens</i> KA53 <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>Candida lipolytica</i> <i>Mycobacterium thermoautotrophium</i> <i>Bacillus stearothermophilus</i> <i>Sphingomonas paucimobilis</i> <i>Candida utilis</i> <i>Halomonas eurihalina</i>

acid or lipopeptide. For example, the rhamnolipids synthesized by *P. aeruginosa* consist of one or two sugar moieties joined to one or two caprylic acid moieties via a glycosidic linkage (Rosenberg and Ron, 1999; Lang and Wullbrandt, 1999).

2. Amino-acid containing bioemulsifiers like surfactin produced by *Bacillus subtilis* composed of seven amino-acid ring structure coupled to one molecule of 3-hydroxy-13-methyl tetradecanoic acid.
3. Polysaccharide–lipid complexes. For example, the emulsan synthesized by *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 is an extracellular heteropolysaccharide polyanionic complex (Rosenberg et al., 1979).
4. Protein-like substances such as liposan produced by *Candida lipolytica* composed of protein and carbohydrates.

The high diversity of biosurfactant produced by numerous microorganisms is noteworthy (Rosenberg and Ron, 1999). In this sense the chemical nature of a biosurfactant/bioemulsifier plays an important role in its function. However, the chemical composition and emulsifying activity of the biosurfactant depend not only on the producer strain but also on the culture conditions. Thus, the nature of the carbon and nitrogen sources, C:N ratio, nutritional limitations and physical parameters (i.e. temperature, aeration and pH) influence not only the amount but also the types of polymer produced. This play an important role on the yield and structure of microbial bioemulsifiers, changing the substrate often alters the structure of the product, thus altering their properties.

For example, we have studied the influence of the addition of hydrocarbons and other oil related substances to culture media in the chemical composition and in the emulsifying activity of the exopolysaccharides (EPS) synthesized by strains of *H. eurihalina*, *Alcaligenes faecalis*, *B. subtilis*, or *Ochrobactrum anthropi* (Calvo et al., 1998; Martínez-Checa et al., 2002, 2007; Toledo et al., in press). Our results demonstrated that the amount of carbohydrates and proteins of the biopolymer obtained was strongly influenced by the hydrophobic sub-

stance added to culture media. These changes in EPS composition originated noticeable modifications in the emulsifying activity. Thus, it could be suggested that the chemical composition of biopolymers produced dependent of the different hydrophobic compounds added to culture media (Table 2). Moreover, these differences in composition result in differences in emulsifying activity (Table 3).

Sutherland (2001) reported that the content of some chemical groups attached to the carbohydrates structures could vary widely depending on the growth and nutrient conditions. In this sense, we have demonstrated that in the bioemulsifier produced by *H. eurihalina* strain H96, the ratio of uronic acid and sulphate content increased when biopolymer was synthesized with hydrocarbon compounds and that the different chemical structures of the bioemulsifiers were translated into different functional properties (Calvo et al., 1998). In summary biosurfactant, being complex organic molecules with a broad range of functional properties that includes emulsification and de-emulsification, phase separation, wetting, foaming, solubilization, corrosion inhibition and reduction of viscosity. These properties have received considerable attention in recent years for the potential application of biosurfactant for bioremediation processes, particularly for bioremediation of oil-contaminated sites.

3. Use of biosurfactant in oil bioremediation

The fact that biosurfactants have a biological origin implies a better biocompatibility and good microbial biodegradability; consequently there is large number of potential applications for this type of surfactants. This biological origin is of great interest, especially when there is extensive interference with the environment, for example for tertiary petroleum recovery, for the decontamination of oil-polluted areas, for crop protection and for the cosmetic and pharmaceutical sectors (Banat et al., 2000). It is therefore not surprising that a number of investigations in the laboratory (Banat, 1995; Barkay et al.,

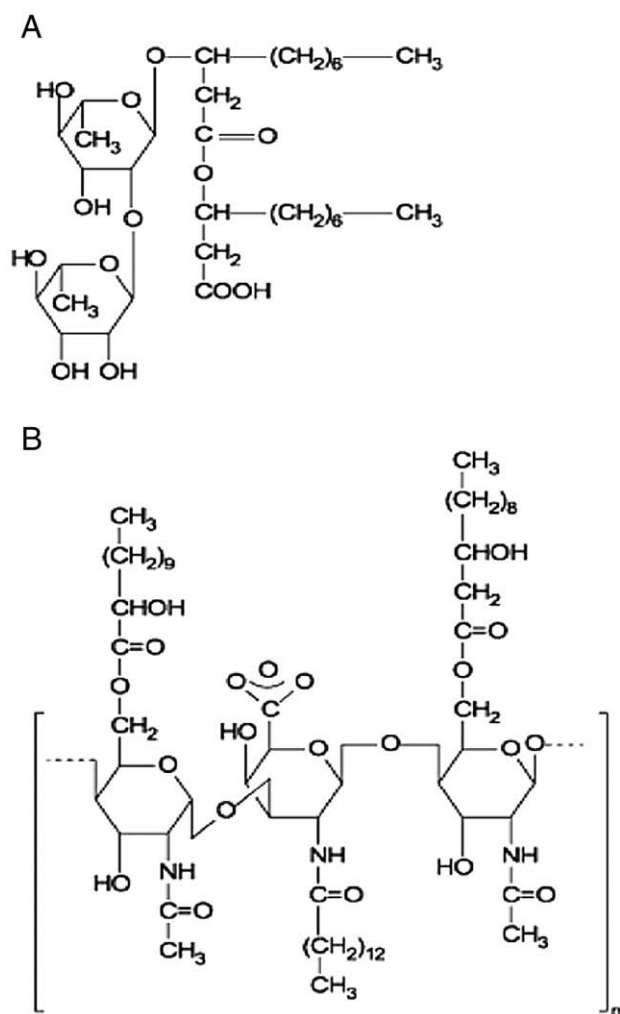


Fig. 1 – Chemical structure of rhamnolipid as low (A) and emulsan as high (B) molecular weight bioemulsifiers.

1999) and in the field have been described on these areas (Christofi and Ivshina, 2002; Kosaric, 2001).

Biodegradation of hydrocarbons in soil can be efficiently enhanced by addition or by in situ production of biosurfactants.

It is generally observed (Kosaric, 2001) that the degradation time and particularly the adaptation time, for microbes are clearly shortened.

The specific assembly of the soil particles, known as soil structure, determines the transfer ability of the soil with regard to water, and nutrients to the bioactive areas. Consequently, presence of biosurfactants in soil may produce a positive effect in form of stimulation of dissolution or desorption rates, solubilization or even emulsification of hydrocarbons. Norman et al. (2002) have clearly showed that rhamnolipids stimulate different processes involved in degradation of organic substrates. The efficiency of the biodegradation process and the specific mechanism of action of rhamnolipid may depend on how the substrate is presented. In this sense, this group showed that rhamnolipid and several other surfactants stimulated the degradation of hexadecane to a greater extent when it was entrapped in matrices with pore-sizes larger than 300 nm rather than in matrix with smaller pore-sizes or in sea sand.

According to Norman et al. (2002) degradation of hydrocarbon can only be enhanced by surfactant when the process is under rate limiting conditions. Another important factor in soil bioremediation is the variety and balance of nutrients in the soil. Addition of nutrients to the soil, in form of nitrogen, phosphorous and if necessary carbon compounds, allows the native microbial population to develop and augment. Thus such addition is translated in an increase of microorganisms capable of metabolising the pollutant, therefore enhancing the biodegradation rate. This principle prompted us to study the effect of addition of the bioemulsifier AD2-EPS in combination with two different nutrient additives: the inorganic NPK fertilizer and the S200C oleophilic commercial product (from IEP Europe) in oil bioremediation process using soil microcosms. Our results showed that addition of AD2-EPS+S200C enhanced hydrocarbon biodegradation over an untreated control or treated soils amended with AD2-EPS, S200C or NPK alone, suggested that AD2-EPS enhanced the solubility and consequently the bioavailability of hydrocarbon compounds to specific oil degrader microorganisms previously stimulated by the S200C product (Calvo et al.; unpublished data). Similar results have been previously reported by other authors (Kosaric, 2001; Providenti et al., 1995).

Table 2 – Yield production and chemical composition of EPS synthesized by *Halomonas eurihalina* strain F2-7 growing in MY medium with glucose, *n*-tetradecane, *n*-hexadecane, *n*-octane, xylene, mineral light oil, mineral heavy oil, petrol or crude oil, and in control medium.

	Substrates						
	Glucose ^a	Octane	Xylene	Light oil	Heavy oil	Petrol	Crude oil
Yield production ^b	1.3±0.11	0.76±0.13	1±0.15	1.45±0.11	0.96±0.18	0.58±0.13	0.68±0.13
Chemical composition ^c							
Carbohydrates	36.89±1.35	22.53±1.71	29.62±0.97	27.77±0.81	25.92±1.24	26.81±0.09	28.28±1.11
Proteins	7.27±0.94	2.12±0.31	1.93±0.54	4.18±0.27	6.94±0.73	3.38±0.28	2.10±0.22
Uronic acids	1.32±0.16	3.16±0.21	2.35±0.19	2.17±0.08	2.81±0.05	2.91±0.17	2.57±0.28
Acetyl residues	0.43±0.01	0.94±0.03	1.27±0.23	1.01±0.07	1.57±0.37	1.23±0.21	1.07±0.07
Sulfates	7.15±0.95	14.72±1.18	13.70±1.05	21.73±2.01	15.60±1.16	28.16±1.25	20.66±1.02

^aMY medium with glucose.

