



RIZORREMEDIACIÓN
DE SUELOS
CONTAMINADOS POR
HIDROCARBUROS
MEDIANTE
MICROORGANISMOS
TOLERANTES A LA
SEQUÍA

Lucía Santa-Cruz Calvo

2014

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Lucía Santa Cruz Calvo
D.L.: GR 1950-2014
ISBN: 978-84-9083-115-1



UNIVERSIDAD DE GRANADA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA –

INSTITUTO DEL AGUA

**RIZORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS POR
HIDROCARBUROS MEDIANTE MICROORGANISMOS
TOLERANTES A LA SEQUÍA**

Lucía Santa-Cruz Calvo

Granada, 2014



UNIVERSIDAD DE GRANADA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA –

INSTITUTO DEL AGUA

RIZORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS POR

HIDROCARBUROS MEDIANTE MICROORGANISMOS

TOLERANTES A LA SEQUÍA

Memoria de tesis presentada por **Lucía Santa-Cruz Calvo**, Licenciada en Ciencias Ambientales para optar al grado de **DOCTORA**

Los Directores

Dr. Maximino Manzanera Ruiz
Profesor Titular del Dpto de Microbiología
Universidad de Granada

Dra. Concepción Calvo Sainz
Catedrática del Dpto. de Microbiología
Universidad de Granada

Granada, a 7 de Abril de 2014

A mis padres,
a Noemí, a Sara

Multo autem ad rem magis pertinet qualis tibi videaris quam aliis.
Lucio Anneo Séneca

ÍNDICE

Resumen	
Objetivos	
Introducción	9
i.1. Hidrocarburos del petróleo	13
i.1.a Origen de los hidrocarburos	14
i.2. Degradación de hidrocarburos	14
i.2.a Degradación Física	14
i.2.b Degradación química	15
i.2.c Degradación biológica o biodegradación	15
i.3 Biorremediación	20
i.3.a Técnicas de biorremediación <i>ex situ</i>	21
i.3.b Técnicas de biorremediación <i>in situ</i>	24
Capítulo I: Caracterización de las cepas tolerantes a la sequía 4J27 y 5J12A para su utilización en técnicas de biorremediación	31
Introducción	31
Resultados	40
I.1 Identificación y relación taxonómica de las cepas 4J27 y 5J12A..	40
I.2 Caracterizaciones quimiotaxonómicas de las cepas bacterianas <i>Arthrobacter</i> sp. 4J27 y <i>Arthrobacter</i> sp. 5J12A	47
I.3 Caracterizaciones fenotípicas de las cepas bacterianas <i>Arthrobacter</i> sp. 4J27 y <i>Arthrobacter</i> sp. 5J12A: Características metabólicas, enzimáticas y motilidad	50
Discusión	70
Capítulo II: Degradación de hidrocarburos por las cepas 4J27 y 5J12A y aislamiento de microorganismos tolerantes a la desecación para su uso en procesos de riorremediación	77
Introducción	77
Resultados	80

II.1 Degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos por las cepas <i>Arthrobacter</i> sp. 4J27 y <i>Arthrobacter</i> sp. 5J12A	81
II.2 Aislamiento de microorganismos tolerantes a la desecación y biodegradadores, procedentes del área circundante a raíces de Gayomba	83
II.3 Aislamiento de microorganismos biodegradadores procedentes de un suelo seco contaminado con diesel	91
Discusión	113

Capítulo III: Bioprotección de una cepa sensible a la desecación por la cepa tolerante *Microbacterium* sp. 3J1

Introducción	119
Resultados	120
III.1 Búsqueda de mutantes resistentes de la cepa <i>Microbacterium</i> sp. 3J1	121
III.2 Tolerancia a la desecación de las cepas <i>Microbacterium</i> sp. 3J1 y <i>Pseudomonas putida</i> MAX40 en placas	122
III.3 Tolerancia a la desecación de las cepas <i>Microbacterium</i> sp. 3J1 y <i>Pseudomonas putida</i> MAX40 en microcosmos con vermiculita	125
III.4 Tolerancia a la desecación de las cepas <i>Microbacterium</i> sp. 3J1 y <i>Pseudomonas putida</i> MAX40 en microcosmos con un suelo franco-arenoso.....	132
Discusión	

Capítulo IV: Protección de plantas frente a la falta de agua por microorganismos

Introducción	145
Resultados	146
IV.1 Selección de microorganismos y plantas	147
IV.2 Efecto de las cepas sobre el crecimiento de la planta	152
Discusión	174

Capítulo V: Rizorremediación de suelos contaminados con diesel en condiciones de sequía mediante la inoculación de microorganismos	183
Introducción	183
Resultados	186
V.1 Selección de microorganismos y plantas	186
V.2 Rizorremediación de un suelo contamiando con diesel en condiciones de sequía	187
Discusión	216
Conclusiones	225
Material y métodos	229
Referencias	257

RESUMEN

El agua constituye más del 80% de la biomasa de la mayoría de los organismos e interviene en la mayor parte de los procesos metabólicos que se realizan en los seres vivos (Gleick 1993).

La humedad del suelo y el pH son parámetros muy influyentes en la abundancia microbiana y la actividad del suelo. Sin embargo, existe un debate acerca de cómo el estrés por falta de agua afecta a la comunidad microbiana, su biomasa y su actividad (Williams 2007).

La biorremediación de contaminantes orgánicos es dependiente de la cantidad de agua presente en el suelo. El agua es necesaria no sólo para los requerimientos fisiológicos de los microorganismos sino también para el transporte de nutrientes y los productos metabólicos. Además la cantidad de agua presente en el suelo determina el oxígeno en los microambientes del mismo (Barker et al. 1994). Por tanto, en suelos sometidos a condiciones de estrés por falta de agua es necesario la aplicación de herramientas biotecnológicas adaptadas a las condiciones del lugar.

El empleo de la técnica de rizorremediación es ventajosa para biorremediar suelos contaminados con diesel sometidos a condiciones de estrés por sequía. Las raíces penetran a través del suelo haciendo más biodisponible los contaminantes, que podrían estar previamente inaccesibles, además los exudados producidos por las raíces de la planta pueden mejorar la desorción de contaminantes desde el suelo. Se ha demostrado que la planta y los microorganismos secretan enzimas y exudados que

actúan como surfactantes y pueden incrementar la biodisponibilidad del contaminante en el suelo (Makkar & Rockne 2003; Bogan & Sullivan 2003; Fava et al. 2004). Las raíces también permiten una mayor penetración del oxígeno y nutrientes en el perfil del suelo, lo cual beneficia a los microorganismos rizosféricos responsables de la degradación de los contaminantes. Para adaptar la técnica a las condiciones de estrés hídrico se deben emplear organismos adaptados a dichas condiciones (anhidrobiontes). En base a ello, en primer lugar caracterizamos microorganismos rizosféricos tolerantes a la desecación para su uso en técnicas de biorremediación e iniciamos la búsqueda de otros microorganismos que presentaran la capacidad de crecer en presencia de compuestos hidrocarbonados, además de tolerar la falta de agua. También estudiamos si los microorganismos aislados presentaban la capacidad de promover el crecimiento de las plantas en condiciones de estrés hídrico y si mejoraban el proceso natural de degradación de los contaminantes hidrocarbonados en conjunto con la planta (rizorremediación).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Las herramientas biotecnológicas utilizadas para la descontaminación de un ambiente deber estar adaptadas a las condiciones ambientales del lugar donde se pretenden emplear, para así proporcionar una mayor eficiencia en el proceso de degradación. Si utilizamos la técnica de rizorremediación en ambientes sometidos a condiciones extremas de sequía, hemos de emplear microorganismos y plantas que toleren las condiciones de estrés hídrico y que además dichos microorganismos compitan con las comunidades autóctonas y expresen las funciones catabólicas requeridas.

El aislamiento de microorganismos rizosféricos que presenten la capacidad de tolerar la falta de agua (anhidrobiontes) y con las propiedades catabólicas apropiadas, supone una ventaja ya que las bacterias rizosféricas están adaptadas para colonizar y competir por el espacio y los recursos que les ofrece la rizosfera. A tenor de lo expuesto, se plantea como objetivo principal establecer una metodología para aislar e identificar nuevos microorganismos rizosféricos tolerantes a la falta de agua y degradadores de hidrocarburos y su aplicación como herramientas biotecnológicas para la descontaminación de suelos sometidos a estrés hídrico.

OBJETIVOS

Para alcanzar el objetivo principal, se definieron los siguientes objetivos parciales:

1. Caracterización de microorganismos tolerantes a la desecación (anhidrobiontes) para su uso como herramientas biotecnológicas para la descontaminación de suelos.
2. Aislamiento de microorganismos rizosféricos degradadores de hidrocarburos y tolerantes a la desecación.
3. Aplicaciones biotecnológicas de las cepas anhidrobiontes para la protección de plantas y la descontaminación de suelos sometidos a condiciones de estrés hídrico.

INTRODUCCIÓN

El petróleo es la fuente más importante de energía para las actividades humanas, pero su uso industrial puede generar desastres ambientales (Atlas & Bartha 1992; Liu et al. 2010). La Unión Europea estima que hay aproximadamente 3,5 millones de lugares potencialmente contaminados en 2006 (COM, 2006). Más del 50% de dichos lugares están afectados por aceites minerales, hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) o hidrocarburos aromáticos volátiles, como por ejemplo benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos (BTEX) (EEA, 2011). Dichos sustancias pueden encontrarse en los productos del petróleo como la gasolina, el diesel y lubricantes, los cuales pueden ser puestos en libertad y difundirse en el suelo (Pinedo et al. 2014). Los hidrocarburos totales del petróleo (TPHs del inglés *Total Petroleum Hydrocarbons*) es un parámetro ampliamente aplicado para determinar la cantidad de hidrocarburos derivados del petróleo en el medio ambiente y entre ellos muchas sustancias peligrosas provenientes de compuestos con un número de átomos de carbono entre 10 y 40 (C₁₀ a C₄₀) (ISO, 2004). El área mediterránea está fuertemente afectada por HAPs (Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos), dado que por una parte se estima una emisión antropogénica anual de entre 40 a 700 toneladas de HAPs en el área continental de los países de la cuenca mediterránea, a los que hay que sumar las 40 toneladas anuales producto de los depósitos por ríos, y a las 1.000 toneladas anuales emitidas como consecuencia del transporte marítimo de petróleo (UNEP, 2002).

Con el paso del tiempo, se ha ido desarrollando una conciencia social de este peligro que lentamente va forzando el establecimiento de una legislación (Martín et al. 2004). En la Carta Europea de Suelos desarrollada por la Comunidad Europea en 1972 ya empieza a notarse una mayor sensibilización con los problemas de contaminación de suelos. Donde dice en su primer punto que el suelo es uno de los bienes más apreciados de la humanidad. Ya que el suelo permite la vida de los vegetales, los animales y las personas en la superficie de la Tierra. Y en el quinto y sexto punto dice que el suelo debe ser protegido de la erosión y de la contaminación (Carta Europea del suelo).

En el 4º Programa de Acción Ambiental de la Comunidad Europea (1987-1992) se reconoce de manera oficial la necesidad de una reglamentación referente a la protección del suelo y se insta a los gobiernos de los países miembros a elaborar una normativa de protección bajo las directrices recogidas en las "Bases Científicas para la Protección del Suelo en la Comunidad Europea". En esta normativa se propone

"salvaguardar las propiedades y condiciones que aseguren el cumplimiento de las funciones del suelo". Considerándose como principales funciones: el crecimiento vegetal, la producción de alimentos, la filtración del agua, y la participación del suelo de forma activa en los ciclos geoquímicos de los elementos (Bases científicas Protección Suelo Comunidad Europea).

A pesar de la evidente vulnerabilidad ecológica de los suelos, la legislación europea y la española han carecido de instrumentos normativos para promover su protección, y hasta la promulgación de la Ley 10/1998, de 21 de abril, de Residuos, en España no se disponía de ninguna norma legal que permitiera proteger eficazmente los suelos contra la contaminación y, en el caso de los ya contaminados, identificarlos y caracterizarlos utilizando para ello una metodología normalizada y técnicamente rigurosa para la identificación y caracterización de los suelos contaminados, la definición de los Niveles Genéricos de Referencia (NGR) y los procedimientos específicos a realizar para abordar su posible descontaminación (Real Decreto 9/2005, de 14 de enero).

Desde la propia Unión Europea se elaboró en 2002 una comunicación que con el título "Estrategia Temática para la Protección del Suelo", dicha comunicación planteaba una profunda reflexión sobre el estado del suelo en la Unión Europea y sus potenciales amenazas. Lo que ha constituido la reflexión científica a partir de la cual se ha elaborado la Directiva Europea para la Protección del Suelo de septiembre de 2006 (Rad y López, 2006), donde se establece una comunicación de la Comisión a otras instituciones europeas, en las que fija el marco de actuación y otras acciones necesarias para una adecuada protección del suelo. La cual se estructura según las siguientes líneas de prevención por la cual los Estados Miembro deben asegurar el uso sostenible del suelo y deberán prever medidas correctoras para aquellos casos en los que el suelo soportase un uso que merme sus funciones.

Debido a la lentitud con la que se desarrolla y aplica la directiva se propuso el Real Decreto 9/2005 de 14 de Enero, sobre Relación de Actividades Potencialmente Contaminantes y Criterios y Estándares para la Declaración de Suelos Contaminados. El artículo 4 de este real decreto dice que, la recuperación de un suelo contaminado se llevará a cabo aplicando las mejores técnicas disponibles en función de las características de cada caso. Las actuaciones de recuperación deben garantizar

que se materialicen soluciones permanentes, priorizando, en la medida de lo posible, las técnicas de tratamiento *in situ* que eviten la generación, traslado y tratamiento de nuevos residuos (Real Decreto 9/2005).

La rápida expansión y la sofisticación creciente de diferentes sectores industriales, fundamentalmente en los últimos treinta años, se ha traducido en un incremento de la cantidad y la complejidad de residuos tóxicos. En el caso del suelo, la contaminación por hidrocarburos provoca una reducción o inhibición del desarrollo de la cobertura vegetal, cambios en la dinámica y diversidad poblacional de la fauna y la biota microbiana y además puede suponer una contaminación de aguas subterráneas y superficiales (Chaîneau et al. 1997).

i.1. HIDROCARBUROS DEL PETRÓLEO

El petróleo es una mezcla homogénea de compuestos orgánicos, principalmente hidrocarburos insolubles en agua. Los hidrocarburos totales del petróleo son uno de los grupos de compuestos orgánicos más comunes persistentes en el medio ambiente y son conocidos por su toxicidad en los organismos (Huang et al. 2004).

Dada la tetravalencia del átomo de carbono y de la monovalencia del hidrógeno, las distintas posibilidades de combinación de estos átomos pueden clasificarse según dos reglas generales, la adición de los átomos de carbono en cadenas o en ciclos y con saturación o no. El petróleo es una compleja mezcla de compuestos alcanos saturados lineales, ramificados y cíclicos, además de aromáticos (Gallego et al. 2001). En la Figura i.1 se representa los tipos de hidrocarburos que constituyen el petróleo.

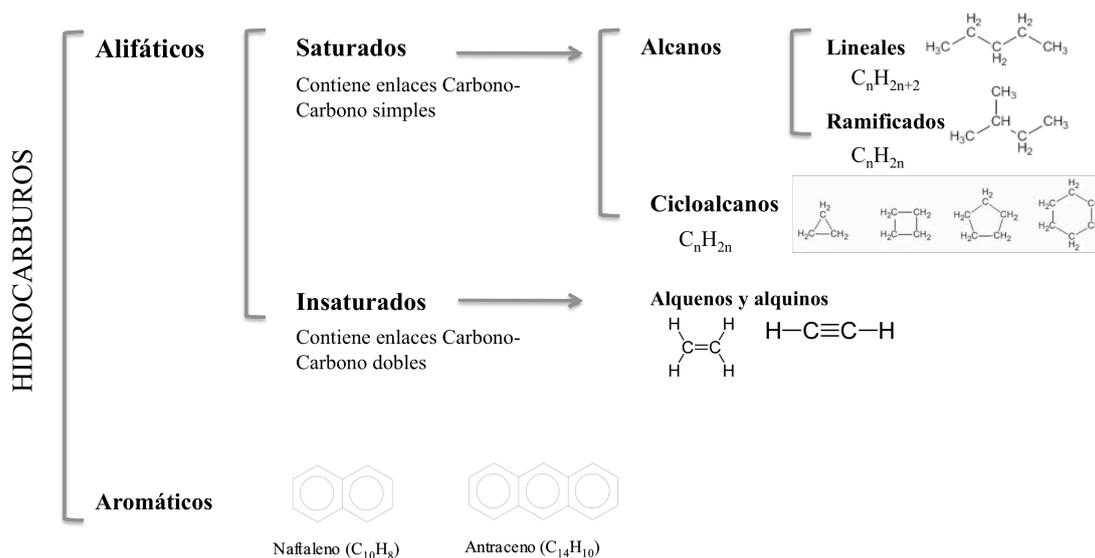


Figura i.1. Esquema de clasificación de hidrocarburos del petróleo.

Los alcanos, también llamados parafinas, son hidrocarburos saturados compuestos sólo por átomos de carbono y de hidrógeno. Dichos hidrocarburos se clasifican como lineales cuya la relación C/H es de C_nH_{2n+2} o ramificados, cuya relación C/H es de C_nH_{2n} . Sin embargo, los alcanos cíclicos o cicloalcanos son hidrocarburos saturados (C_nH_{2n}) compuestos por átomos de carbonos unidos entre ellos con enlaces simples en forma de anillo. Por otra parte, los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) son hidrocarburos cíclicos no saturados con tres dobles enlaces, los cuales consisten en dos o más anillos aromáticos fusionados (Harvey, 1991).

En la Figura i.2 se representan los HAPs utilizados en el trabajo, donde se indica, el nombre, la posición de los anillos aromáticos en cada uno de ellos, y los carbonos e hidrógenos que lo componen. El círculo representa los tres dobles enlaces deslocalizados.

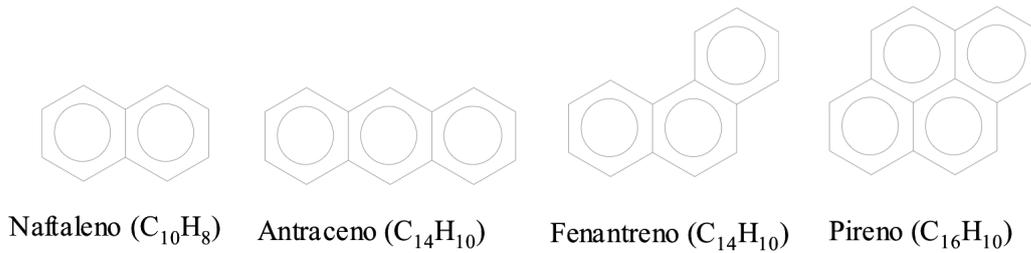


Figura i.2. Disposición espacial de los anillos aromáticos que componen los HAPs. Se representa mediante un círculo los tres dobles enlaces deslocalizados.

Las características más importantes que condicionan el comportamiento de los HAPs en el medio ambiente van ligadas a las características fisicoquímicas propias de la estructura de cada HAP. Son de gran importancia la hidrofobicidad, que aumenta cuanto mayor sea el número de anillos y la volatilidad de los HAPs de menor peso molecular. Debido a las propiedades hidrofóbicas, los HAPs muestran una fuerte tendencia a adsorberse a las superficies lo que dificulta su biodegradación, así como a acumularse en la cadena trófica (Clements et al. 1994).

Los HAPs de 3 y 4 anillos son considerados como compuestos recalcitrantes debido a la energía de resonancia de la molécula y a la baja solubilidad en agua (Klevens, 1950). Numerosos estudios han demostrado que el índice de degradación de los HAPs disminuye cuanto mayor sea el número de anillos de benceno fusionados en la molécula (Heitkamp & Cerniglia 1987).

i.1.a Origen de los hidrocarburos

Los hidrocarburos saturados, lineales, ramificados y cíclicos son formas altamente reducidas de carbono, que son producidos por procesos geoquímicos de la descomposición de plantas y algas. Los alcanos constituyen entre el 20 y el 50% del petróleo y depende del tipo de fuente. Además dichos compuestos, predominantemente los de cadena larga, son producidos por los organismos vivos de la biosfera (plantas, algas y bacterias) como productos de desecho, como elemento estructural, o mecanismo de defensa o como señal química.

El origen de los HAPs en el medio ambiente es muy diverso, aunque básicamente podemos diferenciar tres fuentes distintas, pirolíticas, petrogénicas y diagénicas.

Por una parte los de origen pirolítico proceden de la combustión incompleta de la materia orgánica, reciente o fósil, bien por causas *naturales* (incendios de bosques, erupciones volcánicas, etc.) o bien por origen *antropogénico* (utilización de combustibles fósiles, incineración de residuos, emisiones de vehículos, procesos industriales de gasificación y licuefacción del carbón, "cracking" del petróleo, etc.). Por otra parte los de origen petrogénico se producen por vertidos accidentales o intencionados de derivados del petróleo. En último lugar, los HAPs de origen diagenético provienen de la materia orgánica sedimentaria, la cual puede sufrir una serie de procesos geoquímicos naturales, como son la descarboxilación, aromatización, desfuncionalización y otros, considerándose como HAPs de origen natural. (Blumer, 1976).

i.2. DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS

Las técnicas convencionales utilizadas para la remediación han consistido en retirar el suelo contaminado y depositarlo en un vertedero, para limitar y contener las zonas contaminadas de un área más restringida. Estos métodos tienen algunos inconvenientes. El primer método simplemente mueve la contaminación a otros lugares y puede crear importantes riesgos en los procesos de excavación, manipulación y transporte de materiales peligrosos. Además, es muy difícil y cada vez más costoso encontrar nuevos vertederos para la disposición final del material. El método de limitación y contención es sólo una solución provisional ya que la contaminación se mantiene en el sitio, lo que requiere un control y mantenimiento de las barreras de aislamiento a largo plazo, con todos los costos asociados y la responsabilidad potencial (Vidali 2001).

i.2.a Degradación Física

Algunas tecnologías que se han utilizado son incineración a altas temperaturas y los distintos tipos de descomposición química (por ejemplo la oxidación por UV). Pueden ser muy eficaces para reducir los niveles de una amplia gama de contaminantes, pero tienen varios inconvenientes, principalmente, su complejidad tecnológica, el costo de la aplicación a pequeña escala, y la falta de aceptación pública. La eliminación física

de los HAPs pasa por lograr degradar alguno de sus anillos para hacerlos perder estabilidad (Vidali, 2001).

i.2.b Degradación Química

Hay una gran cantidad de técnicas disponibles basadas en el tratamiento químico de los compuestos hidrocarbonados, cuyo proceso se puede llevar a cabo *in situ* o *ex situ*. Ambos casos suelen conllevar elevados costes, ya que requiere de una inversión alta en infraestructuras y la producción de subproductos poco deseables. Algunas de las más innovadoras se han aplicado para casos de vertidos industriales como son la ozonización, así como la hidroxilación. La reacción con ozono molecular parece ser el camino de degradación más importante para estos compuestos (Beltrán, 1997). Este proceso se puede llevar a cabo *in situ* o *ex situ*, pero en ambos casos requiere de una inversión alta en infraestructuras (Battistel et al. 2007).

i.2.c Degradación Biológica o biodegradación

Se denomina biodegradación a la transformación de un compuesto catalizada biológicamente a formas más simples, en el caso de los hidrocarburos a ácidos grasos o dióxido de carbono. La capacidad de los microorganismos de degradar compuestos orgánicos depende de numerosos factores, entre los que encontramos, la estructura química, concentración y biodisponibilidad del contaminante, así como el tamaño y naturaleza de la población microbiana (Torstensoon, 1988; Huesemann 1995). La actividad microbiana también se ve influenciada por factores ambientales como la humedad, el pH, las propiedades físicas y químicas del suelo y el potencial redox (Vogel y Walter, 2002). La biodegradación de muchos compuestos orgánicos ocurre con mayor rapidez bajo condiciones aeróbicas, cuando el oxígeno es usado como aceptor final de electrones.

Los hidrocarburos se diferencian en su susceptibilidad a la degradación microbiana y se han ordenado en función de su biodegradabilidad, en el siguiente orden de mayor a menor: alcanos lineales, alcanos ramificados, aromáticos de bajo peso molecular y cicloalcanos (Leahy & Colwell, 1990). Los alcanos lineales son considerados los compuestos del petróleo con mayor susceptibilidad a la biodegradación. Se ha

demostrado que existe degradación microbiana incluso por encima de C₄₄ (Haines y Alexander, 1974). En general los compuestos más susceptibles son los saturados, seguidos de los aromáticos ligeros y por último, los aromáticos de alto peso molecular (Leahy & Colwell, 1990). La presencia de alcanos con un número reducido de carbonos, generalmente entre C₅ y C₁₀, a altas concentraciones, inhibe la biodegradación ya que actúan como solventes apolares rompiendo la membrana lipídica de los microorganismos. Hay muchos géneros de microorganismos que incluyen cepas con capacidad para crecer en alcanos (Tabla i.1). La degradación de alcano es llevada a cabo por dos importantes clases de enzimas, las alcano monooxigenasas, también conocidas como alcano hidroxilasa o *alkB* y ciertos sistemas de citocromo P450 (van Beilen et al. 2006).

Tabla i.1. Microorganismos capaces de degradar aeróbicamente los hidrocarburos alifáticos.
(Van Beilen et al. 2003).

Bacteria	Levaduras	Hongos	Algas
<i>Achormobacter</i>	<i>Candida</i>	<i>Apergillus</i>	<i>Prototheca</i>
<i>Acinetobacter</i>	<i>Cryptococcus</i>	<i>Cladosporium</i>	
<i>Alcanivorax</i>	<i>Debaryomyces</i>	<i>Corollasporium</i>	
<i>Alcaligenes</i>	<i>Hansenula</i>	<i>Cunninghamella</i>	
<i>Bacillus</i>	<i>Pichia</i>	<i>Dendryphiella</i>	
<i>Brevibacterium</i>	<i>Thodotorula</i>	<i>Fusarium</i>	
<i>Burkholderia</i>	<i>Saccharomyces</i>	<i>Gliocladium</i>	
<i>Corynebacterium</i>	<i>Sporbolomyces</i>	<i>Lulworthia</i>	
<i>Flavobacterium</i>	<i>Torulopsis</i>	<i>Penicillium</i>	
<i>Mycobacterium</i>	<i>Trichosporon</i>	<i>Varicospora</i>	
<i>Nocardia</i>	<i>Yarrowia</i>	<i>Vericillium</i>	
<i>Pseudomonas</i>			
<i>Sphingomonas</i>			
<i>Streptomyces</i>			

Se han descrito varios tipos de microorganismos capaces de degradar hidrocarburos alifáticos, incluidos bacterias, hongos filamentosos y levaduras (van Beilen & Funhoff 2007; Wentzel et al. 2007; Rojo 2009). Algunas caracterizaciones recientes describen especies con una alta especialización en la degradación de hidrocarburos.

Dichas especies son denominadas como bacterias hidrocarbonoclasticas (HCB), las cuales juegan un importante papel en la eliminación de ambientes contaminados y no contaminados (Harayama et al. 2004; Yakimov et al. 2007; Wang et al. 2010).

Se requieren diferentes tipos de enzimas dependiendo de la longitud de la cadena de los alcanos, para introducir oxígeno en dichos compuestos, y así iniciar la biodegradación aeróbica. A modo simplificado van Beilen y colaboradores (2007) distinguen tres categorías: (1) Las enzimas metano monooxigenasas, las cuales inician la degradación de los alcanos de cadena corta con un número de átomos de carbono entre 1 y 4 (C1-C4), es decir desde metano a butano. (2) Las enzimas citocromo P450 o hemoproteína, las cuales pueden oxidar los alcanos con un número de átomos de carbono entre C5 y C16. Por último, (3) los alcanos de cadena larga (C>17) son oxidados por un sistema de enzimas desconocidos (van Beilen & Funhoff 2007).

Los alcanos son generalmente activados por la oxidación terminal del correspondiente alcohol primario, el cual es además oxidado por las enzimas alcohol deshidrogenasa y aldehído deshidrogenasa (Figura i.3). Los ácidos grasos resultantes entran dentro del ciclo de la β -oxidación (Leahy & Colwell 1990; Watkinson & Morgan 1991). El alcohol secundario es convertido a alcanona mediante una reacción de oxidación (Forney & Markovetz 1970), el cual es oxidado a través de la enzima Baeyer-Villiger monooxygenasa a éster (Figura i.3) (Forney & Markovetz 1968; Forney et al. 1967). El éster es hidrolizado por la acción de la enzima esterasa a alcohol y un ácido graso (Shum & Markovetz 1974; Ashraf et al. 1994).

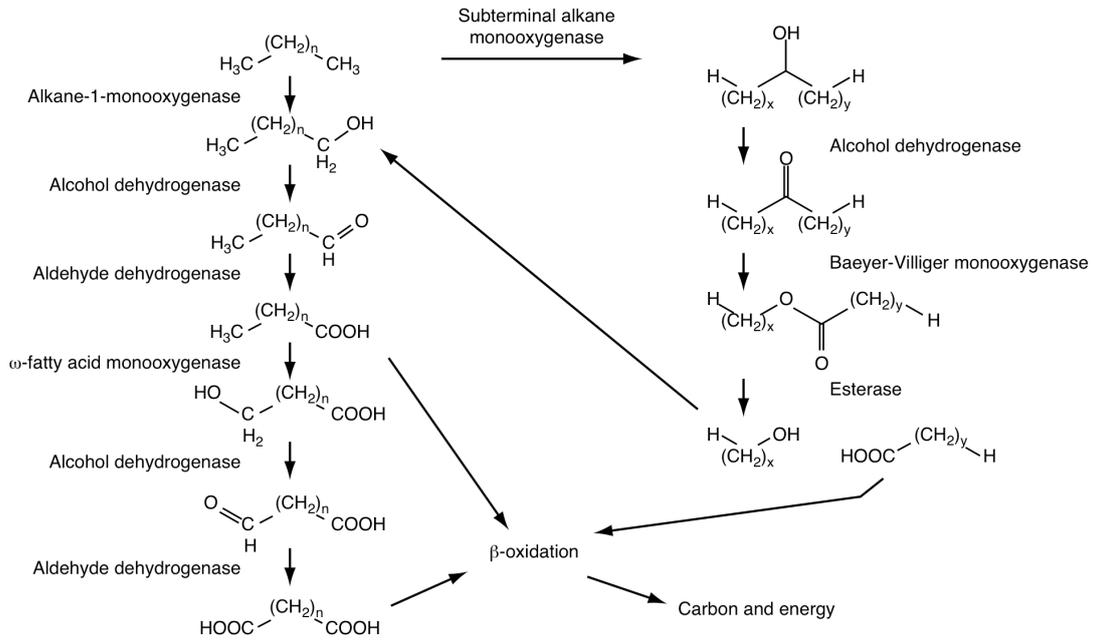


Figura i.3. Ruta de degradación de alcanos mediante oxidación terminal, sub- y biterminal. (Van Beilen et al. 2003).

Por otra parte, en cuanto a la degradación de compuestos aromáticos existen dos tipos de procesos al inicio de las rutas degradativas en condiciones aerobias que son comunes a todos los compuestos aromáticos, hidroxilación del anillo aromático y escisión del anillo bencénico. Ambos tipos de reacciones están catalizadas por enzimas, las cuales muestran una alta especificidad por su sustrato y requieren oxígeno. La hidroxilación del anillo aromático está catalizada por enzimas que reciben el nombre genérico de monooxigenasas o hidroxilasas. Y la escisión está catalizada por dioxigenasas. La acción conjunta de las dos enzimas origina la pérdida de aromaticidad del compuesto y hace posible la posterior utilización del carbono contenido en su estructura cíclica saturada mediante la intervención de otras enzimas. Generalmente, los productos de rotura son metabolizados hasta compuestos intermediarios del ciclo de Krebs (Suárez, 1993).

Por otra parte, en cuanto a la degradación de compuestos aromáticos existen dos tipos de procesos al inicio de las rutas degradativas en condiciones aerobias que son comunes a todos los compuestos aromáticos, hidroxilación del anillo aromático y escisión del anillo bencénico. Ambos tipos de reacciones están catalizadas por enzimas, las cuales muestran una alta especificidad por su sustrato y requieren

oxígeno. La hidroxilación del anillo aromático está catalizada por enzimas que reciben el nombre genérico de monooxigenasas o hidroxilasas. Y la escisión está catalizada por dioxigenasas. La acción conjunta de las dos enzimas origina la pérdida de aromaticidad del compuesto y hace posible la posterior utilización del carbono contenido en su estructura cíclica saturada mediante la intervención de otras enzimas. Generalmente, los productos de rotura son metabolizados hasta compuestos intermediarios del ciclo de Krebs (Suárez, 1993).

La degradación del naftaleno se inicia a través de varios componentes enzimáticos, la enzima naftaleno dioxigenasa ataca al anillo aromático para formar *cis*-(1R,2S)-dihidroxi-1,2-dihidronaftaleno (dihidrodiol *cis*-naftaleno) (Figura i.2) (Goyal & Zylstra 1997; Simon et al. 1993). El dihidrodiol *cis*-naftaleno formado por el ataque del anillo de naftaleno, se deshidrogena a 1,2-dihidroxy-naftaleno por la enzima *cis*-dihidrodiol deshidrogenasa (Auger 1995; Goyal & Zylstra, 1997). Posteriormente, 1,2-dihidroxy-naftaleno es metabolizado a salicilato vía ácido 2-hidroxi-2*H*-cromeno-2-carboxílico, ácido *cis*-o-hidroxibenzapiruvato y 2-hidroxi-benzaldehído (Goyal & Zylstra 1997; Baboshin et al. 2008; Denome et al. 1993; Kiyohara et al. 1994). También el salicilato es decarboxilado a catecol, el cual es además metabolizado por fisión del anillo en las vías *meta*- y *ortho*-. Fuenmayor y colaboradores (1998) informan sobre la conversión a gentisato mediante la enzima salicilato-5-hidroxilasa. Jouanneau y colaboradores (2007) purificaron la enzima salicilato 1-hidroxilasa de *Sphingomonas* sp. CHY-1 y se caracterizó sus propiedades catabólicas y bioquímicas. El sistema de enzimas catabólicas que codificadas por el plásmido NAH7, ha sido bien caracterizado en *Pseudomonas putida* G7 (Denome et al. 1993; Simon et al. 1993; Goyal & Zylstra 1996)

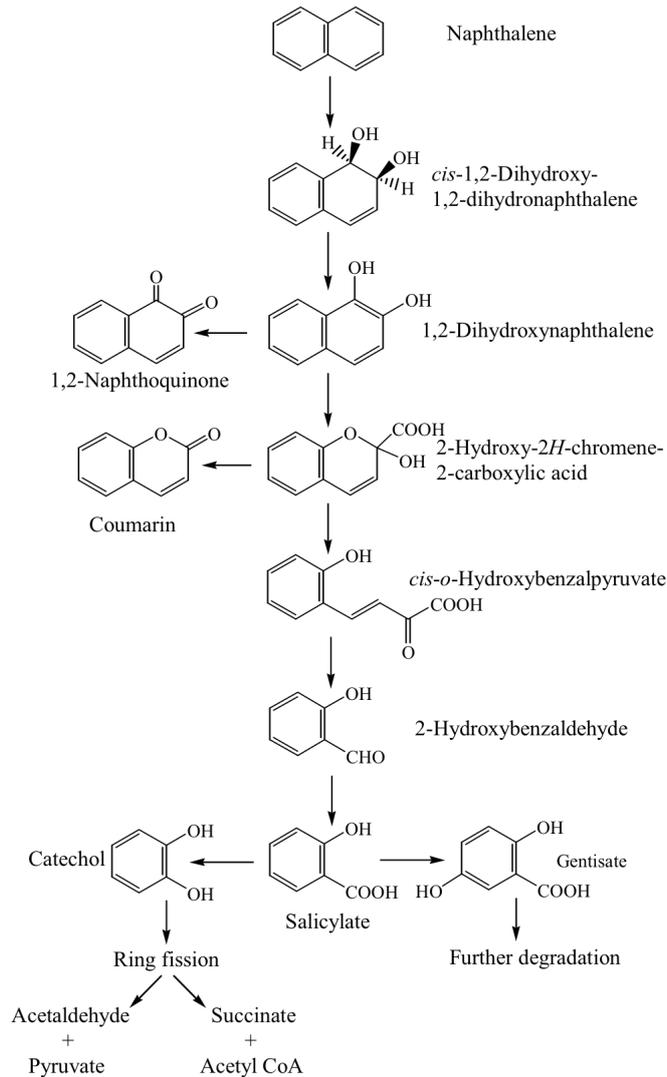


Figura i.2. Vía de degradación del naftaleno por bacterias. (Denome et al. 1993; Kiyohara et al. 1994; Auger 1995; Goyal & Zylstra 1997; Baboshin et al. 2008).

i.3. BIORREMEDIACIÓN

La biorremediación de los suelos contaminados con petróleo es una tecnología multidisciplinar, que implica al campo de la microbiología, ingeniería, ecología, geología y química. Dicha tecnología basada en la habilidad de los microorganismos de degradar los compuestos hidrocarbonados (Iwamoto & Nasu 2001; Watanabe 2001). La biorremediación es el resultado de la ruptura biológica, o biodegradación, de compuestos contaminantes, en formas menos tóxicas (Crawford, 2002). Para que la biorremediación sea eficaz, los contaminantes deben ser susceptibles de ataque microbiano (transformación metabólica), los productos metabólicos deben ser

inocuos, y el proceso no debe tener efectos secundarios adversos en los ecosistemas. En muchos casos la biorremediación permite biodegradar, depurar o inmovilizar contaminantes peligrosos (Atlas, 1988).

La biorremediación puede llevarse a cabo mediante dos tratamientos, el denominado *in situ*, el cual no necesita excavación ni retirada del suelo contaminado, por lo que hay menos liberación de polvo y contaminantes y además permite descontaminar un mayor volumen de suelo que el tratamiento *ex situ*. Aún así este tratamiento tiene otros inconvenientes, en comparación con los tratamientos *ex situ*, como mayor lentitud, dificultad de mantener las condiciones óptimas del proceso, riesgos de lixiviación y contaminación del subsuelo, además su eficacia depende en mayor medida del tipo de suelos, que deben ser permeables si se quiere asegurar un buen rendimiento del proceso. Sin embargo el tratamiento *ex situ* puede ser más rápido, más fácil de controlar y aplicables a más tipos de suelos (Martín *et al.*, 2004), este requiere que el suelo contaminado sea desplazado del lugar donde se ha producido la contaminación (Madsen, 2002).

i.3.a Técnicas de biorremediación *ex situ*

Las técnicas de biorremediación *ex situ* más comunes son *Landfarming*, compostaje, biopilas y biorreactores. A continuación describimos con más detalle cada una de ellas.

i.3.a.1 *Landfarming*

La técnica de biorremediación mediante *Landfarming* fue utilizada durante muchos años por la industria petrolera de los Estados Unidos de Norteamérica. Ésta tecnología surgió del conocimiento empírico de los operadores de las refinerías del petróleo, quienes desecharon los lodos de los separadores tipo API (American Petroleum Institute) y otros residuos del petróleo en forma de una capa delgada sobre la parte superior del suelo en un sitio próximo a la refinería. Se dieron cuenta que estos residuos desaparecían durante el curso de varios meses. Previo a una mayor regulación y estricto control, esta técnica llamada labrado de tierras (del inglés *landfarming*) fue ampliamente utilizada sin comprender los procesos que causaban la degradación de los lodos (King *et al.* 1992).

Actualmente se sabe que la técnica de *Landfarming* consiste en provocar la oxidación biológica de los hidrocarburos contenidos en el suelo mediante la estimulación de la microflora natural que se encuentra en el mismo. El suelo contaminado se excava y es extendido sobre un lecho preparado. Esta técnica está limitada debido a que requiere de espacios grandes para su aplicación y además por la liberación de compuestos orgánicos volátiles (COVs) (Vidali 2001).

La efectividad de esta metodología depende de innumerables factores tales como el tipo y la concentración de los contaminantes, nutrientes, aireación, condiciones ambientales, presencia de inhibidores, densidad de la comunidad microbiana, y otros (Marín et al. 2005). La capacidad de controlar y optimizar todas estas variables anteriormente citadas son las que determinaran la eficiencia del proceso de *Landfarming*.

Estudios previos de Marín y colaboradores (2005) pusieron de manifiesto que la técnica de *Landfarming* resulta eficaz para la degradación de hidrocarburos, particularmente los de tipo alifático (Marín et al. 2005); hecho observado por otros autores en ambientes no semiáridos (Litchfield 1991). La velocidad de degradación de los hidrocarburos está condicionada por el carácter más o menos aromático de los mismos. La degradación es muy rápida durante los primeros 4 meses, y se va ralentizando conforme los hidrocarburos más ligeros (alifáticos) van desapareciendo del medio y éste se va enriqueciendo en los más aromáticos.

i.3.a.2 Compostaje

El compostaje es un proceso biooxidativo que consiste en la estabilización de la materia orgánica, es una técnica que implica la combinación de suelos contaminados con compuestos orgánicos no peligrosos tales como el estiércol o residuos agrícolas. La presencia de estos materiales orgánicos apoya el desarrollo de una población microbiana rica y característica de la temperatura elevada de compostaje. Sus limitaciones son semejantes a las del caso anteriormente mencionado (Vidali 2001).

i.3.a.3 Biopilas

La técnica consiste en la formación de pilas de material biodegradable de dimensiones variables, formadas por suelo contaminado y material orgánica (compost) en condiciones favorables para el proceso de biodegradación de los contaminantes. Las pilas pueden ser aireadas de forma activa, volteando la pila, o de forma pasiva, mediante tubos perforados de aireación. Las biopilas proporcionan un entorno favorable para los microorganismos autóctonos tanto aerobios como anaerobios, es un técnica muy controlada por lo que no existen pérdidas de eficacia. El mayor control sobre las condiciones, la mayor homogeneidad en la mezcla y la posibilidad de monitorización más precisa son las principales diferencias con el *Landfarming* (von Fahnestock et al. 1998).

i.3.a.4 Biorreactores

Los biorreactores de lodos o reactores acuosos son utilizados para el tratamiento *ex situ* de la contaminación del suelo y del agua contaminada. La biorremediación en reactores implica el procesamiento de material sólido contaminado (suelo, sedimentos, lodo) o agua a través de un sistema de ingeniería de contención.

Un biorreactor de lodos puede ser definido como un recipiente de contención, así como el conjunto de aparatos utilizados para crear una condición de mezcla de las tres fases (sólido, líquido y gaseoso) para aumentar la tasa de biorremediación de los contaminantes solubles en agua, así como la mezcla de agua de los suelos contaminados y la biomasa (normalmente microorganismos), capaces de degradar contaminantes. En general, la velocidad y el grado de biodegradación es mayor en un sistema de biorreactor de conservación *in situ* porque el medio es más manejable y por lo tanto, más controlable y predecible.

i.3.b Técnicas de biorremediación *in situ*

Las técnicas de biorremediación *in situ* más comunes son la atenuación natural, bioestimulación, bioaumento, fitorremediación y rizorremediación. A continuación describimos con más detalle cada una de ellas.

i.3.b.1 Biorremediación intrínseca o Atenuación natural

La Agencia de protección Ambiental estableció la “atenuación natural” como una tecnología de limpieza pasiva que puede denominarse “biorremediación intrínseca”. La biorremediación intrínseca se basa en la capacidad de los microorganismos presentes en el lugar contaminado, de metabolizar los compuestos contaminantes. La atenuación natural supone la destrucción del contaminante mediante procesos bióticos, es decir, mediante la participación de los microorganismos presentes en el lugar contaminado, así como también la participación de los procesos abióticos como pueden ser el transporte, dilución, volatilización, sorción, reacciones químicas y otros. La atenuación natural supone una gestión de la biodegradación de los contaminantes sin tener medidas ingenieriles de mejora del proceso. La capacidad de los microorganismos autóctonos de llevar a cabo la biorremediación, debe ser estudiado en el laboratorio donde se incluyan análisis químicos de los contaminantes y otros productos así como también productos que indiquen que se está produciendo biodegradación, requiriendo por tanto una adecuada monitorización del proceso (Madsen, 2002). El tiempo es un factor limitante en el proceso de atenuación natural, ya que la adaptación de la comunidad microbiana puede ser prolongada, dependiendo de la naturaleza de los xenobióticos y además no se puede aplicar en áreas domésticas cercanas al ambiente contaminado (Leahy & Colwell 1990). Este “tratamiento” se ha ido considerando poco a poco como una herramienta para el tratamiento de suelos contaminados (Kuiper et al. 2004).

i.3.b.2 Bioestimulación

En el campo de la bioestimulación la adición de nutrientes al suelo para favorecer la degradación de hidrocarburos, se ha enfocado en la adición de nitrógeno (N) y fósforo

(P), tanto en forma orgánica como en forma inorgánica, ya que el carbono (C) es el mayor constituyente del petróleo (Bento et al. 2005). Más recientemente, se ha estudiado la adición de C en el suelo, mediante la adición de glucosa, biosólidos o compost, para la biodegradación de hidrocarburos (Namkoong, 2002). Existen varias fuentes de nutrientes utilizadas en estudios de bioestimulación, como son los fertilizantes inorgánicos, urea, aserrín, compost, estiércol y biosólidos (Rosenberg et al. 1993; Walworth & Reynolds 1995; Cho et al. 1997; Namkoong 2002). Los biosólidos son una fuente de nutrientes para los microorganismos que participan en la biodegradación (Namkoong 2002; Sarkar et al. 2005).

Sánchez y colaboradores (2000), describieron la atenuación natural como un conjunto de procesos biológicos, químicos y físicos que ocurren de forma natural en el lugar contaminado, lo cual provoca la transformación o destrucción de los contaminantes. En dichos procesos se incluye la sorción, volatilización, dilución y dispersión. Los estudios sugieren que la adición de nutrientes al suelo produce un incremento de la biomasa microbiana, estimulando la biodegradación y por tanto aceleran el proceso de biorremediación (Margesin & Schinner 2001; Duncan et al. 2003; Maki et al. 2003). En todos los estudios antes citados describen la bioestimulación como un proceso que causa un rápido inicio de la biorremediación. Duncan y colaboradores (2003) discuten acerca de la rápida respuesta asociada a la aplicación de fertilizantes, aunque transcurridos 2 años no parecía haber diferencias entre la atenuación natural y la bioestimulación.

i.3.b.3 Bioaumentación

El bioaumentación es un método que se basa en la mejora de la degradación y transformación de xenobióticos mediante la inyección de microbios específicos, que sean capaces de degradar los xenobióticos de interés. Hay muchos microorganismos descritos como herramientas para la mineralización de compuestos recalcitrantes, como son los HAPs, los alifáticos clorinados y aromáticos, así como alcanos de cadena larga (Grosser et al. 1991; Cerniglia 1993; Kastner et al. 1998; Heidelberg et al. 2002). Dichos microorganismos pueden ser silvestres o genéticamente modificados equipados con plásmidos catabólicos que contengan genes relevantes para la degradación de los compuestos contaminantes (King et al. 1990).

Goldstein y colaboradores (1985) informaron sobre cinco posibles razones por las que se puede cometer un error en la inoculación de bacterias autóctonas en el ambiente contaminado. La primera que la concentración del contaminante en el lugar puede ser demasiado baja para el crecimiento de los inóculos. La segunda que la presencia de ciertos compuestos en el ambiente puedan inhibir el crecimiento o la actividad del inóculo. La tercera que el crecimiento de la comunidad de protozoos presentes en el suelo contaminado sea mayor al crecimiento de las bacterias inoculadas, resultando un declive en la población bacteriana. La cuarta razón que el microorganismo inoculado prefiera usar otra fuente de carbono presente en el suelo en vez del contaminante. La quinta donde el inóculo puede que no difunda bien a través del suelo y por tanto se dificulta o imposibilita la biodisponibilidad del contaminante.

Numerosos estudios observan a menudo un descenso en la población exógena que se ha añadido. Existen varias explicaciones para la muerte del microorganismo introducido que pueden ser tanto por causas bióticas como abióticas. Entre las abióticas encontramos fluctuaciones extremas en temperatura, contenido hídrico o sequías, pH y disponibilidad de nutrientes, además de los posibles niveles tóxicos del contaminante presente en el suelo. En el caso de las causas bióticas se encuentran la competencia con los organismos indígenas por los nutrientes, producción de sustancias antagonistas por estos organismos indígenas, así como la actividad depredadora de protozoos y virus bacteriófagos (Aprill y Sims 1990).

i.3.b.5 Fitorremediación

La fitorremediación es un método basado en el uso de plantas para la extracción, secuestro o detoxificación de contaminantes. Este método es especialmente respetuoso con el medio ambiente, conserva la estructura del suelo y además es visualmente atractivo (Khan et al. 2000). Los contaminantes que pueden ser susceptibles de ser tratados con la técnica de fitorremediación son los contaminantes elementales y los contaminantes orgánicos (Meagher, 2000). El grupo referido a los contaminantes elementales se refiere a los metales pesados y radionucleidos (Khan et al. 2000; Clemens et al. 2002; Cobbett & Goldsbrough 2002). Hay una gran variedad de plantas utilizadas para descontaminar los suelos, como la planta del tabaco, los girasoles, la planta de la mostaza, el maíz y otros géneros, utilizadas por presentar la capacidad de

absorber o hiperacumular el contaminante. Por otra parte, el segundo grupo lo forman plantas utilizadas para la descontaminación de compuestos orgánicos, como pueden ser los bifenilos policlorados, compuestos aromáticos, nitroaromáticos o hidrocarburos halogenados (Meagher 2000). Este grupo de contaminantes pueden ser mineralizados utilizando álamos, sauce, alfalfa y diferentes variedades de hierbas forrajeras. La degradación de los contaminantes por parte de las plantas mediante metabolismo está más limitada que la realizada por los microorganismos (Kuiper et al. 2004).

i.3.b.6 Rizorremediación

En muchos casos de fitorremediación son los microorganismos presentes en la rizosfera de las plantas los que realizan la biodegradación del contaminante. Esta contribución de la microbiota asociada a la raíz de la planta en el proceso de biorremediación se conoce como rizorremediación (Anderson et al. 1993; Schwab & Banks 1994). Esto se debe probablemente a la capacidad de las bacterias de colonizar el sistema de raíces. Esta técnica depende de factores primarios y secundarios del metabolismo, del establecimiento, supervivencia e interacciones ecológicas con otros organismos. El uso de las plantas en combinación con los microorganismos ha sido ventajoso ya que causa un incremento de la población microbiana así como también de su actividad metabólica en la rizosfera (Kuiper et al. 2004). Los exudados de las raíces de las plantas estimulan a los microorganismos creando una zona con una gran actividad microbiana. La planta genera exudados que contienen azúcares, ácidos orgánicos, aminoácidos y vitaminas como principales componentes (Vancura y Hovadik, 1965). El efecto estimulador de la rizosfera ha sido reconocido durante muchos años y fue descrito por primera vez por Hiltner (1904), el cual define la rizosfera como la zona del suelo en la cual los microorganismos están influenciados por el sistema de raíces. Y a su vez los microorganismos de la rizosfera también tienen un fuerte impacto sobre la planta, pueden tener la propiedad de estimular el crecimiento de las raíces o bien tener propiedades en cuanto a la inhibición del crecimiento de estas (Campbell y Greaves 1990; Hartmann et al. 2008).

La composición de la población microbiana en la rizosfera depende tanto de la composición de los exudados radiculares como de la especie de planta (Shann y Boyle

1994), el tipo de raíces, la edad de la planta, el tipo de suelo y la historia de este (Anderson et al. 1993). Existen estudios sobre las especies de plantas más adecuadas para la rizorremediación y muestran que existen variedades de hierbas y leguminosas (Kuiper et al. 2001; Qiu et al. 1994; Shann y Boyle 1994).

La decisión de la técnica de biorremediación más efectiva depende de las características de los contaminantes, la toxicidad, la estructura molecular, solubilidad, volatilidad y susceptibilidad al ataque microbiano, así como también el lugar donde se encuentra el contaminante, la geología, la hidrología, el tipo de suelo, el clima y otros.

CAPÍTULO I

CAPÍTULO I

CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS TOLERANTES A LA SEQUÍA 4J27 Y 5J12A PARA SU UTILIZACIÓN EN TÉCNICAS DE BIORREMEDIACIÓN

Introducción

I.1 EL AGUA. FUENTE DE VIDA

El agua constituye más del 80% de la biomasa de la mayoría de los organismos e interviene en la mayor parte de los procesos metabólicos que se realizan en los seres vivos. El agua en el planeta ocupa 3/4 (71%) partes de su volumen. Tal y como se indica en la Figura I.1, de la totalidad de agua en el planeta el 96,5% es agua salada (mares y océanos), mientras que un 2,5% es agua dulce y un 0,9% considerada como otro tipo de aguas saladas. De la totalidad del agua dulce un 68,7% lo ocupan los glaciares y capas de hielo, un 30,1% las aguas subterráneas y un 1,2% aguas superficiales y otras aguas dulces. Este último porcentaje lo componen el hielo subterráneo y permafrost (69%), lagos (20,9%), la humedad del suelo (3,8%), la atmósfera (3%), los pantanos (2,6%), los ríos (0,49%) y los seres vivos (0,26%) (Gleick, 1993).

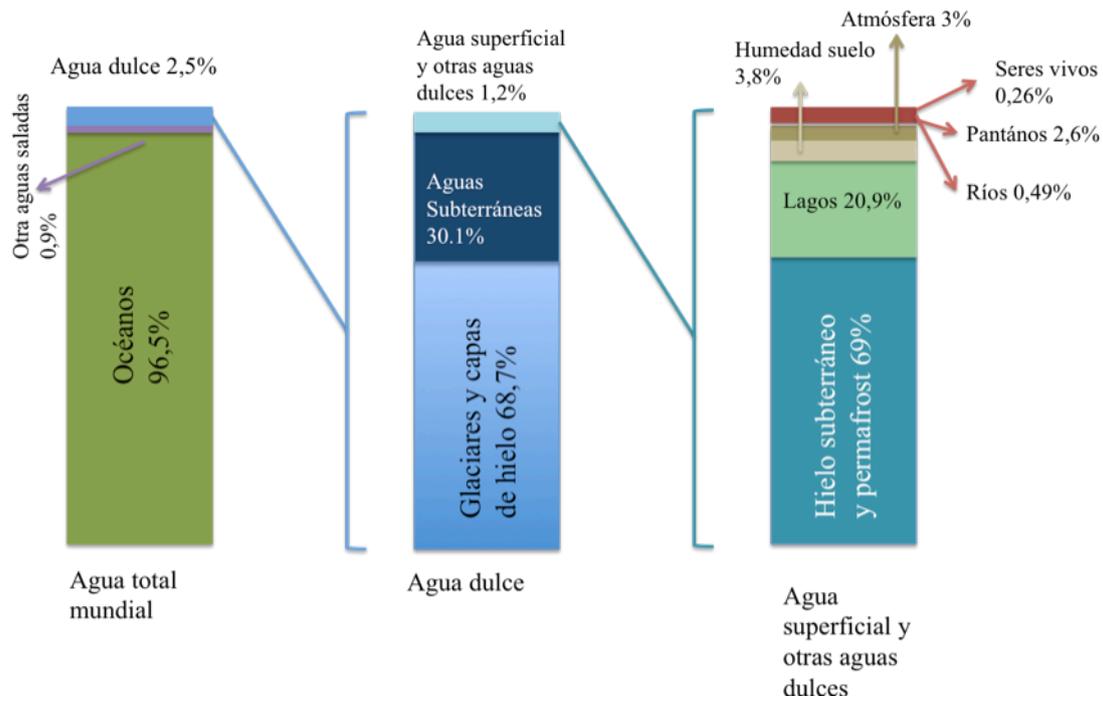


Figura I.1. Distribución del agua en el Planeta Tierra. (Adaptado de Gleick, 1993)

La humedad del suelo y el pH son parámetros conocidos por su especial influencia en la abundancia microbiana y la actividad del suelo. La interacción microbiana en los procesos geoquímicos y los factores ambientales son complejos (Bock et al. 1986). Muchas áreas del planeta sufren pronunciadas sequías de alta intensidad y duración (Figura I.2) (Kindzewicz et al. 2006). La falta de humedad en una variedad de ambientes es conocido por su efecto en la comunidad microbiana, ya que aquellas poblaciones sensibles se verán considerablemente reducidas (Oliver et al. 1991; Vilchez et al. 2008; Vilchez & Manzanera 2011).

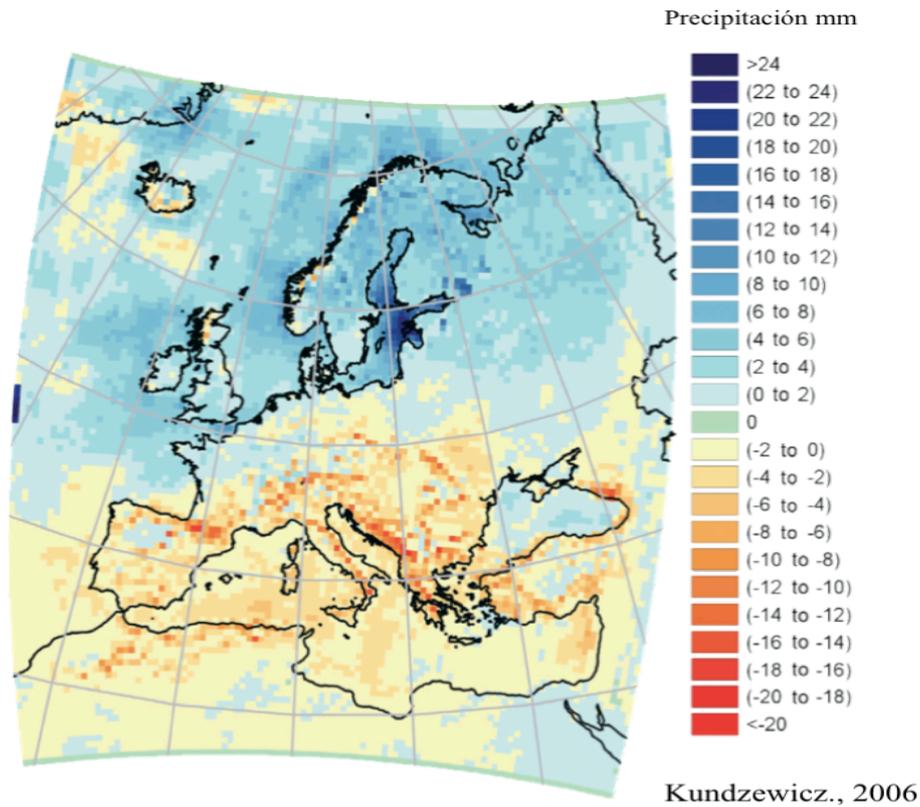


Figura I.2. Diferencia en la precipitación anual (mm) en Europa, entre el periodo control (1961-1990) y proyección futura (2070-2099).

La dinámica del agua y su falta provoca un estrés con gran influencia en la fisiología y función microbiana (Harris 1981; Kempf & Bremer 1998). Sin embargo, existe todavía un debate acerca de cómo el estrés por falta de agua afecta a la comunidad microbiana, su biomasa y su actividad (Williams 2007). La gran mayoría de los ecosistemas sometidos a cortos o largos periodos de sequía, causan en el suelo descensos bruscos en el contenido hídrico. De vez en cuando, el estrés por falta de agua es aliviado por las lluvias o por la irrigación (ecosistemas agrológicos). La desecación y rehidratación del suelo provoca inmediatos cambios en el ciclo de los nutrientes (Sørensen 1974; Saetre & Stark, 2005). Hay por ejemplo una evidencia de que tanto las fuentes microbianas como las no microbianas de carbono (C) contribuyen a los cambios de C y N y a la tasa de mineralización (Schimel et al. 1999; Deneff et al. 2001; Steenwerth et al. 2005; Cosentino et al. 2006). En los ecosistemas semiáridos, los veranos con lluvias provocan una esporádica hidratación en unos pocos centímetros del suelo. Dicha hidratación durante las lluvias causa una

liberación de N, el cual puede ser tomado por las plantas y otros organismos (Saetre & Stark, 2005). Todavía existe un debate acerca de la respuesta abiótica y biótica que puedan explicar los cambios en los procesos del suelo debido a la desecación y rehidratación esporádica (Schimel et al. 1999; Deneff et al. 2001; Steenwerth et al. 2005; Cosentino et al. 2006).

I.2 IMPORTANCIA DEL AGUA EN LA BIORREMEDIACIÓN

La biorremediación de contaminantes orgánicos es dependiente de la cantidad de agua presente en el suelo. El agua es necesaria no sólo para los requerimientos fisiológicos de los microorganismos sino también para el transporte de nutrientes y los productos metabólicos. Además la cantidad de agua presente en el suelo determina el oxígeno en los microambientes del mismo (Barker et al. 1994). Esto implica que para lograr una tasa de biodegradación óptima debe haber una monitorización del contenido hídrico en el suelo. Según Vidali (2001) en nivel de agua requerido para la actividad microbiana está entre el 25 y el 28% de capacidad de retención de agua (Vidali 2001), mientras que Dibble y Bartha (1979) recomiendan un contenido hídrico con valores entre el 30 y el 80% de la capacidad de campo para que sea adecuado para biodegradación en suelo (Dibble & Bartha 1979). Y según Calvo y colaboradores (2009) la humedad del suelo debe estar entre el 50 y 80% de saturación. El nivel de agua existente durante la biodegradación es uno de los que en mayor grado afecta al proceso. En este sentido existe una correlación entre la humedad del suelo y el periodo de remediación (Ayotamuno et al. 2006).

I.3 MICROORGANISMOS TOLERANTES A LA FALTA DE AGUA. ANHIDROBIOSIS

El primero en describir el fenómeno de recuperar un organismo seco tras la adición de agua fue Antony van Leeuwenhoek en 1702. Este proceso fue originalmente denominado como “anabiosis” (volver a la vida), porque se consideraba que el organismo moría y volvía a la vida tras la rehidratación (L. M. Crowe & Crowe 1992; Crowe 2002). En 1959 David Keilin (1959) publicó el termino “anhidrobiosis” para referirse a la “vida sin agua”. Para estos microorganismos la falta de agua se traduce

en una parada en el metabolismo, es decir, en una disminución de energía y por tanto biosíntesis. Un organismo en anhidrobiosis carece de las funciones dinámicas características de los organismos vivos, en este sentido esto no se puede definir como un organismo “sin vida” ni como un organismo muerto, ya que cuando se produce la rehidratación el organismo vuelve tener el estado de un organismo vivo (Crowe & Crowe 1992; Clegg 2001) .

La anhidrobiosis ocurre en muchos organismos, incluido bacteria, levadura, rotíferos, tardígrados, huevos de algunos crustáceos (*Artemia salina*), nemátodos, esporas de hongos, líquenes y algunas plantas. Estos organismos son denominados anhidrobiontes y pueden permanecer en estado seco, mediante una parada del metabolismo (J. H. Crowe & Crowe 1992; Potts 1994; Billi & Potts 2002; Crowe 2002).

A nivel bacteriano, los microorganismos toleran la desecación a diferentes niveles dependiendo de su estado fisiológico, el medio ambiente o el grupo taxonómico entre otros factores. Las bacterias procariotas Gram positivas son los microorganismos más tolerantes a la desecación (Daly et al. 2004).

A parte de las bacterias esporulantes, las Actinobacterias presentan la tolerancia a la desecación más alta, entre las que se encuentran los *Actinomycetes* y los *Coryneformes*. Las actinobacterias usualmente se encuentran en los suelos, encontrándose en suelos muy secos, como por ejemplo el Desierto de Atacama y el Desierto de Taklamakan, entre otros. Además se han encontrado en permafrost, donde el agua no está presente en forma disponible. Por tanto, las Actinobacterias son un filo que presenta bacterias adaptadas a vivir bajo periodos intensos sin agua (Sneath 1962; Gilichinsky et al. 1992).

Narváez-Reinálido y colaboradores (2010) en su trabajo aislaron 5 cepas con una alta tolerancia a la desecación, donde 2 de ellas pertenecían al género *Arthrobacter*.

I.3.a El género *Arthrobacter*

Los miembros del género *Arthrobacter* son metabólica y ecológicamente diverso (J. S. Lee et al. 2003; Lee J. S , Lee K. C 2003; Mongodin et al. 2006), se han encontrado

arthrobacters en una amplia variedad de ambientes, incluido suelo, agua de mar, agua fresca, piel humana, aceite, salmuera, hojas de tabaco, aire, aguas residuales y lodos activos, pinturas, especímenes clínicos y en cianobacterias (Goodfellow et al. 2012). Van Waasbergen y colaboradores (2000) incluso detectaron cepas del género *Arthrobacter* en el sedimento, hasta una profundidad de 170-220 m. Dicho género presenta cepas con la capacidad de sobrevivir en ambientes extremos durante largos periodos de tiempo (Mongodin et al. 2006), como por ejemplo en condiciones de sequía (Boylen 1973; Mongodin et al. 2006).

Arthrobacter crystallopoietes es la única especie del género *Arthrobacter* clasificada como tolerante a la desecación, aún así existen otras cepas no identificadas (*Arthrobacter* spp.) clasificadas como tolerantes, aisladas de ambientes secos, como son suelos secos naturales sujetos a la falta de agua durante varios meses (Robinson et al., 1965; Eppard et al., 1996) o suelos secos artificiales como son los suelos secos en presencia de CaSO₄ (Boylen, 1973).

El género *Arthrobacter* fue propuesto por Conn & Dimmick (1947), modificando el nombre propuesto por Fisher (1895). Conn y Dimmick (1947) clasificaron tres especies del género *Arthrobacter*, la especie *Arthrobacter globiforme*, *Arthrobacter helvolum* y *Arthrobacter tumescens*. Skerman et al. (1980) cambió el nombre de *A. globiforme* por *A. globiformis*, siendo a partir de entonces el nombre utilizado para designar a la especie. Éste género pertenece a la clase Actinobacteria, incluidas como bacterias coreniformes Gram-positivas, con metabolismo aeróbico, no productoras de ácido tras el metabolismo de la glucosa. Presentan un contenido G+C entre 59 y 66 mol% (Stackebrandt & Woese 1981; Jones & Collins 1986; Keddie et al., 1986). La mayoría de las especies del género *Arthrobacter* exhiben un ciclo de vida donde pasan de forma de bacilo a forma de coco cuando se encuentran en medios pobres en nutrientes (Keedy & Jones, 1981). De modo que un cultivo en fase estacionaria (generalmente 2-7 días) está compuesto por células en forma de coco con un diámetro de 0.6-1.0 µm, algunas especies muestran sólo células esféricas a lo largo del ciclo de vida. Los ácidos grasos predominantes son iso y anteiso de cadena ramificada con C_{15:0} anteiso, C_{15:0} iso, C_{17:0} anteiso y C_{16:0} iso. Pocas especies exhiben cantidades significantes de C_{16:0}. El sistema de quinonas está compuesto por menaquinonas completamente insaturadas o mono-saturadas, con una longitud de cadena de 8 a 10 unidades isoprenoides. Los peptidoglicanos de la pared celular son del tipo A3α y

A4 α y contienen lisina con variaciones en el puente interpéptido (Goodfellow et al. 2012).

I.2.b Caracterizaciones de cepas bacterianas

El estudio quimiotaxonómico de géneros y especies bacterianas, constituye uno de los objetivos de la Microbiología, aunque esté menos extendido que otros como las pruebas bioquímicas o la analogía del ADN, resultando de utilidad para la caracterización, y por tanto para una clasificación de especies más completa. Muchos taxónomos consideran que todos los datos válidos posibles deben ser utilizados para determinar la filogenia, es decir la utilización de información fenotípica y genotípica. Dicha información va desde las propiedades moleculares hasta las características ecológicas, de este modo se ha de utilizar pues el mayor número de propiedades como sea posible para obtener resultados más estables y fiables (Prescott et al. 2009).

I.2.b.1 Peptidoglicanos

Los sáculos de glucopéptido (mureína) son un elemento único y esencial en la pared celular de la mayoría de las bacterias. Estos sáculos están constituidos por cadenas de polisacáridos reticulados por péptidos. Los sáculos forman una estructura cerrada que rodea la membrana citoplasmática, donde las cadenas de glicano están compuestas por una secuencia alternante de N-acetil-glucosamina y el ácido N-acetil murámico, unidos mediante enlaces β 1,4 (Figura I.3) (Vollmer et al. 2008).

Hay una gran diversidad en la composición y secuencia de los péptidos en los peptidoglicanos, en las diferentes especies (Vollmer et al. 2008). Dentro de esta diversidad, los organismos corineformes muestran una gran variación de tipos de peptidoglicanos de todas las familias de bacterias que lo componen, entre las que se encuentran A1 γ , A3 γ , A3 α , A4 α , A4 β y A4 γ . Las cepas que poseen la variación de peptidoglicanos A3 α , forman un grupo bastante uniforme, aunque muestran un gran número de puentes interpéptidos diferentes. La mayoría de estas cepas pertenecen al género *Arthrobacter* y son distinguidas por su crecimiento estrictamente aeróbico y un ciclo de vida completo (Schleifer & Kandler 1972).

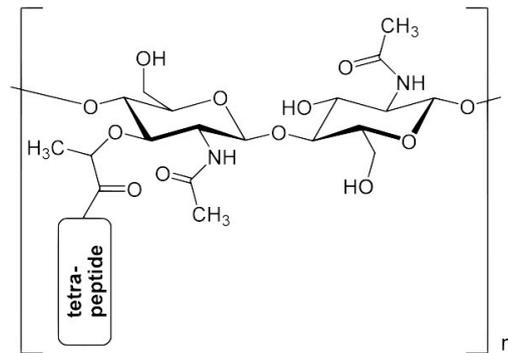


Figura I.3. Hebra de glicano. Se representa una molécula de N-acetil-glucosamina y una de ácido N-acetil murámico unidos mediante enlaces β 1,4 (Vollmer et al. 2008).

I.2.b.2 Ácidos grasos

Los ácidos grasos son biomoléculas de naturaleza lipídica y son uno de los constituyentes más importantes del material celular. En las células bacterianas, los ácidos grasos están principalmente en las membranas de las células como constituyentes acilo de los fosfolípidos (Kaneda 1991). Dichos ácidos grasos unidos mediante enlace éster a una molécula de glicerol, son constituyentes comunes en casi todos los miembros de las *Bacterias* (Tindall et al. 2010).

Cuando se determinan los patrones de ácidos grasos de las cepas, las condiciones de cultivo de dichas cepas han de ser idénticas antes de proceder a la extracción de los ácidos grasos. Aunque puede haber excepciones, ya que existen casos en el que los organismos no pueden cultivarse en las mismas condiciones. Por otra parte, los patrones de ácidos grasos entre los grupos taxonómicos no fluctúa significativamente (Tindall et al. 2010).

I.2.b.3 Menaquinonas

Las quinonas isoprenoides de las bacterias se clasifican en dos grupos estructurales (Figura I.4), las denominadas menaquinonas (vitamina K) (I) y las ubiquinonas (coenzima Q) (Collins et al. 1977). Las menaquinonas y las ubiquinonas son constituyentes de la membrana plasmática de las bacterias (Pennock, 1966) y juegan

un papel importante en el transporte de electrones y en la fosforilación oxidativa (Brodie y Wataabe, 1996; Redfearn, 1966).

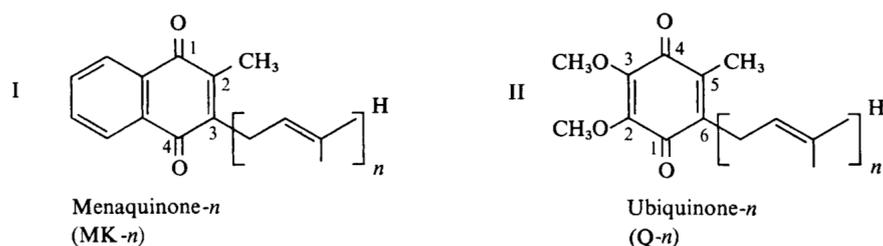


Figura I.4. Estructura principal de las menaquininas y ubiquinonas. (Collins et al. 1977)

En las bacterias *Gram*-positivas, las cadenas laterales de isoprenoides muestran diferentes patrones de hidrogenación (saturación). En algunos casos, la primera posición de saturación es en el segundo doble enlace del isoprenoide (desde el anillo naftoquinone) seguido por la posición tres (Collins, 1985). El grado de saturación y la posición relaciona grupos como los determinados mediante la secuenciación del gen ARNr 16S (Tindall, 2004).

I.2.b.3 El gen ARNr 16S

El análisis del gen ARNr 16S es el método más usado para los estudios de evolución y parentesco microbianos, dado que son moléculas imprescindibles, ya que se encuentra en todos los microorganismos y su papel funcional es el mismo en todos los ribosomas. La estructura del ARNr 16S está altamente conservada y se considera que microorganismos que presentan un 97% o más de similitud en los genes codificantes para ARNr 16S pueden pertenecer a la misma especie. También se acepta que la técnica de hibridación ADN-ADN es una de las más apropiadas para determinar si dos cepas son de la misma especie, cuando el grado de hibridación entre el ADN total de ambas especies supere el 70% (Stackebrandt & Goebel 1994)

El promedio de la tasa de substitución de bases, del gen ARNr 16S, es del 1% cada 50 millones de años. Su estructura se modifica muy lentamente en el tiempo debido probablemente a la función esencial y constante que desempeñan. Los árboles filogenéticos de filos, en base a la secuencia del gen ARNr 16S, hasta ahora no son representativos en términos generales. La técnica de hibridación ADN-ADN

determina si dos cepas son de la misma especie o por el contrario no lo son, es por tanto un buen método para determinar la relación entre taxones estrechamente relacionados, es decir, relaciones entre especies (Prescott et al. 2009).

Resultados

Para mejorar el proceso de biorremediación en condiciones de sequía, nos planteamos el uso de microorganismos con capacidad para tolerar la falta de agua junto con plantas (rizorremediación). Para ello recurrimos a una colección de bacterias tolerantes a la desecación obtenida por nuestro grupo (Narváez-Reinálido et al. 2010). De ésta colección seleccionamos las cepas pertenecientes al género *Arthrobacter* (4J27 y 5J12A), que además de clasificarse como tolerante a la desecación, se identificaron como rizobacterias promotoras del crecimiento en plantas (PGPR, del inglés *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria*) (Vílchez et al. en preparación). Por otro lado, el genoma secuenciado de dichas cepas (Manzanera et al. en preparación), nos permitió identificar genes con homología a aquellos implicados en la degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs). Por ello, para hacer más óptima la inoculación de las cepas en un suelo árido o semiárido contaminado, decidimos estudiar las características fisiológicas, metabólicas y filogenéticas de las cepas del género *Arthrobacter* (4J27 y 5J12A) con más detalle.

I.1. IDENTIFICACIÓN Y RELACIÓN TAXONÓMICA DE LAS CEPAS 4J27 Y 5J12A

I.1.a Identificación taxonómica en base al gen ARNr 16S

Para identificar taxonómicamente y conocer las cepas estrechamente relacionadas con cada una de las cepas 4J27 y 5J12A, se recurrió a la amplificación y secuenciación del gen ARNr 16S. Para la amplificación de dicho gen se aisló previamente el ADN total de las cepas objeto de estudio mediante el sistema QIAquick “Blood and Tissue”. La estrategia de PCR empleada para identificar las cepas seleccionadas se basó en el uso de los oligonucleótidos Fd1 y Rd1 (Weisburg et al. 1991a), tal y como se describe en el apartado M9.c. El producto de esta amplificación se sometió a electroforesis para

estimar su tamaño, grado de pureza y concentración aproximada. Tal y como se observa en la Figura I.5, se obtuvo una banda en el caso de cada cepa como producto de amplificación del tamaño esperado, de aproximadamente 1.500 pb.

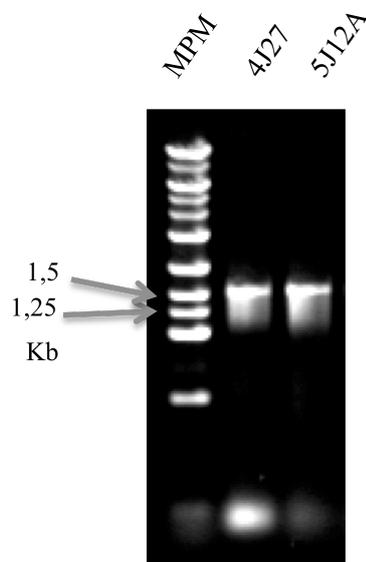


Figura I.5. Electroforesis de la reacción de amplificación del gen ARNr 16S de las cepas 4J27 y 5J12A. La calle nombrada como MPM se corresponde con el marcador de peso molecular, DNA ladder 500 pb-10 kb, de la casa Molecular Biology Laboratory (MBL). Las siguientes calles, nombradas como 4J27 y 5J12A corresponden con el producto de PCR de parte del gen ARNr 16S de cada una de ellas.

Los productos de las PCR se limpiaron para eliminar sales, nucleótidos, Taq polimerasa y oligonucleótidos como paso previo a la secuenciación mediante el sistema comercial QIAquick PCR Purification Kit 50, tal y como se indica en el apartado M9.e.

Tras su limpieza y una vez contrastado el tamaño, calidad y concentración de los amplicones de nuevo, se procedió a la secuenciación de los mismos. En el caso del producto correspondiente a la amplificación del gen ARNr 16S de la cepa 4J27 se logró una lectura de 1.420 pb y al igual que en el caso de 5J12A donde también se logró una secuenciación de 1.420 pb. Dicha secuenciación se realizó utilizando los oligonucleótidos Fd1, Rd2, Fd2 y Rd1 (Weisburg et al. 1991b), tal y como se indica en el apartado M9.e. Para la construcción de ambas secuencias se procedió al ensamblaje del producto de las cuatro secuenciaciones obtenidas de cada uno de los dos amplicones. Dichas construcciones fueron comparadas con todas las secuencias

de las cepas tipo que existen a fecha de 14 de noviembre de 2012 en la base de datos EzTaxon (Kim et al. 2012), mediante el servidor EzBioCloud (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>, Kim et al. 2012), tal y como se indica en el apartado M11. Así se pudo identificar a qué género pertenecían dichas cepas, además de las especies con las que mantenía un mayor porcentaje de identidad. En base a la secuencia del gen ARNr 16S de la cepa 4J27, se observó una máxima similitud con la especie *Arthrobacter phenanthrenivorans* DSM 18606^T, presentando un valor de 99.2%. Por otra parte, en base la secuencia al gen ARNr 16S de la cepa 5J12A, se observó una máxima identidad con la especie *Arthrobacter luteolus* DSM 13067^T, presentando un valor de 99,5% y con la especie *Arthrobacter koreensis* DSM 16760^T, presentando en este caso un valor de 99,4% de identidad.

I.1.b Análisis filogenético en base al gen ARNr 16S

Para establecer las relaciones filogenéticas de las cepas objeto de estudio con las más relacionadas, se realizó una comparación de secuencias del gen ARNr 16S. Esta comparación se realizó mediante la construcción de un árbol filogenético. Para realizar la construcción del árbol filogenético, se alinearon las secuencias parciales de dicho gen de las cepas 4J27 y 5J12A, con las secuencias de las especies más relacionadas del género *Arthrobacter*, según la base de datos EzTaxon, tal y como se indica en el apartado M11. Las distancias evolutivas se calcularon en base al modelo evolutivo de los dos parámetros de Kimura (*Kimura's two-parameters-K2P*) y el árbol filogenético se realizó mediante el método evolutivo del vecino más próximo (*Neighbour-joining*), tal y como aparece en la Figura I.6.