^bData are expressed in grams of EPS per liter of culture medium.

^cResults are expressed as percentages of total dry weight of the polymers, values are means of at least three determinations.

Table 3 – Emulsifying activity of EPS V2-7 of *Halomonas eurihalina* on *n*-octane, xylene, mineral light oil, mineral heavy oil, petrol and crude oil (Martínez-Checa et al., 2007).

EPS-emulsifier	Substrates					
	Octane	Xylene	Light oil ^b	Heavy oil ^b	Petrol	Crude oil
Glucose-EPS	57.58±1.74 ^a	69.23±1.23	61.53±1.46 ^b	57.59±1.94	57.67±0.99	71.15±1.23
Octane-EPS	63.46±1.14	47.11±0.76	30.76±1.21	61.23±2.19	35.41±1.15	88.46±0.85
Xylene-EPS	42.30±1.27	71.15±1.97	28.84±0.44	23±3.16	19.23±1.01	55.76±1.66
Light oil ^b -EPS	60.83±1.81	40.38±1.21	67.30±1.19	48.07±1.26	36.53±0.17	76.92±1.37
Heavy oil ^b -EPS	56.73±2.18	9.61±1.18	35.19±0.29	62.56±1.51	38.17±1.04	65.38±1.25
Petrol-EPS	54.8±0.58	8.65±0.92	33.65±1.12	55.79±2.25	62.50±1.75	75±0.95
Crude-EPS	55.76±1.77	46.15±2.17	33.65±0.99	47.11±1.63	38.46±0.43	75.96±1.44

^aEmulsifying activity was expressed as the percentage of the total height occupied by the emulsion.

^bMineral oil.

Soil hydrocarbon degradation may also be limited by the available water for microbial growth and metabolism. A decrease in moisture content results in a decrease in microbial activity, while rewetting causes a large and rapid increase in activity (Ayotamuno et al., 2006). Generally, optimum activity occurs when the soil moisture is 50–80% of saturation. Experimental assays in our laboratory indicated that addition of surfactant to sandy soil increased retention of soil moisture in the long time.

Bioemulsifiers have been often reported as enhancers of hydrocarbon biodegradation in liquid media, soil slurries and water and soil microcosms (Providenti et al., 1995; Ron and Rosenberg, 2002; McKew et al., 2007). In soil microcosms, treatment of waste crude oil with *Halomonas* bioemulsifiers produced a selective enhancing of indigenous hydrocarbon degrading bacteria suggesting the utility of bioemulsifiers as biostimulating agent of a bioremediation process (Calvo et al., 2002).

In oil-contaminated mud flats, the elimination of polycyclic aromatics from the crude oil Arabian light was due to wave action and to microbial degradation, addition of trehalose lipid biosurfactant stimulated the biodegradation rate caused the completed elimination within six months (Kosaric, 2001). In soil slurry reactors sophorolipids significantly enhanced biodegradation of naphthalene (Norman et al., 2002). On the other hand, results obtained in our laboratory have shown high efficiency of hydrocarbon biodegradation in biopiles assays amended with AD2-EPS bioemulsifier plus activated sludge (Calvo et al. unpublished data). As above-mentioned, the low availability of the hydrocarbons to the cells is one of the major limiting factors for their biodegradation. In this sense, bioavailability can be enhanced by an increase in temperature, a condition favourable for the growth of thermophilic microorganisms, during hydrocarbon degradation (Margesin and Schinner, 2001). Feitkenhauer et al. (2003) summarized several advantages by using thermophilic microorganisms for bioremediation of hydrocarbons over mesophilic organisms. Briefly, elevated temperature can increase the solubility of hydrophobic pollutants, decrease their viscosity, enhance their diffusion, and transfer long-chain *n*-alkanes from solid phase to liquid phase. Combined effect of thermophilic strains and production of emulsifying agents by *Bacillus* strain NG80-2 has been recently described by Wang et al. (2006) with great effect for long-chain *n*-alkanes

degradation. On the other hand, when oil-contaminated soils are subjected to very low temperatures such as those on polar areas, emulsifiers or biosurfactants are of paramount importance because they can counter the increased viscosity and decreased water solubility of the hydrocarbons at lower temperatures (Aislabie et al., 2006).

4. Future prospects

Regardless of the different chemical composition and applications that bioemulsifiers show the main field of research nowadays is focused on the mass production of these compounds to an industrial scale. Currently a deep understanding is needed for optimal production of glycolipids, lipopeptide, emulsan, alasan and biodispersan. In this regard the following studies are of key importance to achieve the desired production yield. With respect to the glycolipids as bioemulsifiers, rhamnolipids are considered as the best studied type of glycolipids. Many research (Lang and Wullbrandt, 1999; Wang et al., 2006) papers have been published showing improved methods for rhamnolipids production. A recent study (Chen et al., 2007) focused on optimization of rhamnolipid production from a *P. aeruginosa* S2 strain in various carbon and nitrogen sources. These authors (Chen et al., 2007) used the relationships between several exploratory variables and one or more response variable (Response Surface methodology, RSM) to identify optimal C and N source in form of optimal concentration of glucose and NH₄NO₃, concluded that the optimal C/N ratio was approximately 11:4 for rhamnolipid production. These results indicated as well that concentrations of MgSO₄ and FeSO₄ were the most significant factors affecting rhamnolipid production in scaling-up production of rhamnolipid in a well-controlled 5 L jar fermentator. Nevertheless changing the media and culture conditions is not the only factor to modify in order to increase the production yield. In this sense, the development and use of overproducing mutant or recombinant strains for enhancing biosurfactant yield have been reported (Al-Gelawi and Al-Makadci, 2007). Also, different backgrounds have been proposed to overcome the complex environmental regulation with respect to rhamnolipid biosynthesis, and to replace the opportunistic pathogen *P. aeruginosa* with a safe industrial strain. To achieve rhamnolipid production in a heterologous host, *Pseudomonas*

putida was used. To this end *rhlAB* rhamnolipid genes with the *rhlRI* quorum sensing system, were inserted into *P. putida*. In this way a functional rhamnolipid synthetase catalyzed the formation of rhamnolipid in *P. putida* (Cha et al., 2008). However, the industrial application of recombinant hyperproducing strains, has still not been properly tested, despite of the fact that the hyperproducers have been reported to increase yields several folds. This area of bioemulsifiers research is still in its infancy.

With reference to the lipopeptides and in order to increase surface activity, we have to mention that most lipopeptide biosurfactants have been shown to have a structure similar to that of surfactin, the biosurfactant produced by *B. subtilis* (Peypoux et al., 1999).

Recombinants of *B. subtilis* have been developed by expressing foreign gene related to surfactin production, resulting in high production of bioemulsifier (Ohno et al., 1995). Moreover, recombinant strains often give rise to better product characteristics. Thus, surfactin, the lipopeptide bioemulsifier produced by a large multimodular peptide synthetase suffers from the disadvantage of lysing erythrocytes because of its membrane-active property. However, the production of a novel lipohexapeptide after engineering of *B. subtilis* surfactin synthetase reduced toxicity towards erythrocytes and enhanced lyses of *Bacillus licheniformis* cells, making it more suitable to the bioemulsifiers in therapeutic formulations.

For emulsan optimal production, a series of studies has focused on growth conditions, including the effect of ethanol and phosphate on emulsan production by *A. calcoaceticus* RAG-1 using batch-fed fermentators (Choi et al., 1996). Similar studies can be performed for alasin, since this bioemulsifier of *Acinetobacter radioresistant* KA53 consists on a high-mass complex of proteins and polysaccharides. The emulsification ability of alasin depends on the presence of hydrophobic residues in the four loops spanning the transmembrane domains of AlnA protein. Therefore much genetic engineering can be done to improve not only its surface activity but also its yield production.

In the case of biodispersan, Elkeles et al. (1994) found a biodispersan producer strain of *A. calcoaceticus* A2 mutant defective in protein secretion that produced equal, or even higher, levels of this bioemulsifier (Elkeles et al., 1994). The reduction on secreted proteins presented on the extracellular fluid reduced problems in the purification and application of biodispersan.

In general elements, such as nitrogen, iron, and manganese, are reported to affect the yield of biosurfactants, for example, the limitation of nitrogen is reported to enhance biosurfactant production in *P. aeruginosa* strain BS-2 (Dubey and Juwarkar, 2004) and *Ustilago maydis* (Hewald et al., 2005). Similarly, the addition of iron and manganese to the culture medium has been reported to increase the production of biosurfactant by *B. subtilis* (Wie et al., 2003). The ratios of different elements such as C:N, C:P, C:Fe or C:Mg affected biosurfactant production and optimization of these rates has to be achieved to enhance the production yield of the different biosurfactants (Amézcuca-Vega et al., 2007; Chen et al., 2007).