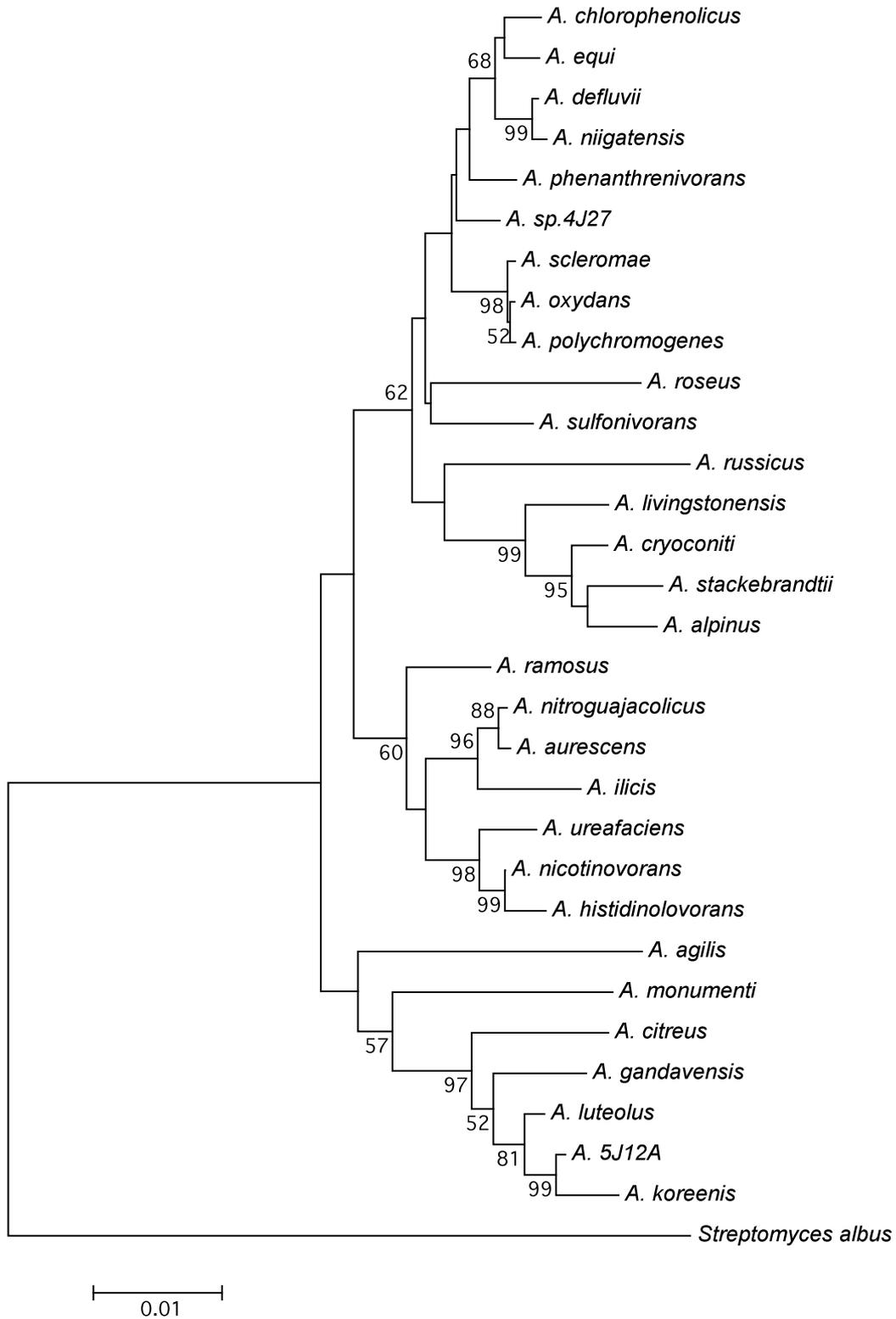


Figura I.6. Árbol filogenético de las cepas 4J27 y 5J12A con las especies más cercanas en base al gen ARNr 16S. Se muestra las relaciones filogenéticas de las cepas 4J27 y 5J12A y las 28 especies más relacionadas, en base a la comparación de secuencias del gen ARNr 16S. *Streptomyces albus* se usó como exogrupo. El número, expresado en porcentaje, de cada bifurcación indica cuantas veces coincide cada especie en esa posición, en base a las 1.000 iteraciones realizadas. Se muestra sólo los valores mayores al 50%. La barra de escala indica 0.01 cambio por cada nucleótido.

El análisis filogenético en base al gen codificante para el ARNr 16S mediante el método del vecino más próximo, mostró que la cepa 4J27 mantenía mayor relación filogenética con la especie bacteriana *Arthrobacter phenanthrenivorans* DSM 18606^T. Por otra parte, la cepa 5J12A mostró mayor relación filogenética con las especies bacterianas *A. koreensis* DSM 16760^T y *A. luteolus* DSM 13067^T. Corroborado con otro árboles realizados con diferentes modelos matemáticos, como son la probabilidad máxima (*Maximum likelihood*) y la mínima evolución (*Minimum evolution*).

I.1.c Hibridación ADN-ADN

Para conocer el grado de asociación filogenética de la cepa 4J27 con respecto a la especie bacteriana *A. phenanthrenivorans* DSM 18606^T, se utilizó la técnica de hibridación ADN-ADN (DDH del inglés *DNA-DNA Hybridization*), para así determinar con cual de las dos mantiene una relación más estrecha. Tal y como se ha indicado en la *Introducción* de esta memoria, mediante dicha técnica se pueden establecer semejanzas entre genomas de forma directa y por tanto, de forma indirecta el grado de similitud taxonómica. Dicha técnica se realizó tal y como se indica en el apartado M10. Los resultados de la DDH indicaron que el ADN aislado de la cepa 4J27 presentó un porcentaje de hibridación del 22,3% con el ADN aislado de la cepa *A. phenanthrenivorans* DSM 18606^T, en un primer estudio, y un 22,6% en un segundo estudio. Según las recomendaciones del comité *ad hoc* para la definición de especies bacterianas (Wayne et al. 1987), dado que los porcentajes de hibridación no superaron el 70% de similitud con la cepa con la que mantiene la relación filogenética más estrecha, *A. phenanthrenivorans* DSM 18606^T, podemos proponer que la cepa 4J27 es una especie diferente a *A. phenanthrenivorans*.

También se realizaron otras hibridaciones con especies que resultaron próximas a la cepa objeto de estudio, según los árboles filogenéticos que fueron realizados con otra metodología, al comienzo del trabajo. Dichas especies fueron *A. oxydans* DMS 20119^T y *A. polychromogenes* DSM 20136^T. De modo que el ADN aislado de la cepa 4J27, presentó un porcentaje de hibridación del 30,04% con el ADN aislado de la cepa *A. oxydans* DMS 20119^T, en un primer ensayo y en un segundo ensayo resultó 22,6%. Sin embargo, el ADN aislado de la cepa 4J27 presentó un porcentaje de

hibridación del 16,7% con la cepa *A. polychromogenes* DSM 20136^T en un primer ensayo, y un 16,8% en un segundo ensayo, tal y como se indica en la Tabla I.1.

Tabla I.1. Porcentaje de hibridación ADN-ADN de la cepa 4J27 con las especies del género *Arthrobacter* más relacionadas. En la primera columna se indica la especie del género *Arthrobacter* con la que se realizó la hibridación ADN-ADN, y en la segunda columna el porcentaje de similitud del estudio de hibridación, donde entre paréntesis se indica la replica del estudio.

% Hibridación ADN-ADN	
	<i>Arthrobacter</i> sp. 4J27
<i>Arthrobacter phenanthrenivorans</i> DSM 18606 ^T	22,3% (22,1)
<i>Arthrobacter oxydans</i> DSM 20119 ^T	30,04% (22,6)
<i>Arthrobacter polychromogenes</i> DSM 20136 ^T	16,7% (16,9)

Igualmente, para conocer el grado de asociación filogenética de la cepa 5J12A con respecto a las especies filogenéticamente más relacionadas *A. luteolus* DSM 13067^T y *A. koreensis* DSM16760^T, se utilizó la técnica de hibridación ADN-ADN, análogamente a como acabamos de describir para la cepa 4J27.

Como resultado de este análisis, el ADN aislado de la cepa 5J12A, presentó un porcentaje de hibridación de 6,3% con la cepa *A. luteolus* DSM 13067^T, en un primer análisis y 7,8% en un segundo análisis. Como resultado de la hibridación del ADN con la especie bacteriana *A. koreensis* DSM 16760^T, se observó un porcentaje de hibridación del 80,9% en un primer estudio y 89,5 en un segundo estudio, tal y como se indica en la Tabla I.2. Así pues según las recomendaciones del comité *ad hoc* para la definición de especies bacterianas (Wayne et al. 1987), la cepa 5J12A no superó el 70% de similitud ADN-ADN con la cepa *A. luteolus* DSM 13067^T, pero dicho porcentaje sí fue superado cuando se hibridó con el ADN aislado de la especie bacteriana *A. koreensis* DSM 16760^T, por lo que se consideró que dicha cepa pertenece a la especie bacteriana *A. koreensis*.

Tabla I.2. Porcentaje de hibridación ADN-ADN de la cepa 5J12A con respecto a las especies del género *Arthrobacter* más relacionadas. Se indica en la primera columna la especie del género *Arthrobacter* con la que se realizó la hibridación ADN-ADN, y en la segunda columna el porcentaje de similitud del estudio de hibridación, donde entre paréntesis se indica la replica del estudio.

% Hibridación ADN-ADN	
	<i>Arthrobacter</i> sp. 5J12A
<i>Arthrobacter koreensis</i> DSM 16760 ^T	80,9% (89,5)
<i>Arthrobacter luteolus</i> DSM 13067 ^T	6,3% (7,8)

II.d Contenido G+C (mol%)

El género *Arthrobacter* fue previamente descrito como Actinobacteria, Gram positiva y con alto contenido en G+C (Keddie et al. 1986; Jones y Keddie 1992), cuyo valor está dentro del rango 59-70 mol% (Keddie et al. 1986). Así pues, el contenido G+C de la de la cepa *Arthrobacter* sp. 4J27 fue 65,3 mol% (SantaCruz-Calvo et al. 2013). Sin embargo, según la bibliografía el contenido G+C de la especie *A. phenanthrenivorans* DSM 18606^T fue de 67,5 mol% (Kallimanis et al. 2009), el de la especie *A. oxydans* DSM 20119^T fue 63,1 mol% y el de la especie *A. polychromogenes* DSM 20136^T fue 62,9 mol% (Kim et al. 2008). Del mismo modo se determinó el contenido G+C de la cepa *A. koreensis* 5J12A el cual fue de 65 mol%. Así, según la bibliografía el contenido G+C de la especie *A. luteolus* DSM 13067^T fue 66 mol% y el de la especie *A. koreensis* DSM16760^T fue 63 ± 2 mol% (Tabla I.3). Por lo tanto, dichas especies estuvieron dentro del rango G+C (mol%) esperado.

Tabla I.3. Contenido G+C (mol%) de las cepas del género *Arthrobacter* objeto de estudio. En la primera columna se indica las cepas *Arthrobacter* sp. 4J27 y sus controles *A. phenanthrenivorans* DSM18606^T, *A. oxydans* DSM20119^T y *A. polychromogenes* DSM20136^T. Además de la cepa *A. koreensis* 5J12A y sus controles *A. luteolus* DSM 13067^T y *A. koreensis* DSM16760^T, en la segunda columna se indica el contenido G+C (mol%) y en la última columna la referencia.

Cepas	Contenido GC (mol%)	Referencia
<i>Arthrobacter</i> sp. 4J27	65,3	(SantaCruz-Calvo et al. 2013)
<i>A. phenanthrenivorans</i> DSM 18606 ^T	67,5	(Kallimanis et al. 2009)
<i>A. oxydans</i> DSM 20119 ^T	63,1	(Huang et al. 2005)
<i>A. polychromogenes</i> DSM 20119 ^T	62,9	(Huang et al. 2005)
<i>A. koreensis</i> 5J12A	65	Este trabajo
<i>A. luteolus</i> DSM 13067 ^T	66	(Wauters et al. 2000)
<i>A. koreensis</i> DSM 16760 ^T	63 ± 2	(Lee et al. 2003)

I2 CARACTERIZACIONES QUIMIOTAXONÓMICAS DE LAS CEPAS BACTERIANAS *Arthrobacter* sp. 4J27 y *Arthrobacter koreensis* 5J12A: QUINONAS RESPIRATORIAS, PEPTIDOGLICANOS, ÁCIDOS GRASOS Y AZÚCARES DE LA PARED CELULAR

Dado que pretendemos utilizar estas cepas del género *Arthrobacter* como herramientas para el desarrollo de sistemas de biorremediación y que por su novedad se desconocen muchas de sus propiedades fisiológicas, decidimos realizar una caracterización quimiotaconómica, fisiológica y fenotípica de las cepas. El estudio quimiotaconómico constituye uno de los objetivos de la Microbiología, resultando de utilidad para la caracterización, y por tanto para una clasificación de especies más completa (Prescott et al. 2009). Estos análisis quimiotaconómicos incluyeron la determinación de los ácidos grasos, menaquinonas, peptidoglicanos, y azúcares de la pared celular.

I2.c Peptidoglicanos

Hay una gran diversidad en la composición y secuencia de los péptidos en los peptidoglicanos de las diferentes especies (Vollmer et al. 2008) de bacterias Gram-positivas (Schleifer & Kandler 1972). El conocimiento de las variadas estructuras de peptidoglicanos y sus posibles implicaciones filogenéticas, contribuye no sólo a la clasificación de las bacterias Gram-positivas, sino también a la clarificación de las relaciones filogenéticas entre procariotas (Schleifer & Kandler 1972).

Los peptidoglicanos se aislaron en el servicio de identificación del *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen*, DSMZ (Braunschweig, Germany), a partir de 3 g de biomasa, preparados en el laboratorio. Sus estructuras se analizaron según el método descrito por Schleifer & Kandler (1972), tal y como se indica en el apartado M8.a. Así pues, la determinación de los peptidoglicanos de la cepa *Arthrobacter* sp. 4J27 por cromatografía bidimensional (2D-TLC) revelaron la presencia de los aminoácidos alanina (Ala), serina (Ser), treonina (Thr), glutamina (Glu) y lisina (Lys), en una proporción molar de 2,8:1,2:1,0:1,0:1,5 y la presencia de los péptidos L-Ala – D-Glu, L-Lys – D-Ala, L-Lys – L-Ser, L-Lys – L-Ser – L-Thr, D-Ala – L-Lys – L-Ser – L-Thr, L-Ser – L-Thr y L-Ala – D-Ala. Tras estos resultados pudimos concluir que la cepa 4J27 contiene un peptidoglicano de tipo A3 α (Schippers-Lammertse et al. 1963) con L-Lys – L-Ser – L-Thr – L-Ala como puente interpeptídico. De igual modo se determinaron los peptidoglicanos de la cepa *A. koreensis* 5J12A, cuya cromatografía reveló la presencia de los aminoácidos alanina (Ala), treonina (Thr), glutamina (Glu) y lisina (Lys), en una proporción molar 3,7:0,6:1,0:0,8 y la presencia de los péptidos L-Ala – D-Glu, L-Lys – D-Ala, L-Lys – L-Thr, D-Ala – L-Lys – L-Thr y L-Ala – L-Ala. Tras dichos análisis pudimos concluir que la cepa 5J12A presentó un peptidoglicano de tipo A3 α con L-Lys – L-Thr – L-Ala₂ como puente interpeptídico.

I2.d Azúcares de la pared celular

La composición de azúcares se considera una característica que también completa la descripción de una cepa a nivel taxonómico. El patrón de componentes aminoacídicos de la pared celular sirve para distinguir grupos taxonómicos grandes como son los

géneros, mientras que las especies dentro de ese grupo pueden distinguirse por el tipo de azúcares y amino azúcares de sus paredes celulares (Cummins & Harris, 1956).

Para determinar que azúcares componían la pared celular de las cepas objeto de estudio, *Arthrobacter* sp. 4J27 y *Arthrobacter koreensis* 5J12A, se utilizaron 15 mg de células liofilizadas, obtenidas tal y como se describe en el apartado 2.a de este capítulo. Dichas células fueron hidrolizadas en H₂SO₄, 1N (2 h a 100°C), como se indica en el apartado M8.a. Los azúcares encontrados en la pared celular del aislado *Arthrobacter* sp. 4J27 fueron galactosa, glucosa, manosa, ribosa y ramnosa. Y los encontrados en la cepa *Arthrobacter koreensis* 5J12A fueron galactosa, ribosa y ramnosa.

I2.a Ácidos grasos

Abel y colaboradores (1963) correlacionaron los tipos de ácidos grasos de la membrana plasmática con la clasificación taxonómica, dado que éstos son un grupo de lípidos ampliamente estudiados y con suficiente diversidad para ser usados en la definición de comunidades microbianas (Bobbie & White 1980). Los ácidos grasos más frecuentemente encontrados en las bacterias están entre C₁₀ y C₂₀ en longitud, siendo los que están entre C₁₅ y C₁₉ los que más prevalecen (Shaw, 1974).

Para determinar la composición en ácidos grasos de las cepas *Arthrobacter* sp. 4J27 y *A. koreensis* 5J12A se necesitaron 30 mg de células liofilizadas para su envío al DSMZ. Las células liofilizadas se obtuvieron mediante siembra por estría de dichas cepas en 5 ml de medio TSA inclinado (pico de flauta), tal y como se indica en el apartado M8.a. Los resultados indicaron que la cepa 4J27 presentaba el siguiente perfil de ácidos grasos, nombrados de mayor a menor: anteiso C_{15:0}, 41,20%; anteiso C_{17:0}, 30,86%; C_{16:0}, 10,21%; iso C_{16:0}, 6,61%; iso C_{15:0}, 4,40%; C_{18:0}, 2,38%; iso C_{17:0}, 1,79%; iso C_{14:0}, 0,83%; C_{14:0}, 0,75%; anteiso C_{19:0}, 0,61% e iso C_{18:0}, 0,36%. Por otra parte, los resultados indicaron que la cepa 5J12A presentaba el siguiente perfil de ácidos grasos, nombrados de mayor a menor: anteiso C_{15:0}, 43,26%; anteiso C_{17:0}, 17,75%; C_{16:0}, 16,72%; iso C_{15:0}, 7,33%; iso C_{16:0}, 5,65%; C_{15:0}, 2,65%; iso C_{17:0}, 1,73%; C_{14:0}, 1,31%; C_{18:0}, 1,30%; iso C_{14:0}, 1,18%; C_{17:0}, 1,11%.

I2.b Menaquinonas

El estudio de los componentes de tipo quinónico es uno de los métodos más utilizados en los estudios taxonómicos. Las quinonas isoprenoides, constituyentes de la membrana plasmática (Pennock, 1966), juegan un papel importante en el transporte electrónico, en la fosforilación oxidativa y en el transporte activo (Brodie & Watanabe, 1966; Redfearn, 1966). Las bacterias corineformes poseen menaquinonas como quinonas isoprenoides. Ya en 1976 se indicaba que los análisis de las quinonas isoprenoides podían proporcionar características para la clasificación de coreniformes y taxones relacionados (Yamada et al. 1976; Collins et al. 1977).

Para el análisis del sistema de transporte de electrones se partieron de 200 mg de células liofilizadas, obtenidas tal y como se describe en el apartado 2.a de este capítulo. Con estas células se realizó la determinación de la composición de menaquinonas, tal y como se indica en el apartado M8.a. Los resultados de estos análisis revelaron que la cepa *Arthrobacter* sp. 4J27 presentaba las siguientes menaquinonas, MK9 (I-H₂), 68%; MK9, 21% y MK8 (I-H₂), 11%. Por otra parte, los análisis de la cepa *Arthrobacter koreensis* 5J12A revelaron la presencia de menaquinonas del tipo MK8 (I-H₂), 62%; MK7 (I-H₂), 20% y MK9 (I-H₂), 18%.

I3. CARACTERIZACIONES FENOTÍPICAS DE LAS CEPAS BACTERIANAS *Arthrobacter* sp. 4J27 y *A. koreensis* 5J12A: CARACTERÍSTICAS METABÓLICAS, ENZIMÁTICAS Y MOTILIDAD

Con objeto de caracterizar a la cepa *Arthrobacter* sp. 4J27 y *A. koreensis* 5J12A a nivel fenotípico se realizaron ensayos de su potencial metabólico, enzimático, de susceptibilidad a antibióticos y de motilidad, así como su actividad catalasa, oxidasa y potencial para reducir nitratos.

I3.a Características metabólicas

Para estudiar qué substratos podrían ser oxidados por las cepas tolerantes a la desecación del género *Arthrobacter* aisladas en nuestro grupo, se realizaron ensayos colorimétricos en base al kit comercial BIOLOG™, tanto para la cepa *Arthrobacter* sp.

4J27 como para la cepa *A. koreensis* 5J12A así como para las cepas taxonómicamente más cercanas a éstas. Para realizar este ensayo procedimos tal y como se describe en el apartado M7.a. Como resultados de este análisis observamos que algunos de los pocillos que contenían ciertos substratos produjeron coloración, derivada de la utilización de esos compuestos como parte del metabolismo de la célula. Otros pocillos no se colorearon tras la adición del cultivo celular, ya que la cepa no fue capaz de metabolizar el substrato que en él se encontraba.

Así pues, las cepas *Arthrobacter* sp. 4J27 y *A. koreensis* 5J12A fueron capaces de metabolizar ciertos compuestos presentes en la placa BIOLOG™, tal y como se indica en la Tabla I.4 mediante un signo positivo (+), así como fue incapaz de metabolizar ciertos compuestos, marcados en dicha tabla con un signo negativo (-). También se representan los resultados del análisis de las especies más relacionadas con la cepa 4J27, *A. phenanthrenivorans* DSM 18606^T, *A. oxydans* DSM 20119^T y *A. polychromogenes* DSM 20136^T. Y las más relacionadas con la cepa 5J12A, *A. luteolus* DSM 13067^T y *A. koreensis* DSM 16760^T.

Tabla I.4. Características metabólicas diferenciales entre las cepas *Arthrobacter* sp. 4J27, *Arthrobacter koreensis* 5J12A y las más relacionadas filogenéticamente. En la primera columna se representa cada uno de los metabolitos, y en el resto de columnas las capacidades metabólicas de las cepas *Arthrobacter* sp. 4J27 y las especies relacionadas. Así como las capacidades enzimáticas de *A. koreensis* 5J12A y sus relacionadas. En gris claro se indica aquellas pruebas donde todas las cepas relacionadas fueron positivas (+) y en gris oscuro aquellas pruebas donde todas las cepas relacionadas fueron negativas (-).

	<i>Arthrobacter</i> sp. 4J27	<i>A. phenanthrenivorans</i>	<i>A. oxydans</i>	<i>A. polychromogenes</i>	<i>A. koreensis</i> 5J12A	<i>A. luteolus</i>	<i>A. koreensis</i>
α-cyclodextrina (A2)	-	-	-	-	-	-	-
β-cyclodextrina (A3)	-	-	-	-	-	-	-
Dextrina (A4)	+	+	+	+	+	+	+
Glicógeno (A5)	-	+	-	+	+	-	+
Inulina (A6)	+	-	-	-	-	-	-
Manan (A7)	-	-	-	-	+	+	+
Tween 40 (A8)	-	-	+	+	+	+	+
Tween 80 (A9)	-	-	-	+	+	+	+
N-acetil-D-glucosamina (A10)	+	+	+	+	-	-	-
N-acetil-D-manosamina (A11)	+	+	+	-	-	-	-
Amigdalina (A12)	-	+	-	-	-	-	-
L-arabinosa (B1)	+	+	+	+	+	+	+
D-arabitol (B2)	-	-	+	-	+	-	+
D-arbulina (B3)	+	-	-	+	-	-	-
D-celobiosa (B4)	+	+	-	+	+	-	+
D-fructosa (B5)	+	+	+	+	+	+	+
L-fucosa (B6)	-	-	-	-	-	-	-
D-galactosa (B7)	+	+	+	+	-	-	-
Ácido D-galacturónico (B8)	+	-	-	-	-	-	-
Gentiobiosa (B9)	-	+	-	+	-	-	-
Ácido D-gluconico (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-galactosida (C9)	-	+	+	-	+	-	-
β-metil D-galactosida (C10)	-	+	-	+	-	-	-
3-metil glucosa (C11)	+	+	+	+	+	-	+
α-metil D-glucosida (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)	+	-	+	+	-	-	-
Sedoheptulosa (D9)	-	-	-	-	-	-	-
D-sorbitol (D10)	+	+	+	+	+	-	+
Estachiosa (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 p-hidroxifenilacético (E1)	+	+	+	+	+	-	+
α-cetoglutarico (E11)	+	-	+	-	-	-	-
Ácido α-cetoalérico (E12)	-	-	+	-	+	+	+

CAPÍTULO I

	<i>Arthrobacter</i> sp. 4J27	<i>A. phenanthrenivorans</i>	<i>A. oxydans</i>	<i>A. polychromogenes</i>	<i>A. koreensis</i> 5J12A	<i>A. luteolus</i>	<i>A. koreensis</i>
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-piroglutamico (G8)	-	+	-	+	+	-	-
L-serina (G9)	-	+	+	+	+	-	+
Putrescina (G10)	-	-	+	+	+	-	-
2,3-butanodiol (G11)	-	-	-	-	+	-	-
Glicerol (G12)	+	+	+	+	+	+	+
Adenosina (H1)	+	+	+	+	+	+	+
2'-deoxiadenosina (H2)	+	-	-	-	+	+	+
Inosina (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)	+	+	+	+	+	+	-

De modo que, la cepa *Arthrobacter* sp. 4J27 y sus relacionadas, *A. phenanthrenivorans* DSM 18606^T, *A. oxydans* DSM 20119^T y *A. polychromogenes* DSM 20136^T fueron capaces de metabolizar las siguientes fuentes de carbono: dextrina, N-acetil-D-glucosamina, L-arabinosa, D-fructosa, D-galactosa, D-manitol 3-metil, glucosa, D-psicosa, D-rafinosa, D-sorbitol, sacarosa, D-xilosa, ácido *p*-hidroxifenilacético, L-alaninamida, glicerol, adenosina y D-L- α -glicerolfosfato. Sin embargo, todas ellas fueron incapaces de metabolizar las siguientes fuentes de carbono: α -cyclodextrina, β -cyclodextrina, manan, m-inositol, D-melibiosa, α -metil D-glucosida, sedoheptulosa, estachiosa, D-tagatosa, ácido γ -hidroxibutírico, ácido D-málico, metil piruvato, mono metil succinato, ácido succinámico, ácido succínico, ácido N-acetil L-glutámico, L-alanil glicina, 2,3-butanodiol, adenosina-5'-monofosfato, uridina-5'-monofosfato, fructosa-6-fosfato y glucosa-6-fosfato.

Por otra parte, la cepa *A. koreensis* 5J12A y las especies relacionadas, *A. luteolus* DSM 13067^T y *A. koreensis* DSM 16760^T, fueron capaces de metabolizar las siguientes fuentes de carbono: dextrina, manan, tween 40, tween 80, L-arabinosa, D-fructosa, α -D-glucosa, D-ribosa, sacarosa, D-xilosa, ácido acético, ácido α -

cetoalérico, lactamida, ácido propiónico, ácido pirúvico, glicerol, adenosina, 2'-deoxiadenosina, inosina, timidina y uridina. Sin embargo, todas ellas fueron incapaces de metabolizar las siguientes fuentes de carbono: α -ciclodextrina, β -ciclodextrina, inulina, N-acetil-D-glucosamina, N-aceil-D-manosamina, amigdalina, D-arbulina, L-fucosa, D-galactosa, ácido D-galacturónico, gentiobiosa, ácido D-glucónico, m-inositol, α -D-lactosa, β -metil D-galactosida, α -metil D-glucosida, β -metil D-glucosida, α -metil D-manosida, salicina, sedoheptulosa, α -cetoglutárico, ácido D-málico, ácido L-málico, metil piruvato, mono metil succinato, ácido succinámico, ácido succínico, L-alaninamida, uridina-5'-monofosfato, glucosa-1-fosfato y glucosa-6-fosfato.

De estos datos se generó un patrón de absorbancia de la cepa *Arthrobacter* sp. 4J27, con respecto a los metabolitos que la cepa oxida y aquellos que por el contrario no metaboliza, tal y como se indica en la Figura I.7. También se representó el patrón de absorbancia, obtenido mediante la misma prueba con las especies bacterianas, con la que mantenía mayor relación, *A. phenanthrenivorans* DSM 18606^T, *A. oxydans* DSM 20119^T y *A. polychromogenes* DSM 20136^T.

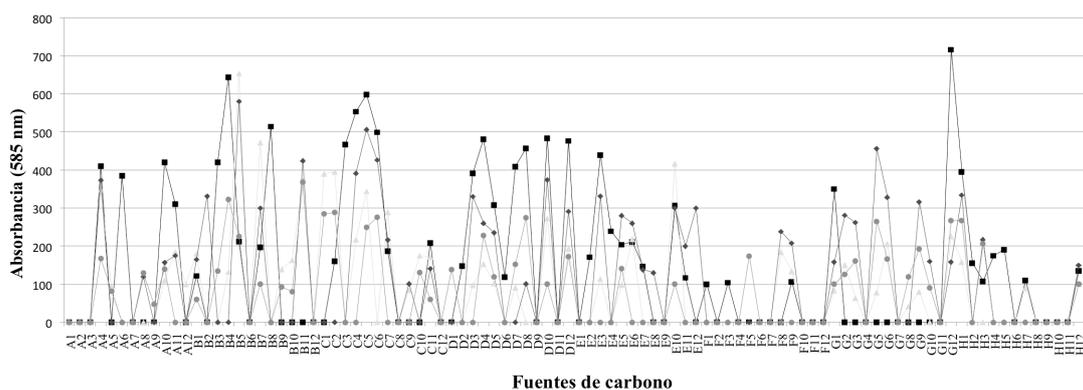


Figura I.7. Patrón de absorbancia de la cepa *Arthrobacter* sp. 4J27, *A. phenanthrenivorans* DSM 18606^T, *A. oxydans* DSM 20119^T y *A. polychromogenes* DSM 20136^T. Se representa en forma de gráfica, la absorbancia a la longitud de onda de 585 nm del cultivo de las cepas *Arthrobacter* sp. 4J27 (cuadrado), *A. phenanthrenivorans* DSM 18606^T (rombo), *A. oxydans* DSM 20119^T (triángulo) y *A. polychromogenes* DSM 20136^T (círculo), en todas las fuentes de carbono contenidas en la microplaca GP2. Se indica en el eje de abscisas las fuentes de carbono, según la nomenclatura de la placa, y en el eje de ordenadas la absorbancia a 585 nm.

Por otra parte, se generó un patrón de absorbancia de la cepa *A. koreensis* 5J12A, con respecto a los metabolitos que la cepa oxida y aquellos que por el contrario no

metaboliza, tal y como se indica en la Figura I.8. También se representó el patrón de absorbancia obtenido mediante la misma prueba, con la especie bacterianas con la que poseía mayor relación filogenética *A. luteolus* DSM 13067^T y *A. koreensis* DSM 16760^T.

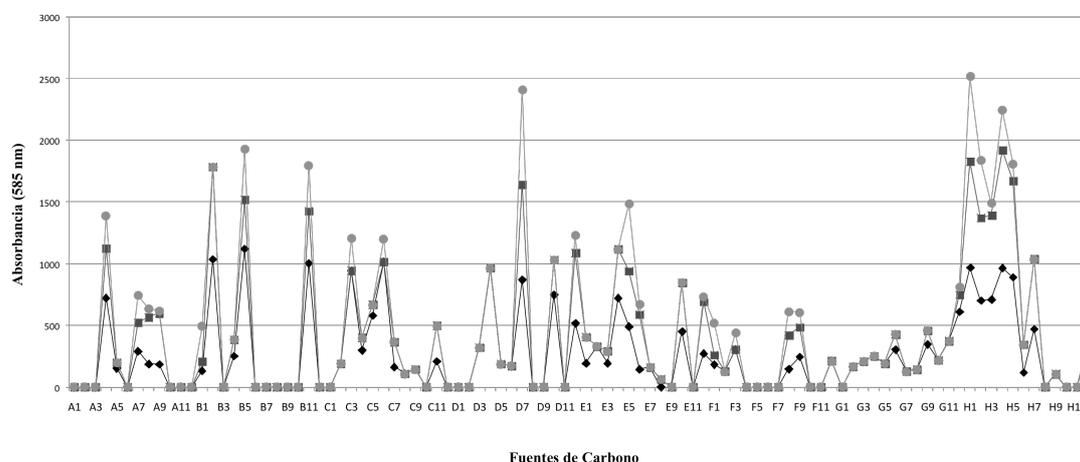


Figura I.8. Patrón de absorbancia de la cepa *A. koreensis* 5J12A, *A. luteolus* DSM 13067^T y *A. koreensis* DSM16760^T. Se representa en forma de gráfica, la absorbancia a la longitud de onda de 585 nm del cultivo de la cepa objeto de estudio, *A. koreensis* 5J12A (rombo), *A. luteolus* DSM 13067^T(cuadrado) y *A. koreensis* DSM 16760^T(círculo), en todas las fuentes de carbono contenidas en la microplaca GP2. Se indica en el eje de abscisas las fuentes de carbono, según la nomenclatura de la placa, y en el eje de ordenadas la absorbancia a 585 nm.

Con todos los datos recogidos de las capacidades metabólicas de las cepas objeto de estudio *Arthrobacter* sp. 4J27 y *A. koreensis* 5J12A, y sus respectivos controles, se generó un dendograma (Figura I.9), tal y como se indica en el apartado 10.a de *Material y Métodos* para así apreciar las relaciones de agrupación entre los datos, y la distancia entre ellos según las relaciones establecidas.

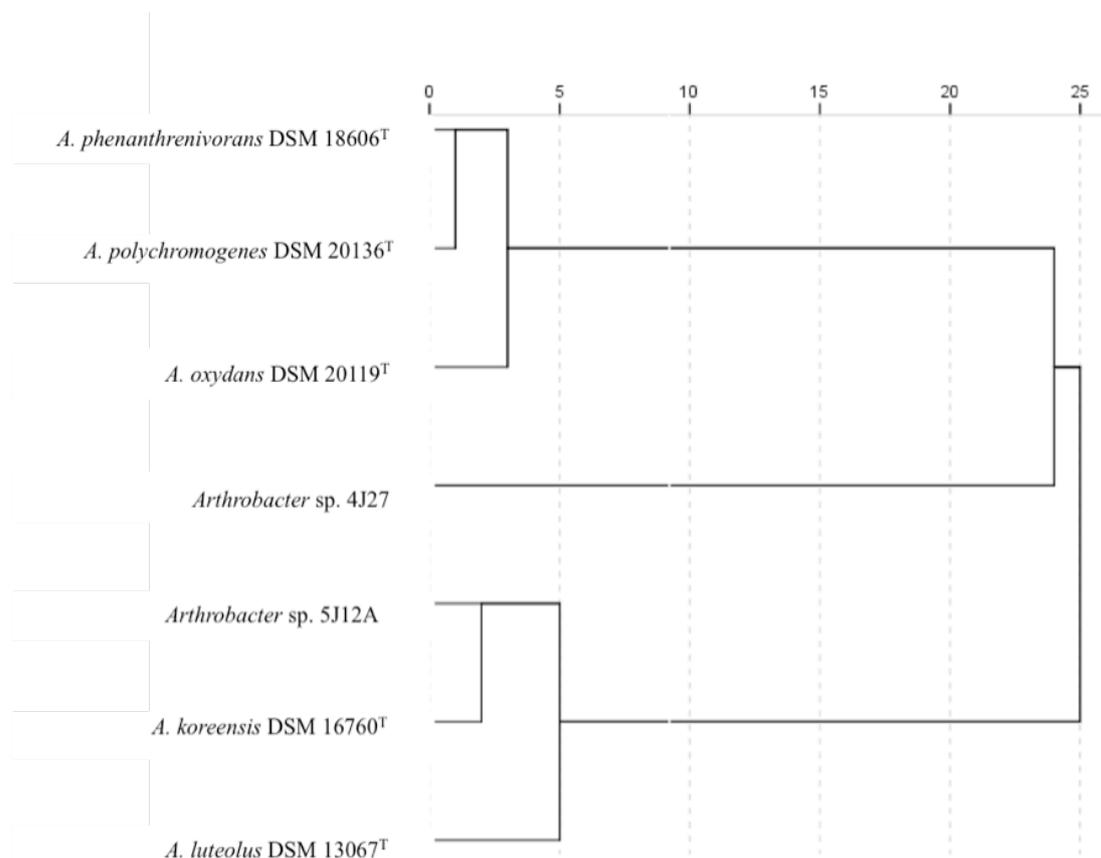


Figura I.9. Relaciones de agrupación entre los datos en forma de dendrograma. Se representa las relaciones de agrupación entre los datos de las capacidades metabólicas, de la cepa *Arthrobacter* sp. 4J27 y sus controles *A. phenanthrenivorans* DSM 18606^T, *A. oxydans* DSM 20119^T y *A. polychromogenes* DSM 20136^T y los datos de la cepa *A. koreensis* 5J12A y sus controles *A. luteolus* DSM 13067^T y *A. koreensis* DSM16760^T.

Según el dendrograma en base a las capacidades metabólicas, se generaron 2 agrupaciones, por una parte encontramos a la cepa *A. koreensis* 5J12A con *A. luteolus* DSM 13067^T y *A. koreensis* DSM 16760^T. Y en la otra agrupación se concentraron la cepa *Arthrobacter* sp. 4J27 y las especies control *A. phenanthrenivorans* DSM 18606^T, *A. oxydans* DSM 20119^T y *A. polychromogenes* DSM 20136^T.

I3.b Ensayos enzimáticos

Con el objeto de determinar algunas de las actividades de las enzimas que presentan las cepas *Arthrobacter* sp. 4J27, *A. koreensis* 5J12A y las cepas taxonómicamente más cercanas, y por tanto qué reacciones se producen a partir de ciertos compuestos, se realizaron distintos tipos de ensayos API. Las tiras API son un sistema

estandarizado para la identificación en 24 horas de diferentes tipos de bacterias, mediante ensayos miniaturizados.

Para este estudio se utilizaron los kits API Coryne, API 20E y API 20NE, cuyas tiras fueron inoculadas con colonias de cada una de las cepas objeto de estudio, provenientes de placas de TSA de 24 horas de crecimiento, tratadas tal y como se indica en las instrucciones del fabricante. Como resultado de estos ensayos, tras 24 horas de incubación, se observaron algunas pruebas positivas, tal y como se indica en Tabla I.5, señaladas con un signo positivo (+) y algunas pruebas negativas, señaladas con un signo negativo (-).

Tabla I.5. Características enzimáticas diferenciales entre la cepa *Arthrobacter* sp. 4J27, la cepa *A. koreensis* 5J12A y las más relacionadas del género *Arthrobacter*. En la primera columna se indica cada una de las pruebas enzimáticas contenidas en las tiras API y en el resto de columnas se indican las capacidades enzimáticas de las cepas *Arthrobacter* sp. 4J27 y las especies relacionadas. Así como las capacidades enzimáticas de *A. koreensis* 5J12A y sus relacionadas. En gris claro se indica aquellas pruebas donde todas las cepas relacionadas fueron positivas (+) y en gris oscuro aquellas pruebas donde todas las cepas relacionadas fueron negativas (-).

	<i>Arthrobacter</i> sp. 4J27	<i>A. phenanthrovorans</i>	<i>A. oxydans</i>	<i>A. polychromogenes</i>	<i>A. koreensis</i> 5J12A	<i>A. luteolus</i>	<i>A. koreensis</i>
Reducción de nitratos en nitritos	-	+	+	+	+	-	+
Reducción de nitratos en nitrógeno	+	-	-	-	-	-	-
Formación de indole (triptofano)	-	-	-	-	-	-	-
Fermentación glucosa	-	-	-	-	-	-	-
Arginina dihidrolasa	-	-	-	-	-	-	-
Ureasa	-	-	-	-	-	-	-
Hidrólisis esulina	-	-	+	-	-	-	-
Hidrólisis gelatina	-	-	-	-	-	-	-
p-NitroFenil-betaD-Galactopiranosidasa	+	+	+	+	-	-	-
Asimilación glucosa	+	+	+	+	+	+	+
Asimilación arabinosa	+	-	+	+	+	+	+
Asimilación manosa	+	+	+	+	+	+	+
Asimilación manitol	+	+	+	+	+	+	+
Asimilación N-Acetil-Glucosamina	+	+	+	+	+	+	+
Asimilación maltosa	+	+	+	+	+	+	+
Asimilación gluconato potásico	+	+	+	+	+	+	+
Asimilación ácido capríco	-	-	-	-	-	-	-
Asimilación ácido adipico	-	-	-	-	+	+	+
Asimilación malata	+	+	+	+	+	+	+
Asimilación citrato trisódico	+	+	-	+	+	+	+
Asimilación ácido fenilacético	-	-	-	-	+	+	+
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+
Citocromo oxidasa	-	-	-	-	-	-	-
orto-NitroFenil-betaD-Galactopiranosidasa	-	-	-	-	-	-	-
Arginina-dihidrolasa	-	-	-	-	-	-	-
Lisina decarboxilasa	-	-	-	-	-	-	-
Ornitina decarboxilasa	-	-	-	-	-	-	-
Utilización del citrato	-	-	-	-	-	-	-
Producción de H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-
Ureasa	-	-	-	-	-	-	-
Triptofano desaminasa	-	-	-	-	-	-	-
Producción de indole	+	+	+	+	+	+	+
Producción de acetoina (Voges Proskauer)	+	+	-	-	+	-	+
Gelatinasa	-	-	-	-	-	-	-
Fermentación/oxidación glucosa	+	+	+	+	+	+	+
Fermentación/oxidación manitol	+	+	+	+	+	+	+
Fermentación/oxidación inositol	+	+	+	+	+	+	+
Fermentación/oxidación sorbitol	+	+	+	+	+	+	-
Fermentación/oxidación rhamnosa	+	+	+	+	-	+	+
Fermentación/oxidación sacarosa	+	+	+	+	-	+	-
Fermentación/oxidación melibiosina	+	+	+	+	-	+	-
Fermentación/oxidación amygdalina	+	+	+	+	-	+	+
Fermentación/oxidación arabinosa	+	+	+	+	-	+	-

CAPÍTULO I

Reducción de nitratos	-	+	+	+	+	+	+	+
Pirazinamidas	+	+	+	+	+	+	+	+
Pirolidonil Arlamidasa	-	-	-	-	-	-	-	-
Fosfatasa alcalina	-	+	-	-	-	-	-	+
β -glucuronidasa	+	-	-	-	-	-	-	-
β -galactosidasa	+	+	+	+	+	-	-	-
α -glucosidasa	+	+	+	+	+	-	-	-
N-acetil- β -glucosaminidasa	-	-	-	-	-	-	-	-
β -glucosidasa (esculina)	+	-	+	+	+	-	-	-
Ureasa	-	-	-	-	-	-	-	-
Hidrólisis gelatina	-	-	-	-	-	-	-	-
Fermentación glucosa	-	-	-	-	-	-	-	-
Fermentación ribosa	-	-	-	-	-	-	-	-
Fermentación xilosa	-	-	-	-	-	-	-	-
Fermentación manitol	-	-	-	-	-	-	-	-
Fermentación maltosa	-	-	-	-	-	-	-	-
Fermentación lactosa	-	-	-	-	-	-	-	-
Fermentación sacarosa	-	-	-	-	-	-	-	-
Fermentación glicógeno	-	-	-	-	-	-	-	-

De modo que destacamos que la cepa *Arthrobacter* sp. 4J27 y las especies relacionadas *A. phenanthrenivorans* DSM 18606^T, *A. oxydans* DSM 20119^T, *A. polychromogenes* DSM 20136^T, resultaron todas positivas en las siguientes pruebas enzimáticas: β -galactosidasa (*p*-NitroFenil- β D-Galactopiranosidasa), asimilación glucosa, asimilación manosa, asimilación manitol, asimilación N-acetil-glucosamina, asimilación maltosa, asimilación gluconato potásico, asimilación malata, catalasa, producción de indol, fermentación/oxidación de la glucosa, manitol, inositol, sorbitol, ramnosa, sacarosa, melibiosa, amigdalina así como de la arabinosa, reducción de nitratos, pirazinamidas, β -galactosidasa y α -glucosidasa. Sin embargo, dichas cepas resultaron negativas en las siguientes pruebas: formación de indol (triptofano), fermentación glucosa, arginina dihidrolasa, ureasa, hidrólisis gelatina, asimilación ácido cáprico, asimilación ácido adípico, asimilación ácido fenilacético, citocromo oxidasa, β -galactosidasa (orto-NitroFenil- β D-Galactoprianosidasa), arginina-dihidrolasa, lisina decarboxilasa, ornitina decarboxilasa, utilización del citrato, producción de H₂S, ureasa, triptofano desaminasa, celatinasa, pirolidonil, arlamidasa, ureasa, hidrólisis gelatina, así como la fermentación glucosa, ribosa, xilosa, manitol, maltosa, lactosa, sacarosa y glicógeno.