The genetic of the industrial microorganisms is a very important factor affecting the yield of all biotechnological

products. As above indicated, few mutant and recombinant strains with enhanced bioemulsifiers production have been reported (Mukherjee et al., 2006). Thus, future research aiming for high-level production of bioemulsifiers must be focused towards the development of novel recombinant hyperproducer strains.

The potential use of these hyperproducer strains in addition to novel cost-effective bioprocesses throws the real challenges and offers tremendous opportunities for making industrial production of bioemulsifiers a success story.

In conclusion, for an optimal production of biosurfactant several elements, media components, precursors, conformation and genetic background have to be considered. All these factors are of paramount importance and affect the process of biosurfactant production as well as the final quantity and quality of the biosurfactant. Consequently more research needs to be done in this regard in order to increase yield production in combination with the search for new types of bioemulsifiers for its application on hydrocarbon bioremediation processes.

Acknowledgments

This research has been supported by a grant of Ministerio de Medio Ambiente (MMA.A4872007/20-01.1). M. Manzanera was granted by Programa Ramón y Cajal (MEC, Spain and EDRF, European Union).

REFERENCES

- Aislabie J, Saul DJ, Foght JM. Bioremediation of hydrocarbon-contaminated polar soils. *Extremophiles* 2006;10:171–9.
- Al-Gelawi MH, Al-Makadci OA. Genetic improvement of rhamnolipid production from *Pseudomonas aeruginosa*. *Arab Gulf J Sci Res* 2007;25:16–22.
- Amézcuca-Vega C, Poggi-Varaldo HM, Esparza-García F, Ríos-Leal E, Rodríguez-Vázquez R. Effect of culture conditions on fatty acids composition of a biosurfactant produced by *Candida ingens* and changes of surface tension of culture media. *Bioresour Technol* 2007;98:237–40.
- Ashtaputre AA, Shah AK. Emulsifying property of a viscous exopolysaccharide from *Sphingomonas paucimobilis*. *World J Microbiol Biotechnol* 1995;11:219–22.
- Ayotamuno JM, Kogbara RB, Taleat MO. Bioremediation of a petroleum hydrocarbon polluted agricultural soil at different levels of water application in Port Harcourt, Nigeria. *J Food Agric Environ* 2006;4:214–7.
- Banat IM. Biosurfactant production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review. *Bioresour Technol* 1995;51:1–12.
- Banat IM, Makkar RS, Cameotra SS. Potential commercial applications of microbial surfactants. *Appl Microbiol Biotechnol* 2000;53:495–508.
- Barkay T, Navon-Venezia S, Ron E, Rosenberg E. Enhancement of solubilization and biodegradation of polyaromatic hydrocarbons by the emulsifier alasin. *Appl Environ Microbiol* 1999;65:2697–702.
- Bognolo G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. *Colloids Surf* 1999;152:41–52.
- Calvo C, Martínez-Checa F, Mota A, Quesada E. Effect of cations, pH and sulfate content on the viscosity and emulsifying activity of

- the *Halomonas eurihalina* exopolysaccharide. *J Ind Microbiol Biotechnol* 1998;20:205–9.
- Calvo C, Martínez-Checa F, Toledo FL, Porcel J, Quesada E. Characteristics of bioemulsifiers synthesized in crude oil media by *Halomonas eurihalina* and their effectiveness in the isolation of bacteria able to grow in the presence of hydrocarbons. *Appl Microbiol Biotechnol* 2002;60:347–51.
- Calvo C, Toledo FL, Pozo C, Martínez-Toledo MV, González-López J. Biotechnology of bioemulsifiers produced by microorganisms. *J Food Agric Environ* 2004;2:238–43.
- Cha M, Lee N, Kimb M, Kimb M, Lee S. Heterologous production of *Pseudomonas aeruginosa* EMS1 biosurfactant in *Pseudomonas putida*. *Bioresour Technol* 2008;99:2192–9.
- Chen SY, Lu WB, Wei YH, Chen WM, Chang JS. Improved production of biosurfactant with newly isolated *Pseudomonas aeruginosa* S2. *Biotechnol Prog* 2007;23:661–6.
- Choi JW, Choi HG, Lee WH. Effects of ethanol and phosphate on emulsan production by *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1. *J Biotechnol* 1996;45:217–25.
- Christofi N, Ivshina IB. Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. *J Appl Microbiol* 2002;93:915–29.
- Dubey K, Juwarkar A. Determination of genetic basis for biosurfactant production in distillery and curd whey wastes utilizing *Pseudomonas aeruginosa* strain BS2. *Indian J Biotechnol* 2004;3:74–81.
- Elkeles A, Rosenberg E, Ron EZ. Production and secretion of the polysaccharide biodispersan of *Acinetobacter calcoaceticus* A2 in protein secretion mutants. *Appl Environ Microbiol* 1994;60:4642–5.
- Feitkenhauer H, Muller R, Markl H. Degradation of polycyclic aromatic hydro-carbons and long chain n-alkanes at 60–70 °C *Thermus* and *Bacillus* spp. *Biodegradation* 2003;14:367–72.
- Guerra-Santos LH, Kappeli O, Flechter A. Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors. *Appl Microbiol Biotechnol* 1986;24:443–8.
- Hewald S, Joseph K, Bölker M. Genetic analysis of biosurfactant production in *Ustilago maydis*. *Appl Environ Microbiol* 2005;71:3033–40.
- Itoh S, Suzuki T. Effect of rhamnolipids on growth of *Pseudomonas aeruginosa* mutant deficient in n-paraffin-utilizing ability. *Agric Biol Chem* 1972;36:2233–5.
- Iyer A, Mody K, Jha B. Emulsifying properties of a marine bacterial exopolysaccharide. *Enzyme Microbiol Technol* 2006;38:220–2.
- Javaheri MJ, Jenneman GE, McClnerney MJ, Knapp RM. Anaerobic production of a biosurfactant by *Bacillus liqueniformis* JF-2. *Appl Environ Microbiol* 1985;50:698–700.
- Kawashima H, Nakahara T, Oogaki M, Tabuchi. Extra-cellular production of a mannosyl-erythritol lipid of a mutant of *Candida* sp. Form n-alkanes and tryacylglycerols. *J Ferment Technol* 1983;61:143–8.
- Kosaric N. Biosurfactants and their application for soil bioremediation. *Food Technol Biotechnol* 2001;39:295–304.
- Lang S, Wullbrandt D. Rhamnolipids-biosynthesis, microbial production and application potential. *Appl Microbiol Biotechnol* 1999;51:22–32.
- MacDonald CR, Cooper DG, Zajic JE. Surface active lipids from *Nocardia erythropolis* grown on hydrocarbons. *Appl Environ Microbiol* 1981;41:117–23.
- Margesin R, Schinner F. Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments (review). *Appl Microbiol Biotechnol* 2001;56:650–63.
- Martin M, Bosch P, Parra JL, Espuny MJ, Virgili A. Structure and bioconversion of trehalose lipids. *Carbohydr Res* 1991;220:93–100.
- Martínez-Checa F, Toledo FL, Vilchez R, Quesada E, Calvo C. Yield production, chemical composition, and functional properties of emulsifier H-28 in media containing various hydrocarbons. *Appl Microbiol Biotechnol* 2002;58:358–63.
- Martínez-Checa F, Toledo FL, El Mabrouki K, Quesada E, Calvo C. Characteristics of Bioemulsifier V2-7 synthesized in culture media added of hydrocarbons: chemical composition, emulsifying activity and rheological properties. *Biotechnol Resour* 2007;98:3130–5.
- McKew BA, Coulon F, Yakimov MM, Denaro R, Genovese M, Smith CJ, et al. Efficacy of intervention strategies for bioremediation of crude oil in marine systems and effects on indigenous hydrocarbonoclastic bacteria. *Environ Microbiol* 2007;9:1562–71.
- Mukherjee S, Das P, Sen R. Towards commercial production of microbial surfactants. *Trends Biotechnol* 2006;24:509–15.
- Navon-Venezia S, Zosim Z, Gottlieb A, Legmann R, Carmeli S, Ron EZ, et al. A new bioemulsifier from *Acinetobacter radioresistens*. *Appl Environ Microbiol* 1995;61:3240–4.
- Norman RS, Frontera-Suau R, Morris PJ. Variability in *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide expression during crude oil degradation. *Appl Environ Microbiol* 2002;68:5096–103.
- Ohno A, Ano T, Shoda M. Production of a lipopeptide antibiotic, surfactin, by recombinant *Bacillus subtilis* in solid state fermentation. *Biotechnol Bioeng* 1995;47:209–14.
- Peypoux F, Bonmatin JM, Wallach J. Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Appl Microbiol Biotechnol* 1999;51:553–63.
- Plaza GA, Ulfing K, Brigmon RL. Surface Active properties of bacterial strains isolated from petroleum hydrocarbon-bioremediated soil. *Pol J Microbiol* 2005;54:161–2.
- Providenti MA, Fleming CA, Lee H, Trevors JT. Effect of addition of rhamnolipid-producing *Pseudomonas aeruginosa* on phenanthrene mineralization in soil slurries. *FEMS Microbiol Ecol* 1995;17:15–26.
- Ron E, Rosenberg E. Biosurfactants and oil bioremediation. *Curr Opin Biotechnol* 2002;13:249–52.
- Rosenberg E, Ron EZ. High- and low-molecular-mass microbial surfactants. *Appl Microbiol Biotechnol* 1999;52:154–62.
- Rosenberg E, Zuckerberg A, Rubinovitz C, Gutnick DL. Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: isolation and emulsifying properties. *Appl Environ Microbiol* 1979;37:402–8.
- Rosenberg E, Rubinovitz C, Gottlieb A, Rosenhak S, Ron EZ. Production of biodispersan by *Acinetobacter calcoaceticus* A2. *Appl Environ Microbiol* 1988;54:317–22.
- Sutherland IW. Microbial polysaccharides from Gram-negative bacteria. *Int Dairy J* 2001;11:663–74.
- Toledo, F.L., González-López, J., and Calvo, C. Production of bioemulsifier by *Bacillus subtilis*, *Alcaligenes faecalis* and *Enterobacter* species in liquid culture. *Bioemulsifier Bioresource Technology*; in press.
- Wang L, Tang Y, Wang S, Liu RL, Liu MZ, Zhang Y, et al. Isolation and characterization of a novel thermophilic *Bacillus* strain degrading long-chain n-alkanes. *Extremophiles* 2006;10:347–56.
- Wie YH, Wang LF, Changy JS, Kung SS. Identification of induced acidification in iron-enriched cultures of *Bacillus subtilis* during biosurfactant fermentation. *J Biosci Bioeng* 2003;96:174–8.
- Wilkinson SG, Galbraith L. Studies on lipopolysaccharides from *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur J Biochem* 1975;52:331–43.
- Zuckerberg A, Diver A, Peeri Z, Gutnick DL, Rosenberg E. Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: chemical and physical properties. *Appl Environ Microbiol* 1979;37:414–20.