Por otra parte, la cepa *A. koreensis* 5J12A y las cepas filogenéticamente más relacionadas *A. luteolus* DSM 13067^T y *A. koreensis* DSM16760^T, resultaron positivas en las siguientes pruebas enzimáticas: reducción de nitratos a nitrito, asimilación glucosa, arabinosa, manosa, manitol, N-acetil-glucosamina, maltosa, gluconato potásico, ácido adípico, malata, citrato trisódico, así como ácido fenilacético, además de catalasa. Sin embargo, dichas cepas resultaron negativas en las siguientes pruebas: reducción de nitratos en nitrógeno, formación de indol (triptofano), fermentación glucosa, arginina dihidrolasa, ureasa, hidrólisis esculina,

hidrólisis gelatina, β -galactosidasa (*p*-NitroFenil-betaD-galactopiranosidasa), asimilación ácido cáprico, citocromo oxidasa, β -galactosidasa (orto-NitroFenil- β D-Galactopiranosidasa), arginina-dihidrolasa, lisina decarboxilasa, ornitina decarboxilasa, utilización del citrato, producción de H₂S, ureasa, triptófano desaminasa, gelatinasa, pirolidonil arilamidasa, β -glucuronidasa, β -galactosidasa, α -glucosidasa, N-acetil- β -glucosaminidasa, β -glucosidasa (esculina), ureasa, hidrólisis gelatina, fermentación glucosa, ribosa, xilosa, manitol, maltosa, lactosa, sacarosa, así como glicógeno.

Con todos los datos recogidos de las capacidades enzimáticas de las cepas objeto de estudio *Arthrobacter* sp. 4J27 y *Arthrobacter koreensis* 5J12A, y sus respectivos controles, se generó un dendograma, tal y como se indica en la Figura I.10, para así apreciar las relaciones de agrupación entre los datos, y la distancia entre ellos según las relaciones establecidas.

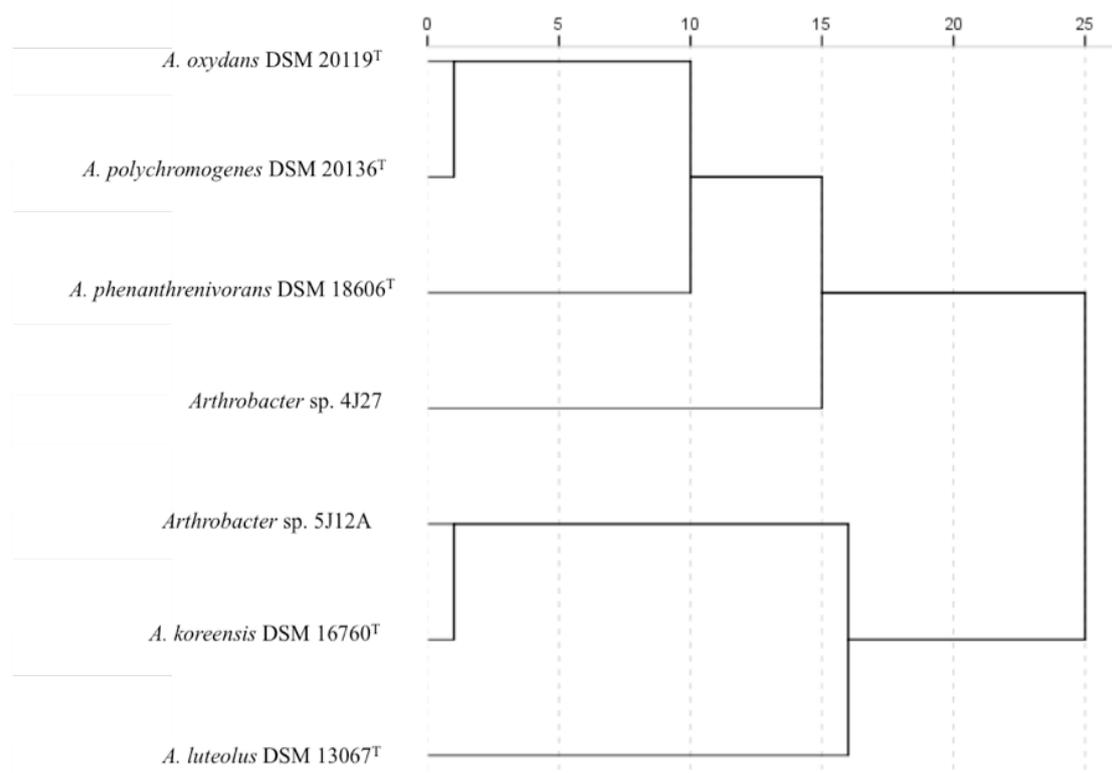


Figura I.10. Relaciones de agrupación entre los datos en forma de dendograma. Se representa las relaciones de agrupación entre los datos de las capacidades enzimáticas, de la cepa *Arthrobacter* sp. 4J27 y sus controles *A. phenanthrenivorans* DSM 18606^T, *A. oxydans* DSM 20119^T y *A.*

polychromogenes DSM 20136^T y los datos de la cepa *A. koreensis* 5J12A y sus controles *A. luteolus* DSM 13067^T y *A. koreensis* DSM16760^T.

Según el dendograma en base a las capacidades enzimáticas, se generaron 2 agrupaciones, por una parte se encontraban las cepas *Arthrobacter* sp. 4J27, con sus controles *A. phenanthrenivorans* DSM 18606^T, *A. oxydans* DSM 20119^T y *A. polychromogenes* DSM 20136^T y por otra parte se concentraron la cepa 5J12A con sus controles *A. luteolus* DSM13067^T y *A. koreensis* DSM16760^T.

I3.c Susceptibilidad a antibióticos

Siguiendo con la caracterización de la cepa a nivel fenotípico, analizamos la sensibilidad de las cepas *Arthrobacter* sp. 4J27 y *Arthrobacter koreensis* 5J12A, presentaba a ciertos antibióticos. La caracterización del perfil de resistencia o sensibilidad a antibióticos nos permitirá realizar seguimientos o introducir marcadores genéticos a estas cepas para posteriores estudios de colonización de distintos ambientes. Dicho análisis de sensibilidad o antibiograma, mediante el uso de discos de difusión, está basado en el trabajo de Bauer y colaboradores (1966) y es uno de los métodos que el Comité Nacional de Normas de Laboratorios Clínicos (NCCLS) recomienda para la determinación de la sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos. Este ensayo se realizó tal y como se indica en el apartado M7.e, y se basa en el uso de un disco con el antibiótico dispuesto sobre el cultivo, el cual causa una zona de inhibición en el crecimiento microbiano. En este tipo de ensayos se considera que si el diámetro del halo es de 30-35 mm o más, usualmente es indicativo de que la cepa es susceptible. Pero si el diámetro es de 15-20 mm o inferior, es indicativo de que la cepa es resistente (Piddock, 1990). Los antibióticos se utilizaron a las concentraciones finales indicadas en µg/ml: estreptomocina (Sm), 25; rifampicina (Rif), 30; cloramfenicol (Cm), 50; kanamicina (Km), 30; tetraciclina (Tc), 10. Los resultados de estos ensayos se muestran en la Tabla I.6, donde se observa que las cepas *Arthrobacter* sp. 4J27 y *A. koreensis* 5J12A fueron sensibles a todos los antibióticos ensayado.

Tabla I.6. Susceptibilidad a antibióticos. Se presenta en la primera columna el antimicrobiano utilizado, en la segunda columna la carga del disco ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$), y en la tercera y cuarta el diámetro (mm) del halo de inhibición de las cepas *Arthrobacter* sp. 4J27 y *Arthrobacter koreensis* 5J12A respectivamente.

Antimicrobiano	Carga del disco ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Diámetro del halo de inhibición (mm)	
		<i>Arthrobacter</i> sp. 4J27	<i>Arthrobacter koreensis</i> 5J12A
Estreptomina	25	157 \pm 12	183 \pm 21
Rifampicina	30	347 \pm 6	307 \pm 21
Cloramfenicol	50	340 \pm 10	388 \pm 10
Kanamicina	30	150 \pm 0	147 \pm 6
Tetraciclina	10	157 \pm 0	156 \pm 0

I3.d Motilidad y pruebas de reducción de nitratos, catalasa y oxidasa

Los procariotas capaces de moverse lo pueden hacer por varios sistemas, dentro de los cuales el mejor estudiado es el uso de flagelos. Los flagelos bacterianos son apéndices filamentosos extracelulares largos y helicoidales, responsables del desplazamiento en medios líquidos de la mayor parte de las eubacterias móviles. Para determinar la movilidad de las cepas objeto de estudio, se utilizó el medio manitol-movilidad, tal y como se indica en el apartado M7.c. Como control positivo de la prueba de motilidad se utilizó a *Escherichia coli* (HB101) (Faddin, 2003), tal y como se indica en el apartado 1 de *Material y Métodos*. De este modo, tras 24 horas de incubación en el medio específico, se pudo observar que la cepa *Arthrobacter* sp. 4J27 no mostró motilidad aparente en el análisis, ya que no se observó crecimiento más allá de la siembra en picadura. Igualmente no se observó motilidad aparente para la cepa *A. polychromogenes* DSM 20136^T, mientras que las cepas más cercanas *A. phenanthrenivorans* DSM 18606^T y *A. oxydans* DSM20119^T sí presentaron capacidad para moverse. Del mismo modo, la cepa *A. koreensis* 5J12A no presentó crecimiento más allá de la siembra en picadura, al igual que las cepas taxonómicamente más cercanas *A. luteolus* DSM 13067^T, sin embargo la cepa *A. koreensis* DSM 16760^T sí presentó capacidad para el movimiento.

Para seguir con la caracterización fenotípica de las cepas objeto de estudio, se analizaron las actividades enzimáticas nitrato reductasa, oxidasa y catalasa, en el mismo medio manitol-movilidad. De este modo, se determinó la capacidad de la cepa de reducir el nitrato a nitrito, es decir, si ésta presentaba la enzima nitrato reductasa. Para ello, se añadió al medio manitol-movilidad los reactivos Griess-Ilosvay A (α -naftilamina al 0,5%) y B (ácido sulfanílico al 0,8%), tal y como se indica en el apartado M7.c. Según el ensayo la cepa objeto de estudio *Arthrobacter* sp. 4J27 y sus controles *A. oxydans* DSM20119^T y *A. polychromogenes* DSM 20136^T resultaron incapaz de reducir nitrato, a diferencia de la cepa control *A. phenanthrenivorans* DSM 18606^T, la cual si presentó la capacidad de reducir nitrato a nitrito. Por otro lado, tanto la cepa *A. koreensis* 5J12A como sus controles *A. luteolus* DSM 13067^T y *A. koreensis* DSM 16760^T, fueron capaces de reducir nitrato. Con la adición de dichos reactivos también fue posible determinar que la cepa *Arthrobacter* sp. 4J27 fue capaz de metabolizar el manitol (confirmado en ensayos anteriores, apartado 3.a y 3.b de este capítulo), al igual que sus controles *A. phenanthrenivorans* DSM 18606^T, *A. oxydans* DSM20119^T y *A. polychromogenes* DSM 20136^T. Igualmente la cepa *A. koreensis* 5J12A y sus controles *A. luteolus* DSM 13067^T y *A. koreensis* DSM 16760^T, fueron capaces de metabolizar en manitol (confirmado en ensayos anteriores, apartado 3.a y 3.b de este capítulo).

La enzima citocromo C oxidasa o complejo IV, permite distinguir entre diferentes grupos de organismos (Steel 1961; Bascomb & Manafi 1998). Ésta es una enzima presente en la cadena de transporte de electrones, de la membrana plasmática. De este modo para determinar si las cepas *Arthrobacter* sp. 4J27 y *A. koreensis* 5J12A, así como las cepas taxonómicamente más cercanas presentaban dicha enzima, se adicionó a una colonia el reactivo de Kovac's, tal y como se indica en el apartado M6.c. Como control positivo se utilizó la cepa *E. coli* HB101, ya que presenta actividad oxidasa positiva (Faddin, 2003) y como control negativo se consideró a la cepa *Staphylococcus aureus* NCTC 12035, puesto que no posee la enzima citocromo C oxidasa (Messina et al. 2002). Así, tras la adición de dicho reactivo no se observó el cambio de color a púrpura intenso en ninguna de las cepa ensayadas, *Arthrobacter* sp. 4J27 y *A. koreensis* 5J12A. Como era de esperar el control positivo, *E. coli* HB101, presentó actividad oxidasa positiva a diferencia del control negativo, *S. aureus* NCTC 12035, que no presentó dicha actividad.

La enzima catalasa se encuentra con frecuencia entre los organismos aerobios para eliminar H_2O_2 (subproducto de muchas reacciones metabólicas). Dicha enzima es utilizada para la identificación de organismos. La familia Micrococcaceae a la que pertenece el género *Arthrobacter*, presentan actividad catalasa positiva (Bascomb & Manafi, 1998). Para comprobar si la cepa objeto de estudio, presentaba actividad catalasa se añadió a una colonia aproximadamente 2 gotas de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 3% (v/v), tal y como se describe en el apartado M6.c. De modo que, se utilizó como control positivo la cepa *E. coli* HB101 por presentar actividad catalasa positiva (Faddin, 2003). Nuevamente se utilizó la cepa *S. aureus* KCTC 12035 como control negativo, por no presentar actividad catalasa (Messina et al. 2002). Tras dicha adición se observó que la cepa *Arthrobacter* sp. 4J24 y *A. koreensis* 5J12A, así como las cepas taxonómicamente más cercanas produjeron burbujas, por lo que se consideraron como cepas con actividad catalasa positiva. Como era de esperar el control positivo, *E. coli* HB101, presentó actividad catalasa positiva, a diferencia del control negativo, *S. aureus* KCTC 12035, que presentó actividad catalasa negativa.

I4. ESTUDIO DEL CRECIMIENTO EN FUNCIÓN DE PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS

Para continuar con la caracterización de las cepas *Arthrobacter* sp. 4J27 y *A. koreensis* 5J12A y dado que el fin último es la producción industrial de estas cepas en caso de poder utilizarse como herramientas en procesos de biorremediación, se decidió estudiar los parámetros fisicoquímicos más relevantes en el crecimiento bacteriano. Para estos estudios se determinaron los rangos de temperatura, pH y concentración de NaCl a las que las cepas *Arthrobacter* sp. 4J27 y *A. koreensis* 5J12A y las cepas taxonómicamente más cercanas proliferan, así como las condiciones a las que el crecimiento estaba impedido.

I4.a Caracterización de la temperatura máxima tolerada y mínima inhibitoria

El objetivo de este ensayo fue identificar tanto la temperatura máxima tolerada como la temperatura mínima inhibitoria, para el crecimiento de las cepas objeto de estudio, *Arthrobacter* sp. 4J27 y sus controles *A. phenanthrenivorans* DSM 18606^T, *A.*

oxydans DSM 20119^T y *A. polychromogenes* DSM 20136^T y la cepa *A. koreensis* 5J12A y sus controles *A. luteolus* DSM 13067^T y *A. koreensis* DSM 16760^T.

Para caracterizar la temperatura máxima, por encima de la cual no se produce un crecimiento aparente de las cepas objeto de estudio, se procedió tal y como se indica en el apartado M3.1. De este modo, se observó que la cepa *Arthrobacter* sp. 4J27 proliferó a las temperaturas de 30 y 35°C, pero no se observó aumento de la absorbancia cuando los cultivos se incubaron a 40, 45 y 50°C, al igual que ocurrió con las cepas control *A. phenanthrenivorans* DSM 18606^T, *A. oxydans* DSM20119^T y *A. polychromogenes* DSM 20136^T. De igual modo, se realizó el ensayo enfocado a caracterizar la temperatura máxima, por encima de la cual no se produce un crecimiento aparente de la cepa *A. koreensis* 5J12A, así pues como se puede observar en la Tabla I.7 esta proliferó a las temperaturas de 30, 35 y 40°C, a diferencia de sus controles *A. luteolus* DSM 13067^T y *A. koreensis* DSM 16760^T, que no fueron capaces de crecer a la temperatura de 40°C, pero si a 30 y 35°C.

Análogamente, para identificar la temperatura mínima aproximada, por debajo de la cual no se registró aumento aparente de la absorbancia, se procedió tal y como se indica en el apartado M3.2. En este caso, la cepa *Arthrobacter* sp. 4J27 proliferó a las temperaturas de 15 y 20°C, pero no se observó aumento aparente de la absorbancia, a las temperaturas de 5 y 10°C, sin embargo, la cepa *A. phenanthrenivorans* DSM 18606^T fue capaz de crecer a todas las temperaturas ensayadas, pero *A. oxydans* DSM 20119^T sólo fue capaz de crecer a la temperatura mínima de 20°C y *A. polychromogenes* DSM 20136^T a las temperaturas mínimas de 10, 15 y 20°C. De igual modo, se realizó el ensayo enfocado a caracterizar la temperatura mínima, por debajo de la cual no se produjo un crecimiento aparente de la cepa *A. koreensis* 5J12A y sus controles. Así pues como se puede observar en la Tabla I.7, ésta proliferó a las temperaturas de 15 y 20°C, pero no a las temperaturas mínimas de 5 y 10°C, a diferencia de sus controles *A. luteolus* DSM 13067^T y *A. koreensis* DSM 16760^T, que no fueron capaces de crecer a las temperaturas de 5, 10 ni 15°C, pero si a 20°C.

Los registros más altos de absorbancia (Abs_{600nm} 8,7), se observaron cuando el cultivo de la cepa *Arthrobacter* sp. 4J27 se incubó a 30°C, por lo que estimamos que la temperatura óptima de crecimiento está en torno a esta temperatura. Sin embargo, los para *A. koreensis* 5J12A los valores más elevados de absorbancia se registraron a

40°C, por lo que estimamos que la temperatura óptima de crecimiento está en torno a esta temperatura (Tabla I.7).

Tabla I.7. Características distintivas de las cepas bacterianas según la temperatura máxima y mínima. En la tabla se representa con signo positivo (+) el aumento significativo de la absorbancia de los cultivos de las distintas cepas, y se representa con doble signo positivo (++) la temperatura a la cual se registró la absorbancia más alta. Por el contrario se representó con signo negativo (-) cuando no se observó aumento aparente en la turbidez tras un periodo de 24 h.

Cepas	Temperatura (°C)								
	5	10	15	20	30	35	40	45	
<i>Arthrobacter</i> sp. 4J27	-	-	+	+	++	+	-	-	
<i>A. penanthrenivorans</i> DSM 18606 ^T	+	+	+	+	+	++	-	-	
<i>A. oxydans</i> DSM 20119 ^T	-	-	-	+	++	+	-	-	
<i>A. polychromogenes</i> DSM 20136 ^T	-	+	+	++	+	+	-	-	
<i>A. koreensis</i> 5J12A	-	-	+	+	+	+	++	-	
<i>A. luteolus</i> DSM 13067 ^T	-	-	-	+	++	+	-	-	
<i>A. koreensis</i> DSM 16760 ^T	-	-	-	+	+	++	-	-	

I4.b Caracterización del pH máximo tolerado y mínimo inhibitorio

Con objeto de identificar el pH máximo tolerado y el mínimo inhibitorio, para el crecimiento de las cepas *Arthrobacter* sp. 4J27 y *A. koreensis* 5J12A, así como las especies taxonómicamente más relacionadas, se planteó como primer paso la caracterización de la concentración máxima a la cual se produce crecimiento aparente de la cepa, de modo que se procedió tal y como se indica en el apartado M3.2. De modo que, tras la realización de dicho ensayo, tal y como se refleja en la Tabla I.8, observamos que la cepa *Arthrobacter* sp. 4J27 fue capaz de proliferar a pH 9, pero no se observó aumento aparente de la absorbancia, cuando el pH del medio se ajustó a 12 o por encima de 12, al igual que las cepas control *A. phenanthrenivorans* DSM 18606^T, *A. oxydans* DSM20119^T y *A. polychromogenes* DSM 20136^T. Sin embargo, la cepa *A. koreensis* 5J12A creció a pH 9 y 12, pero no se observó crecimiento aparente a pH 13, respecto a las cepas control *A. luteolus* DSM 13067^T y *A. koreensis* DSM 16760^T que sólo fueron capaces de proliferar a pH 9.

Para identificar el pH mínimo inhibitorio aproximado al cual no se produce un crecimiento aparente de las cepas *Arthrobacter* sp. 4J27 y *A. koreensis* 5J12A, así como de sus respectivos controles, se procedió tal y como se indica en el apartado M3.2. Según este ensayo, tal y como se indica en la Tabla I.8, la cepa *Arthrobacter* sp. 4J27 fue capaz de proliferar a pH 5 y 7, pero a pH 3 no se observó aumento aparente de la absorbancia, al igual que las cepas control *A. phenanthrenivorans* DSM 18606^T, *A. oxydans* DSM 20119^T y *A. polychromogenes* DSM 20136^T. Del mismo modo, la cepa *A. koreensis* 5J12A fue capaz de proliferar a pH mínimo de 5 y 7 pero no fue capaz a pH 3, al igual que la cepa control *A. koreensis* DSM 16760^T, sin embargo la cepa control *A. luteolus* DSM 13067^T no proliferó a pH 5.

El mayor aumento de absorbancia (Abs_{600nm} de 9,2), se registró a pH 7 tanto para *Arthrobacter* sp. 4J27, como para *A. koreensis* 5J12A (Tabla I.8).

Tabla I.8. Caracterización del pH máximo y mínimo tolerado. En la tabla se representa con (+) el aumento significativo de la absorbancia de los cultivos de las distintas cepas, y se representa con (++) el pH al cual se registró la absorbancia más alta. Por el contrario se representó con signo (-) cuando no se observó aumento aparente en la turbidez tras un periodo de 24 h.

Cepas	pH					
	3	5	7	9	12	13
<i>Arthrobacter</i> sp. 4J27	-	+	++	+	-	-
<i>A. penanthrenivorans</i> DSM 18606 ^T	-	+	++	+	-	-
<i>A. oxydans</i> DSM 20119 ^T	-	+	++	+	-	-
<i>A. polychromogenes</i> DSM 20136 ^T	-	+	++	+	-	-
<i>A. koreensis</i> 5J12A	-	+	++	+	+	-
<i>A. luteolus</i> DSM 13067 ^T	-	-	++	+	-	-
<i>A. koreensis</i> DSM 16760 ^T	-	+	++	+	-	-

I4.c Caracterización de la concentración de NaCl máxima tolerada y mínima inhibitoria

Con objeto de identificar la concentración máxima tolerada y mínima inhibitoria de NaCl para el crecimiento de las cepas *Arthrobacter* sp. 4J27 y *A. koreensis* 5J12A, así

como las cepas taxonómicamente más relacionadas, se planteó como primer paso la caracterización de la concentración máxima a la cual se produce crecimiento aparente de las cepas, de modo que se procedió tal y como se indica en el apartado M3.3. Como se puede observar en la Tabla I.9, la cepa *Arthrobacter* sp. 4J27, fue capaz de proliferar a 0,8 M (NaCl) pero no a concentraciones mayores, al igual que las cepas control *A. phenanthrenivorans* DSM 18606^T y *A. oxydans* DSM 20119^T pero no la cepa control *A. polychromogenes* DSM 20136^T, que no fue capaz de proliferar a la concentración de 0,8 M. Igualmente, la cepa *A. koreensis* 5J12A y sus controles *A. luteolus* DSM 13067^T y *A. koreensis* DSM 16760^T fueron capaces de proliferar en un medio con un concentración de 0,6 y 0,8 M en NaCl pero no a concentraciones más altas.

Para identificar la concentración de NaCl mínima aproximada, a la cual se produjo un crecimiento aparente de las cepas *Arthrobacter* sp. 4J27 y *A. koreensis* 5J12A, así como de sus respectivos controles, se procedió tal y como se indica en el apartado M3.3. A continuación se tomaron medidas de absorbancia a una longitud de onda de 600 nm a las 6, 12 y 24 horas de incubación. Así pues, tal y como se indica en la Tabla I.9, la cepa 4J27 proliferó en ausencia de NaCl y en presencia de NaCl a las concentraciones de 0,2 y 0,4 M, al igual que las cepas control *A. phenanthrenivorans* DSM 18606^T, *A. oxydans* DSM20119^T y *A. polychromogenes* DSM 20136^T. De mismo modo, la cepa 5J12A y sus controles *A. luteolus* DSM 13067^T y *A. koreensis* DSM 16760^T, fueron capaces de proliferar en ausencia de NaCl y en presencia a las concentraciones de 0,2 y 0,4 M.

La absorbancia más alta (Abs_{600nm} de 8,6) para el cultivo de la cepa *Arthrobacter* sp. 4J27 y la cepa *A. koreensis* 5J12A, se registró cuando se adicionó al medio LB, 0,2 M de NaCl, por lo que consideramos que la concentración óptima de NaCl para el crecimiento máximo de ambas cepas está entorno a ese valor.

Tabla I.9. Caracterización de la concentración de NaCl máxima y mínima. En la tabla se representa con (+) el aumento significativo de la absorbancia de los cultivos de las distintas cepas, y se representa con (++) la concentración a la cual se registró la absorbancia más alta. Por el contrario se representó con signo (-) cuando no se observó aumento aparente en la turbidez tras un periodo de 24 h.

Cepas	Concentración NaCl (M)							
	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1	1,2	1,6
<i>Arthrobacter</i> sp. 4J27	+	++	+	+	+	-	-	-
<i>A. penanthrenivorans</i> DSM 18606 ^T	++	+	+	+	+	-	-	-
<i>A. oxydans</i> DSM 20119 ^T	+	++	+	+	+	-	-	-
<i>A. polychromogenes</i> DSM 20136 ^T	++	+	+	+	-	-	-	-
<i>A. koreensis</i> 5J12A	+	++	+	+	+	-	-	-
<i>A. luteolus</i> DSM 13067 ^T	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>A. koreensis</i> DSM 16760 ^T	+	+	++	+	+	-	-	-

I4.d Tolerancia a la desecación

Dado que las cepas objeto de estudio, *Arthrobacter* sp. 4J27 y *A. koreensis* 5J12A, fueron clasificadas como tolerantes a la sequía (Narváez-Reinálido et al. 2010), y a que su uso se destinará al tratamiento de las mismas en procesos de biorremediación de ambientes sometidos a sequía, se decidió realizar un ensayo para determinar la supervivencia de dichas cepas a la falta de agua, además se compararon con las cepas filogenéticamente más relacionadas. Dicho ensayo se realizó tal y como se indica en el apartado M4.d. La tolerancia a condiciones de sequía de las distintas cepas se expresó como porcentaje de supervivencia a la falta de agua. En este ensayo se incluyó como control positivo una cepa de *Acinetobacter calcoaceticus* PADD68, aislada en nuestro grupo e identificada como tolerante a la desecación, con aproximadamente un 4% de supervivencia, porcentaje a partir del cual consideramos que una cepa es tolerante a la desecación. Como control negativo se incluyó *Pseudomonas putida* KT2440 (Manzanera et al. 2002; Narváez-Reinálido et al. 2010), utilizada por ser una cepa sensible a la desecación (Manzanera et al. 2002), tal y como aparece en la Figura I.11.

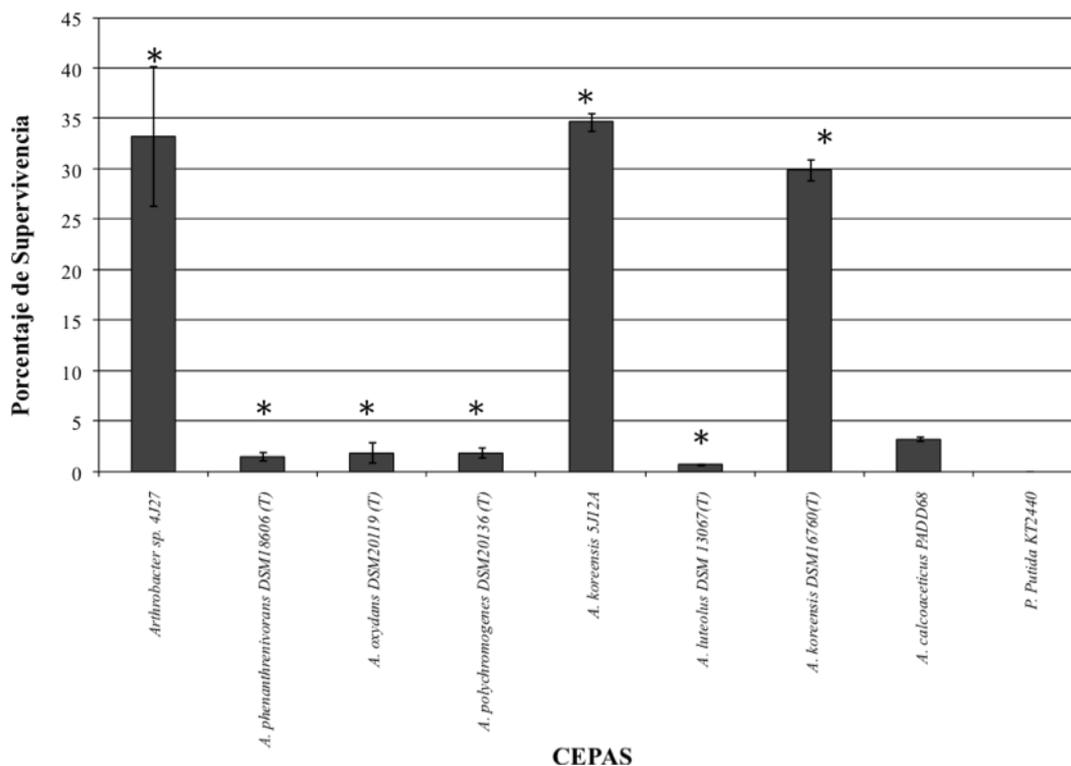


Figura I.7. Tolerancia a la desecación. Se representa en forma de columnas el porcentaje de supervivencia de las cepas del género *Arthrobacter* objeto de estudio. Además de la cepa considerada como control positivo *A. calcoaceticus* PADD68 y la cepa considerada como sensible a la desecación, *P. putida* KT2440. En el eje de abscisas se indican las cepas objeto de estudio y en el eje de ordenadas se indica el porcentaje de supervivencia a la desecación. Se indica con asterisco (*) las diferencias significativas. La desviación estándar, media de tres experiencias, se presenta en forma de barras de error.

Todas las cepas presentaron diferencias significativas con respecto a la cepa considerada como control positivo *A. calcoaceticus* PADD68A la cual mostró un $3.23\% \pm 0.2$ de supervivencia a la falta de agua. Por otro lado, la cepa *Arthrobacter* sp. 4J27 mostró un grado de tolerancia a la desecación ($31.58\% \pm 6.9$) muy superior a la cepa considerada como control positivo, al igual que la cepa *A. koreensis* 5J12A ($34.63\% \pm 0.87$). Además la cepa *Arthrobacter* sp. 4J27 presentó una clara diferencia significativa con respecto a las cepas filogenéticamente más relacionadas, *A. phenanthrenivorans* DSM 18606^T ($1.5\% \pm 0.41$), *A. oxydans* DSM20119^T (1.87 ± 0.99) y *A. polychromogenes* DSM 20136^T (1.8 ± 0.49), las cuales fueron consideradas como sensibles a la desecación por sus bajo porcentaje de supervivencia. Al igual que ocurrió con la cepa control *A. luteolus* DSM 13067^T (0.65 ± 0.041) que fue considerada como sensible a la desecación. Sin embargo, la cepa control *A. koreensis* DSM 16760^T presentó una alta tolerancia a la desecación (29.89 ± 1.035). La cepa

considerada como control negativo de la experiencia por ser sensible a la falta de agua, *P. putida* KT2440, presentó una supervivencia por debajo de los niveles de detección.

Discusión

El género *Arthrobacter* fue definido por primera vez por Conn & Dimmick (1947) como perteneciente a la clase *Actinobacteria* e incluida como bacteria corineforme, con metabolismo aeróbico. Existen numerosos casos de especies dentro de dicho género descritas como anhidrobiontes (Mulder & Antheunisse 1963) y como degradadoras de hidrocarburos (Casellas et al. 1997; Kallimanis et al. 2009a). Las cepas 4J27 y 5J12A, clasificadas como tolerantes a la desecación (Narváez-Reinálido et al. 2010), se identificaron como pertenecientes al género *Arthrobacter* mediante la secuenciación del gen ARNr 16S. De modo que en base a la secuencia del gen ARNr 16S de la cepa 4J27 se observó una máxima similitud con las especies bacterianas *A. phenanthrenivorans* DSM 18606^T, *A. oxydans* DSM 20119^T y *A. polychromogenes* DSM 20136^T. Sin embargo, la cepa 5J12A presentó máxima similitud con las especies bacterianas *A. luteolus* DSM 13067^T y *A. koreensis* DSM 16760^T. Así pues, para conocer el grado de similitud taxonómica entre las cepas objeto de estudio y las que están más relacionadas, se realizó la técnica de hibridación ADN-ADN. Según las recomendaciones del comité *ad hoc* para la definición de especies bacterianas, la cepa 4J27 no perteneció a ninguna de las especies control *A. phenanthrenivorans* DSM 18606^T, *A. oxydans* DSM 20119^T y *A. polychromogenes* DSM 20136^T. Por ello se propuso como nueva especie dentro del género *Arthrobacter* y se nombró como *Arthrobacter siccitolerans* (sic.ci.to'le.rans. L. Adj. *siccus* dry, L. part. adj. *Tolerans* toleranting; N.L. part. adj. *Siccitolerans* dry-toleranting) (SantaCruz-Calvo et al. 2013). Sin embargo, la cepa 5J12A resultó pertenecer a la especie bacteriana *A. koreensis*, por lo que se denominó como *Arthrobacter koreensis* 5J12A. Tras dicho análisis se determinó el contenido G+C (mol%) de cada una de las cepas, tras lo cual se observó que ambas presentaron un valor dentro del rango mostrado por todos los miembros del género *Arthrobacter*, considerado como bacterias de alto contenido en G+C (mol%) (Keddie et al. 1986).

Ya que el objetivo de este capítulo es caracterizar las cepas con capacidad para tolerar la falta de agua para su uso en técnicas de biorremediación en ambientes áridos o semiáridos y clasificar la cepa *A. siccitolerans* 4J27^T como nueva especie dentro del género *Arthrobacter*, realizamos una serie de análisis quimiotaxonómicos, fenotípicos y fisicoquímicos. Entre las pruebas quimiotaxonómicos analizamos los peptidoglicanos, ácidos grasos, la composición de quinonas respiratorias y azúcares de la pared celular. Los peptidoglicanos de las especies del género *Arthrobacter* contienen lisina como diaminoácido. Aplicando el esquema de Schleifer and Kandler (1972), según las diferencias en la composición de los aminoácidos de la cadena interpeptídica, se distinguen dos grupos dentro del género *Arthrobacter*, por un lado aquellos que poseen el tipo de peptidoglicanos A3 α y por otro lado aquellos que poseen el tipo A4 α . La mayoría de las especies del género poseen el tipo A3 α , los cuales presentan L-aminoácido monocarboxílico o glicina o ambos en el puente interpeptídico. Según los resultados obtenidos las cepas *A. siccitolerans* 4J27^T y *A. koreensis* 5J12A pertenecen al grupo de especies con el tipo de peptidoglicanos A3 α . Ambas presentaron diferencias en la composición de los aminoácidos del puente interpeptídico, ya que este grupo lo componen especies con una gran variedad de puentes, aquellos arthrobacters con el tipo de peptidoglicanos A3 α pueden ser distinguidos en base a la composición de los aminoácidos que conforman dicho puente. Según los resultados obtenidos tras el análisis de los peptidoglicanos podemos decir que, la cepa *A. siccitolerans* 4J27^T forma parte del grupo 3 compuesto por *A. chlorophenicus*, *A. sulfonivorans*, *A. oxydans*, *A. defluvii*, *A. polychromogenes* y *A. scleromae*. Y la cepa *A. koreensis* 5J12A se clasifica dentro de la subclase III junto con *A. citreus*, *A. gandavensis*, *A. koreensis* y *A. luteolus* (Goodfellow et al. 2012).

En referencia a la composición de azúcares de la pared celular se han analizado aproximadamente la mitad de las especies del género *Arthrobacter* y la mayoría de estas presentaron galactosa (Gal) como único azúcar de la pared celular o en combinación con otros azúcares, como la glucosa (Glu), ramnosa (Rha), manosa (Man), ribosa (Rib) y xilosa (Xyl) (Goodfellow et al. 2012). En el análisis de los azúcares de la pared celular de la cepa *A. siccitolerans* 4J27^T, se observó que presentaba 5 tipos de azúcares, Gal, Glu, Rha, Man y Rib. Sin embargo, la cepa *A. koreensis* 5J12A presentó 3 tipos de azúcares en la pared celular, Gal, Rha y Rib, a diferencia de lo encontrado en la especie *A. koreensis* DSM 16760^T (Rha), la cual

posee junto con las especies *A. psychrophenicus* (Glc) y *A. luteolus* (Rha) un sólo tipo de azúcar (J.-S. Lee et al. 2003; Goodfellow et al. 2012). Según los resultados la composición de azúcares no es consistente entre las cepas de una misma especie. Muchos autores han considerado este análisis más adecuado para la caracterización de las especies que para la identificación de grupos estrechamente relacionados, ya que o bien existe una variada composición en el tipo de azúcares de la pared celular entre las especies estrechamente relacionadas, o bien ciertas composiciones son encontradas en diferentes subclases/ARNr (Goodfellow et al. 2012).

Los ácidos grasos ramificados predominantes en las especies del género *Arthrobacter* son iso- y anteiso-. Las especies bacterianas *A. siccitolerans* 4J27^T y *A. koreensis* 5J12A presentaron como ácido graso ramificado predominante, el denominado ácido anteiso-pentadecanoico (C_{15:0} anteiso). La mayoría de especies dentro del género posee un perfil de ácidos grasos dominado por C_{15:0} anteiso y poseen usualmente grandes cantidades de C_{15:0} iso, C_{16:0} iso y C_{17:0} anteiso (Westerberg et al. 2000; Goodfellow et al. 2012). Algunas especies del género *Arthrobacter* poseen cantidades notables de C_{16:0}, como son *A. citreus*, *A. nicotianae*, *A. cumminsii*, *A. niigatensis*, *A. oxydans* y *A. polychromogenes* (Goodfellow et al. 2012) y las cepas objeto de estudio *A. siccitolerans* 4J27^T y *A. koreensis* 5J12A. Sin embargo, la presencia de estos ácidos grasos no está correlacionado con las relaciones genéticas (Goodfellow et al. 2012).