Efficiency of the EPS emulsifier produced by *Ochrobactrum anthropi* in different hydrocarbon bioremediation assays

C. Calvo · G. A. Silva-Castro · I. Uad ·
C. García Fandiño · J. Laguna · J. González-López

Received: 1 April 2008 / Accepted: 30 July 2008 / Published online: 11 September 2008
© Society for Industrial Microbiology 2008

Abstract *Ochrobactrum anthropi* strain AD2 was isolated from the waste water treatment plant of an oil refinery and was identified by analysis of the sequence of the gene encoding 16S rDNA. This bacterium produced exopolysaccharides in glucose nutrient broth media supplemented with various hydrocarbons (*n*-octane, mineral light and heavy oils and crude oils). The exopolysaccharide AD2 (EPS emulsifier) synthesized showed a wide range of emulsifying activity but none of them had surfactant activity. Yield production varied from 0.47 to 0.94 g of EPS l⁻¹ depending on the hydrocarbon added. In the same way, chemical composition and emulsification activity of EPS emulsifier varied with the culture conditions. Efficiency of the EPS emulsifier as biostimulating agent was assayed in soil microcosms and experimental biopiles. The AD2 biopolymer was added alone or combined with commercial products frequently used in oil bioremediation such as inorganic NPK fertilizer and oleophilic fertilizer (S200 C). Also, its efficiency was tested in mixture with activated sludge from an oil refinery. In soil microcosms supplemented with S200 C + EPS emulsifier as combined treatment, indigenous microbial populations as well as hydrocarbon degradation was enhanced when compared with microcosms treated with NPK fertilizer or EPS emulsifier alone. In the same

way EPS emulsifier stimulated the bioremediation effect of S200 C product, increasing the number of bacteria and decreasing the amount of hydrocarbon remained. Finally, similar effects were obtained in biopile assays amended with EPS emulsifier plus activated sludge. Our results suggest that the bioemulsifier EPS emulsifier has interesting properties for its application in environment polluted with oil hydrocarbon compounds and may be useful for bioremediation purposes.

Keywords *Ochrobactrum anthropi* · Bioemulsifier · Biodegradation · Hydrocarbon

Introduction

Microbial biosurfactants and bioemulsifiers are produced by a wide variety of diverse microorganisms and they have different chemical structures and properties [6, 28]. In general, bacteria make low molecular weight molecules that efficiently reduce surface and interfacial tensions such as glycolipids [18, 35] and lipopeptide [22]; [32], and high molecular weight polymers that are efficient emulsifiers such as emulsan [45], alasan [30] or biodispersan [36]. Within the first group, it is worth mentioning the rhamnolipids produced by *Pseudomonas* species, composed of two molecules of rhamnose and two molecules of 3 hydroxyacids. Also remarkable are the trehalolipids produced by several species of *Rhodococcus*, *Arthrobacter* and *Mycobacterium* composed of trehalose, nonhydroxylated fatty acid and mycolic acids and the sophorolipids produced by *Candida* and *Torulopsis*, in which sophorose is combined with long chain hydroxyacid [11, 37]. The high molecular weight biopolymers containing polysaccharides, polysaccharides attached to lipids; or polysaccharides attached to

C. Calvo (✉) · G. A. Silva-Castro · I. Uad · J. González-López
Environmental Microbiological Research Group,
Department of Microbiology, Institute of Water Research,
University of Granada, C/Ramón y Cajal no. 4,
18071 Granada, Spain
e-mail: ccalvo@ugr.es

C. García Fandiño
CTR Repsol YPF, Madrid, Spain

J. Laguna
AG Ambiental, Madrid, Spain

proteins have been described as efficient emulsifying agents of numerous hydrocarbon compounds [4, 10, 20, 28, 33, 40].

Regardless of the different chemical composition and applications that bioemulsifiers show, the main field of research nowadays is focused on the mass production of these compounds on an industrial scale [17]. Many research [25, 42] papers have been published showing improved methods for rhamnolipids production. Recently, the relationships between several exploratory variables and one or more response variable [Response Surface methodology (RSM)] have been used to identify optimal C and N source in order to optimize rhamnolipid production from a *P. aeruginosa* S2 strain [13] and bioemulsifier production by *Candida lipolytica* [2].

The diversity of these compounds results in a broad spectrum of potential applications, being valuable in industries as diverse as agriculture, food industry, leather, textile or paper industries, cosmetic and pharmaceutical industries, etc. However, the largest possible market for biosurfactants and bioemulsifiers could be the oil industry, both for petroleum production and for bioremediation of oil contaminated sites [21, 34].

Biodegradation is one of the primary mechanisms for elimination of petroleum and other hydrocarbon pollutants from the environment [26]. It is considered an environmentally acceptable way of eliminating oils and fuel because the majority of hydrocarbons in crude oils and refined products are biodegradable, and hydrocarbons degrading microbes are ubiquitous [23].

Petroleum hydrocarbon compounds bind to soil components and are difficult to remove and degrade. Bioemulsifiers can emulsify hydrocarbons enhancing their water solubility and increasing the displacement of oily substances from soil particles and thus making them more available to microorganisms [6]. It has been demonstrated that emulsifying agents enhance the degradation process due to better solubilization of hydrocarbon prior to microbial degradation [15]. Addition of compounds able to emulsify hydrocarbons into microscopic droplets increases the surface area exposed to bacteria, this produces a readily available food source that bacteria can assimilate quickly [28, 34]. For these reasons, inclusion of bioemulsifiers in a bioremediation treatment of a hydrocarbon polluted environment could be really advantageous. In this sense, it has been reported [8, 19, 34] that biosurfactant and other natural emulsifying agents are important tools for biotreatment of hydrocarbon polluted environment.

In the present study, we describe the properties, characterization and efficiency of EPS emulsifier produced by *O. anthropi* as biostimulating agent to oil hydrocarbon biodegradation under experimental conditions such as soil microcosms and biopiles.

Materials and methods

Microorganism

Strain AD2 was isolated from an activated sludge plant (wastewater treatment plant of a Repsol YPF oil refinery located in Puertollano, Spain). Sludge samples (10 g) from the aerobic biological reactor were placed in 500-ml Erlenmeyer flask mixed with 100 ml of BH liquid medium and 1 ml of Kirkuk crude oil and incubated at 28 °C for a week. Samples for bacterial isolation (0.1 ml) were plated on BH agar medium [15] with the addition of 0.1% w/v naphthalene, phenanthrene or pyrene. For that purpose, the polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) was dissolved in ether and the solution was then spread onto the surface of the medium. Strain AD2 was selected for further studies due to its ability to grow and produce a clear halo on the surface of the BH medium supplemented with 0.1% of PAHs. The strain was long-term maintained in the laboratory by lyophilisation. For this study, stock cultures were grown on TSA (Difco) slants.