En cuanto a las quinonas respiratorias, el género *Arthrobacter* se divide en dos grupos según la composición en menaquinonas. El primer grupo incluye la mayoría de las especies del género. Dicho grupo lo componen aquellas especies que presentan como componente mayoritario, menaquinonas monosaturadas con 9 unidades isoprenoides en la cadena, MK-9(H₂). Este grupo también incluye un pequeño número de especies que presentan como componente mayoritario menaquinonas monosaturadas con 8 unidades isoprenoides, MK-8(H₂), las cuales corresponden al grupo polifilético *A. globiformis*/*A. citreus* (Keddie et al. 1986). Según los resultados obtenidos, la cepa *A. koreensis* 5J12A pertenece a dicho primer grupo. El segundo grupo lo conforman varias especies del género, las cuales exhiben menaquinonas con 8, 9 y/o 10 unidades de isoprenoides insaturadas y corresponden al grupo de *A. nicotianae* (Keddie et al. 1986). La especie bacteriana *A. siccitolerans* 4J27^T presentó menaquinonas insaturadas y saturadas de 9 unidades de isoprenoides (SantaCruz-Calvo et al. 2013).

Este sistema de quinonas compuestas de menaquinonas monosaturadas y completamente insaturadas con isoprenoides de distintas longitudes, forman un grupo inusual entre las bacterias (Goodfellow et al. 2012). La especie *A. scleromae*, próxima a la cepa *A. siccitolerans* 4J27^T según el árbol filogenético (ARNr 16S) también presentó menaquinonas insaturadas y saturadas de 8 unidades isoprenoides (Huang et al. 2005). Además la cepa con la que guarda una relación más estrecha, *A. phenanthrenivorans*, posee menaquinonas insaturadas y saturadas de 9 y 8 unidades de isoprenoides respectivamente (Kallimanis et al. 2009a).

Tras los análisis quimiotaconómicos se realizaron análisis fenotípicos de las cepas *A. siccitolerans* 4J27^T y *A. koreensis* 5J12A. Dichos análisis mostraron el potencial metabólico y enzimático de cada una de las cepas objeto de estudio y las especies estrechamente relacionadas. De modo que, según las capacidades metabólicas la cepa *A. siccitolerans* 4J27^T presentó mayor relación con la cepa *A. oxydans* DSM 20119^T, seguida de la especie bacteriana *A. phenanthrenivorans* DSM 18606^T y por último la especie *A. polychromogenes* DSM 20136^T. Según la agrupación en forma de dendograma de los datos metabólicos, la cepa 4J27 forma un grupo diferente al resto de especies con las que guarda relación filogenética. Sin embargo, según el árbol filogenético en base al gen ARNr 16S, dicha cepa presentó la relación más estrecha con la cepa *A. phenanthrenivorans* DSM 18606^T, con la que comparte el mismo grupo según el árbol filogenético (ARNr 16S). Por otra parte, la cepa *koreensis* 5J12A presentó mayor relación según las capacidades metabólicas, con la cepa *A. koreensis* DSM 16760^T. Sin embargo, la especie bacteriana *A. luteolus* DSM 13067^T aparece separada del grupo, presentando mayores diferencias según las capacidades metabólicas. Según dichas capacidades la distribución de la cepa *A. koreensis* 5J12A y sus controles, concuerdan con la distribución obtenida tras la realización del árbol filogenético. En base al potencial enzimático, la cepa *A. siccitolerans* 4J27^T guardó una relación más estrecha con la especie bacteriana *A. phenanthrenivorans* DSM 18606^T y la cepa *A. koreensis* 5J12A con la especie a la que pertenece, *A. koreensis* DSM 16760^T. Ambas relaciones concuerdan con las obtenidas tras la realización del árbol filogenético en base al gen ARNr 16S. La cepa *A. siccitolerans* 4J27^T presentó diferencias en cuanto a la capacidad para reducir nitrato a nitrito, con respecto a la especie con la que guarda más relación *A. phenanthrenivorans* DSM 18606^T. Por otra

parte, la cepa *A. koreensis* 5J12A y la especie tipo a la que pertenece, *A. koreensis* DSM 16760^T no presentaron diferencias en la capacidad de reducir nitrato a nitrito.

Para utilizar las cepas *A. siccitolerans* 4J27^T y *A. koreensis* 5J12A como herramientas biotecnológicas para la descontaminación de ambientes sometidos a estrés hídrico, temperaturas altas y pH ligeramente ácidos o ácidos. Realizamos un estudio para conocer las limitaciones en el crecimiento en base a distintas condiciones de temperaturas, pH y salinidad (NaCl). Con ello continuamos con la caracterización fisicoquímica de cada una de ellas. Así pues, la cepa *A. siccitolerans* 4J27^T presentó la capacidad de proliferar en un ambiente sometido a temperaturas comprendidas entre 15 y 35°C, a un pH tanto ácido como básico y ausencia o alta concentración salina. Sin embargo, la cepa *A. koreensis* 5J12A proliferó a temperaturas comprendidas entre 15 y 40°C, a pH tanto ácido como básico y en ausencia o alta concentración salina.

La especie *A. siccitolerans* 4J27^T se clasificó como tolerante a la desecación (Narváez-Reinálido et al. 2010), sin embargo ninguna de las cepas relacionadas filogenéticamente *A. phenanthrenivorans* DSM 18606^T, *A. oxydans* DSM 20119^T y *A. polychromogenes* DSM 20136^T presentó capacidad para tolerar condiciones de falta de agua. Por otra parte, la especie *A. koreensis* DSM 16760^T al igual que la cepa *A. koreensis* 5J12A presentó tolerancia a la desecación. Por ello nos planteamos que dentro del género *Arthrobacter* las cepas que pertenecen a una especie bacteriana tolerante a la desecación, podrían compartir esta propiedad.

CAPÍTULO II

CAPÍTULO II

DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS POR LAS CEPAS 4J27 Y 5J12A Y AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS TOLERANTES A LA DESECACIÓN PARA SU USO EN PROCESOS DE RIZORREMEDIACIÓN

Introducción

La rizorremediación, es un tipo específico de fitorremediación, que implican a la planta y los microbios de la rizosfera asociados a las raíces de éstas, para la degradación de compuestos contaminantes. Dicha asociación puede establecerse naturalmente o bien por la introducción deliberada de microorganismos específicos. Estos microorganismos pueden ser degradadores del contaminante y/o promotores del crecimiento en planta, bajo condiciones de estrés ambiental (Gerhardt et al. 2009).

Algunos microorganismos rizosféricos amortiguan estreses abióticos modificando el ambiente, dichos microorganismos son comúnmente denominados como bacterias promotoras del crecimiento en plantas (PGPR). Las PGPR facilitan directa o indirectamente el crecimiento de la planta (Glick et al. 1995; Glick et al. 1998); la estimulación indirecta incluye una variedad de mecanismos por los cuales la bacteria previene de fitopatógenos, inhibiendo su crecimiento y desarrollo (Sivan & Chet, 1992; Glick & Bashan 1997). Sin embargo, la estimulación directa incluye la fijación

de nitrógeno atmosférico, la síntesis de fitohormonas (giberelinas, citocininas y auxinas), la solubilización de minerales como fosfatos. Además las PGPR poseen enzimas específicas, indicadas algunas en la Figura II.1, que producen cambios fisiológicos en las plantas a nivel molecular (Jacobson et al. 1994; Glick 1995; Saleem et al. 2007).

La planta bajo condiciones de estrés disminuye su crecimiento como consecuencia de una serie de procesos fisiológicos, como son la sobreproducción endógena de etileno (Saleem et al. 2007; Belimov et al. 2009). El etileno es una hormona que produce la planta, la cual modifica su crecimiento y desarrollo (Arshad et al. 2002; Glick et al. 2005). En condiciones de sequía su producción tiene efectos negativos en el crecimiento de las raíces y como consecuencia en el crecimiento de la planta. En este aspecto, un mecanismo de acción asociado a determinados microorganismos consiste en disminuir la concentración de etileno (Kloepper et al. 1989) mediante la actividad de la enzima 1-aminociclopropano-1 ácido carboxílico deaminasa (ACCd) (Glick et al. 1998), cuando ésta los produce en mayor concentración en respuesta a algún estrés ambiental (Glick et al. 1998; Glick 2005; Safronova et al. 2005), como puede ser el estrés por falta de agua (Mayak et al. 2004; Yowono et al. 2005). Recientemente varios grupos han demostrado que existen PGPR con capacidad para proteger a plantas frente a condiciones de sequía, aislados de suelos secos o sometidos a condiciones de falta de agua (Sharp et al. 2004; Mayak et al. 2004; Ahmad et al. 2008; Vílchez et al. 2008; Yang et al. 2009).

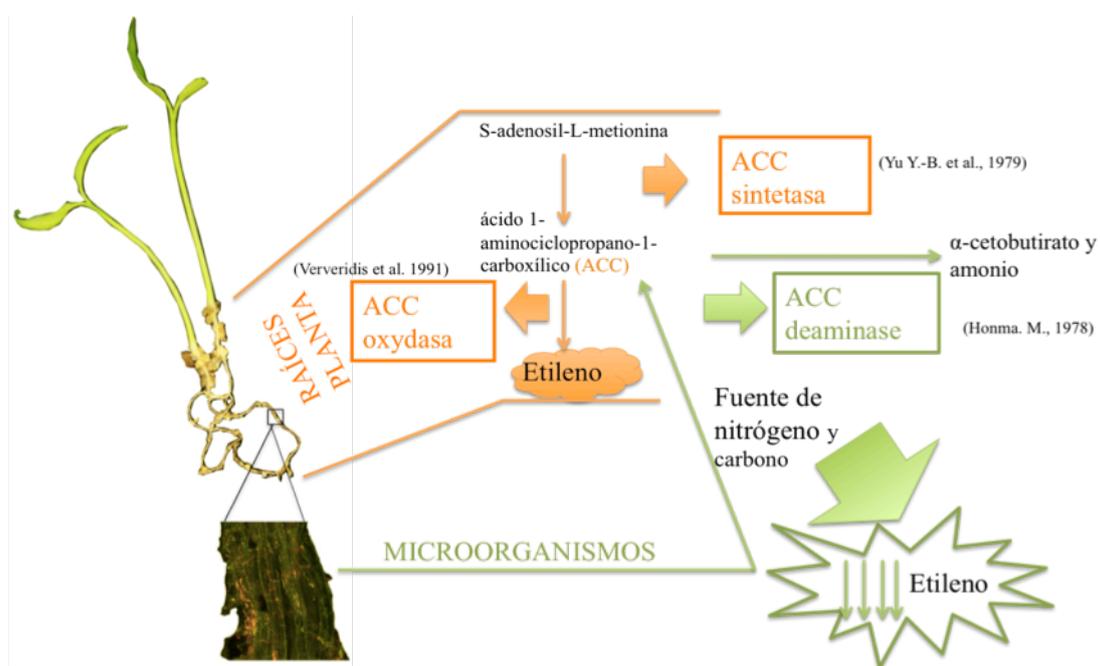


Figura II.1. Esquema de actividad de la enzima 1-aminociclopropano-1 ácido carboxílico deaminasa (ACCd).

II.2 AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS TOLERANTES A LA DESECACIÓN

Algunos microorganismos acumulan pequeños compuestos orgánicos, denominados solutos compatibles, en respuesta a cambios extracelulares de osmolaridad, debido a la desecación o la adición de sales (Brown, 1976; Arakawa & Timasheff 1982). Dichos solutos permiten a los microorganismos que lo producen estabilizarse frente a situación de estrés ambiental. Los solutos compatibles que protegen a microorganismos ahidrobiontes son llamados “xeroprotectores” (Vílchez et al. 2008). Según Manzanera y colaboradores (2004), dichos solutos compatibles, como la trehalosa o hidroxiectoína protegen a las células vivas deshidratadas ante la presencia de solventes orgánicos (Manzanera et al. 2004; Vílchez et al. 2008). Vílchez y colaboradores (2008) demostraron que las células de *Pseudomonas putida* KT2440 podían estabilizarse en presencia de xeroprotectores como la trehalosa o la hidroxiectoína y por tanto tolerar la presencia de disolventes, como el cloroformo. Aquellas células desprovistas de xeroprotectores dejaban de ser viables a causa de los efectos deletéreos del cloroformo, lo que denominó como esporas artificiales (Vílchez et al. 2008). A partir de esta investigación, Narváez y colaboradores (2010)

desarrollaron un método para el aislamiento de microorganismos tolerantes a la falta de agua, mediante el uso del cloroformo como agente selectivo. El cloroformo es un compuesto químico utilizado como desinfectante, capaz de matar células vegetativas aunque no a sus esporas. De modo, que aquellas bacterias silvestres estabilizadas por xeroprotectores, producidos por las mismas como respuesta a condiciones de estrés por falta de agua, pueden ser aisladas utilizando el cloroformo. Para proceder al aislamiento, el suelo del que proceden ha de estar en condiciones de sequía durante un periodo de tiempo prolongado para que aquellas bacterias xerotolerantes hayan producido los xeroprotectores, que la protegen del estrés ambiental y a su vez del cloroformo utilizado para el aislamiento (Figura II.2).

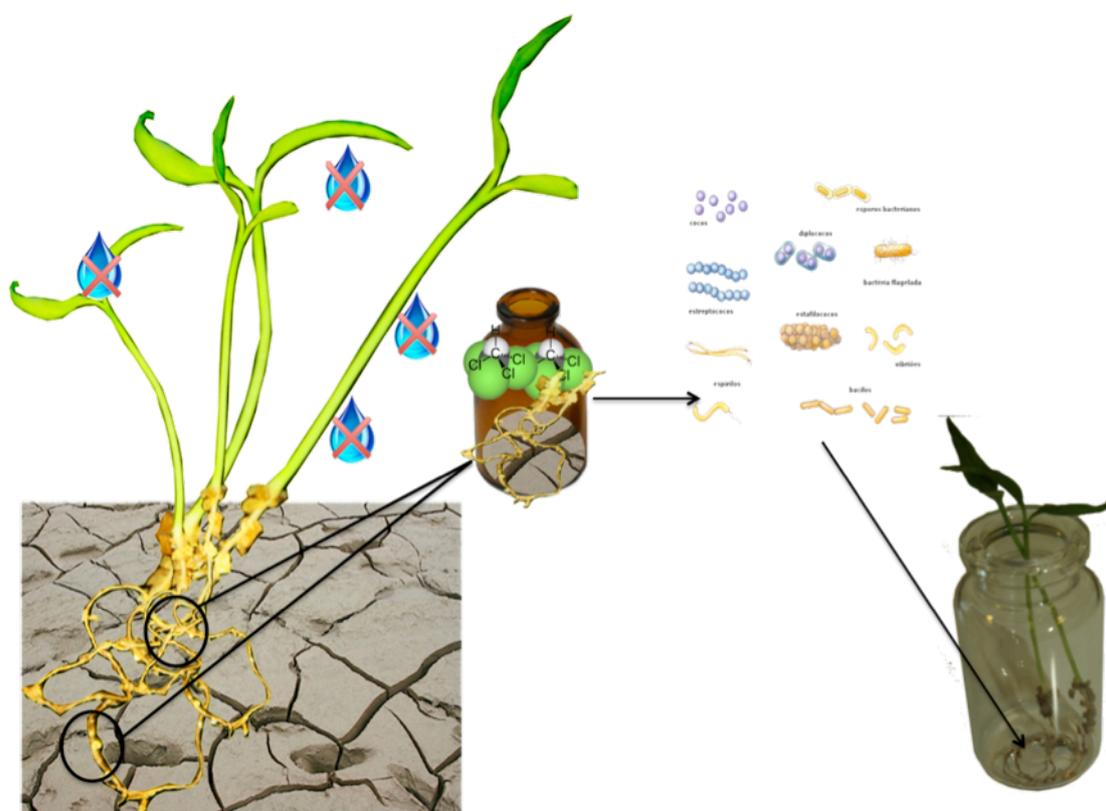


Figura II.2. Esquema del proceso de aislamiento de bacterias tolerantes a la desecación mediante el método del cloroformo.

Resultados

Para adecuar la técnica de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos a las condiciones de condiciones de falta de agua, hemos de emplear microorganismos

y plantas que toleren la falta de agua y que dichos microorganismos presenten la capacidad para degradar compuestos contaminantes, en nuestro caso compuestos hidrocarbonados. La secuenciación del genoma de las cepas *A. siccitolerans* 4J27 y *A. koreensis* 5J12A, nos permitió identificar genes con homología a los implicados en el ciclo de degradación de ciertos hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs). En el caso de la especie *A. siccitolerans* 4J27 se identificaron genes implicados en la degradación del antraceno, fenantreno y pireno. Igualmente, en el caso de la cepa *Arthrobacter koreensis* 5J12A se identificaron genes con homología a los implicados en la degradación del antraceno, fenantreno y pireno. Tal y como hemos indicado en el capítulo I, dichos resultados nos encaminaron hacia la posibilidad de que ambas cepas pudieran utilizarse como herramientas biotecnológicas para la descontaminación de suelos sometidos a condiciones de estrés por falta de agua y contaminados con compuestos recalcitrantes como son el antraceno, el fenantreno y el pireno.

En primer lugar procedimos al análisis del crecimiento de las cepas *A. siccitolerans* 4J27 y *A. koreensis* 5J12A, en un medio mínimo adicionado con los hidrocarburos antes mencionados. Una vez analizados los resultados, decidimos aislar nuevos microorganismos que presentaran la capacidad de tolerar la falta de agua y de crecer en un medio mínimo adicionado con algunos hidrocarburos aromáticos y además incluimos el contaminante diesel.

II.1. DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS POR LAS CEPAS *A. siccitolerans* 4J27 y *A. koreensis* 5J12A

Para identificar si las cepas tolerantes a la desecación, *A. siccitolerans* 4J27 y *A. koreensis* 5J12A eran capaces de utilizar los hidrocarburos aromáticos policíclicos antraceno, fenantreno y pireno, realizamos un estudio de la capacidad de crecimiento de las cepas en medio mínimo (M9) líquido adicionado con cada uno de los hidrocarburos, como única fuente de carbono y como control negativo el medio mínimo M9 sin fuente de carbono, tal y como se indica en el apartado M5.a. El resultado del recuento para la cepa *A. siccitolerans* 4J27 se representa en la Figura II.3.

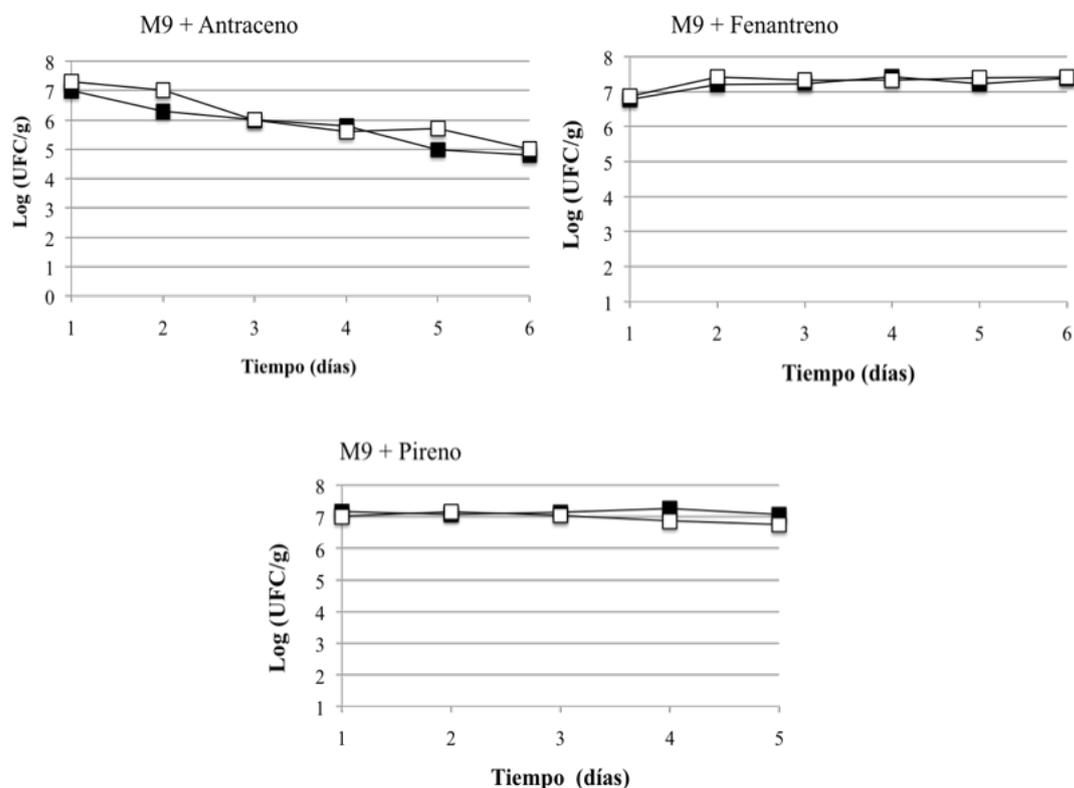


Figura II.3. Crecimiento de la cepa *A. siccitolerans* 4J27 en medio mínimo líquido (M9) adicionado con antraceno, fenantreno y pireno como única fuente de carbono. Se representa el crecimiento de la cepa en medio mínimo líquido adicionado con cada uno de los HAPs (cuadrado negro) y en medio mínimo sin fuente de carbono (cuadrado blanco). En el eje de abscisas se representa el tiempo en días y en el eje de ordenadas el log (UFC/ml).

Según los resultados la cepa *A. siccitolerans* 4J27 no fue capaz de crecer en un medio mínimo líquido adicionado con ninguno de los HAPs antraceno, fenantreno y pireno. Así como tampoco fue capaz de proliferar en un medio mínimo sin fuente de carbono.

Análogamente se procedió al estudio del crecimiento de la cepa *A. koreensis* 5J12A en medio mínimo líquido adicionado con antraceno, fenantreno y pireno (Figura II.4).

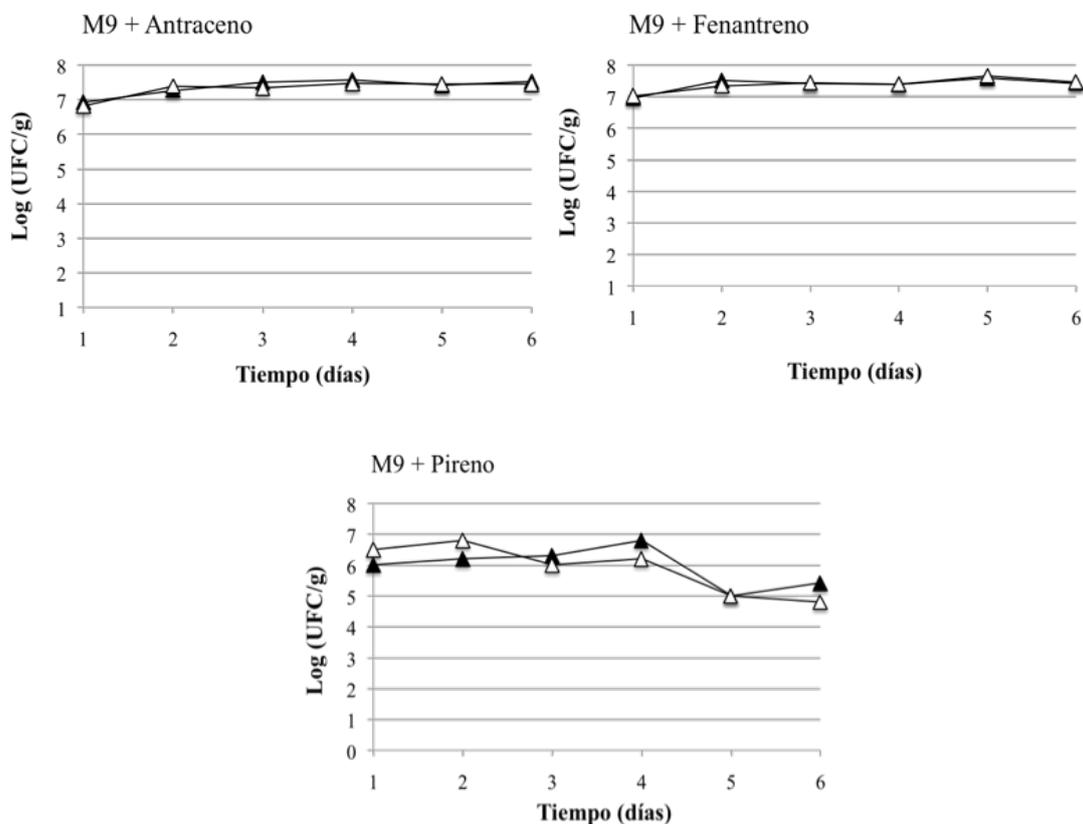


Figura II.4. Crecimiento de la cepa 5J12A en medio mínimo líquido (M9) adicionado con antraceno, fenantreno y pireno como única fuente de carbono. Se representa el crecimiento de la cepa en medio mínimo líquido adicionado con cada uno de los HAPs (cuadrado negro) y en medio mínimo sin fuente de carbono (cuadrado blanco). En el eje de abscisas se representa el tiempo en días y en el eje de ordenadas el log (UFC/ml).

Según los resultados, la cepa *A. koreensis* 5J12A no fue capaz de crecer en un medio mínimo líquido adicionado con ninguno de los HAPs antraceno, fenantreno y pireno. Así como tampoco fue capaz de proliferar en un medio mínimo sin fuente de carbono.

II2 AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS TOLERANTES A LA DESECACIÓN Y BIODEGRADADORES, PROCEDENTES DEL ÁREA CIRCUNDANTE A RAÍCES DE GAYOMBA

Debido a la incapacidad de las cepas *A. siccitolerans* 4J27 y *A. koreensis* 5J12A de utilizar los hidrocarburos aromáticos policíclicos objeto de estudio, como única fuente de carbono en las condiciones ensayadas, decidimos realizar el aislamiento y selección de microorganismos que presentaran las siguientes características, 1) la capacidad de tolerar las condiciones de estrés hídrico, 2) los genes catabólicos

necesarios para degradar hidrocarburos (naftaleno, antraceno, fenantreno, pireno y diesel) y 3) capacidad para colonizar las raíces de plantas.

Los aislamientos se realizaron tal y como se indica en el apartado M4.b, es decir, mediante el método para el aislamiento de microorganismos tolerantes a la desecación de muestras procedentes de un suelo seco (Narvaez-Reinaldo et al. 2010), pero con una nueva variante. Para ello se tomó una muestra de suelo seco de la rizosféra de la gayomba, retama de olor (*Spartium junceum*), en Granada (España) cercanos a la autovía A-44 (37.182 N, 3.624 W), no expuesto a lluvia, ni riego, por un periodo superior a 3 meses, tal y como se indica en el apartado M.3.a. Dicha muestra se dividió en 2 viales de vidrio estéril, uno de ellos fue tratado con 3 ml de cloroformo y el otro vial con 3 ml de 1xM9. De ambos viales se realizaron diluciones seriadas, sembradas en TSA y se incubaron durante 24/48 horas en una estufa a temperatura de 30°C. Tras ello se realizó un recuento de la microbiota cultivables en TSA (MC) y de los microorganismos potenciales xerotolerantes cultivables (XC), respectivamente. El número de colonias detectado fue de $9,9 \cdot 10^6$ (UFC/g) de MC, en la muestra que no fue tratada con cloroformo, mientras que en la muestra tratada con el disolvente estas se redujeron hasta alcanzar valores promedio de $1,74 \cdot 10^6$ UFC/g de suelo de XC. De modo que el 17,46% de los microorganismos cultivables en TSA presentes en la muestra tomada de la rizosfera de la planta de la gayomba, se consideraron como potenciales tolerantes a la desecación.

Tras el recuento, se tomaron 200 mg de la muestra contenida en el vial tratado con cloroformo, que se utilizaron como inóculo en 4 matraces con 30 ml de medio mínimo (M9). Cada uno de los matraces contenía uno de los HAPs objeto de estudio naftaleno, antraceno, fenantreno y pireno, al 1% (p/v). Dichos matraces se incubaron a una temperatura de 30°C y una agitación de 150 rpm durante 4 días, momento en el que se realizó el conteo de bacterias cultivables potencialmente tolerantes a la sequía y degradadoras de HAPs (DXC), en forma de UFC/g de suelo.

Tal y como se observa en la Tabla II.1, por lo general gran parte de la comunidad xerotolerante (XC) toleró la presencia de los contaminantes objeto de estudio, siendo la microbiota xerotolerante presente en el matraz con pireno la que más se redujo en número de colonias. Por otra parte, la XC que además toleró el naftaleno como única

fuerza de carbono durante 4 días, presentó valores muy similares con respecto a la microbiota presente en el matraz con medio mínimo con antraceno.

Tabla II.1. Recuento de microorganismos presentes en las muestras tratadas con cloroformo. En la primera columna se indica los HAPs objeto de estudio, en la segunda columna las UFC/g de suelo de potenciales degradadores xerotolerantes cultivables (DXC) y en la última columna se indica el porcentaje de DXC (de cada hidrocarburo) con respecto a la totalidad de la población microbiana xerotolerante cultivable (XC).

HAPs	DXC (UFC/g)	DXC/XC (%)
Naftaleno	$1,3 \cdot 10^6$	76,6
Antraceno	$1,3 \cdot 10^6$	72,6
Fenantreno	$1,2 \cdot 10^6$	67,8
Pireno	$9,6 \cdot 10^5$	55,2

Para reconstituir la población presente en cada matraz, de los matraces anteriores con cada uno de los HAPs, se realizó un total de 3 trasplantes de 1 ml de cultivo a un nuevo matraz con medio mínimo (M9) adicionados igualmente con dichos HAPs al 1% (p/v). Se realizaron un total de 3 pases cada 4 días. Sin embargo, a partir del cuarto pase, el medio de cultivo fue modificado, de modo que se substituyó la fuente de nitrógeno del medio M9 por el ácido 1-aminociclopropano-1 carboxílico (ACC) y se le denominó medio mínimo M8. Se realizaron un total de 2 trasplantes en dicho medio mínimo M8, cada 4 días. Para proceder al recuento del segundo y último pase se realizaron diluciones seriadas y se sembraron 100 µl de las diluciones 10^3 , 10^4 , 10^5 y 10^6 en placas de TSA, a los 0, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 días. Dichas placas se incubaron en una estufa a una temperatura de 30°C durante 24/48 horas, para así realizar un recuento de células viables en forma de log (UFC/ml) (Figura II.5).

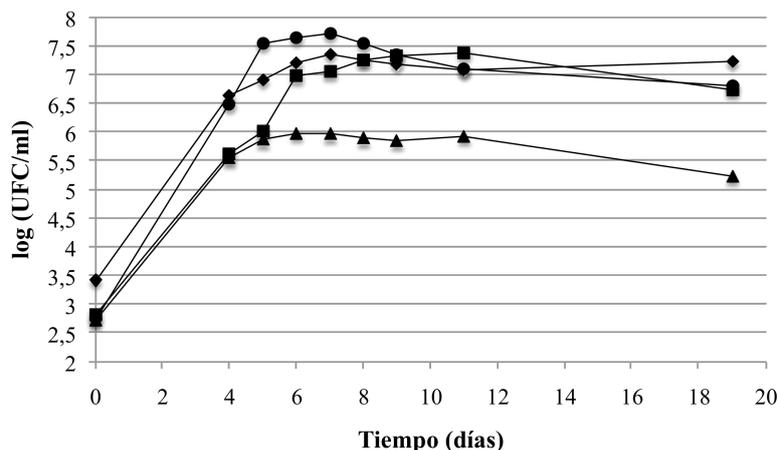


Figura II.5. Crecimiento bacteriano en medio M8 enriquecido con HAPs. Se representa el crecimiento de la población presente en los matraces con medio mínimo M8 adicionado con naftaleno (cuadrado), antraceno (rombo), fenantreno (círculo) y pireno (triángulo), como única fuente de carbono y ACC, como única fuente de nitrógeno. En el eje de abscisas se indica el tiempo en días, y en el eje de ordenadas se representa el log (UFC/ml).

Como se puede observar en la Figura II.5, las poblaciones microbianas presentes en cada uno de los matraces con medio mínimo M8 adicionado con los HAPs objeto de estudio presentaron el máximo aumento aproximadamente a los 6-7 días de ensayo. La comunidad microbiana presente en el medio mínimo M8 adicionado con naftaleno como única fuente de carbono, alcanzó valores promedio de $1,65 \cdot 10^6$ UFC/ml al final del periodo de incubación. Dicha población aumentó 3,81 logaritmos a lo largo del periodo, al igual que la población presente en el matraz con el medio mínimo M8 adicionado con antraceno, la cual aumentó 3,9 logaritmos a lo largo del periodo de incubación. Dicha población alcanzó valores promedio de $5,5 \cdot 10^6$ UFC/ml al final del periodo de incubación. Sin embargo, la comunidad microbiana presente en el matraz con el medio mínimo M8 adicionado con fenantreno presentó un aumento de 2,5 logaritmos a lo largo del periodo de incubación, de modo que el número de colonias estimadas fue de $1,7 \cdot 10^5$ UFC/ml. Por último, la microbiota presente en el matraz con el medio mínimo adicionado con pireno como única fuente de carbono alcanzó valores promedio de $6,3 \cdot 10^6$ UFC/ml, es decir, dicha comunidad aumentó 4 logaritmos a lo largo del periodo de ensayo.

Los aislamientos se realizaron en el día 6 y 9 de muestreo, los aislamientos se sembraron en nuevas placas de TSA, y se consideraron como potencialmente tolerantes a la desecación y degradadoras de compuestos hidrocarbonados. Se aislaron

un total de 10, 4, 9 y 11 colonias provenientes de los matraces con medio M8 adicionado con naftaleno, antraceno, fenantreno y pireno, respectivamente.

II2.a Ensayo de esporulación

Para distinguir las cepas que toleraron el tratamiento con disolventes orgánicos mediante mecanismos de xerotolerancia de aquellas que resisitían mediante producción de esporas, se realizó un ensayo de esporulación, tal y como se indica en el apartado M4.c. Este ensayo se basa en la diferente sensibilidad de las células vegetativas con respecto a las esporas, al tratamiento con calor (Vílchez et al. 2008). De modo que se ensallaron los 34 aislados anteriormente. Tras dicho ensayo resultó que el 100% de las cepas aisladas mediante el método del cloroformo, con HAPs como única fuente de carbono y ACC como única fuente de nitrógeno, eran no esporulantes.

II2.b Ensayo de tolerancia a la desecación

Con objeto de caracterizar el nivel de tolerancia a la falta de agua de los aislados, se realizó un estudio de tolerancia a la desecación. Para ello, las 34 colonias aisladas identificadas como no esporulantes se sometieron a un secado bajo una corriente de aire estéril durante 24 horas, tal y como se indica en el apartado M4.d. La tolerancia a condiciones de sequía de las distintas cepas se expresó como porcentaje de supervivencia a la falta de agua, tomando como 100% el recuento de viables en condiciones óptimas de humedad. En este ensayo se incluyó como control positivo una cepa de *Acinetobacter calcoaceticus* (PADD68) aislada del desierto de Tabernas (Almería) e identificada como tolerante a la desecación, con aproximadamente un 4% de supervivencia, porcentaje a partir del cual consideramos que una cepas es tolerante a la desecación (Narváez-Reinálido et al. 2010). Como control negativo se incluyó *Pseudomonas putida* KT2440, utilizada por ser una cepa sensible a la desecación (Manzanera et al. 2002).

Los resultados obtenidos de estos ensayos mostraron que el nivel de tolerancia a la desecación de *P. putida* KT2440 estaba por debajo de los niveles de detección,

mientras que el de *A. calcoaceticus* PADD68 fue de $3,23\% \pm 0,2$, coincidiendo con los resultados descritos por Narváez-Reinálido y colaboradores (Figura II.6). De los 10 aislados provenientes del medio M8 adicionado con naftaleno, sólo la cepa denominada 56NL8 presentó un porcentaje de supervivencia superior al del control positivo. Sin embargo de los 4 aislados provenientes del medio M8 adicionado con antraceno como única fuente de carbono, ninguno presentó tolerancia a la desecación, según el test realizado. Además de los 9 aislados provenientes del medio M8 adicionado con fenantreno, las cepas denominadas 56FL1 y 59FL3 presentaron un porcentaje superior a la cepa considerada como control positivo. Por último, de los 11 aislados cuando al medio M8 se le adicionó pireno, las cepas denominadas 59FL3, 56PL2 y 56PL3, fueron las que presentaron una supervivencia superior que la considerada como control positivo, *A. calcoaceticus* PADD68. Para comparar los resultados de tolerancia a la desecación de cada una de los aislados y los controles se realizó un análisis estadístico mediante la distribución de *t-students* con un nivel de significancia del 0,005, tal y como se indica en el apartado M11.a.

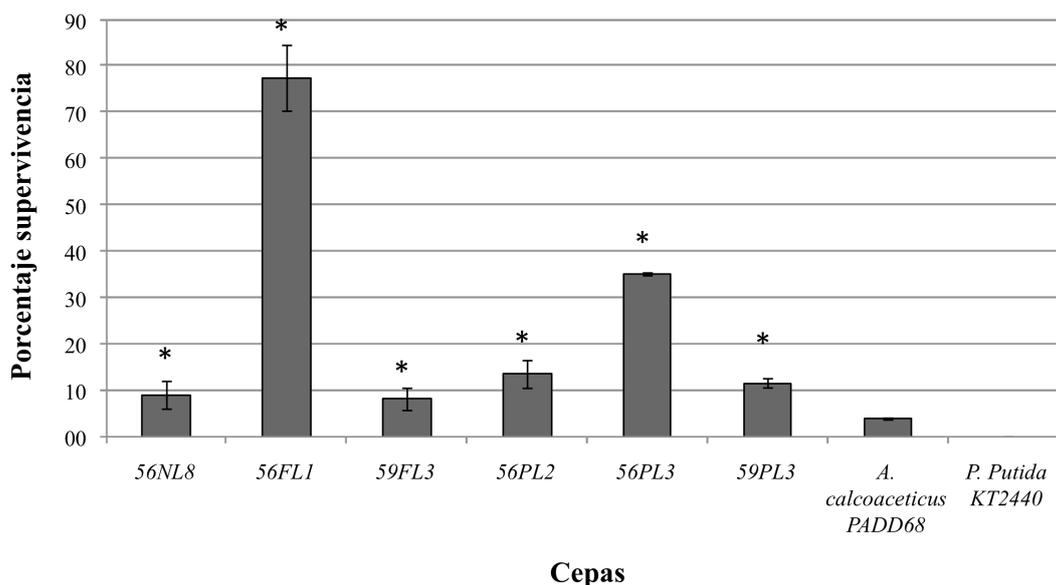


Figura II.6. Tolerancia a la desecación de las cepas aisladas. Se muestran aquellas cepas que mantuvieron un porcentaje mayor que la cepa considerada como tolerante a la sequía *A. calcoaceticus* PADD68. También se muestra la supervivencia de la cepa *A. calcoaceticus* PADD68 y la cepa considerada como control negativo *P. putida* KT2440. En el eje de abscisas se representa las cepas consideradas como tolerantes a la desecación y en el eje ordenadas el porcentaje de supervivencia. Se indica con asterisco (*) las diferencias significativas con respecto al control. Se incluye en forma de barras de error la desviación estándar a la media de tres experiencias.

Según el análisis estadístico todas las cepas presentaron diferencias significativas con respecto al control positivo. La cepa denominada 56FL1 presentó la mayor tolerancia a la desecación en comparación con los demás aislados, incluido la cepa considerada como control positivo, *A. calcoaceticus* PADD68. Dicha cepa presentó un porcentaje de supervivencia del $77,4\% \pm 7,1$. Por otro lado, la cepa denominada 56PL3 presentó un porcentaje de supervivencia del $35,1\% \pm 0,3$. Sin embargo, la cepa denominada 56PL2 presentó un porcentaje de supervivencia del $13,4\% \pm 2,4$, porcentaje muy similar al obtenido con la cepa 59PL3, la cual sobrevivió un $11,5\% \pm 1$ tras la exposición a una corriente de aire estéril durante 24 horas. La cepa 56NL8 presentó un $8,9\% \pm 3$ de supervivencia tras el secado, porcentaje muy similar al obtenido con la cepa 59FL3 que presentó un $8\% \pm 2$ de supervivencia a las condiciones de falta de agua.

Dado que el objetivo de este estudio es conseguir una colección de cepas que, además de tener la capacidad de degradar alguno de los compuestos aromáticos estudiados, sean capaces de proteger a plantas frente a condiciones de estrés hídrico, para su utilización en estudios de biorremediación en zonas áridas y semiáridas, se seleccionaron aquellos aislados que presentaron un porcentaje de supervivencia mayor del 30%. Dicho porcentaje fue considerado por Vilchez y colaboradores (datos no publicados) como porcentaje umbral a partir del cual se considera que una cepa puede presentar la capacidad de proteger a plantas frente a la falta de agua. Así pues, de acuerdo con este porcentaje seleccionamos los aislados, 56FL1 y 56PL3 para los siguientes ensayos.