Culture media

BH medium used for isolation of hydrocarbon degrading microorganisms is a minimal medium with the following composition (g/l): $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2; K_2HPO_4 , 1; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.02; $\text{NH}_4\text{NO}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1; FeCl_3 , 0.05 and agar, 20.

Growth studies of strain AD2 was determined in nutrient broth (NB medium) with the following composition (g/l): glucose, 10; yeast extract, 5; proteose-peptone, 5; and NaCl, 5. Bacteria were cultivated at 32 °C for 5 days under aerobic conditions in a rotatory shaker (150 rpm).

The effect of different hydrocarbons on growth and EPS emulsifier production by strain AD2 was evaluated by addition of octane, toluene, xylene, mineral light oil, mineral heavy oil or crude oil to glucose NB media at concentration of 1% v/v.

PAHs, octane, toluene xylene, mineral light oil, mineral heavy oil supplied by Sigma Co, were standard for HPLC and gas chromatography ($\geq 99.7\%$ of purity). Crude oil used was Kirkuk crude oil from the refinery of Repsol YPF (Puertollano, Spain).

Taxonomical characterization of strain AD2

Strain AD2 was identified by the analysis of the sequence of the gene encoding 16S rRNA (16S rDNA). Primers fD1 and rD1 [43] were synthesized by Sigma-Genosis (Haverhill, UK) and used to amplify almost the full length of 16S rRNA gene. Freshly cultured colonies of strain AD2 were lysed by the addition of 20 μl of a mixture of NaOH (0.05 M)–SDS (0.25%, w/v) and then boiled for 15 min.

The lysates were adjusted to 200 μ l with sterile bidistilled water and centrifuged at 2,500g for 5 min.

The cleared lysates (4- μ l aliquots) were used as template for identification. PCR was performed adding to the lysates 1 \times PCR buffer (ABI; Perkin Elmer, Norwalk, CT), 1.5 mM MgCl₂ (ABI), 200 μ M dNTPs (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany), 20 pmol of each primer, and 1 U of Taq polymerase (ABI). The final volume in the reaction tubes was adjusted to 50 μ l. Reactions were run in a Perkin Elmer GeneAmp PCR system 2400 (Perkin Elmer, Norwalk, CT). The temperature profile was the one previously described by Vinuesa et al. [41] except for the initial denaturation step, which was extended to 7 min. PCR products were run on 1% agarose gels and bands were purified using a Quiaex II kit (Quiagen, Hilden, Germany). The nucleotide sequence of the purified bands was determined by the deoxy chain terminator method, using the ABI-PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit, (Perkin Elmer) and automated sequencer Applied Biosystems ABI capillary system (Perkin Elmer). Sequence data were analyzed using gene Runner 3.05 software, and compared to sequences in the EMBL databank using the free BLASTn [3] online software provide by the European Bioinformatics Institute (<http://www.ebi.ac.uk>).

Production and characterization of EPS emulsifier

Production of EPS emulsifier was determined in NB medium. Erlenmeyer flasks (500 ml) containing 100 ml of NB medium were inoculated with 1 ml of an overnight culture, grown in the same medium. After incubation at 32 °C for 5 days under aerobic conditions in a rotatory shaker (150 rpm), the cultures were centrifuged at 36,000g in a Sorval RC-JB refrigerated centrifuge at 4 °C for 60 min. Supernatant obtained were precipitated with cold ethanol. The biopolymer precipitated from the supernatants was dissolved in distilled water, dialysed against distilled water during 24 h lyophilised, and weighed [10]. The EPS obtained were subjected to colorimetric analysis of proteins [9] and total carbohydrates [16].

Emulsification assays and surfactant activity test

Emulsifying activity of biopolymer synthesized by strain AD2 grown in glucose NB liquid media amended or unamended with hydrocarbon compounds was detected by a modified version of the method previously described by Cooper and Goldenberg [12]. Test tubes (105 \times 15 mm) were amended with 3.0 ml of exopolymer diluted in distilled water (0.1%, w/v) and 3 ml of a hydrophobic substrate (*n*-octane, xylene, toluene, mineral light oil, mineral heavy oil or crude oil). Then the tubes were shaken vigorously to homogeneity using a vortex, and left to stand for

24 h. Emulsifying activity was expressed as the percentage of the total height occupied by the emulsion. Surfactant activity was determined by measurement of surface tension with a Krüs K11 digital tensiometer, using a plate method [7]. This property was searched in the bacterial culture and in bioemulsifier distilled water solution.

Microcosm assays

Soil microcosms were constructed with oil polluted soil samples (Table 1) incubated at room temperature in steady conditions for 21 days and weekly tested. The soil samples were obtained from a real contaminated soil; they were supplied by the Company AG Ambiental (Madrid, Spain) in order to perform assays of biotreatability. This soil was franc-clay soil (36% clay, 33% sand and 10% slime); it was polluted by a mixture of diesel and fuel oil at final total hydrocarbon concentration near 10,000 mg/Kg (See Table 1 for values of initial pollution).

Six microcosms (three replicate for each treatment) were constructed in order to evaluate the effect of the EPS emulsifier on hydrocarbon biodegradation. Each microcosm received a specific treatment: (A) NPK fertilizer (0.3 g/Kg of soil), (B) oleophilic compound S200 C (1 ml/Kg of soil), (C) EPS emulsifier (1.5 g/Kg of soil), (D) NPK fertilizer (0.3 g/Kg of soil) + EPS emulsifier (1.5 g/Kg of soil), (E) S200 C (1 ml/Kg of soil) + EPS emulsifier (1.5 g/Kg of soil) and (F) control microcosm without any addition.

The NPK fertilizer (Agroblem S.L) is an inorganic complex fertilizer composed of 18% total nitrogen (nitrate, 1.2%; ammonium, 3.1% and urea 13.7%), 8% of P₂O₅, 2% of MgO, 19% of K₂SO₃ and 0.5% of Fe. S200 C is an oleophilic fertilizer (IEP Europe) which stimulates the indigenous hydrocarbon microorganisms.

Biopile systems

The composting process was determined in biopile systems of 1 m height/1.25 m³ total volumes. The biopiles were

Table 1 Concentration of hydrocarbons (mg of hydrocarbon/kg of soil) in oil polluted soil utilized in microcosms and biopiles assays

Hydrocarbon compound	Polluted soil of microcosms	Polluted soil of biopiles
TPH	8,530 \pm 1438	11,000 \pm 1458
Alkanes	5,726 \pm 572	7,863 \pm 171
Prystane	547 \pm 81	219 \pm 84
Phytane	468 \pm 89	212 \pm 56
Alkenes and alkynes	ND	997 \pm 285
Naphthalenes	263 \pm 45	1,663 \pm 64
Pregnans	ND	45 \pm 25

ND Not detected

constructed with 1,245 Kg of soil, contaminated with 13.05 Kg (14.5 l of Kirkuk crude oil) of hydrocarbons and 300 Kg of straw added as bulking agent. Homogenization of contaminant was carried out by turning over. Four different biopiles (in duplicate) were tested in order to understand the effects of activated sludge and EPS emulsifier on hydrocarbon biodegradation. The treatments assayed were as follows: (A) control biopile, (B) biopile amended with 325 Kg of activated sludge, (C) biopile amended with 325 Kg of activated sludge + 150 g of EPS emulsifier, (D) biopile amended with 150 g of EPS emulsifier. The total amount of EPS emulsifier was added in four doses: 60 g of EPS emulsifier at the beginning of experiment and 30 g after 15, 30 and 45 days of treatment. EPS emulsifier addition was done by irrigation with 1% EPS solution in distilled water. Table 1 shows values of initial pollution.

Enumeration of culturable bacteria in soil

Three replicate samples from each microcosm were withdrawn every week for enumeration of aerobic heterotrophic bacteria. 0.1 ml of serially diluted soil samples were plated in 1/10 diluted Trypticase Soy Agar (TSA, Difco) according to Avidano et al. [5]. Triplicate plates were incubated at 28 °C for 48 h before the colonies were counted.

TPH, *n*-alkanes and PAH determinations

Total petroleum hydrocarbons were extracted from the soil samples with a mixture of hexane: acetone 1:1 (v/v) and determined by gravimetric analysis according to Aguilera-Vázquez et al. [1]. Analysis of *n*-alkanes and polycyclic aromatics hydrocarbons (PAHs) in the soil samples were determined from the extracted fractions above mentioned using a Hewlett–Packard 6890 GC system equipped with a HP-5-MS-capillary column (30 × 0.32 mm I.D.). Helium (1.6 ml/min) was utilized as carrier gas. The determinations were performed using the following temperature program: 40 °C held 1 min isothermal, heating rate 4 °C/min up to 310 °C, final temperature held for 1.5 min. Injector and detector temperatures were 250 °C and 300 °C, respectively. *n*-alkanes and PAH were detected using a mass detector 5872 (Hewlett–Packard) and the library utilized was Wiley 275.

Results

Taxonomical characterization of strain AD2

The initial characterization of strain AD2 revealed that they are Gram negative rods. Percentages similarity values obtained after pair-wise alignment of the sequence of 16S

rDNA versus the EMBL data base demonstrated the affiliation of this strain to the species *Ochrobactrum anthropi* (over 100% ungapped sequence identity). Thus, our results showed that strain AD2 isolated from activated sludge of the wastewater treatment plant of the oil refinery of Repsol YPF should be classified as *O. anthropi*.