II2.c Capacidad de crecimiento de las cepas 56FL1 y 56PL3 en medio mínimo líquido adicionado con HAPs

Una vez realizado el ensayo de tolerancia a la desecación de las cepas aisladas en medio mínimo con HAPs como fuente de carbono y 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) como fuente de nitrógeno y carbono, el objetivo de este ensayo fue identificar la capacidad de crecimiento en medio mínimo líquido, adicionado con cada uno de los HAPs como única fuente de carbono.

De este modo, para identificar el crecimiento de la cepa objeto de estudio 56FL1 en medio mínimo líquido adicionado con el HAPs del que proviene el aislamiento (fenantreno), se procedió tal y como se indica en el apartado M5a. Dicho matraz se incubó a una temperatura de 30°C y una agitación de 150 rpm durante un periodo de 6 días. Se realizaron diluciones seriadas en solución salina 1xM9 a los 0, 1, 2 y 6 días. De manera análoga la cepa se cultivó en un medio mínimo sin fuente de carbono (Figura II.7).

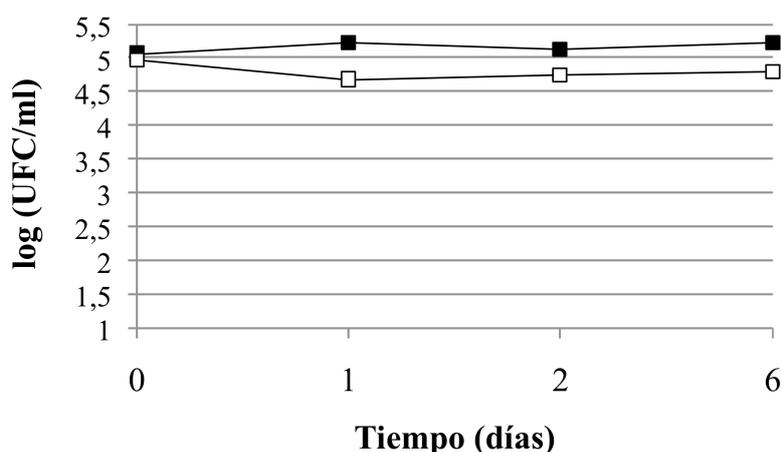


Figura II.7. Crecimiento de la cepa 56FL1 en medio mínimo líquido adicionado con fenantreno. Se indica el crecimiento de la cepa 56FL1 en medio mínimo adicionado con fenantreno (negro) y en medio mínimo sin fuente de carbono (blanco). En el eje de abscisas se representa el tiempo en días y en el eje de ordenadas el log (UFC/ml).

Según los datos obtenidos, la cepa aislada caracterizada como tolerante a la sequía 56FL1, no fue capaz de proliferar en medio mínimo adicionado con fenantreno como única fuente de carbono, en las condiciones ensayadas. Así como tampoco fue capaz de crecer en el mismo medio pero sin fuente de carbono. Debido a los resultados negativos se descartaron para su uso en técnicas de biorremediación, aún así se utilizó para analizar su implicación en la protección de plantas frente a condiciones de estrés hídrico y en la promoción del crecimiento de la misma (capítulo IV).

Análogamente se realizó un análisis del crecimiento de la cepa 56PL3 en medio mínimo adicionado con pireno como única fuente de carbono (Figura II.8).

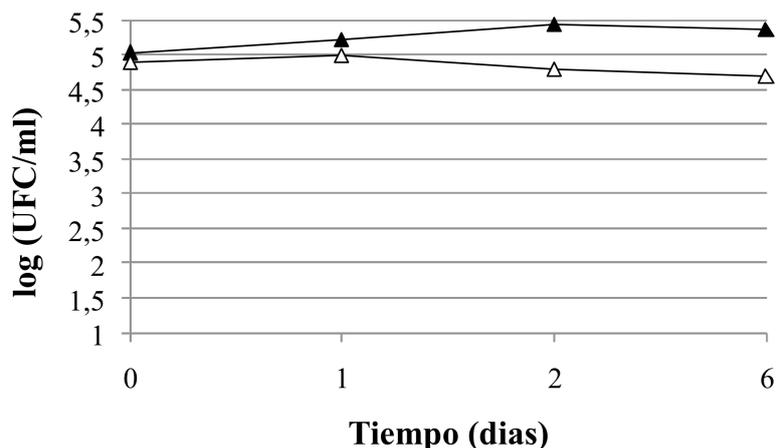


Figura II.8. Crecimiento de la cepa 56PL3 en medio mínimo líquido adicionado con pireno. Se representa el crecimiento de la cepa objeto de estudio 56PL3, en medio mínimo adicionado con pireno (negro) y en medio mínimo sin fuente de carbono (blanco). En el eje de abscisas se representa el tiempo y en el eje de coordenadas las UFC/ml.

Según los datos obtenidos la cepa 56PL3, no fue capaz de proliferar en un medio mínimo adicionado con pireno, como única fuente de carbono en las condiciones ensayadas. Así como dicha cepa tampoco fue capaz de crecer en un medio mínimo sin fuente de carbono.

En base a los resultados de los dos aislamientos, realizados en muestras procedentes del área circundante a raíces de gayomba, podemos decir que sí conseguimos aislar microorganismos tolerantes a la falta de agua, que superen el 30% de supervivencia, mediante el método del cloroformo, pero no hemos conseguido que estos aislados crezcan en presencia de alguno de los HAPs objeto de estudio, en las condiciones ensayadas.

II.3. AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS BIODEGRADADORES PROCEDENTES DE UN SUELO SECO CONTAMINADO CON DIESEL

Tras el aislamiento de 6 microorganismos con capacidad para tolerar la falta de agua, y tras comprobar que las cepas 56FL1 y 56PL3 con un 30% o más de supervivencia, no presentaron la capacidad de crecer en un medio líquido adicionado con fenantreno y pireno, respectivamente, decidimos aislar microorganismos que procedieran de un suelo que hubiera estado en contacto directo con el contaminante durante un tiempo

prolongado y sometido a condiciones de estrés hídrico. Para ello recurrimos al aislamiento de microorganismos biodegradadores, procedentes de un suelo arenoso contenido en una planta piloto contaminada con diesel (Silva-Castro et al. 2013) y sometida a condiciones de estrés hídrico durante al menos 2 años.

II.3.a Condiciones iniciales del suelo

La planta piloto consistió en un contenedor de polietileno de dimensiones de 1,5 m de largo y 1,5 m de ancho y 1 m de alto con un volumen total de 1 m³ y un sistema de circulación de agua. Este tanque contenía aproximadamente 1.500 Kg de un suelo arenoso conteniendo con 20.000 mg/Kg de diesel. En la parte inferior del tanque se colocó una capa de 20 cm de espesor de grava para facilitar el drenaje. Esta planta construida en 2008, se construyó para realizar diferentes tratamientos de bioestimulación (Silva-Castro et al. 2013) y a partir de 2011 se mantuvo en el exterior, sin aplicar ningún tratamiento, sin riego y a temperatura ambiente. La falta de aporte hídrico durante un periodo prolongado y la contaminación con hidrocarburos, mayoritariamente fracciones recalcitrantes que no hubieran sido degradadas con los distintos tratamientos de biorremediación previamente aplicados (Silva-Castro et al. 2013) propició el hábitat idóneo para el aislamiento de microorganismos tolerantes a la falta de agua y degradadores de hidrocarburos. Para proceder a los aislamientos primero se tomó 1 Kg de suelo homogeneizado, el cual se almacenó en un lugar seco y fresco. Tras ello se analizaron las propiedades químicas y físicas del suelo por nuestro grupo y por la empresa AG-Ambiental. Tal y como se indica en la Tabla II.2 recogen las características del suelo.

Tabla II.2. Propiedades químicas y físicas del suelo arenoso contenido en la planta piloto.

Parámetros	Valor
Textura	Arenosa
COT (%)*	0,27
Nitrógeno (mg/Kg)*	1.111
Fósforo (mg/Kg)*	40,66
pH	6,24
Humedad (%)	0,026% ± 0,004
TPHs	5.854,67 ± 360,36 ppm

*Granulometría: Determinado mediante el fraccionamiento por tamizado.

*COT: Carbono total determinado mediante pérdida por calcinación.

*Nitrógeno total: Suma de NTK, nitrato y nitritos.

*Fósforo: Determinado mediante digestión ácida

II.3.b Aislamiento de microorganismos potencialmente degradadores de hidrocarburos aromáticos policíclicos

En primer lugar realizamos una búsqueda de microorganismos potencialmente degradadores, sin utilizar el método del cloroformo, sin por ello descartar que entre los aislamientos existan cepas con potencial para tolerar la falta de agua. Para ello procedimos al aislamiento de microorganismos potencialmente degradadores de los hidrocarburos naftaleno, antraceno, fenantreno y pireno. En estos aislamientos decidimos introducir el diesel como fuente de carbono ya que la planta piloto se contaminó originariamente con dicho contaminante. A diferencia de los aislamientos anteriores, éstos se realizaron en medio mínimo M9 sólido adicionado con los hidrocarburos objeto de estudio, tal y como se indica en el apartado M5.b. Una vez preparadas las placas, se tomó 1 g de suelo homogenizado procedente de la muestra guardada de la planta piloto y se realizaron diluciones seriadas en 1xM9, las cuales se sembraron en placas de TSA para el recuento de la microbiota cultivable en TSA (MC) y en las placas de medio mínimo que acabamos de describir, para el recuento de microorganismos potencialmente degradadores cultivables (DC). De manera que se sembraron 100 µl de las diluciones 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} en dichas placas, las cuales se incubaron en una estufa a una temperatura de 30°C durante 24/48 horas. Tras este

tiempo se observó, en las placas de medio mínimo con el hidrocarburo en cuestión, la posible aparición de colonias. Dichas colonias se aislaron mediante siembra por agotamiento en placas de TSA.

Tras la siembra de las diluciones procedentes de la muestra de suelo, en placas de TSA y posterior incubación, se detectaron $1,87 \cdot 10^6$ UFC/g de suelo considerados como MC. Cuando la muestra se sometió a naftaleno como única fuente de carbono, se observó el mayor porcentaje de células viables en relación al recuento de MC. Sin embargo, cuando al medio mínimo M9 sólido se adicionó diesel como única fuente de carbono se detectó el menor porcentaje de células cultivables con respecto al recuento de MC (Tabla II.3).

Tabla II.3. Recuento de microorganismos cultivables en TSA y microorganismos potencialmente degradadores de hidrocarburos. En la primera columna se indica cada uno de los contaminantes objeto de estudio, en la segunda columna se muestra las UFC/g de suelo de los degradadores totales cultivables (DC), y en la última columna se indica el porcentaje de DC (de cada hidrocarburo) con respecto a la totalidad de la población microbiana cultivable en TSA (MC).

Contaminante	DC	DC / MC (%)
Naftaleno	$3,33 \cdot 10^5$	17,8
Antraceno	$6,67 \cdot 10^4$	3,6
Fenantreno	$8,33 \cdot 10^4$	4,5
Pireno	$1,83 \cdot 10^5$	9,8
Diesel	$5 \cdot 10^4$	2,7

Como resultado de estas siembras observamos la aparición de colonias, por lo que se procedió al aislamiento de éstas en medio enriquecido TSA. De modo que se aislaron 7, 8, 9, 7 y 3 colonias, cuando la comunidad microbiana cultivable (MC) se sometió a naftaleno, fenantreno, antraceno, pireno y diesel presente en la muestra de suelo se sometió a diesel como única fuente de carbono.

II3.b.1 Crecimiento de las cepas potencialmente degradadoras, en medio mínimo líquido adicionado con hidrocarburos

El objetivo de este ensayo fue determinar que aislados crecían en presencia de las fuentes de carbono objeto de estudio naftaleno, antraceno, fenantreno y pireno, además de diesel. Es por ello por lo que analizamos el crecimiento de cada uno de los aislados en medio mínimo M9 líquido adicionado con cada uno de los hidrocarburos de los que proviene el aislamiento.

Para caracterizar el crecimiento de las 7 cepas potencialmente degradadoras de naftaleno en medio mínimo líquido M9 adicionado con naftaleno como única fuente de carbono, se procedió tal y como se indica en el apartado M5.a. Se realizaron diluciones seriadas sembradas en TSA a los 0, 1, 2, 3, 4, 7, 10 y 14 días. Análogamente, se analizó el crecimiento de las cepas objeto de estudio en medio mínimo sin fuente de carbono (Figura II.9).

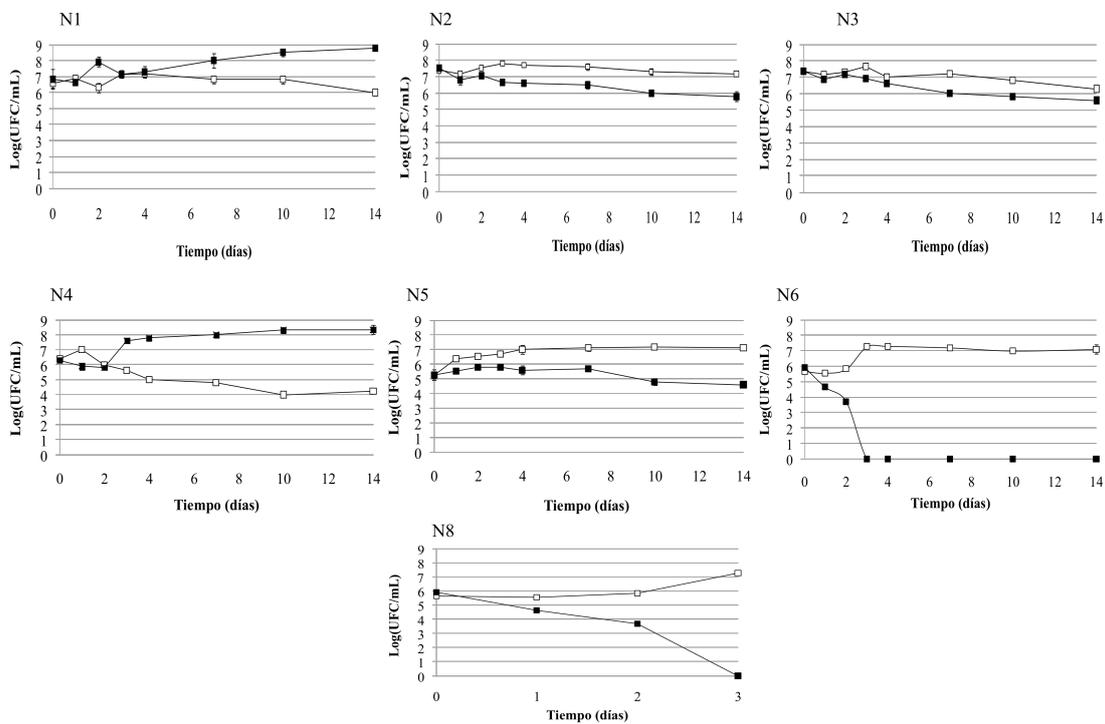


Figura II.9. Crecimiento de las cepas N1, N2, N3, N4, N5, N6 y N8 en medio mínimo líquido adicionado con naftaleno, como única fuente de carbono. Se representa el crecimiento de las cepas potencialmente degradadoras de naftaleno en medio mínimo líquido adicionado con dicha fuente de carbono (cuadrado negro) y en medio mínimo sin fuente de carbono (cuadrado blanco). En el eje de abscisas se representa el tiempo en días y en el eje de ordenadas el log (UFC/ml). Se incluye en forma de barras de error la desviación estándar a la media de tres experiencias.

Tras el análisis de los resultados se observó que sólo las cepas N1 y N4 fueron capaces de crecer en un medio mínimo adicionado con naftaleno, como única fuente de carbono, según las condiciones ensayadas. El número de colonias estimadas de la cepa N1 al inicio del experimento fue de $7,06 \cdot 10^6$ UFC/ml, el número de colonias proliferó alcanzando valores promedio de $6,3 \cdot 10^8$ UFC/ml, al final del periodo de ensayo. Por lo que la cepa aumentó la población 1,95 logaritmos a lo largo del periodo que dura el experimento (14 días). Por otra parte, el número de colonias de la cepa N4 al inicio del experimento fue de $2,11 \cdot 10^6$ UFC/ml y aumentó 2 logaritmos hasta el final del periodo de ensayo donde el número de UFC/ml fue de $2,2 \cdot 10^8$ (UFC/ml). Dichas cepas no fueron capaces de proliferar en un medio mínimo sin fuente de carbono. Por otra parte, las demás cepas denominadas como N2, N3, N6 y N8 no fueron capaces de crecer en un medio mínimo adicionado con el naftaleno como única fuente de carbono, en las condiciones ensayadas.

De manera análoga se caracterizó el crecimiento de las 8 cepas potencialmente degradadoras de antraceno, en medio mínimo M9 líquido adicionado con dicha fuente de carbono (Figura II.10).

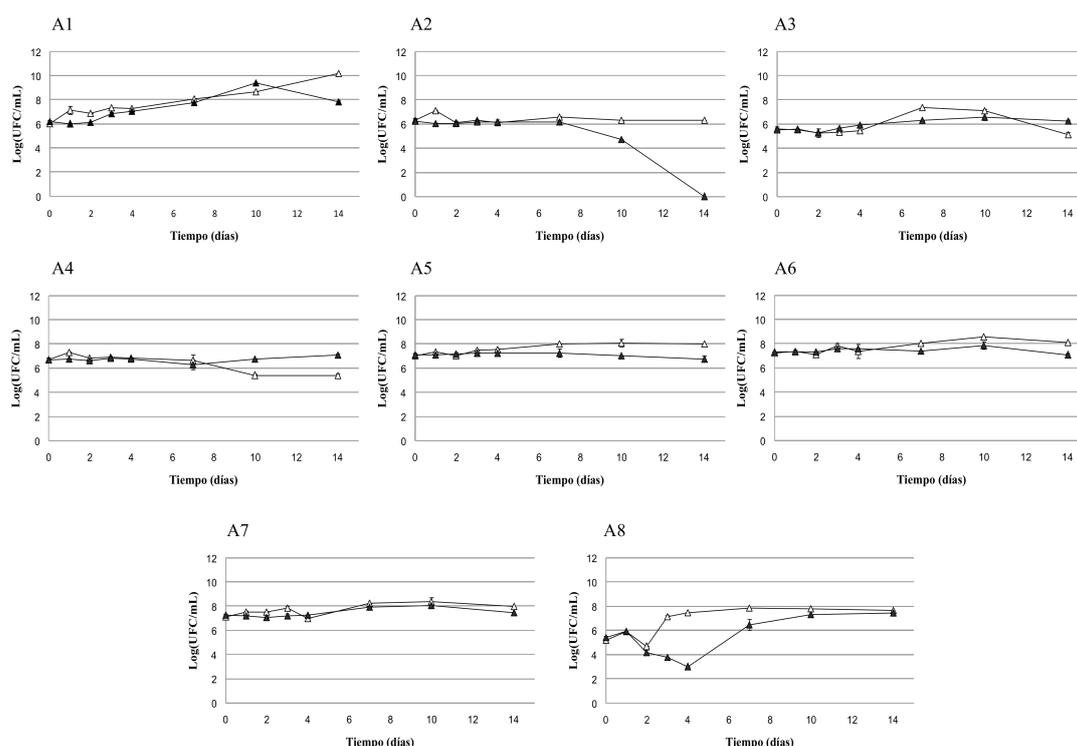


Figura II.10. Crecimiento de las cepas A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7 y A8 en medio mínimo líquido adicionado con antraceno, como única fuente de carbono. Se representa el crecimiento de las cepas potencialmente degradadoras de antraceno en medio mínimo líquido adicionado con dicha fuente de carbono (triángulo negro) y en medio mínimo sin fuente de carbono (triángulo blanco). En el eje de abscisas se representa el tiempo en días y en el eje de ordenadas el log (UFC/ml). Se incluye en forma de barras de error la desviación estándar a la media de tres experiencias.

Como se puede observar en la Figura II.10, las cepas denominadas A1 y A8 presentaron la capacidad de crecer en un medio mínimo adicionado con antraceno como única fuente de carbono, según las condiciones ensayadas. El número de colonias estimadas en el inicio del ensayo para la cepa A1 fue de $1,46 \cdot 10^6$ UFC/ml, transcurridos los 10 días de ensayo se produjo el mayor conteo de colonias alcanzando valores promedio de $2,6 \cdot 10^9$ UFC/ml. Por lo que dicha cepa aumentó 3,2 logaritmos a los 10 días desde el inicio del experimento. Al final del periodo de ensayo la cepa A1 descendió el número de colonias viables, alcanzando valores promedio de $6,1 \cdot 10^7$ UFC/ml. Dicha cepa fue capaz de proliferar en un medio mínimo sin fuente de carbono, de manera muy similar a la descrita cuando se inoculó en un medio adicionado con antraceno. Por otra parte, el número de colonias estimadas de la cepa A8 en el inicio del experimento fue de $2,45 \cdot 10^5$ UFC/ml y ascendió hasta alcanzar valores promedio de $2,8 \cdot 10^7$ UFC/ml. Dicha cepa aumentó su población 2 logaritmos a lo largo del periodo de incubación. Además la cepa A8 proliferó en un medio mínimo sin fuente de carbono, de manera muy similar a la descrita cuando se inoculó la cepa en medio mínimo con antraceno. Las cepas denominadas A2, A3, A4, A5, A6 y A7, no presentaron la capacidad de crecer en un medio mínimo adicionado con el antraceno, como única fuente de carbono, en las condiciones ensayadas. Así como tampoco presentaron la capacidad de proliferar en un medio sin fuente de carbono.

Igualmente, se procedió a la caracterización del crecimiento de las 7 cepas aisladas potencialmente degradadoras de fenantreno, en medio mínimo M9 líquido adicionado con dicha fuente de carbono y en un medio mínimo sin fuente de carbono (Figura II.11).

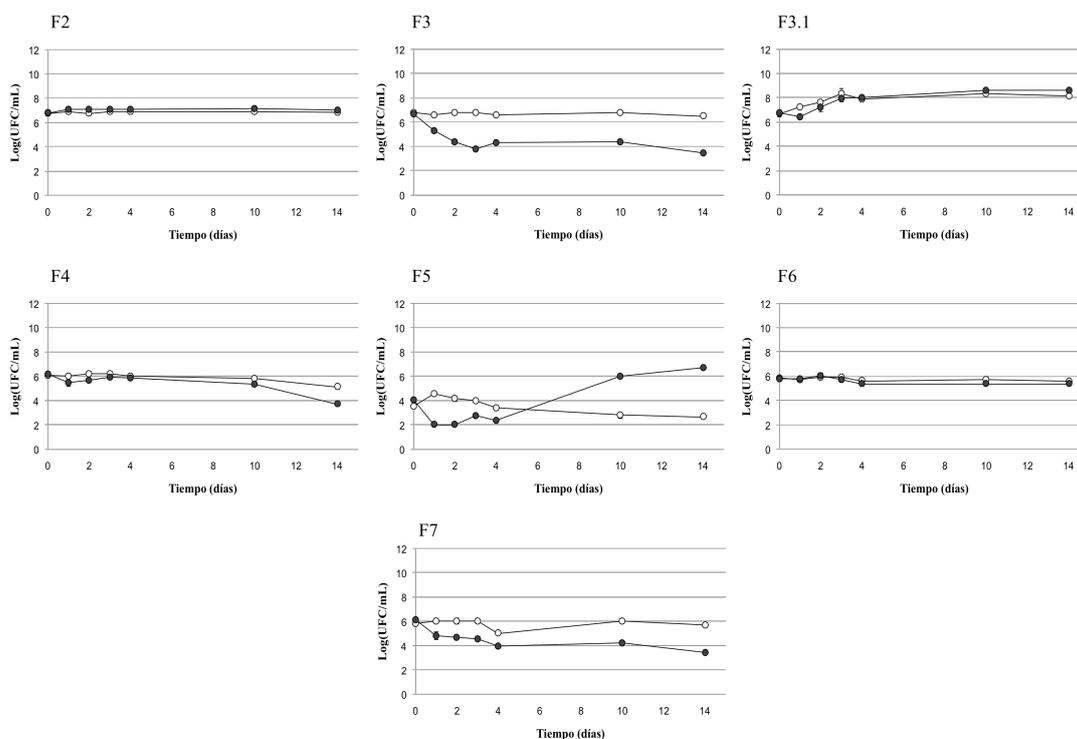


Figura II.11. Crecimiento de las cepas F2, F3, F3.1, F4, F5, F6 y F7 en medio mínimo líquido adicionado con fenantreno como única fuente de carbono. Se representa el crecimiento de las cepas potencialmente degradadoras de fenantreno en medio mínimo líquido adicionado con dicha fuente de carbono (círculo negro) y en medio mínimo sin fuente de carbono (círculo blanco). En el eje de abscisas se representa el tiempo en días y en el eje de ordenadas el log (UFC/ml). Se incluye en forma de barras de error la desviación estándar a la media de tres experiencias.

Como se puede observar en la Figura II.11, las cepas F3.1 y F5, presentaron la capacidad de crecer en un medio mínimo líquido adicionado con fenantreno, como única fuente de carbono, en las condiciones ensayadas. El número de colonias de la cepa F3.1 al inicio del experimento fue de $5,3 \cdot 10^6$ UFC/ml y alcanzó valores promedio de $4 \cdot 10^8$ UFC/ml al final del periodo de ensayo, por lo que dicha población aumentó 1,86 logaritmos a lo largo del periodo de incubación. La cepa F3.1 presentó capacidad de aumentar su población en un medio mínimo sin fuente de carbono (1,4 logaritmos). Por otra parte, el número de colonias de la cepa F5 al inicio del ensayo fue de $1,1 \cdot 10^4$ UFC/ml y aumentó durante el periodo de incubación hasta alcanzar valores promedio de $5,3 \cdot 10^6$ UFC/ml. Dicha población aumentó 2,7 logaritmos a lo largo del periodo de ensayo. La cepa F5 no presentó la capacidad de crecer en un medio mínimo sin fuente de carbono.

Análogamente se procedió a la caracterización de las 7 cepas potencialmente degradadoras de pireno, en medio mínimo líquido adicionado con pireno como única fuente de carbono (Figura II.12).

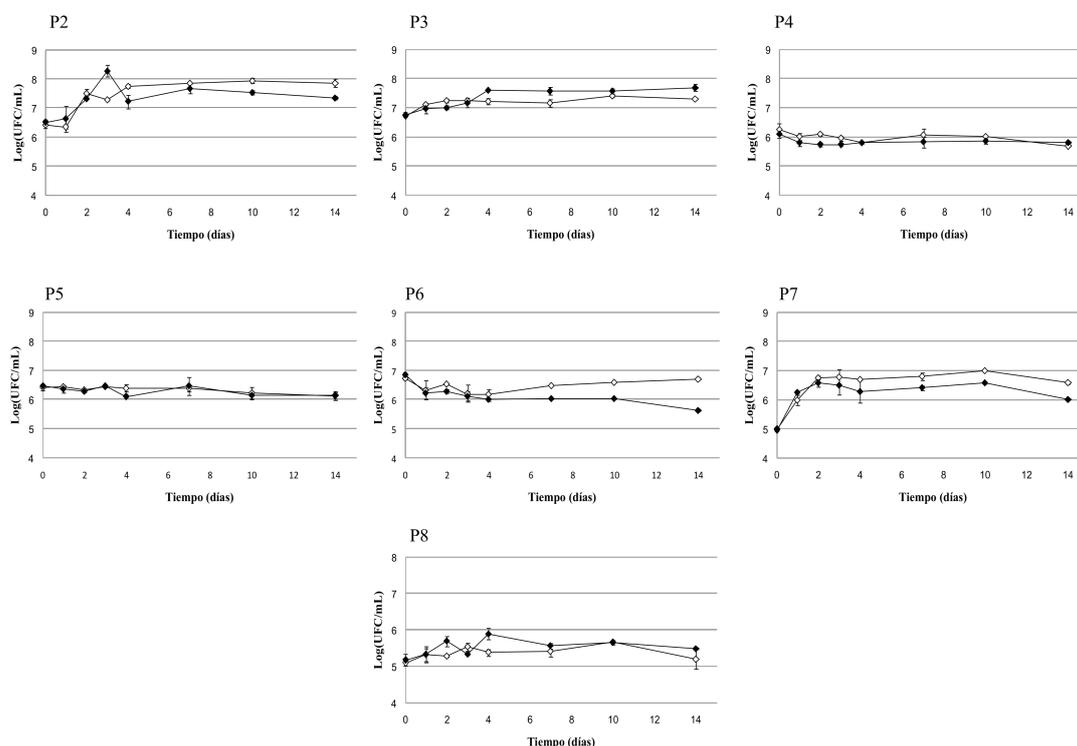


Figura II.12. Crecimiento de las cepas P2, P3, P4, P5, P6, P7 y P8 en medio mínimo líquido adicionado con pireno como única fuente de carbono. Se representa el crecimiento de las cepas potencialmente degradadoras de pireno, en medio mínimo líquido adicionado con dicha fuente de carbono (rombo negro) y en medio mínimo sin fuente de carbono (rombo blanco). En el eje de abscisas se representa el tiempo en días y en el eje de ordenadas el log (UFC/ml). Se incluye en forma de barras de error la desviación estándar a la media de tres experiencias.

Tras el análisis de los resultados se observó que las cepas P3 y P7 presentaron la capacidad de crecer en un medio mínimo adicionado con pireno. El número de colonias estimadas de la cepa P3 en el inicio del experimento fue de $5,7 \cdot 10^6$ UFC/ml y aumentó a lo largo del periodo hasta alcanzar valores promedio de $4,9 \cdot 10^7$ UFC/ml. Dicha cepa presentó un aumento de población cercano al logaritmo a lo largo del periodo de ensayo. La cepa P3 presentó un ligero aumento de población cuando se inoculó en un matraz con medio mínimo sin fuente de carbono. Por otra parte, la cepa P7 presentó mayor crecimiento cuando se cultivó en un medio mínimo sin fuente de carbono. Aún así, el número de colonias estimadas de la cepa P7 al inicio del experimento fueron $9 \cdot 10^4$ UFC/ml y aumentaron alcanzando valores máximos a los

10 días de muestreo donde se estimaron $3,7 \cdot 10^6$ UFC/ml. Dicha cepa presentó un aumento de 1,6 logaritmos a los 10 días de ensayo, trascurridos los cuales descendió hasta alcanzar valores promedio de $1 \cdot 10^6$ UFC/ml. Las cepas P2, P4, P5, P6 y P8 no presentaron la capacidad de proliferar en un medio adicionado con pireno como única fuente de carbono, en las condiciones ensayadas.

Igualmente, se caracterizó el crecimiento de los 3 aislados potencialmente degradadores de diesel, en medio mínimo M9 líquido adicionado con dicha fuente de carbono (Figura II.13).

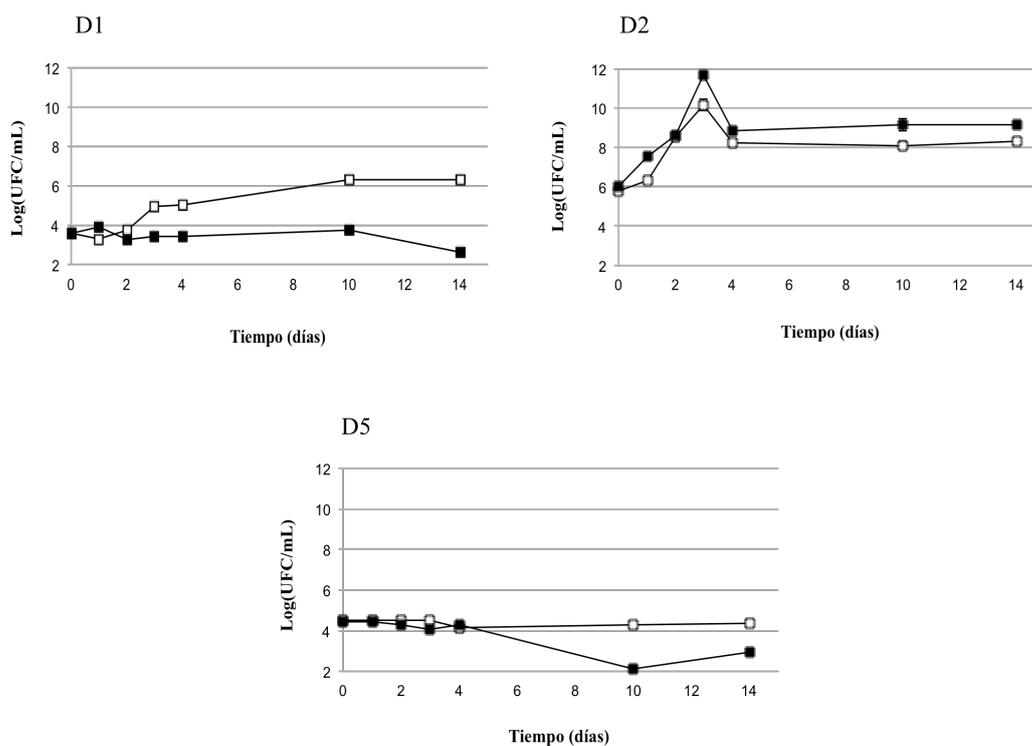


Figura II.13. Crecimiento de las cepas D1, D2 y D5 en medio mínimo líquido adicionado con diesel como única fuente de carbono. Se representa el crecimiento de las cepas potencialmente degradadoras de diesel en medio mínimo líquido adicionado con dicha fuente de carbono (rombo negro) y en medio mínimo sin fuente de carbono (rombo blanco). En el eje de abscisas se representa el tiempo en días y en el eje de ordenadas el log (UFC/ml). Se incluye en forma de barras de error la desviación estándar a la media de tres experiencias.

Tras el ensayo se concluyó que sólo la cepa D2 presentó capacidad de proliferar en un medio mínimo líquido adicionado con diesel como única fuente de carbono. El número de colonias de la cepa D2 al inicio del experimento fue de 10^6 UFC/ml y aumentó hasta alcanzar $1,4 \cdot 10^9$ UFC/ml al final del periodo de incubación. La

población aumentó 3,1 logaritmo a lo largo del periodo de ensayo. La cepa D2 presentó el mayor aumento a los 3 días de ensayo (5,7 logaritmos), donde la población alcanzó valores promedio de $5 \cdot 10^{11}$ UFC/ml. Aún así también presentó la capacidad de crecer en un medio mínimo líquido sin fuente de carbono de manera muy similar. Por otro lado, ninguna de las cepas D1 y D5 presentaron la capacidad de crecer en un medio mínimo con diesel como fuente de carbono.

II3.b.2 Ensayo de esporulación

Para distinguir las cepas que son esporulantes de las que no lo son se realizó un ensayo rápido de esporulación, tal y como se indica en el apartado M4.c. Este ensayo se basa en la diferente sensibilidad de las células vegetativas con respecto a las esporas al tratamiento con calor (Vílchez et al. 2008). Tras el ensayo se observó que sólo un de los aislados cuando al medio mínimo se le adicionó antraceno (A8), presentó tolerancia al tratamiento con calor.

II3.b.3 Ensayo de tolerancia a la desecación de las cepas

Con el objeto de caracterizar el nivel de tolerancia a la falta de agua de los aislados sin el método del cloroformo, se realizó un estudio de tolerancia a la desecación. Para ello se sometieron las 31 colonias aisladas identificadas como no esporulantes, a un secado bajo una corriente de aire estéril durante 24 horas, tal y como se indica en el apartado M4.d. Al igual que en el ensayo anterior, la tolerancia a condiciones de sequía de las distintas cepas se expresó como porcentaje de supervivencia a la falta de agua, tomando como 100% los datos húmedos. Se incluyó, como control positivo una cepa de *Acinetobacter calcoaceticus* (PADD68) aislada del desierto de Tabernas (Almería) e identificada como tolerante a la desecación (Narváez-Reinaldo et al. 2010). Como control negativo se incluyó a *P. putida* KT2440, utilizada por ser una cepa sensible a la desecación (Manzanera et al. 2002).

Como resultado del ensayo se determinó que el nivel de tolerancia a la desecación de la cepa considerada como control positivo fue del $3\% \pm 0,23$, coincidiendo con los resultados descritos por Narváez-Reinaldo. Mientras que el nivel de tolerancia a la

deseccación de la cepa utilizada como control negativo estaba por debajo de los niveles de detección. También se observó que de los 6 aislados cuando al medio mínimo se le adicionó naftaleno como única fuente de carbono, ninguno sobrevivió a las condiciones del ensayo, sin embargo de las 6 cepas aisladas cuando al medio se le adicionó antraceno como única fuente de carbono, la cepa denominada como A2 presentó capacidad de tolerar la falta de agua. Así, de los 7 aislados obtenidos cuando el medio fue limitado a fenantreno como única fuente de carbono, la cepa denominada F4 presentó una tolerancia superior a la cepa considerada como control positivo. Por otra parte, de los 7 aislados cuando la fuente de carbono del medio mínimo fue limitado a pireno, sólo la cepa P4 se consideró como tolerante a la sequía. Por último, de las 3 cepas aisladas en medio mínimo con diesel, sólo la cepa D5 presentó tolerancia a la desecación (Figura II.14). Análogo al ensayo anteriormente mencionado, para determinar las diferencias significativas entre las cepas se realizó un análisis estadístico según la distribución de probabilidad *t-student*, con un nivel de significancia del 0,005.

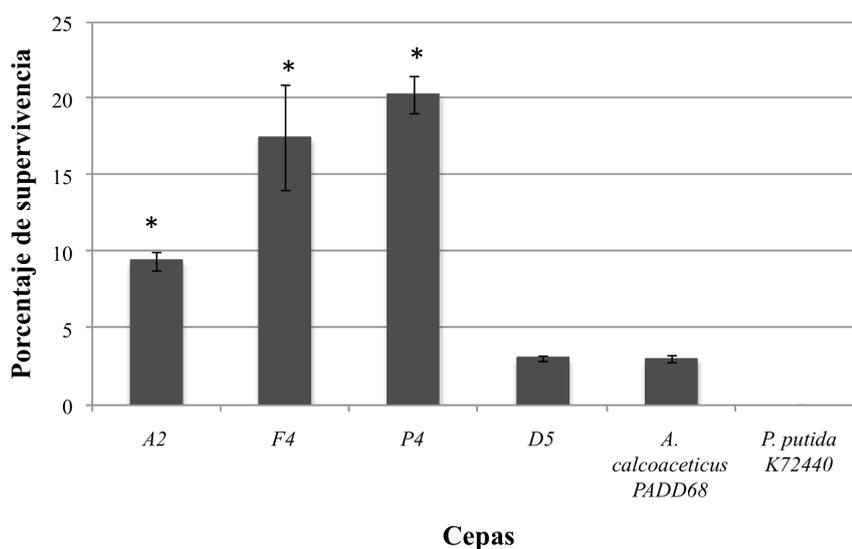


Figura II.14. Tolerancia a la desecación de las cepas aisladas sin el método del cloroformo. Se muestra el porcentaje de supervivencia a la desecación de las cepas aisladas. También se muestra la supervivencia de la cepa *A. calcoaceticus* PADD68 clasificada como tolerante a la sequía, considerada como control positivo. Y la cepa *P. putida* KT2440 considerada como control negativo, por ser sensible a la falta de agua. En el eje de abscisas se representa cada una de las cepas objeto de estudio y en el eje de ordenadas el porcentaje de supervivencia. Se indica con asterisco (*) las diferencias significativas. Se incluye en forma de barras de error la desviación estándar a la media de tres experiencias.

Como se puede observar en la Figura II.14, la cepa denominada P4 presentó mayor tolerancia a la desecación con respecto a los demás aislados, con un porcentaje de supervivencia del $20,25\% \pm 1,2$, seguida de la cepa F4, la cual presentó un porcentaje de supervivencia del $17,46\% \pm 3,4$. La cepa denominada A2 presentó un porcentaje de supervivencia tras el secado bajo una corriente de aire estéril del $9,4\% \pm 0,6$. Sin embargo, la cepa D5 presentó un nivel de tolerancia a la desecación próxima al nivel de la cepa considerada como control positivo (*A. calcoaceticus* PADD68), siendo el porcentaje de supervivencia del $3,03\% \pm 0,17$. Todas las cepas descritas, a excepción de la cepa D5, presentaron diferencias significativas con respecto a la cepa clasificada como tolerante a la desecación *A. calcoaceticus* PADD68.

Como resultado del ensayo de crecimiento en medio mínimo líquido adicionado con los HAPs objeto de estudio, además de diesel y el ensayo de tolerancia a la desecación de los aislados (sin el método del cloroformo), se observó que aquellas cepas que presentaron capacidad de crecer en un medio mínimo líquido adicionado con el hidrocarburo del que provenía, no presentaron la capacidad de tolerar la falta de agua. En la Tabla II.4 se indicó con un signo positivo (+) si la cepa en cuestión fue capaz de superar el ensayo y con signo negativo (-) si por el contrario no fue capaz de superar el ensayo. Aquellas cepas que resultaron negativas en ambas pruebas no aparecen en la Tabla II.4.

Tabla II.4. Cepas aisladas con capacidad de tolerar la falta de agua o capacidad para crecer en medio mínimo con hidrocarburos. En la primera columna se indica la cepa, en la segunda columna se indica la tolerancia a la desecación y en la tercera columna se indica el crecimiento en hidrocarburos.

Cepa	Tolerancia a la desecación	Crecimiento en hidrocarburos
N1	-	+
N4	-	+
A1	-	+
A2	+	-
A7	-	+
F3.1	-	+
F4	+	-
F5	-	+
P2	-	+
P3	-	+
P4	+	-
P7	-	+
D2	-	+
D5	+	-

II3.b.4. Caracterización de los aislados

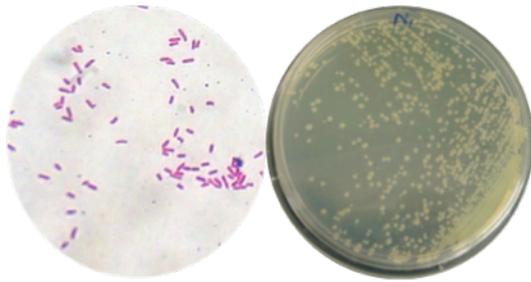
A continuación se realizó para cada uno de los aislados indicados en la Tabla II.4 ensayos para la caracterización morfológica y fisiológica de los mismos (Tabla II.5). Para determinar la morfología celular de la bacteria en cuestión se realizó una tinción Gram, tal y como se indica en el apartado M7.f. Para determinar algunas características fisiológicas se realizó un ensayo para conocer si presentaban actividad catalasa y/o oxidasa, además de si producían indol y/o ácido sulfhídrico (H₂S) y por último si solubilizan fosfatos, tal y como se indica en el apartado M7.d. También se determinó la presencia o no de órganos de movimiento (motilidad).

De modo que todos los aislados a excepción de la cepa F5, presentaron actividad catalasa positiva. Por otro parte, ninguno de los aislados presentó capacidad para producir indol. Además, ninguno de los aislados a excepción de la cepa denominada como D5 presentó la capacidad de producir H₂S. Casi la mitad de los aislados (6) presentaron la capacidad de solubilizar fosfatos. Por último, de los 14 aislados sólo 4 de ellos presentaron la capacidad para el movimiento.

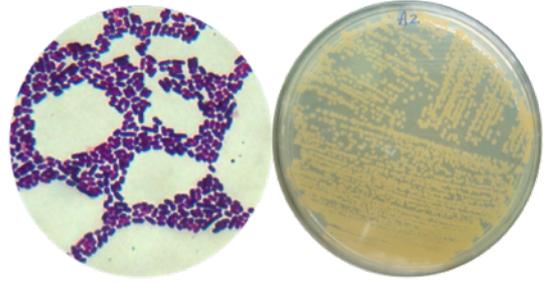
Tabla II.5. Caracterizaciones morfológicas y fisiológicas.

Cepa	Morfología celular	Catalasa	Oxidasa	Prod. indol	Prod. H ₂ S	Solubilización fosfatos	Motilidad
N1	Bacilos <i>Gram</i> + cortos y delgados	+	-	-	-	-	-
N4	Bacilos <i>Gram</i> + alargados y rectos	+	+	-	-	-	-
A1	Bacilos <i>Gram</i> - pequeños	+	+	-	-	+	-
A2	Cocos <i>Gram</i> +	+	-	-	-	+	+
A7	Bacilos <i>Gram</i> - cortos y delgados	+	+	-	-	+	-
F3.1	Bacilos <i>Gram</i> - pequeños	+	+	-	-	-	-
F4	Cocos <i>Gram</i> +	+	-	-	-	-	+
F5	Bacilos <i>Gram</i> + medianos	-	+	-	-	-	-
P2	Bacilos <i>Gram</i> - pequeños	+	+	-	-	+	+
P3	Bacilos <i>Gram</i> - alargados y delgados	+	+	-	-	-	-
P4	Cocos <i>Gram</i> +	+	-	-	-	-	-
P7	Bacilos <i>Gram</i> - cortos y delgados	+	+	-	-	-	-
D2	Bacilos <i>Gram</i> - pequeños	+	+	-	-	+	+
D5	Bacilos <i>Gram</i> - alargados y delgados	+	-	-	+	+	-

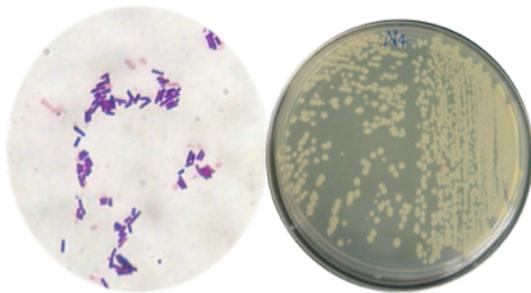
Los resultados de las pruebas de tinción Gram y morfología colonial de cada uno de los aislados hasta ahora seleccionados, se representan en la Figura II.15.



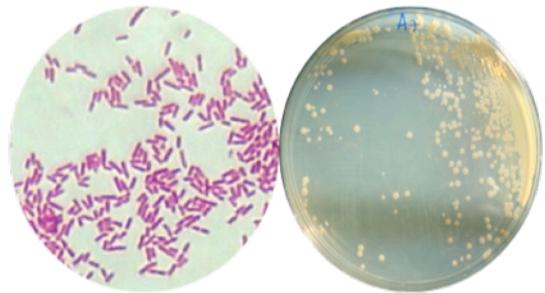
N1



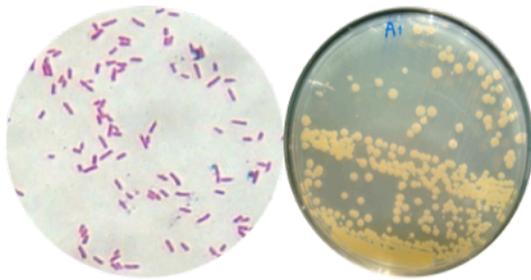
A2



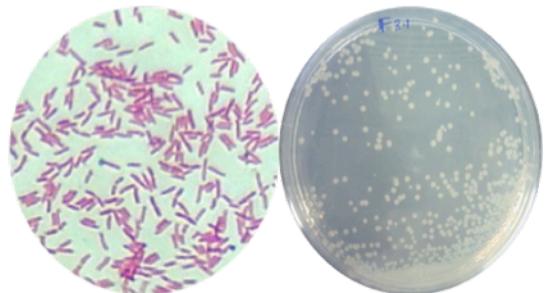
N4



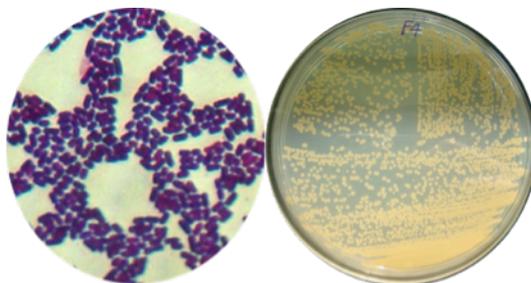
A7



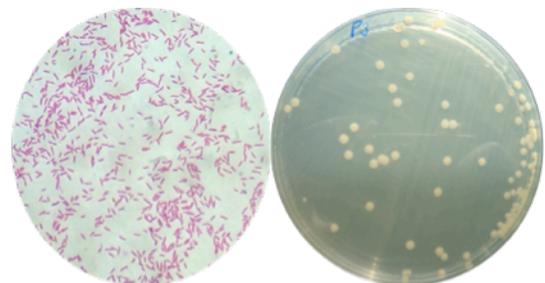
A1



F3.1



F4



P3

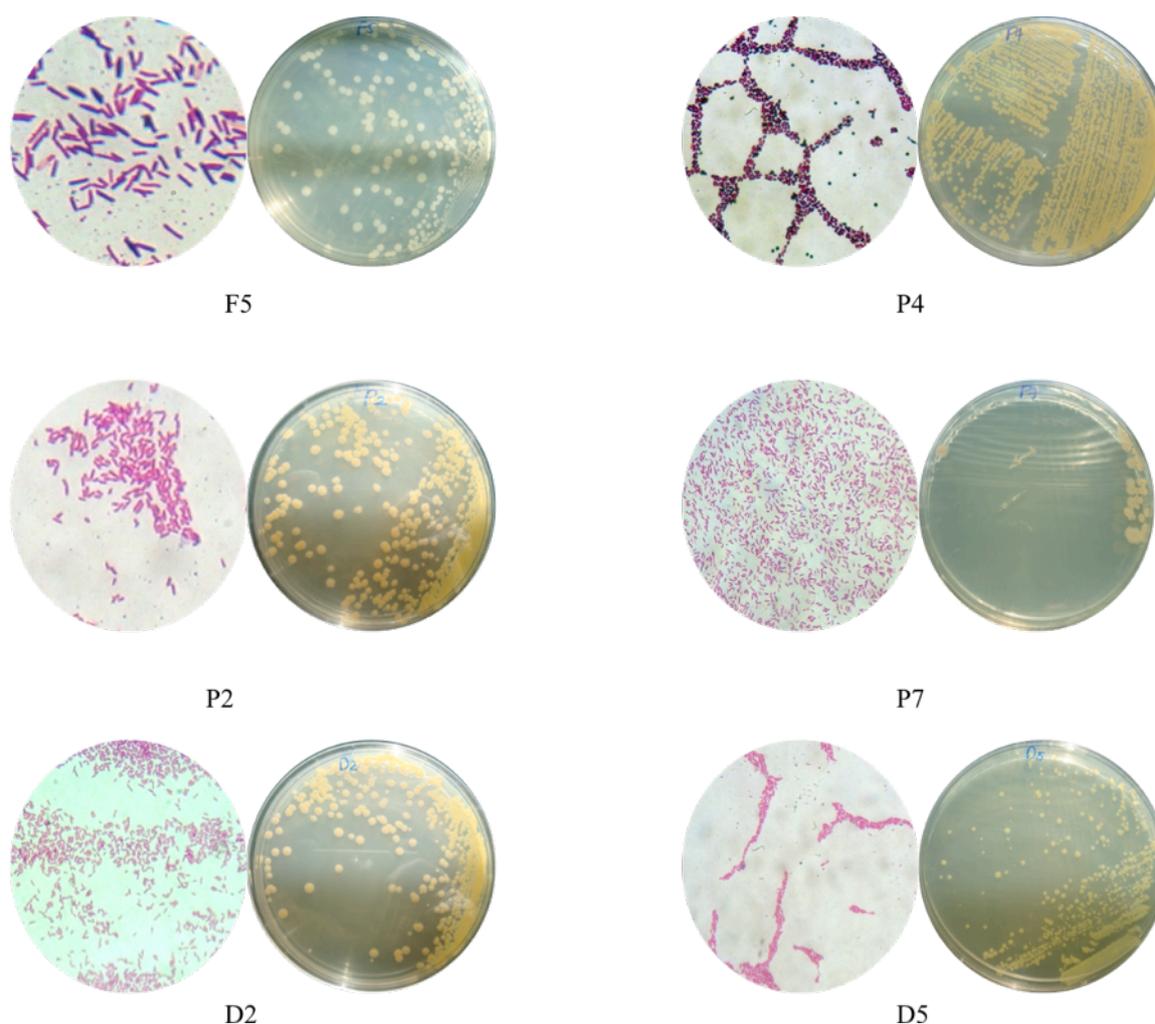


Figura II.15. Tinción *Gram*, morfología celular y forma de la colonia de los aislados.

II3.c Aislamiento de microorganismos potencialmente degradadores de hidrocarburos aromáticos policíclicos con el método del cloroformo

Una vez realizado los aislamientos de microorganismos que presentaban capacidad de crecer en un medio mínimo con los hidrocarburos objeto de estudio o presentaban la capacidad de tolerar la falta de agua, sin utilizar el método del cloroformo, decidimos continuar buscando microorganismos con ambas capacidades mediante dicho método. Para ello se tomó 1 g de suelo de la planta piloto homogenizado, el cual se trató con cloroformo, tal y como se indica en el apartado M4.b. Tras ello se realizaron diluciones seriadas en 1xM9 y se sembraron en las placas de TSA, para el recuento de microorganismos potencialmente xerotolerantes cultivables (XC) y en las placas de

medio mínimo descritas en el apartado M5.b, para el recuento de microorganismos potencialmente degradadores y xerotolerantes cultivables (DXC). De manera que se sembraron 100 μl de las diluciones 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} en dichas placas, las cuales se incubaron en una estufa a una temperatura de 30°C durante 24/48 horas. Una vez transcurrido el tiempo se observó la posible aparición de colonias, las cuales se aislaron mediante siembra por agotamiento en placas de TSA.

Como se puede observar en la Tabla II.6, la comunidad microbiana tratada con cloroformo presente en el medio mínimo (M9) adicionado con naftaleno, no presentó el mayor porcentaje de tolerancia al contaminante como ocurrió con los aislamientos antes mencionados, sin embargo la comunidad presente en los matraces con medio mínimo M9 adicionado con antraceno y pireno presentaron el mayor porcentaje de tolerancia a dichos contaminantes, con un 80%. Por otra parte, cuando la comunidad microbiana tratada con cloroformo se cultivó en medio mínimo M9 con diesel como única fuente de carbono presentó un porcentaje de tolerancia muy bajo (0,04%), en comparación con los demás hidrocarburos probados.

Tabla II.6. Recuento de la microorganismos presentes en las muestras tratadas con cloroformo. En la primera columna se indica cada uno de los contaminantes objeto de estudio, en la segunda columna se muestra las UFC/g de suelo de potenciales degradadores xerotolerantes cultivables en TSA (DXCT), y en la última columna se indica el porcentaje de DXC (de cada hidrocarburo) con respecto a la totalidad de la población microbiana xerotolerante (XC).

Contaminante	DXC (UFC/g)	DXC / XC (%)
Naftaleno	$1,5 \cdot 10^4$	60
Antraceno	$2 \cdot 10^4$	80
Fenantreno	$2 \cdot 10^4$	80
Pireno	$1,5 \cdot 10^4$	60
Diesel	10	0,04

Tras el conteo de UFC/g de suelo, se realizaron aislamientos de colonias individuales, de modo que se aislaron 5 cepas cuando la comunidad potencialmente tolerante se cultivó en medio mínimo adicionado con naftaleno, como única fuente de carbono. También se aislaron 5 cepas cuando la población se cultivó en medio mínimo

adicionado con antraceno. Sin embargo se aislaron 4 cepas cuando la población potencialmente xerotolerante se sometió a fenantreno, como única fuente de carbono, al igual que con pireno. Sin embargo sólo se aisló 1 cepa cuando se sometió el cultivo a diesel, como única fuente de carbono.

II3.c.1 Ensayo de esporulación

Al igual que en aislamientos anteriores se realizó un ensayo de esporulación, el cual permite la discriminación de cepas en función de su capacidad de esporulación, basándose en la sensibilidad de las esporas con respecto al tratamiento con calor, tal y como se indica en el apartado M4.d. De este modo, tras la realización de la técnica se observó que de los 19 aislamientos, sólo 5 de ellos resultaron ser no esporulantes.

II3.c.2 Ensayo de tolerancia a la desecación

Para conocer cuales de las cepas aisladas con el método del cloroformo, caracterizadas como no esporulantes, eran capaces de soportar la falta de agua, se realizó un ensayo de tolerancia a la desecación. Para ello se sometió a cada una de las cepas aisladas a un flujo continuo de aire estéril durante 24 horas, tal y como se indica en el apartado M.3.e, para así provocar el desecado del medio donde estaban resuspendidas y así someterlas durante dicho periodo a condiciones de falta de agua. Tras ello, se pudo calcular el porcentaje de supervivencia de la colección de cepas no esporulantes.

Como resultado del ensayo se determinó que el nivel de tolerancia a la desecación de la cepa considerada como control positivo fue del $4,08\% \pm 0,8$. Mientras que el nivel de tolerancia a la desecación de la cepa utilizada como control negativo, *P. putida* KT2440 estaba por debajo de los niveles de detección. También se observó que sólo el aislado en cloroformo, cuyo crecimiento se limitó a antraceno como única fuente de carbono (AC2) presentó tolerancia a la desecación, con un $30,7\% \pm 1,8$ (Figura II.16).

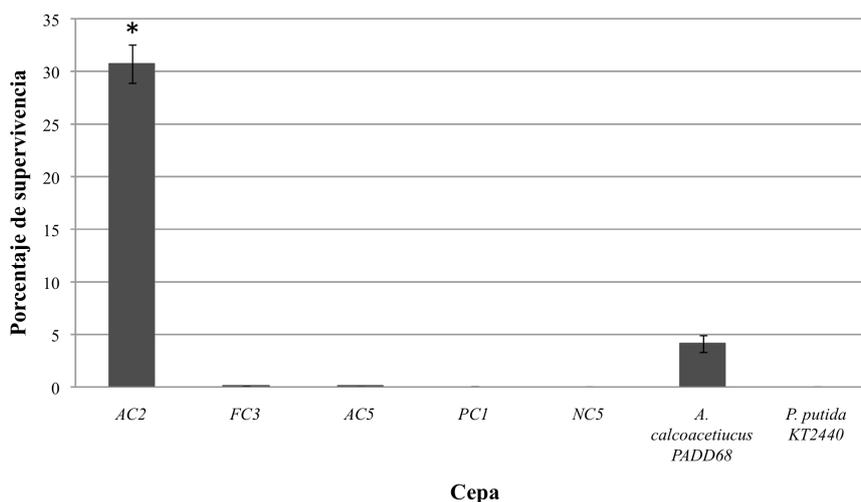


Figura II.16. Ensayo de tolerancia a la desecación de las cepas aisladas con el método del cloroformo. Se muestra el porcentaje de supervivencia de las cepas aisladas mediante el método del cloroformo, además de la cepa *A. calcoaceticus* y la cepa *P. putida* KT2440. En el eje de abscisas se representa cada una de las cepas objeto de estudio y en el eje de ordenadas el porcentaje de supervivencia. Se indica con asterisco (*) las diferencias significativas. Se incluye en forma de barras de error la desviación estándar a la media de tres experiencias.

Tras el análisis de los resultados se observó que la cepa AC2 presentó capacidad de tolerar la falta de agua, con un porcentaje de supervivencia del $30,68\% \pm 1,82$, en las condiciones ensayadas. Las demás cepas aisladas con el método del cloroformo, consideradas como no esporulantes denominadas como FC3, AC5, PC1, NC5, no presentaron la capacidad para tolerar la falta de agua, en las condiciones ensayadas.

3.c.3 Capacidad de crecimiento de las cepas potencialmente degradadoras y tolerantes a la sequía, en medio mínimo líquido adicionado con hidrocarburos

Para identificar el crecimiento de la cepa tolerante a la desecación AC2, en medio mínimo líquido adicionado con antraceno como única fuente de carbono, ya que es el hidrocarburo del que procede el aislamiento, se procedió tal y como se indica en el apartado M5.a. Tras ello se realizaron diluciones seriadas a las 0, 1, 2, 3, 4, 10 y 14 días.

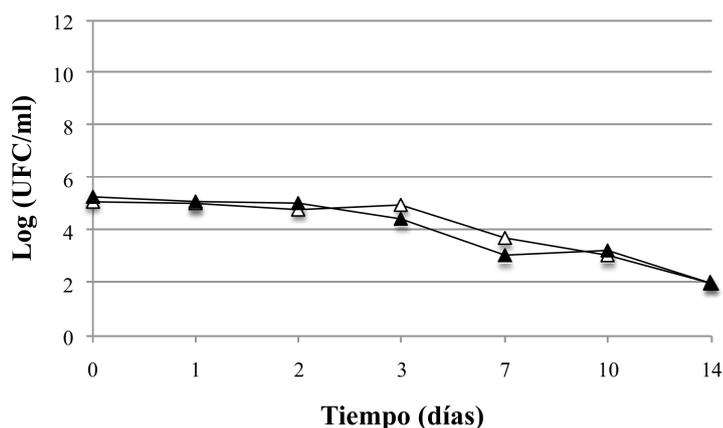


Figura II.17. Crecimiento de la cepa AC2 en medio mínimo líquido adicionado con antraceno, como única fuente de carbono. Se representa el crecimiento de la cepa AC2 en medio mínimo adicionado con antraceno (triángulo negro) y en medio mínimo sin fuente de carbono (triángulo blanco). En el eje de abscisas se representa el tiempo en días y en el eje de ordenadas el log (UFC/ml). Se incluye en forma de barras de error la desviación estándar a la media de tres experiencias.

Como se puede observar en la Figura II.17, la cepa AC2 no presentó capacidad para proliferar en un medio mínimo M9 líquido, adicionado con antraceno como única fuente de carbono, así como tampoco presentó capacidad para crecer en un medio mínimo sin fuente de carbono.

II3.c.4 Caracterización del aislado tolerante a la desecación

A continuación se caracterizó el único aislado con el método del cloroformo que presentó tolerancia a la desecación, AC2. De modo que dicha cepa se clasificó como Gram-positiva con una morfología de coco (Figura II.18). Dicha cepa presentó actividad catalasa y oxidasa positiva. Por otra parte AC2 resultó negativa en las pruebas de producción de indol y H₂S. Además no presentó capacidad para solubilizar fosfatos. Por otra parte, dicha cepa no presentó capacidad para el movimiento.

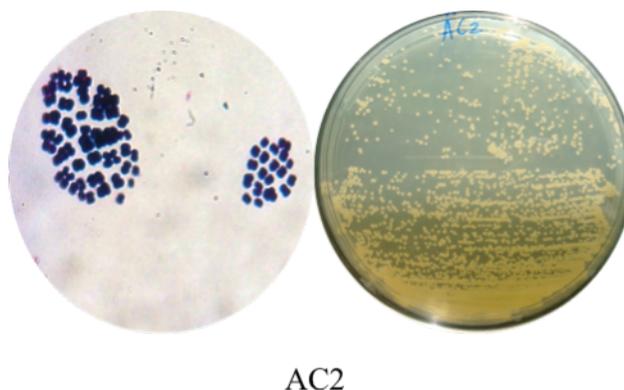


Figura II.18. Tinción *Gram*, morfología celular y forma de la colonia de la cepa AC2.

Discusión

Las herramientas biotecnológicas utilizadas para la descontaminación de un ambiente, deben estar adaptadas a las condiciones ambientales del lugar donde se pretenden emplear, para así conseguir la mayor eficacia posible en el proceso de biodegradación. De modo que si queremos emplear la técnica de rizorremediación para descontaminar suelos sometidos a estrés hídrico, debemos recurrir a aquellas bacterias y plantas que soporten dichas condiciones. Tras una revisión bibliográfica acerca de plantas tolerantes a la sequía, utilizadas para la descontaminación de suelos contaminados con compuestos hidrocarburos, sólo encontramos una planta que presentaba cierta tolerancia a la sequía (capítulo V), razón por la cual propusimos el uso de microorganismos que protejan a las plantas frente a condiciones de estrés hídrico, para así aumentar la tolerancia de la misma frente a dicho estrés.

Por ello seleccionamos las cepas aisladas por nuestro grupo (Narváez-Reinálido et al. 2010), pertenecientes al género *Arthrobacter* (4J27 y 5J12A) y caracterizadas como PGPRs (Vílchez et al. en preparación). Las bacterias PGPRs tienen un gran potencial en la agricultura, ya que favorecen el crecimiento de las plantas y la protección de éstas frente a condiciones adversas, como las condiciones de estrés hídrico (Mayak et al. 2004; Vilchez & Manzanera, 2011; Yuwono et al. 2005), bajas temperaturas, salinidad y otros estreses ambientales. Dichos estreses ambientales pueden ser debido a la contaminación por presencia de diferentes tipos de contaminantes, desde aromáticos

hasta hidrocarburos lineales, compuestos clorinados dioxinas, pesticidas y otros (Marques et al. 1999; Gibson & Parales, 2000; Vilchez & Manzanera 2011; Reed & Glick 2005; Kanaly & Harayama, 2010). Además, muchos PGPRs también producen la enzima 1-aminociclopropano-1 ácido carboxílico (ACC) deaminasa, la cual metaboliza el ACC (ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico), un precursor del etileno en plantas (Jacobson et al. 1994; Glick 1995). El etileno es producido como resultado de una serie de cambios fisiológicos en la planta cuando esta sujeta a estrés ambiental. De modo que el microorganismo es capaz de reducir la concentración de etileno mediante el consumo de ACC, el cual es hidrolizado a α -cetobutirato y amonio.

La secuenciación del genoma realizado en nuestro grupo de las cepas *A. siccitolerans* 4J27 y *A. koreensis* 5J12A (Manzanera et al. no publicado), nos permitió identificar ciertos genes implicados en las rutas de degradación de algunos hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), como son el antraceno, fenantreno y pireno. Por lo tanto, según los datos recogidos, las especies bacterianas *A. siccitolerans* 4J27 y *A. koreensis* 5J12A, podrían ser utilizadas como herramientas biotecnológicas para la descontaminación de ambientes sometidos a condiciones de estrés hídrico. Por ello se estudió el crecimiento de cada una de las cepas en medio mínimo líquido adicionado con cada uno de los HAPs (antraceno, fenantreno y pireno), como única fuente de carbono. La ausencia de crecimiento de las cepas *A. siccitolerans* 4J27 y *A. koreensis* 5J12A en dicho medio mínimo, se tradujo en la búsqueda de nuevas cepas que presentaran la capacidad de crecer (degradar) en presencia de compuestos hidrocarbonados y de sobrevivir en ambientes sometidos a condiciones de estrés hídrico.

Para ello recurrimos al método descrito por Narváez-Reinálido y colaboradores (2010), pero introduciendo una variante. El método se basa en un ciclo de selección de cepas tolerantes a la desecación mediante el uso del cloroformo como agente selectivo, seguido de la siembra de los supervivientes en un medio rico. La variante consistió en incluir dos pasos en dicho ciclo, de manera que obtuvieramos microorganismos tolerantes a la desecación, microorganismos degradadores de hidrocarburos aromáticos policíclicos y colonizadores de la raíz (Penrose & Glick 2003). Las muestras de suelo se recogieron de la rizosfera de la planta de la gayomba,

retama de olor (*Spartium junceum*), la cual se ubicaba cercana a una zona de tráfico rodado continuo (autovía). Se seleccionó dicha zona ya que debido a la combustión incompleta del combustible en los vehículos, aparecen subproductos como hidrocarburos no quemados que van a parar al suelos.

Así pues tras el aislamiento se obtuvo una colección de cepas consideradas como tolerantes a la desecación, aunque sólo dos de ellas superaron el 30% de supervivencia, porcentaje umbral considerado por Vílchez y colaboradores (en preparación), a partir del cual una cepa tiene potencial en la protección de plantas. Las cepas aisladas en HAPs como única fuente de carbono y ACC como única fuente de nitrógeno, se identificaron como pertenecientes al género *Miccorcoccus*. Dicho género presenta especies clasificadas como ACC deaminasa positivas (Patten & Glick 1996; Ali et al. 2010). Debido a la ausencia de crecimiento de las cepas en medio mínimo líquido adicionado con HAPs como única fuente de carbono, se utilizaron para ensayos destinados a la protección de plantas sensibles a la sequía y utilizadas en la producción agrícola (capítulo IV).

Tras dicho aislamiento, se procedió a la realización de nuevos aislamientos de muestras procedentes de un suelo que llevaba 4 años contaminado con diesel, cuyos dos últimos años estuvo sometido a un largo periodo de sequía. Se realizaron dos tipos de aislamientos uno de ellos mediante el método del cloroformo de Narváez y colaboradores (2010) y otro sin dicho método. Con ellos queríamos comprobar la eficacia del método del cloroformo en la búsqueda de microorganismos tolerantes a la desecación y degradadores de compuestos hidrocarbonados. De este modo, según los resultados se aislaron un mayor número de cepas tolerantes a la desecación cuando no se utilizó el método del cloroformo. Aún así, no conseguimos en ninguno de los casos aislar microorganismos que crecieran en un medio mínimo con algún hidrocarburo y que además presentara tolerancia a la desecación.

Los aislados de la planta piloto sin utilizar el método del cloroformo, considerados como tolerantes a la desecación, se clasificaron como bacterias Gram-positivas con una morfología celular de coco, a excepción de una de las cepas que se clasificó como bacteria Gram-negativa con morfología de bacilo alargado. De modo que, en base a los resultados consideramos que las bacterias Gram-positivas con morfología celular de coco presentan mayor resistencia a la desecación que aquellas bacterias Gram-

negativas con morfología de bacilo, según las condiciones de ensayo. Por otro lado, la cepa aislada con el método del cloroformo (AC2), considerada como tolerante a la desecación también se clasificó como Gram-positiva y además presentó morfología celular de coco. Por lo que, quizás dicho tipo de bacterias además de presentar mayor tolerancia a la desecación, también sean más resistentes a la presencia de disolventes, como el cloroformo.

Tras los resultados expresados en el Capítulo pensamos en la posibilidad de utilizar un microorganismo PGPR tolerante a la desecación y un microorganismo rizosférico capaz de crecer (degradar) a expensas de los compuestos hidrocarbonados objeto de estudio, de forma conjunta. Ya que el mecanismo de acción de algunos microorganismos se basa en la acumulación de pequeños compuestos orgánicos en respuesta a cambios extracelulares de osmolaridad, debido a la desecación o la adición sal (Brown 1976; Arakawa & Timasheff, 1982), por lo que dicha producción de compuestos xeroprotectores podría afectar positivamente en la protección de otros microorganismos presentes en el ambiente.

CAPÍTULO III

CAPÍTULO III

BIOPROTECCIÓN DE UNA CEPA SENSIBLE A LA DESECACIÓN POR LA CEPA TOLERANTE *Microbacterium* sp. 3J1

Introducción

Los microorganismos anhidrobiontes acumulan pequeños compuestos orgánicos, denominados solutos compatibles, en respuesta a cambios extracelulares de osmolaridad, debido a la desecación o la adición de sales (Brown, 1976; Arakawa & Timasheff 1982). La acumulación de solutos compatibles es un mecanismo descrito en varias especies de diferentes grupos taxonómicos, entre los que están los procariotas (Kláhn & Hagemann 2011), hongos (Magan 2008), plantas (Hoekstra et al. 2001) y animales incluido células humanas (Garcia-Perez & Burg 1991).

Los solutos compatibles son solutos orgánicos de bajo peso molecular, los cuales mantienen un balance osmótico en condiciones de estrés por falta de agua, gracias a procesos como son la osmoregulación, lo cual no interfiere en el metabolismo celular. Dichos solutos también tienen la función de estabilizar proteínas y componentes celulares (Kempf & Bremer 1998; Hoekstra et al. 2001; Yancey, 2005; Kláhn & Hagemann 2011).

Los solutos compatibles pueden ser químicamente diferenciados, entre ellos están los amino ácidos y derivados (ectoína, hidroxiectoína), poliols y azúcares, metilaminas (N-óxido trimetilamina y glicina-betaina), compuestos de metil sulfonio y urea, está última no denominada como soluto compatible (Kempf & Bremer 1998).

Por lo general, se ha establecido que varios anhidrobiontes pueden tolerar la desecación debido a la acumulación intracelular de disacáridos no reductores, tales como la trehalosa y sacarosa, pudiendo representar hasta el 20% de su peso seco (Crowe & Crowe 1992; Clegg 2001).

Narváez y colaboradores (2010), describen en su trabajo los xeroprotectores (solutos compatibles producidos por organismos anhidrobiontes) producidos por la cepa *Microbacterium* sp. 3J1. Así pues, la cepa *Microbacterium* sp. 3J1 produjo los xeroprotectores en orden de mayor a menor cantidad, trehalosa, lactato, piruvato, ácido oxoglucorónico, ácido glutámico.

Resultados

Los microorganismos aislados descritos en el Capítulo II no presentaban la doble capacidad de tolerar la falta de agua y crecer en medio mínimo adicionado con hidrocarburos (potenciales degradadores), por ello decidimos analizar el beneficio que una cepa xerosensible obtiene cuando está presente en el suelo junto con una cepa xerotolerante. Para ello partimos de la hipótesis de que la cepa xerotolerante al estar en estado de estrés hídrico y producir solutos compatibles (xeroprotectores) es probable que genere un microclima en su entorno (colonia), del cual se beneficie la cepa xerosensible. La especie bacteriana, *Pseudomonas putida* KT2440 es una cepa cuyo crecimiento está afectado por las condiciones de sequía (Manzanera et al. 2002; Narváez-Reinálido et al. 2010) y por tanto su rendimiento biodegradativo en ambientes áridos y semiáridos también está limitado a las estaciones húmedas (Molina et al. 1998). Dicha cepa se utiliza en técnicas de biorremediación debido a su versatilidad para colonizar lugares y para metabolizar determinados compuestos xenobióticos (Franklin et al. 1981; Ramos-Gonzalez & Molin 1998), además de ser un microorganismo modelo en ingeniería genética (Franklin et al. 1981). Para comprobar si *Pseudomonas putida* KT2440 es más estable a los cambios abióticos

como la falta de agua en presencia de una cepa xerotolerante, utilizamos la cepa tolerante a la desecación *Microbacterium* sp. 3J1 (Narváez-Reinálido et al. 2010), ya utilizada en el ensayo de protección de plantas frente a condiciones de estrés hídrico y caracterizada como PGPR (Vílchez et al. en preparación).

Los ensayos para caracterizar la protección de un microorganismo sobre el otro se realizaron a tres escalas. En un primer nivel, se caracterizó utilizando como soporte placas de Petri en ausencia de medio de cultivo, luego se utilizó suelo compuesto por vermiculita como sustrato de fácil manejo y de secado rápido y finalmente se utilizó un suelo franco-arenoso artificial, seleccionado por ser un suelo característico de las zonas áridas y semiáridas, además de presentar características similares con respecto al suelo del que se aisló la cepa *Microbacterium* sp. 3J1.

III.1 BUSQUEDA DE MUTANTES RESISTENTES DE LA CEPA *Microbacterium* sp. 3J1

Para identificar en el suelo a cada una de las cepas objeto de estudio se emplearon mutantes resistentes de dichas cepas a ciertos antibióticos. La cepa de *P. putida* MAX40 un mutante resistente a rifampicina y tetraciclina que además es bioluminiscente por inserción del operon *lux* (pUT mini-Tn5 *lux*CDABE) de *Photobacterium luminescens* (Manzanera et al. 2004).

Para el seguimiento de la cepa *Microbacterium* sp. 3J1 se optó por buscar resistencias espontáneas a antibióticos mediante siembra en placas de TSA con discos de papel impregnados en distintos antibióticos. Inicialmente se caracterizó el perfil de resistencia natural de la cepa a distintos antibióticos utilizando discos con estreptomycin (Sm) a 25 µg/ml, rifampicina (Rif) a 30 µg/ml, cloramfenicol (Cm) a 50 µg/ml, kanamicina (Km) a 30 µg/ml, tetraciclina (Tc) a 10 µg/ml. El disco con el antibiótico se colocó en el centro de una placa de TSA previamente sembrada con 100 µl de un cultivo saturado en TSB y se incubó a una temperatura de 30°C durante 24 horas. Los resultados de estos ensayos se muestran en la Tabla III.1, donde se observa que la cepa fue sensible a todos los antibióticos ensayados.

Tabla III.1. Susceptibilidad a antibióticos. En la primera columna se indica el antimicrobiano utilizado, en la segunda columna la concentración del antibiótico en el disco ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$), y en la tercera el diámetro (mm) del halo de inhibición de la cepa *Microbacterium* sp. 3J1.

Antimicrobiano	Concentración final del disco ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Diámetro del halo de inhibición (mm)
Estreptomina	25	207 \pm 12
Rifampicina	30	337 \pm 12
Cloramfenicol	50	428 \pm 13
Kanamicina	30	153 \pm 12
Tetraciclina	10	106 \pm 0

Como producto de los ensayos de sensibilidad y tras 48 horas de incubación, se observó la aparición de colonias en el halo de inhibición del crecimiento. Para la obtención de mutantes espontáneos se utilizaron las colonias aparecidas en la zona de inhibición más cercanas al disco. Dichas colonias se sembraron por agotamiento para la obtención de cultivos puros en una placa de TSA adicionada con el antibiótico (1:1.000) utilizado en el ensayo del que se obtuvo. Se obtuvieron mutantes espontáneos a los antibióticos estreptomina, rifampicina y kanamicina. Finalmente se seleccionó un mutante espontáneo resistente a kanamicina porque es un antibiótico efectivo para el seguimiento de microorganismos del suelo dada la baja frecuencia de resistencias. A dicho mutante resistente a kanamicina se le denominó *Microbacterium* sp. 3J1K.

III.2 TOLERANCIA A LA DESECACIÓN DE LAS CEPAS *Microbacterium* sp. 3J1K y *P. putida* MAX40 EN PLACAS

Para determinar si la tolerancia a la sequía de la cepa *Microbacterium* sp. 3J1 era extensible a otros microorganismos sensibles a la falta de agua como *P. putida* KT2440, decidimos estudiar la tolerancia de ambas cepas de forma independiente, así como combinada en las mismas condiciones de ensayo.

III.2.a Ensayo de tolerancia a la desecación de las cepas *Microbacterium* sp. 3J1K y *P. putida* MAX40 de forma individual

Para la realización del ensayo se partió de una colonia aislada de la cepa *P. putida* MAX40 de 24 horas de crecimiento, procedente de una placa de TSA con el antibiótico al que es resistente (rifampicina y tetraciclina) y una colonia aislada de la cepa *Microbacterium* sp. 3J1K de 48 horas de crecimiento, procedente de una placa de TSA con kanamicina. Tras ello se desarrolló el método modificado por el cual se evalúa la tolerancia a la desecación, de manera que las diluciones seriadas se sembraron en placas adicionadas con el antibiótico al que es resistente cada una de las cepas objeto de estudio, tal y como se indica en el apartado M4.d. Además se realizó el ensayo a las cepas que no presentaban resistencia a los antibióticos objeto de estudio. En este ensayo se incluyó como control positivo la cepa de *A. calcoaceticus* (PADD68) aislada del desierto de Tabernas (Almería) (Narváez-Reinaldo et al. 2010) y como control negativo se incluyó a *P. putida* KT2440, utilizada por ser una cepa sensible a la desecación (Manzanera et al. 2002). En la Tabla III.2 se indica la supervivencia de cada una de las cepas objeto de estudio en porcentaje.

Tabla III.2. Tolerancia a la desecación de las cepas *Microbacterium* sp. 3J1K y *P. putida* MAX40 de forma individual. En la primera columna se indica el nombre de la cepa empleada y en la segunda columna se indica el porcentaje de supervivencia.

Cepa	Porcentaje de supervivencia
<i>Microbacterium</i> sp. 3J1	$33,4 \pm 1,8$
<i>Microbacterium</i> sp. 3J1K	$30,7 \pm 3,5$
<i>P. putida</i> KT2440	ND
<i>P. putida</i> MAX40	ND
<i>A. calcoaceticus</i> PADD68	$4,03 \pm 0,2$

ND. No detectado

Según los resultados de la Tabla III.2, la cepa *A. calcoaceticus* PADD68 presentó un porcentaje de supervivencia del $4,03\% \pm 0,2$. En el caso de ambas cepas de *P. putida* los valores de supervivencia quedaron por debajo de los niveles de detección tras las 24 horas de secado, en las condiciones ensayadas. Por otro lado, la cepa *Microbacterium* sp. 3J1K presentó un porcentaje de supervivencia especialmente alto,

siendo este del $30,7\% \pm 3,5$, dicho valor no se consideró como significativamente distinto al presentado por la cepa parental *Microbacterium* sp. 3J1.

III.2.b Ensayo de tolerancia a la desecación de las cepas *Microbacterium* sp. 3J1K y *P. putida* MAX40 de forma combinada

El objetivo de este ensayo fue comprobar si la cepa *Microbacterium* sp. 3J1K era capaz de proteger a la cepa sensible a la desecación *P. putida* MAX40 frente a condiciones de falta de agua, mediante un ensayo en placas de Petri en ausencia de medio de cultivo. Para determinar la tolerancia a la desecación de las cepas objeto de estudio cuando ambas se suministran de forma conjunta, se procedió a lo indicado en el apartado M4.d. En la Tabla III.3 se indica la supervivencia en porcentaje de cada una de las cepas objeto de estudio *Microbacterium* sp. 3J1K y *P. putida* MAX40 cuando ambas se suministraron de forma combinada, además de los controles *A. calcoaceticus* (PADD68) y *P. putida* KT2440.

Tabla III.3. Tolerancia a la desecación de las cepas *Microbacterium* sp. 3J1K y *P. putida* MAX40 de forma combinada. En la primera columna se indica el nombre de la cepa y en la segunda columna se indica el porcentaje de supervivencia.