Production and characterization of bioemulsifier AD2

In the present study, assays were carried out to know the capacity of *O. anthropi* strain AD2 to produce extracellular biopolymers with biosurfactant or bioemulsifier activities. Our data showed that strain AD2 was able to produce exopolysaccharide growing on glucose NB liquid media and the capacity of this bacterium to grow and produce the EPS emulsifier in the presence of hydrocarbon compounds. Table 2, shows yield production and chemical composition, in terms of carbohydrates and proteins, of the EPS emulsifier synthesized by *O. anthropi* strain AD2 in glucose NB medium and in glucose NB medium added with *n*-octane, xylene, toluene, mineral light and heavy oils and crude oil. Addition of *n*-octane, mineral light oil and mineral heavy oil enhanced the amount of EPS synthesized. In contrast, strain AD2 was unable to grow in presence of xylene and toluene, thus both hydrocarbons seem to be toxic for it. When a preliminary characterization of the exopolymers was performed, it was found that these water soluble substances contain high amounts of proteins and carbohydrates. However, the addition of hydrocarbons (*n*-octane, mineral light oil, mineral heavy oil or crude oil) affected the protein and carbohydrate composition. Thus, *O. anthropi* strain AD2 produced in glucose-crude oil medium extracellular polymers with higher content of protein (32.57%) than polymers synthesized in glucose-mineral light oil (10.77%). In this context, our results show that *O. anthropi* strain AD2 can produce significant amounts of extracellular polymers in the presence of different hydrocarbons although these compounds can affect the chemical composition of the extracellular polymers.

The extracellular biopolymers synthesized in glucose NB medium showed a wide emulsifying activity, crude oil being the substrate most effectively emulsified followed by mineral light oil (Table 3). Thus, we found that all extracellular biopolymers had a noticeable activity on crude oil; however, the specificity of biopolymers was modified by the conditions used for culture of the strain AD2. For example, extracellular biopolymers extracted from media with mineral light oil were most active on toluene. However, mineral light oil and mineral heavy oil were not emulsified by the polymers produced on crude oil. Finally, none of the isolated biopolymers produced by *O. anthropi* showed bio-surfactant activity.

Table 2 Yield production (g/l of culture medium) and chemical composition (percentage of carbohydrates and proteins) of EPS synthesized by *Ochrobactrum anthropi* strain AD2 in glucose NB

media amended with *n*-octane, xylene, toluene, mineral light oil, mineral heavy oil, and crude oil media

Carbon source of EPS culture media production	Yield production (g/l)	Chemical composition	
		Carbohydrates (%)	Proteins (%)
Glucose	0.5 ± 0.1	72.79 ± 3.91	18.3 ± 1.56
Glucose + <i>n</i> -octane	0.71 ± 0.1	60.82 ± 2.39	26.99 ± 1.72
Glucose + xylene	ND	ND	ND
Glucose + toluene	ND	ND	ND
Glucose + mineral light oil	0.65 ± 0.1	78.97 ± 4.38	10.77 ± 0.48
Glucose + mineral heavy oil	0.94 ± 0.1	66.14 ± 2.35	14.35 ± 1.91
Glucose + crude oil	0.47 ± 0.1	64.35 ± 1.26	32.57 ± 3.55

Values are mean ± standard error of three replicates

ND Growth and extracellular polymers production was not detected

Table 3 Emulsifying activity of EPS emulsifier produced by *O anthropi* strain AD2 in glucose media amended or un-amended (control) using *n*-octane, toluene, xylene, mineral light oil, mineral heavy oil and crude oil

Growth medium for EPS emulsifier production	Emulsifying activity using following substrate (%)					
	Octane	Toluene	Xylene	Light oil ^a	Heavy oil ^a	Crude
NB ^a	37.5 ± 2.7	28.8 ± 1.3	22.5 ± 4.6	51.2 ± 2.4	28.8 ± 3	88.7 ± 4.2
NB-octane	38.1 ± 0.6	25 ± 1.3	23.2 ± 2	56.1 ± 1.2	31.1 ± 0.4	95.1 ± 3.3
NB- light oil ^b	8.16 ± 0.2	58.33 ± 3.9	10.42 ± 3.1	14.58 ± 0.7	12.5 ± 0.5	85.41 ± 5.1
NB- heavy oil ^b	0	53.19 ± 2.8	27.66 ± 0.6	32 ± 0.9	0	81.25 ± 7.2
NB- crude EPS	0	31.25 ± 0.3	14.58 ± 0.7	0	0	72.92 ± 1.4

^a Nutrient broth

^b Mineral oil

Microcosm assays

In this study, it has been evaluated the effectiveness of the biopolymer EPS emulsifier as biostimulating agent and its application in bioremediation processes using microcosm and biopile systems. In soil microcosms, EPS emulsifier was applied alone or amended with an inorganic NPK fertilizer or the S200 C biostimulating agent. Figure 1 shows the response of indigenous microbial population in treated and nontreated soil microcosms. In general, no differences

were found among the assays tested, except for the microcosm treated with S200 C + EPS emulsifier. This treatment remarkably enhanced indigenous microbial population (Fig. 1) throughout the incubation period (21 days). On the other hand, GC/SM analyses showed that inoculation of EPS emulsifier enhanced hydrocarbon removal efficiency when compared to un-amended control soils (Fig. 2). Moreover, a significant increase in the elimination of TPH and *n*-alkanes was detected in the soil microcosm soil treated with NPK + EPS emulsifier compared to microcosms treated with inorganic NPK fertilizer alone. In the same way, addition of the EPS emulsifier bioemulsifier also stimulated the hydrocarbon biodegradation rate in microcosms containing S200 C. As it can be seen in Fig. 2, the percentage of hydrocarbon removed in microcosms treated with S200 C + EPS emulsifier was notably higher than in microcosms containing S200 C alone.

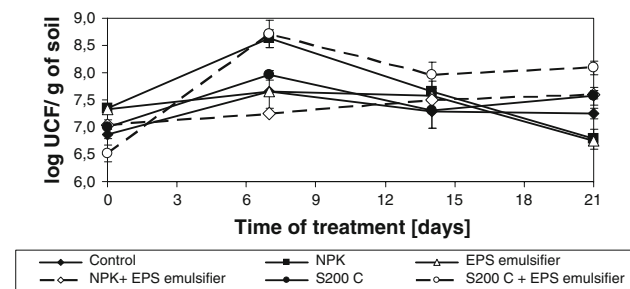


Fig. 1 Total heterotrophic bacteria in soil microcosms amended with NPK fertilizer, EPS emulsifier, S200 C product and un-amended microcosm (control)

Biopile systems

Composting processes have been usefully applied in bioremediation of soil polluted with hydrocarbon. In this context, the composting processes are able to increase the

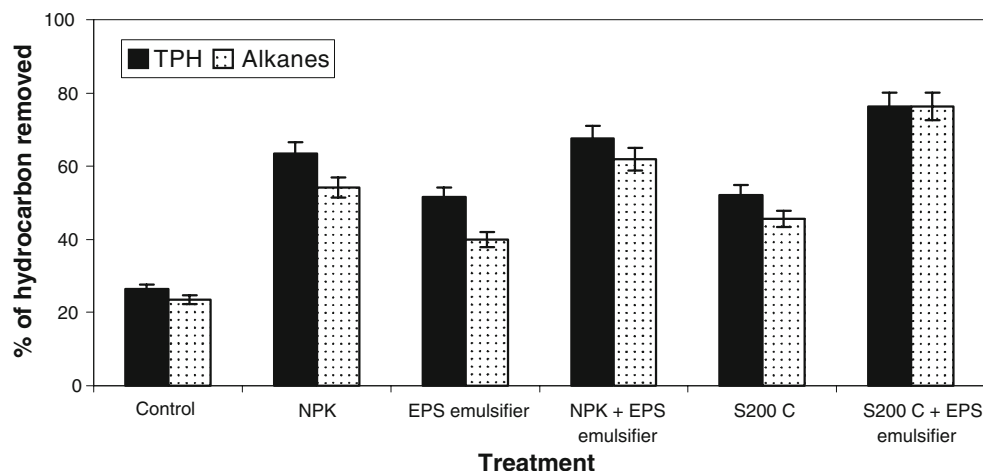


Fig. 2 Efficiency of TPH and *n*-alkanes removing in un-amended soil microcosms (control) or amended soil microcosms with NPK fertilizer, EPS emulsifier and S200 C, after 21 days of treatment

microbial biodegradation activities and consequently enhance the biotransformation of different nutrients such as hydrocarbons. Under this point of view we have studied the effect of the biopolymer EPS emulsifier in the biodegradation of hydrocarbon using composting technology (biopile systems).

We have investigated the effects of the addition of biosurfactant EPS emulsifier and activated sludge on biopile systems for composting of soil contaminated with petroleum hydrocarbons. Both microbial populations and total hydrocarbon biodegradation (Figs. 3, 4) were enhanced in biopile amended with activated sludge plus biosurfactant compared to biopiles amended with activated sludge, AD2 or un-amended control. Thus, our data showed that the addition of both activated sludge and EPS emulsifier to biopile systems clearly increases the petroleum hydrocarbon biodegradation.

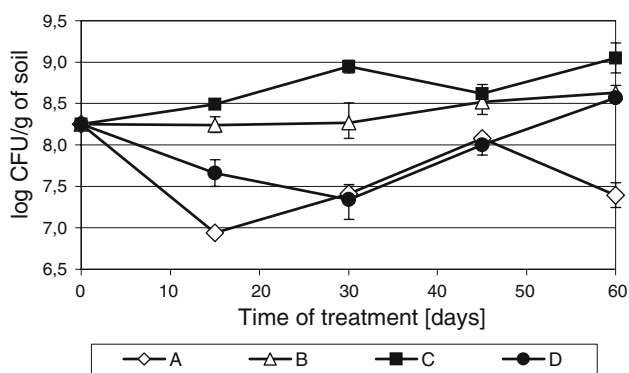


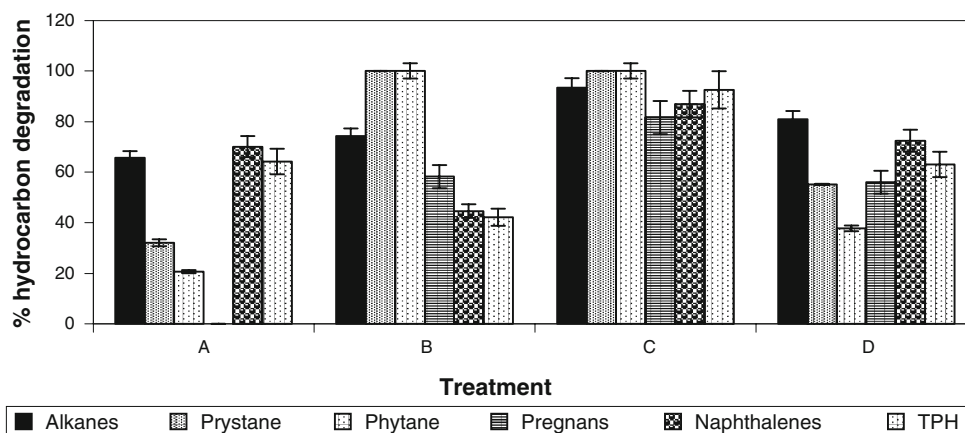
Fig. 3 Evolution of total heterotrophic bacteria in control (un-amended) composting biopiles and composting biopiles amended with activated sludge and EPS emulsifier bioemulsifier, after 60 days of treatment A control, B sludge, C sludge + EPS emulsifier, D EPS emulsifier

Discussion

O. anthropi is a Gram negative bacterium belonging to α Proteobacteria with capacity for bioremediation due to its capability of degrading a high number of pollutants such as organophosphorus pesticides, phenol compounds, and petroleum wastes [31]. Its ability of removing heavy metals by producing high amount of exopolysaccharide has also been described [31]. Studies of the microbial biodiversity during long-term storages of crude oil at different layers of the tank storage, have demonstrated that *Ochrobactrum* spp. were isolated from all the samples collected at each sampling time, suggesting the presence of these microorganisms in a viable state [44]. Similarly, Katsivela et al. [24] have reported that in a 14 months land farming treatment, although microbial diversity was decreased with increased degradation of petroleum hydrocarbons, the genera *Enterobacter* and *Ochrobactrum* were always detected in the land farming treated soil [24].

O. anthropi strain AD2 was isolated in our laboratory from activated sludge of the wastewater treatment plant of an oil refinery and it could be considered as an indigenous crude oil microorganism grown in the refinery oil compounds. This strain was selected among other isolates because it was able to grow in the hydrocarbon culture media and due to its property of producing high amount of exopolymers with emulsifying activity against different hydrocarbon compounds. Thus, *O. anthropi* strain AD2 produces polymers under different culture conditions and in the presence of hydrophobic substances. However, culture medium modifies chemical composition and emulsifying activity of strain AD2 extracellular biopolymers (EPS emulsifier). Most polymers studied here have shown high emulsifying activities. This suggests that *O. anthropi* could produce the emulsifier polymer after being inoculated into

Fig. 4 Efficiency of hydrocarbons removing in control (un-amended) biopile systems, and biopiles systems amended with activated sludge and EPS emulsifier, after 60 days of treatment. *A* control, *B* sludge, *C* sludge + EPS emulsifier, *D* EPS emulsifier, Naphthalene



polluted environmental sites, thus, be useful for in situ bioremediation treatment. The ability of all the polymers studied to emulsify crude oil is also noteworthy, as they are its emulsifying activity comparing to chemical surfactants. Thus, the emulsifying capacity of EPS emulsifier was always higher than that compared to Tween 20, Tween 80 and Triton X100 chemical surfactants [27].

The persistence of hydrocarbons within the ecosystem is due to the low aqueous solubility that limits their availability to hydrocarbon degrading microorganisms; bioemulsifiers can emulsify hydrophobic compounds, form stable emulsion, increase hydrocarbon solubility and consequently enhance the bioavailability in the environment [34]. Thus, they can stimulate the growth of hydrocarbon degrading bacteria, improving their capacity to utilize these compounds [39].

There is a useful diversity of biosurfactants and bioemulsifiers due to the wide variety of producer microorganisms [6]. The EPS emulsifier is an exopolysaccharide which is produced during the stationary phase of growth (after 7 days of incubation). This biopolymer can be included in the high molecular weight exopolymer group [35] and it is able to efficiently emulsify petroleum hydrocarbons, but unable to reduce surface tension.

It has been described that chemical composition and functional properties of exopolymers could be influenced by the nutritional composition of culture media where the bacteria are growing [37]. Thus, yield production, chemical composition and emulsifying activity of the exopolymers depend not only on the producer strain but also on the culture conditions [14, 29]. These chemical modifications could be responsible of the different emulsifying activity detected in the EPS emulsifier according to the growth media where the strain AD2 was cultured.

The effectiveness of EPS emulsifier as a biostimulating agent in oil bioremediation processes was evaluated in the present study using oil contaminated soil microcosms. The EPS emulsifier was applied alone or amended with other biostimulating products such as an inorganic NPK fertilizer

and the S200 C oleophilic commercial product. The primary limiting factors in the microbial degradation of petroleum are nitrogen and phosphorous concentrations. These nutrients are important to cellular production and their supplementation increases the hydrocarbon degradation effectiveness [38]. The results obtained have shown that the application of NPK fertilizer stimulated microbial population at the beginning of the soil treatment (until 7 days of incubation). However, at the end of the soil treatment (21 days) microbial count decreased below un-amended controls. In contrast, combined treatment of NPK and EPS emulsifier enhanced steadily bacterial growth but it was able to maintain higher number of microorganisms at the end of experiments (21 days). This result suggests that EPS emulsifier could be considered as a useful emulsifier that increases the bioavailability of hydrocarbons to bacteria, favoring the use of hydrocarbon as carbon and energy source. This agrees with the highest percentage of hydrocarbons eliminated in microcosms added with inorganic fertilizer and EPS emulsifier.

According to commercial indications, S200 C product selectively stimulates hydrocarbon degrader microorganisms and not other type of bacteria, consequently the specific natural selection of indigenous hydrocarbon degraders promotes a quicker degradation of contaminants. Our experiments have revealed that the addition of S200 C to soil microcosm systems enhanced the percentage of TPH removed compared to un-amended control 52.2% (4,452 ppm eliminated) and 26.3% (2,243 ppm), respectively. However, significant differences in the number of total heterotrophic bacteria were not observed. Finally, when the bioemulsifier EPS emulsifier was added in combination with S200 C, stimulation in microbial growth and oil hydrocarbon biodegradation was detected. Thus, under these experimental conditions, the amount of TPH removed at the end of the treatment (21 days) was near 6,500 ppm (76.3%).

Bioremediation is not a new strategy for oil hydrocarbon removal but in many cases in situ remediation shows a

small rate of degradation. This could be associated with the microorganism's availability to degrade, to low solubility of the contaminant and to specific nutrient limitation. The results obtained suggest that EPS emulsifier usefully enhances the solubility and consequently the bioavailability of hydrocarbon compounds to specific oil degrader microorganisms previously stimulating by the S200 C product. Thus, the use of this combined treatment may be useful for the study of oil hydrocarbon degradation and for bioremediation purposes.

Biopiles are used to reduce the concentration of petroleum constituents in excavated soils through the use of biodegradation. This technology can be performed onsite and involves keeping contaminated soils into piles and stimulating aerobic microbial activity within the soils through the addition of oxygen, minerals, nutrients, and moisture. The enhanced microbial activity results in the breakdown of the petroleum constituents in the soil.

Activated sludges can be considered as an useful source of microorganisms with a wide range of metabolic activities. Our results demonstrated that the addition to biopiles of activated sludge enhanced the bioremediation process; however, this positive effect can be increased by the addition of activated sludge plus biosurfactant EPS emulsifier, suggesting that the application of the composting technology for the bioremediation of oil contaminated soil could be improved with the addition of both products. In conclusion, our results suggest that a combined treatment including bioemulsifiers such as EPS emulsifier could be an efficient tool to improve the yield of hydrocarbons degradation in bioremediation processes.

Acknowledgments This research has been supported by several projects of Ministerio de Educacion y Ciencia (CICYT: REN 200-0384-P4-02) and Ministerio de Medio Ambiente (MMA. A4872007/20-01.1). I Uad was granted by Agencia Española de Cooperación Internacional (A.E.C.I.).

References

- Aguilera-Vázquez L, Soto-Cruz NO, Saucedo-Castañeda G, Gutiérrez-Rojas MA (2001) Model system for composting hydrocarbon contaminated soil by using water activity and porosity as response variables. *Chem Eng J* 81:197–202
- Albuquerque CDC, Filetti AMF, Campos-Takaki GM (2006) Optimizing the medium components in bioemulsifiers production by *Candida lipolytica* with response surface method. *Can J Microbiol* 52:575–583
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389–3402
- Ashtaputre AA, Shah AK (1995) Emulsifying property of a viscous exopolysaccharide from *Sphingomonas paucimobilis*. *World J Microbiol Biotechnol* 11:219–222
- Avidano L, Gamalero E, Cossa GP, Carraro E (2005) Characterization of soil health in an Italian polluted site by using microorganisms as bioindicators. *Appl Soil Ecol* 30:21–33
- Banat RS, MakkarRS, Cameotra SS (2000) Potential commercial applications of microbial; surfactants. *Appl Microbiol Biotechnol* 53:495–508
- Barathi S, Vasudevan N (2001) Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens* isolated from a petroleum-contaminated soil. *Environ Int* 26:413–416
- Barkay T, Nayon-Venezia S, Ron EZ, Rosenberg E (1999) Enhancement of solubilization and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the bioemulsifier alasan. *Appl Environ Microbiol* 65:2697–2702
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
- Calvo C, Martínez-Checa F, Toledo FL, Porcel J, Quesada E (2002) Characteristics of bioemulsifiers synthesized in crude oil media by *Halomonas eurihalina* and their effectiveness in the isolation of bacteria able to grow in the presence of hydrocarbons. *Appl Microbiol Biotechnol* 60:347–351
- Calvo C, Toledo FL, Pozo C, Martínez-Toledo MV, González-López J (2004) Biotechnology of bioemulsifiers produced by microorganisms. *J Food Agric Environ* 2:238–243
- Cooper DJ, Goldenberg BG (1987) Surface active agents from two *Bacillus* species. *Appl Environ Microbiol* 54:224–229
- Chen SY, Lu WB, Wei YH, Chen WM, Chang JS (2007) Improved production of biosurfactant with newly isolated *Pseudomonas aeruginosa* S2. *Biotech Progr* 23:661–666
- Desai JD, Banat M (1997) Microbial production of surfactant and their commercial potential. *Microbiol Mol Biol Rev* 61:47–61
- Déziel E, Paquette G, Villemur R, Lépine F, Bisaillon JG (1996) Biosurfactant production by a soil *Pseudomonas* strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl Environ Microbiol* 62:1908–1912
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 28:350–356
- Fletcher A (1992) Biosurfactants: moving towards industrial application. *Trends Biotechnol* 10:208–217
- Guerra-Santos LH, Kappeli O, Flechter A (1986) Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors. *Appl Microbiol Biotechnol* 24:443–448
- Herman DC, Zhang Y, Miller R (1997) Rhamnolipid (biosurfactant) effects on cell aggregation and biodegradation of residual hexadecane under saturated flow conditions. *Appl Environ Microbiol* 63:3622–3627
- Iyer A, Mody K, Jha B (2006) Emulsifying properties of a marine bacterial exopolysaccharide. *Enzyme Microbiol Technol* 38:220–222
- Jacques RJS, Santos EC, Bento FM, Peralba MCR, Pedro A, Selbach EL, Camargo FAO (2005) Anthracene biodegradation by *Pseudomonas* sp. isolated from a petrochemical sludge landfarming site. *Int Biodeterior Biodegradation* 56:143–150
- Javaheri MJ, Jenneman GE, McInnerney MJ, Knapp RM (1985) Anaerobic production of a biosurfactant by *Bacillus liqueniformis* JF-2. *Appl Environ Microbiol* 50:698–700
- Kanaly R, Harayama S (2000) Biodegradation of high-molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *J Bacteriol* 182:2059–2067
- Katsivela E, Moore ERB, Maroukli D, Strömpl C, Pieper D, Kalogerakis N (2005) Bacterial community dynamics during in-situ bioremediation of petroleum waste sludge in land farming sites. *Biodegradation* 16:169–180

25. Lang S, Wullbrandt D (1999) Rhamnose lipids-biosynthesis, microbial production and application potential. *Appl Microbiol Biotechnol* 51:22–32
26. Leahy JG, Colwell R (1990) Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol Rev* 54:305–315
27. Martínez-Checa F, Toledo FL, Vilchez R, Quesada E, Calvo C (2002) Yield production, chemical composition and functional properties of emulsifier H28 synthesized by *Halomonas eurihalina* strain H28 in media added with several hydrocarbons. *Appl Microbiol Biotechnol* 58:358–363
28. Menezes Bento F, Oliveira Camargo A, Okeke BC, Jr Frankenberg (2005) Diversity of biosurfactant producing microorganisms isolated from soils contaminated with diesel oil. *Microbiol Res* 160:249–255
29. Mulligan CN, Gibbs BF (1989) Correlation of nitrogen metabolism with biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* 53:3016–3019
30. Navon-Venezia S, Zosim Z, Gottlieb A, Legmann R, Carmeli S, Ron EZ, Rosenberg E (1995) Alasan a new bioemulsifier from *Acinetobacter radioresistens*. *Appl Environ Microbiol* 61:3240–3244
31. Ozdemir G, Ozturk T, Ceyhan N, Isler R, Cosar T (2003) Heavy metal biosorption by biomass of *Ochrobactrum anthropi* producing exopolysaccharide in activated sludge. *Bioresour Technol* 90:71–74
32. Peypoux F, Bonmatin JM, Wallach J (1999) Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Appl Microbiol Biotechnol* 51:553–563
33. Plaza GA, Ulfing K, Brigmon RL (2005) Surface active properties of bacterial strains isolated from petroleum hydrocarbon-bioremediated soil. *Pol J Microbiol* 54:161–162
34. Ron EZ, Rosenberg E (2002) Biosurfactants and oil bioremediation. *Curr Opin Biotechnol* 13:249–252
35. Rosenberg E, Ron EZ (1999) High- and low-molecular-mass microbial surfactants. *Appl Microbiol Biot* 52:154–162
36. Rosenberg E, Rubinovitz C, Gottlieb A, Rosenhak S, Ron EZ (1988) Production of biodispersant by *Acinetobacter calcoaceticus* A2. *Appl Environ Microbiol* 54:317–322
37. Sutherland IW (2001) Microbial polysaccharides from Gram-negative bacteria. *Int Dairy J* 11:663–674
38. Ting YP, Hu HL, Tan HM (1999) Bioremediation of petroleum hydrocarbons in soil microcosms. *Resour Environ Biotechnol* 2:197–218
39. Toledo FL, Calvo C, Rodelas B, González-López J (2006) Selection and identification of bacteria isolated from waste crude oil with polycyclic aromatic hydrocarbons removal capacities. *Syst Appl Microbiol* 29:244–252
40. Toledo FL, González Lopez J, Calvo C (2007) Production of bioemulsifier by *Bacillus subtilis*, *Alcaligenes faecalis* and *Enterobacter* species in liquid culture. *Bioemulsifier Bioresour Technol* 99(17):8470–8475. doi:10.1016-j.biortech.2007.08.055
41. Vinuesa P, Rademaker JLW, De Bruijin FJ, Werner D (1998) Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulating endemic woody legumes of the Canary Islands by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of genes encoding 16S rRNA (16S rDNA) and 16S–23S rDNA intergenic spacers, repetitive extragenic palindromic PCR genomic fingerprinting, and partial 16S rDNA sequencing. *Appl Environ Microbiol* 64:2096–2104
42. Wang L, Tang Y, Wang S, Liu RL, Liu MZ, Zhang Y, Liang FL, Feng L (2006) Isolation and characterization of a novel thermophilic *Bacillus* strain degrading long-chain *n*-alkanes. *Extremophiles* 10:347–356
43. Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* 173:697–703
44. Yoshida N, Takahashi N, Hiraishi A (2005) Phylogenetic characterization of a polychlorinated dioxin-dechlorinating microbial community by use of microcosm studies. *Appl Environ Microbiol* 71:4325–4334
45. Zuckerman A, Diver A, Peeri Z, Gutnick DL, Rosenberg E (1979) Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: chemical and physical properties. *Appl Environ Microbiol* 37:414–420