Cepa	Porcentaje de supervivencia
<i>Microbacterium</i> sp. 3J1K	$30,4 \pm 0,59$
<i>P. putida</i> MAX40	ND
<i>P. putida</i> KT2440	ND
<i>A. calcoaceticus</i> PADD68	$4,26 \pm 0,37$

ND. No detectado

Tras el ensayo de tolerancia a la desecación se observó que la cepa *A. calcoaceticus* PADD68 presentó un nivel de tolerancia del $4,26 \pm 0,37$. Sin embargo, la cepa sensible a la desecación *P. putida* KT2440 presentó un nivel de tolerancia por debajo de los niveles de detección. Por otra parte la cepa *Microbacterium* sp. 3J1K presentó

una supervivencia a la falta de agua del $30,4\% \pm 0,58$, mientras que los niveles de supervivencia registrados de la cepa *P. putida* MAX40 estuvieron por debajo de los niveles de detección, incluso cuando se incubó conjuntamente con la cepa con la cepa clasificada como tolerante a la sequía *Microbacterium* sp. 3J1K.

III.3 TOLERANCIA A LA DESECACIÓN DE LAS CEPAS *Microbacterium* sp. 3J1K y *P. putida* MAX40 EN MICROCOSMOS CON VERMICULITA

Dado que no se observó un efecto protector de la cepa xerotolerante (*Microbacterium* sp. 3J1K) hacia la cepa xerosensible (*P. putida* MAX40), en las condiciones ensayadas, decidimos estudiar la posible interacción entre ambas cepas en un sistema más complejo, por si requería de un soporte físico y un mayor área de interacción entre ambas cepas y por tanto con un efecto más parecido al de un suelo real. Para ello estudiamos la tolerancia a la falta de agua de *Microbacterium* sp. 3J1K y de *P. putida* MAX40 en microcosmos utilizando vermiculita como soporte sólido. Dichos microcosmos estaban compuestos por 71,5 g de vermiculita en recipientes de 500 ml de volumen, tal y como se observa en la Figura III.1.



Figura III.1. Microcosmos edáficos con vermiculita como sustrato. Se muestra los microcosmos inoculados con la cepa *P. putida* MAX40 tras 10 días. A la izquierda, el microcosmos en condiciones de humedad y a la derecha el microcosmos sometido a condiciones de estrés hídrico.

Para ello se realizaron 8 microcosmos divididos en 4 grupos, el primero de ellos denominado V3J1K, fue inoculado con la cepa *Microbacterium* sp. 3J1, el segundo de ellos denominado VMAX40 fue inoculado con la cepa *P. putida* MAX40, el tercero de ellos denominado V3J1KMAX40 fue inoculado con las cepas *Microbacterium* sp. 3J1 y *P. putida* MAX40 y finalmente el denominado V0 utilizado como control para la detección de posibles cepas resistentes a los antibióticos utilizados. De cada grupo se realizaron dos replicas a una de las cuales se le eliminó el riego durante todo el periodo que duró el ensayo, mientras que la otra replica se regó durante todo el periodo de muestreo cada 48 horas con 0,5 ml/g (Tabla III.4).

Tabla III.4. Microcosmos en vermiculita sometidos a distintas condiciones. En la primera columna se indica el nombre del microcosmos, en la segunda columna el nombre de la cepa con el que se inoculó y en la tercera columna las condiciones a las que se incubaron cada uno de los microcosmos.

Microcosmos	Inóculo	Condiciones
V3J1K	<i>Microbacterium</i> sp. 3J1K	Humedad
		Sequía
VMAX40	<i>P. putida</i> MAX40	Humedad
		Sequía
V3J1KMAX40	<i>Microbacterium</i> sp. 3J1K y <i>P. putida</i> MAX40 MAX40	Humedad
		Sequía

La inoculación de los microcosmos con las cepas *P. putida* KT2440 y *Microbacterium* sp. 3J1, se realizó tal y como se indica en el apartado M6.a. Tras ello se realizó un recuento de células viable, donde en el caso de las células de *P. putida* MAX40 sembradas en placas de TSA sin antibiótico se detectaron $2,24 \cdot 10^8$ UFC/ml, mientras que en placas de TSA con rifampicina y tetraciclina se observaron $2,54 \cdot 10^8$ UFC/ml. En el caso de las células de *Microbacterium* sp. 3J1K sembradas en placas de TSA sin antibiótico se detectaron $1,27 \cdot 10^9$ UFC/ml, mientras que en placas de TSA adicionadas con kanamicina se observaron $1,05 \cdot 10^9$ UFC/ml. Para comprobar si era necesario adicionar a los inóculos el antibiótico calculamos la frecuencia de la reversión de la mutación, la cual al ser inferior al 12%, consideramos que no era

necesario adicionar al medio enriquecido antibiótico para el crecimiento de las cepas marcadas.

III.3.a. Contenido hídrico de los microcosmos compuestos por vermiculita

Se realizó un seguimiento de la humedad contenida en el suelo de cada uno de los microcosmos a los 0, 1, 3, 4, 6, 9 y 10 días, para conocer en que punto de muestreo la diferencia entre el contenido hídrico del suelo en condiciones de humedad y el suelo sometido a condiciones de estrés hídrico era significativamente mayor, se determinó tal y como se indica en el apartado M5.d.2.

En la Figura III.2 se representa la evolución del contenido hídrico de cada uno de los microcosmos a lo largo del periodo de muestreo.

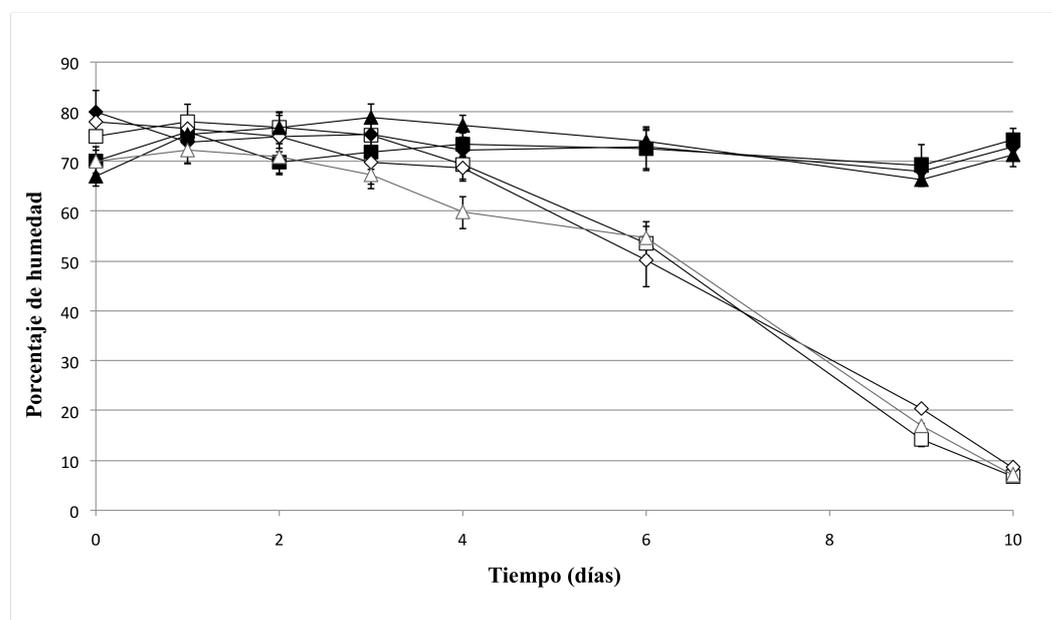


Figura III.2. Contenido hídrico de los microcosmos con vermiculita. Se representa el contenido hídrico del suelo en cada uno de los microcosmos en condiciones de humedad (símbolos negros) y en condiciones de sequía (símbolos blancos). En el eje de abscisas se indica el tiempo en días y en el eje de ordenadas se indica la humedad en porcentaje. Se incluye en forma de barras de error la desviación estándar a la media de tres experiencias.

La humedad de los microcosmos en ausencia de estrés hídrico se mantuvo constante en valores entorno al 65-70%. Por otro lado, los valores de humedad (%) de los microcosmos sometidos a estrés hídrico descendieron hasta aproximadamente un 7% al final del ensayo. Mediante un análisis de la distribución t de Student se determinó

que los microcosmos en condiciones de humedad no presentaron diferencia significativa en ningún punto de muestreo, al igual que ocurrió con los sometidos a condiciones de sequía entre sí. Sin embargo, las diferencias entre los microcosmos en condiciones de humedad y los sometidos a condiciones de sequía fueron significativamente diferentes a partir del día 6 de ensayo.

III.3.b. Ensayo de tolerancia a la desecación de la cepa *Microbacterium* sp. 3J1K y *P. putida* MAX40 en vermiculita

Una vez determinado que a partir del día 10 se lograba la mayor diferencia en contenido hídrico entre los microcosmos en condiciones de humedad y los microcosmos sometidos a estrés hídrico decidimos evaluar la tolerancia de las cepas *Microbacterium* sp. 3J1K y *P. putida* MAX40, tanto por independiente como cuando se suministraban de forma conjunta, en los microcosmos compuestos por vermiculita. Para estimar las células viables tras el periodo de 10 días, tanto en los microcosmos incubados en condiciones de humedad como los microcosmos sometidos a sequía, se recurrió al método de siembra en placa y posterior recuento de UFC/g de suelo de cada una de las cepas, tal y como se indica en el apartado M6.a.1.

En la Figura III.3 se representa el recuento de colonias como producto de las UFC/g de suelo de la cepa *Microbacterium* sp. 3J1K en los microcosmos V3J1K y de la cepa de la cepa *P. putida* MAX40 en los microcosmos VMAX40, en condiciones de irrigación continua y en condiciones sequía. Sólo se sembraron las diluciones seriadas al día 10 del ensayo ya que es cuando se observó mayor diferencia significativa, con respecto al contenido hídrico de los microcosmos expuestos a un riego continuo y los microcosmos sometido a condiciones de estrés hídrico.

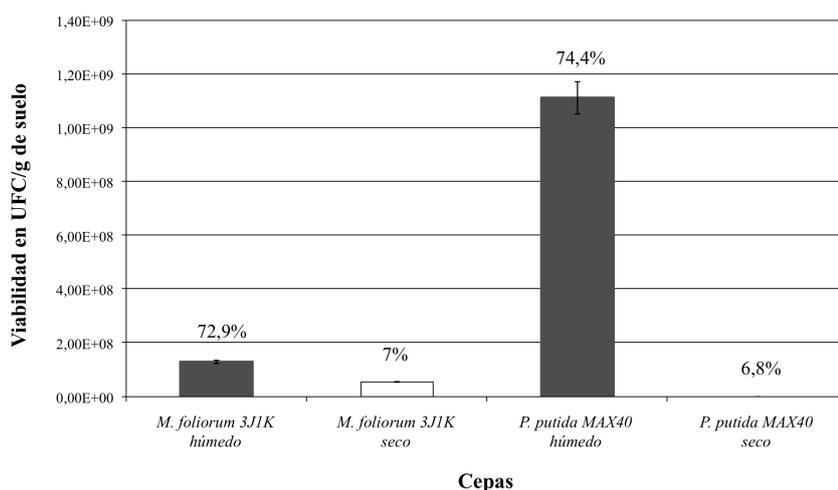


Figura III.3. Células viables presentes en los microcosmos V3J1K y VMAX40. Se indica la viabilidad en forma de UFC/g de suelo de la cepa *Microbacterium* sp. 3J1K y la cepa *P. putida* MAX40, en un suelo compuesto por vermiculita sometido a condiciones de humedad (gris) y en un suelo sometido a condiciones de estrés hídrico (blanco). Se indica el porcentaje de humedad de cada microcosmos encima de cada barra. En el eje de abscisas se la cepa y en el eje de ordenadas se indica las UFC/g de suelo. Se incluye en forma de barras de error la desviación estándar a la media de tres experiencias.

Como resultado del ensayo para determinar la tolerancia a la desecación de las cepas *Microbacterium* sp. 3J1K y *P. putida* MAX40, se estimaron $1,3 \cdot 10^8$ UFC/g de suelo de la cepa *Microbacterium* sp. 3J1K en el suelo sometido a condiciones de humedad, a los 10 días. El contenido hídrico al final del ensayo en el microcosmos V3J1K en condiciones de humedad fue de $72,9\% \pm 1,0$. Por otro lado, cuando el suelo se sometió a condiciones de sequía se estimaron $5,5 \cdot 10^7$ UFC/g de suelo al final del ensayo, dicho suelo presentó una humedad del $7\% \pm 0,3$ en el momento del muestreo (V3J1K). En ninguno de los suelos se identificó la aparición de colonias resistentes a los antibióticos rifampicina y tetraciclina.

Por otra parte se estimaron $1,8 \cdot 10^9$ UFC/g de suelo de células viables de la cepa *P. putida* MAX40 en un suelo sometido a condiciones de humedad en el microcosmos VMAX40. En dicho punto de muestreo la humedad fue del $74,4\% \pm 4,2$. Por otro lado, cuando el suelo se sometió a condiciones de sequía se estimaron $8,9 \cdot 10^3$ UFC/g de suelo al final del ensayo, dicho suelo presentó una humedad del $6,8\% \pm 1,3$ en el momento del muestreo (Figura III.3). En ninguno de los suelos contenidos en los microcosmos objeto de estudio se identificaron resistentes al antibiótico kanamicina.

De manera análoga se realizó un recuento de células viables en forma de UFC/g de suelo de cada una de las cepas objeto de estudio *Microbacterium* sp. 3J1K y *P. putida* MAX40, en los microcosmos donde ambas cepas se suministraron de forma combinada (V3J1KMAX40). Para ello se tomó 1 g tanto del suelo en condiciones de humedad, así como del suelo sometido a condiciones de estrés hídrico, cada uno de los cuales se resuspendieron en 1xM9. Tras ello se realizaron diluciones seriadas en dicha solución salina a los 10 días. Dichas diluciones se sembraron en placas de TSA adicionado con kanamicina para el seguimiento de la cepa *Microbacterium* sp. 3J1K y en placas de TSA suplementado con rifampicina y tetraciclina para el seguimiento de la cepa sensible a la sequía *P. putida* MAX40.

En la Figura III.4 se representa el número de células viables como UFC/g de suelo de la cepa *Microbacterium* sp. 3J1K y la cepa sensible a la sequía *P. putida* MAX40 en forma combinada a los 10 días de ensayo, en un suelo en condiciones de humedad y de sequía.

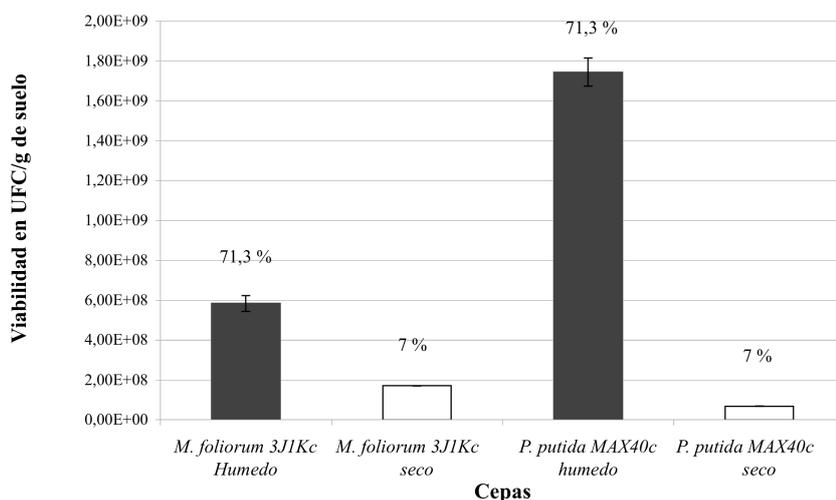


Figura III.4. Células viables presentes en los microcosmos V3J1KMAX40. Se indica la viabilidad en forma de UFC/g de suelo de la cepa *Microbacterium* sp. 3J1K y la cepa *P. putida* MAX40 cuando se suministran de forma conjunta (c), en un suelo compuesto por vermiculita sometido a condiciones de humedad (gris) y en un suelo sometido a condiciones de estrés hídrico (blanco). Se indica el porcentaje de humedad de cada microcosmos encima de cada barra. En el eje de abscisas se indica la cepa y en el eje de ordenadas se indica las UFC/g de suelo. Se incluye en forma de barras de error la desviación estándar a la media de tres experiencias.

Como resultado del ensayo se estimaron $6 \cdot 10^8$ UFC/g de suelo de la cepa *Microbacterium* sp. 3J1K en el microcosmos V3J1KMAX40 cuyo suelo se incubó en condiciones de humedad. En dicho punto de muestreo la humedad fue del $71,3\% \pm$

1,3. Sin embargo, cuando el suelo se sometió a condiciones de sequía se estimaron $1,7 \cdot 10^8$ UFC/g de suelo al final del ensayo, dicho suelo presentó una humedad del $7\% \pm 0,5$ en el momento del muestreo. Por otro lado, se estimaron $1,7 \cdot 10^9$ UFC/g de suelo de la cepa *P. putida* MAX40 en el suelo sometido a condiciones de humedad, en el microcosmos V3J1KMAX40. En dicho punto de muestreo la humedad del suelo fue del $71,3\% \pm 1,3$. Cuando el suelo se sometió a condiciones de estrés por falta de agua se estimaron $6,7 \cdot 10^7$ UFC/g de suelo de la cepa *P. putida* MAX40. Dicho suelo presentó una humedad del $7\% \pm 0,5$ en el momento del muestreo.

El objetivo de este ensayo fue determinar si existe un efecto protector de la cepa clasificada como xerotolerante *Microbacterium* sp. 3J1K, sobre la cepa clasificada como sensible a la desecación, *P. putida* MAX40, en un suelo compuesto por vermiculita. Para ello con los datos de viabilidad de cada una de las cepas *Microbacterium* sp. 3J1K y *P. putida* MAX40, calculamos el porcentaje de supervivencia de cada una de ellas en un suelo sometido a condiciones de estrés hídrico, tomando como referencia los datos del suelo sometido a condiciones de humedad. Dicho porcentaje se calculó tanto en los microcosmos inoculados con la combinación de ambas cepas, como en aquellos donde se inocularon de forma individual. En la Figura III.5 se representa el porcentaje de supervivencia de la cepa tolerante a la sequía *Microbacterium* sp. 3J1K, el porcentaje de supervivencia de la cepa sensible a la sequía *P. putida* MAX40 y el porcentaje de supervivencia de ambas cuando fueron suministradas de forma combinada.

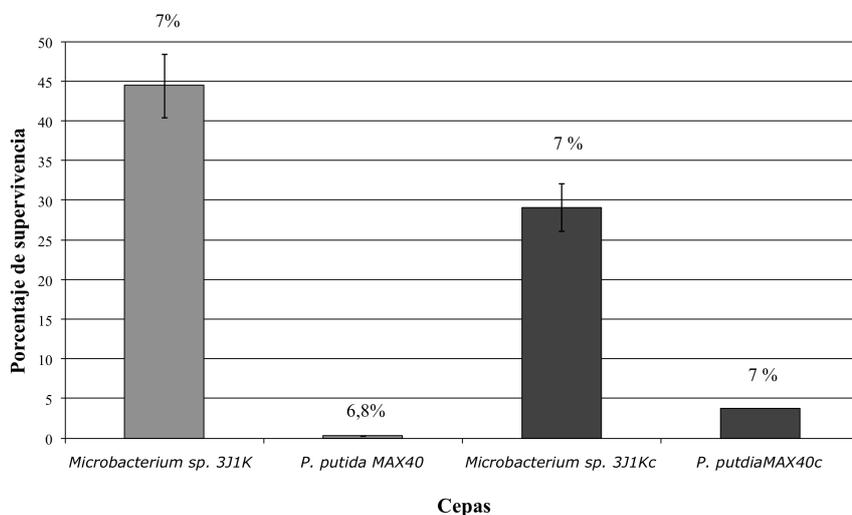


Figura III.5. Supervivencia de microorganismos suministrados de forma individual y conjunta en microcosmos sometidos a estrés hídrico. Se representa la supervivencia en porcentaje de la cepa

tolerante a la sequía *Microbacterium* sp. 3J1K y la cepa sensible a la sequía *P. putida* MAX40 de forma individual (gris claro) y cuando de forma combinada (gris oscuro). Se indica el porcentaje de humedad de cada microcosmos encima de cada barra. En el eje de abscisas se la cepa y en el eje de ordenadas se indica el porcentaje de supervivencia. Se incluye en forma de barras de error la desviación estándar a la media de tres experiencias.

Como se puede observar en la Figura III.5, la cepa *Microbacterium* sp. 3J1K en el microcosmos donde se cultivó de forma individual (V3J1K), presentó una supervivencia del $44,42\% \pm 4$ en un suelo sometido a condiciones de falta de agua, el cual presentó una humedad del $7\% \pm 0,3$ en el momento del muestreo. Por otra parte la cepa sensible a la desecación *P. putida* MAX40 presentó una supervivencia del $0,3\% \pm 0,03$ en un suelo sometido a condiciones de sequía, cuando no se combinó con la cepa tolerante a la falta de agua. Dicho suelo presentó un porcentaje de humedad del $6,8\% \pm 1,3$ en el momento del muestreo. Este contenido hídrico no fue significativamente diferente del observado en el microcosmos V3J1K en condiciones de sequía. Sin embargo, cuando ambas cepas se suministraron de forma conjunta la cepa sensible a la sequía *P. putida* MAX40 presentó una supervivencia del $3,8 \pm 0,5$. Siendo esta, significativamente distinta a la tolerancia observada cuando la cepa se inoculó individualmente en vermiculita. Mientras que la cepa tolerante a la sequía presentó una supervivencia del $29,1\% \pm 3$ en un suelo sometido a condiciones de sequía. Dicho suelo presentó una humedad del $7\% \pm 0,5$ en el momento del muestreo.

III.4 TOLERANCIA A LA DESECACIÓN DE LAS CEPAS *Microbacterium* sp. 3J1K y *P. putida* MAX40 EN MICROCOSMOS CON UN SUELO FRANCO-ARENOSO

Con el fin de evaluar la posible interacción de las cepas objeto de estudio *Microbacterium* sp. 3J1K y *P. putida* MAX40 en suelos más similares a los reales, se preparó un suelo artificial en el laboratorio, cuya composición granulométrica fue arena en un 80% y arcilla en un 20%. Según el diagrama triangular que representa los valores de las tres fracciones (arena, limo y arcilla) dicho suelo presentó una textura franco-arenosa. El suelo se seleccionó por presentar las características típicas de las zonas áridas y semiáridas, además de presentar características similares con respecto al suelo del que se aisló la cepa parental *Microbacterium* sp. 3J1. Para ello se

realizaron microcosmos edáficos en recipientes de 5 litros de volumen con 3.5 Kg de suelo. Dicho suelo se compuso por un 80% de arena y un 20% de arcilla sin esterilizar. Para proporcionar drenaje al sistema se colocó en fondo de los recipientes grava con un tamaño de canto de aproximadamente de 3 cm de diámetro (Figura III.6).



Figura III.6. Microcosmos edáficos compuestos por un suelo franco-arenoso. A la izquierda se muestra un microcosmos sometido a condiciones de sequía y a la derecha un microcosmos en condiciones de humedad.

Al igual que en los anteriores ensayos se realizaron 8 microcosmos clasificados en 4 grupos, los cuales fueron denominados como se detalla a continuación: el primero de ellos denominado S3J1K fue inoculado con la cepa tolerante a la falta de agua *Microbacterium* sp. 3J1K, el segundo denominado SMAX40 que fue inoculado con la cepa sensible a la desecación *P. putida* MAX40, el tercero denominado S3J1KMAX40 el cual fue inoculado con las cepas *Microbacterium* sp. 3J1K y *P. putida* MAX40, las cuales fueron suministradas de forma combinada y el cuarto denominado S0, microcosmos que se utilizó como control para la detección de mutantes espontáneos a los antibióticos utilizados. De cada grupo se realizaron dos replicas a una de las cuales se le eliminó el riego durante todo el periodo que duró el ensayo, mientras que la otra replica se mantuvo en condiciones de humedad durante

todo el periodo de muestreo, con una adición homogénea de 250 ml de agua destilada cada 96 horas (Tabla III.4).

Tabla III.4. Microcosmos compuestos por un suelo franco-arenoso sometido a distintas condiciones. En la primera columna se indica el nombre del microcosmos, en la segunda columna el nombre de la cepa con el que se inoculó cada microcosmos y en la tercera columna las condiciones a las que se sometieron cada uno de ellos.

Microcosmos	Cepa	Condiciones
S3JIK	<i>Microbacterium</i> sp. 3JIK	Humedad
		Sequía
SMAX40	<i>P. putida</i> MAX40	Humedad
		Sequía
S3JIKMAX40	<i>Microbacterium</i> sp. 3JIK y <i>P. putida</i> MAX40	Humedad
		Sequía
S0	Sin inocular	Sequía
		Humedad

Para proceder a la realización del ensayo se inocularon 2 matraces de 1 L de volumen con 500 ml de TSB, tal y como se indica en el apartado M6.a.

III.4.a Contenido hídrico de los microcosmos compuestos por un suelo franco-arenoso

Análogamente al ensayo realizado con vermiculita como sustrato, se realizó un seguimiento de la humedad contenida en el suelo de cada uno de los microcosmos a los 0, 1, 4, 7 y 14 días, para conocer en que punto de muestreo la diferencia entre el contenido hídrico del suelo en condiciones de humedad y el suelo sometido a condiciones de estrés hídrico era significativamente mayor. La toma de muestras se realizó más tarde, que en los microcosmos con vermiculita para permitir que se alcanzara un grado de humedad similar al obtenido en los ensayos de tolerancia a la desecación de las cepas en vermiculita. Para determinar el contenido hídrico de cada

uno de los microcosmos se procedió tal y como se indica en el apartado M5.d.2. En la Figura III.7 se representa el contenido hídrico de cada uno de los microcosmos.

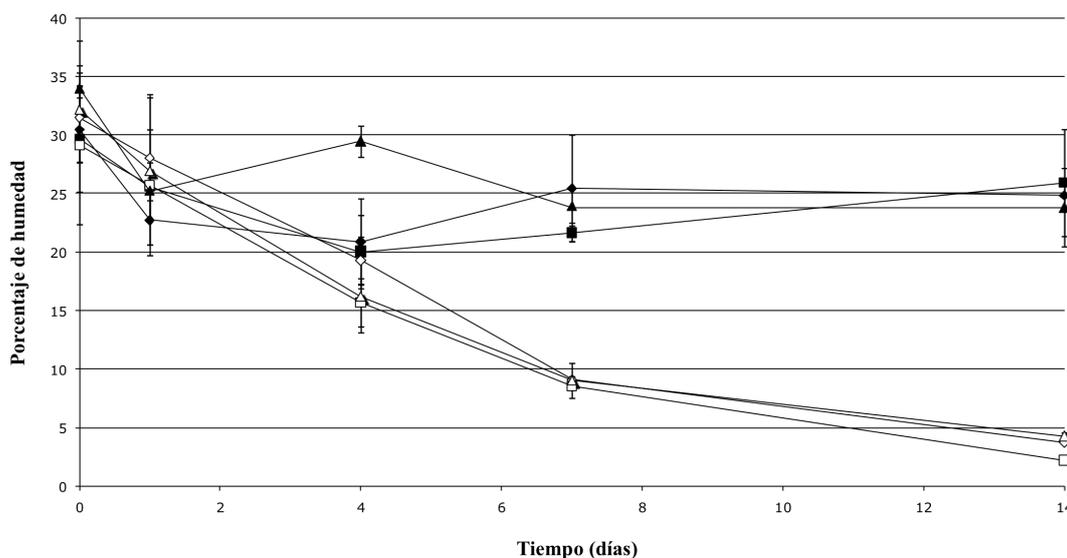


Figura III.7. Contenido hídrico de los microcosmos con suelo franco-arenoso. Se representa el contenido hídrico del suelo en cada uno de los microcosmos en condiciones de humedad (símbolos negros) y en condiciones de sequía (símbolos blancos). En el eje de abscisas se indica el tiempo en días y en el eje de ordenadas se representa la humedad en porcentaje. Se incluye en forma de barras de error la desviación estándar a la media de tres experiencias.

Los microcosmos en condiciones de humedad presentaron un porcentaje de humedad entre 20-35%, manteniéndose entorno a dicho rango durante todo el periodo que dura el ensayo. Por otro lado, aquellos microcosmos que se sometieron a condiciones de sequía presentaron una disminución del contenido hídrico a lo largo del periodo que dura el ensayo. Mediante un análisis de la distribución t de Student se determinó que los microcosmos en condiciones de humedad no presentaron diferencia significativa en ningún punto de muestreo, al igual que ocurrió con los sometidos a condiciones de sequía. De modo que el suelo sometido a condiciones de sequía inoculado con la cepa tolerante a la sequía *Microbacterium* sp. 3J1K presentó un porcentaje de humedad del $3,73\% \pm 0,96$. El suelo inoculado con *P. putida* MAX40, presentó un $2,2\% \pm 0,0$ de humedad al final del periodo que dura el ensayo. Y finalmente el suelo sometido a condiciones de falta de agua, inoculado con ambas cepas presentó un porcentaje de humedad del $4,2 \pm 0,28$.

III.4.b Ensayo de tolerancia a la desecación de la cepa *Microbacterium* sp. 3J1K y *P. putida* MAX40 en suelo franco-arenoso

Una vez determinado que a partir del día 14 se lograba un contenido hídrico similar al de los 10 días en condiciones de sequía cuando se utilizaba vermiculita como sustrato, decidimos evaluar la tolerancia de las cepas *Microbacterium* sp. 3J1K y *P. putida* MAX40 tanto de manera individual como en forma conjunta, en microcosmos compuestos por suelo franco-arenoso. La estimación del número de células de *Microbacterium* sp. 3J1K y la cepa *P. putida* MAX40, en los microcosmos donde se presentan tanto de forma individual como de forma conjunta, se realizó tal y como se indica en el apartado M6.a.1.

En la Figura III.8 se representa el recuento de las células viables en forma de UFC/g de suelo de la cepa *Microbacterium* sp. 3J1K y la cepa *P. putida* MAX40 en un suelo franco-arenoso en condiciones de humedad y de estrés por falta de agua, a los 14 días de ensayo.

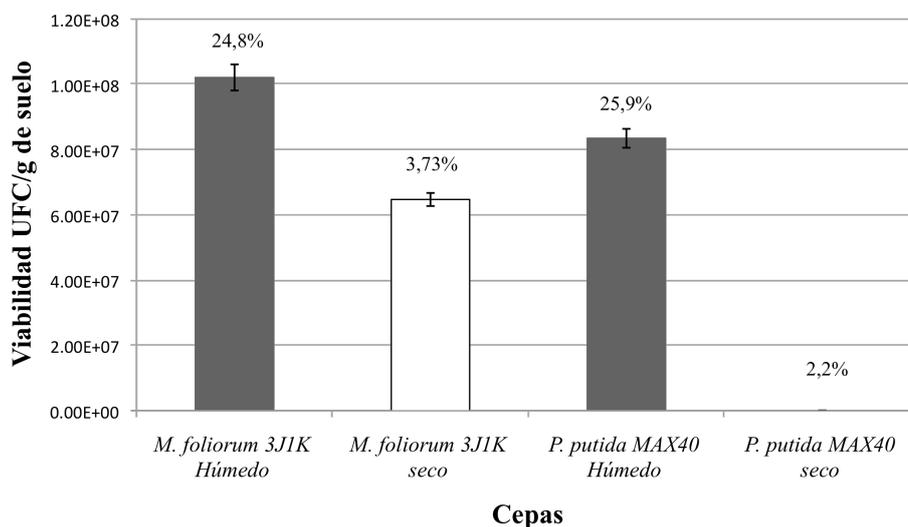


Figura III.8. Células viables presentes en los microcosmos S3J1K y SMAX40. Se indica la viabilidad en forma de UFC/g de suelo de la cepa *Microbacterium* sp. 3J1K y la cepa *P. putida* MAX40, en un suelo compuesto por vermiculita en condiciones de humedad (gris) y en un suelo sometido a condiciones de estrés hídrico (blanco). Se indica el porcentaje de humedad de cada microcosmos encima de cada barra. En el eje de abscisas se indica la cepa y en el eje de ordenadas se indica las UFC/g de suelo. Se incluye en forma de barras de error la desviación estándar a la media de tres experiencias.

Como se puede observar en la Figura III.8, se estimaron $1,1 \cdot 10^8$ UFC/g de suelo de la cepa *Microbacterium* sp. 3J1K, en el microcosmos S3J1K cuyo suelo se incubó en

condiciones de humedad. En dicho punto de muestreo la humedad fue del $24,8\% \pm 0,96$. Sin embargo, cuando el suelo se sometió a condiciones de sequía se detectaron $6,4 \cdot 10^7$ UFC/g de suelo al final del ensayo, dicho suelo presentó una humedad del $3,73\% \pm 0,11$ en el momento del muestreo. En el suelo contenido en cada uno de los microcosmos no aparecieron mutantes dobles a los antibióticos rifampicina y tetraciclina. Por otro lado se estimaron $8,3 \cdot 10^7$ UFC/g de suelo de la cepa *P. putida* MAX40 en el microcosmos SMAX40 cuyo suelo se incubó en condiciones de humedad. En dicho punto de muestreo la humedad fue del $25,9\% \pm 4,5$. Sin embargo, cuando el suelo se sometió a condiciones de estrés hídrico se detectaron $1,1 \cdot 10^5$ UFC/g de suelo al final del ensayo, dicho suelo presentó una humedad del $2,2\% \pm 0,0$ en el momento del muestreo. En ninguno de los suelos aparecieron cepas resistentes a kanamicina.

Análogamente se realizó un recuento de células viables en forma de UFC/g de suelo de cada una de las cepas objeto de estudio *Microbacterium* sp. 3J1K y *P. putida* MAX40, en los microcosmos S3J1KMAX40 donde ambas cepas se suministraron de forma conjunta. En la Figura III.9 se representan las UFC/g de suelo de la cepa tolerante a la falta de agua *Microbacterium* sp. 3J1K y de la cepa sensible a la sequía *P. putida* MAX40 cuando se suministraron de forma conjunta, en un suelo franco-arenoso en condiciones de humedad y de sequía, al final del periodo que dura el ensayo (14 días).

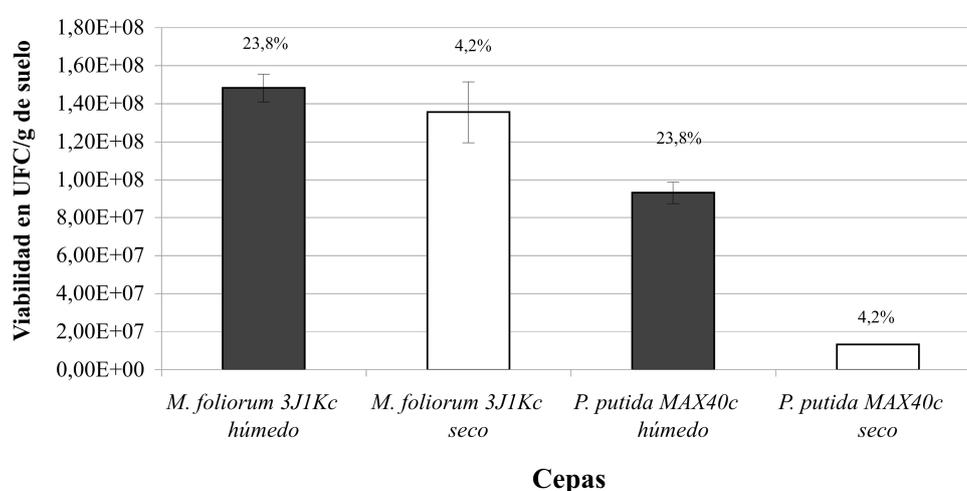


Figura III.9. Células viables presentes en los microcosmos V3J1KMAX40. Se indica la viabilidad en forma de UFC/g de suelo de la cepa *Microbacterium* sp. 3J1K y la cepa *P. putida* MAX40 cuando se suministran de forma conjunta (c), en un suelo compuesto por vermiculita en condiciones de humedad (gris) y en un suelo sometido a condiciones de estrés hídrico (blanco). Se indica el porcentaje de humedad de cada microcosmos encima de cada barra. En el eje de abscisas se indica la cepa y en el

eje de ordenadas se indica las UFC/g de suelo. Se incluye en forma de barras de error la desviación estándar a la media de tres experiencias.

Como se puede observar en la Figura III.9 se estimaron $9,3 \cdot 10^7$ UFC/g de suelo de la cepa *Microbacterium* sp. 3J1K en los microcosmos S3J1KMAX40 cuyo suelo se incubó en condiciones de humedad. En dicho punto de muestreo la humedad fue del $23,8\% \pm 3,35$. Sin embargo, cuando el suelo se sometió a condiciones de sequía se estimaron $1,3 \cdot 10^7$ UFC/g de suelo al final del ensayo, dicho suelo presentó una humedad del $4,2\% \pm 0,28$ en el momento del muestreo. Por otro lado se estimaron $9,3 \cdot 10^7$ UFC/g de suelo de la cepa *P. putida* MAX40 en el microcosmos S3J1KMAX40 cuyo suelo se sometió a condiciones de humedad. En dicho punto de muestreo el porcentaje de humedad en el suelo fue del $23,8\% \pm 3,3$. Cuando el suelo se sometió a condiciones de falta de agua se estimaron $1,3 \cdot 10^7$ UFC/g de suelo al final del ensayo. Dicho suelo presentó una humedad del $4,2\% \pm 0,28$, en el momento del muestreo.

Para determinar si existe un efecto protector de la cepa clasificada como tolerante a la desecación *Microbacterium* sp. 3J1K, hacia la cepa sensible *P. putida* MAX40 en un suelo franco-arenoso calculamos el nivel de supervivencia de cada una de las cepas, cuando se suministraron de forma conjunta, en un suelo sometido a condiciones de estrés hídrico, tomando como referencia los datos del suelo sometido a condiciones de humedad. Además se calculó la supervivencia cuando se suministraron de forma individual. En la Figura III.10 se representa el porcentaje de supervivencia de la cepa tolerante a la sequía *Microbacterium* sp. 3J1K, la supervivencia de la cepa sensible a la sequía *P. putida* MAX40 y la supervivencia de cada una de las cepas cuando se suministran en forma combinada en un suelo sometido a condiciones de sequía.

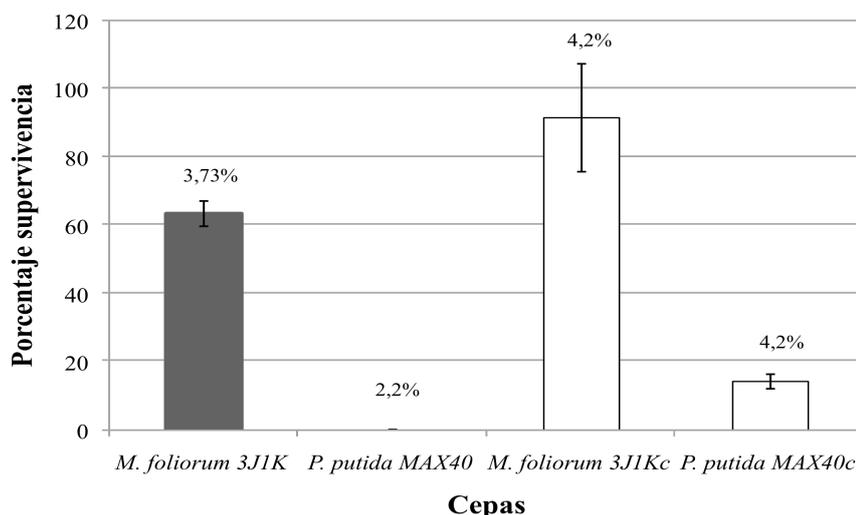


Figura III.10. Supervivencia de las cepas suministradas de forma individual y conjunta en microcosmos sometidos a estrés hídrico. Se representa la supervivencia en porcentaje, de la cepa tolerante a la sequía *Microbacterium* sp. 3J1K y la cepa sensible a la sequía *P. putida* MAX40 de forma individual (gris) y cuando ambas fueron combinadas (c) (blanco). Se indica el porcentaje de humedad de cada microcosmos encima de cada barra. En el eje de abscisas se indica la cepa y en el eje de ordenadas se indica el porcentaje de supervivencia. Se incluye en forma de barras de error la desviación estándar a la media de tres experiencias.

Cuando la cepa tolerante a la sequía *Microbacterium* sp. 3J1K se suministró de forma individual, presentó una supervivencia del $63,4\% \pm 3,7$ en un suelo sometido a condiciones de falta de agua, el cual presentó una humedad del $3,8\% \pm 0,9$ en el momento del muestreo. Por otra parte, cuando la cepa sensible a la desecación *P. putida* MAX40 se suministró de forma individual, presentó una supervivencia del $0,13\% \pm 0,03$ en un suelo sometido a condiciones de sequía. Dicho suelo presentó una humedad del $2,2\%$ en el momento del muestreo. Por otro lado cuando ambas cepas se suministraron de forma conjunta (c), la cepa sensible a la sequía *P. putida* MAX40, presentó un porcentaje de supervivencia del $14,2 \pm 2,1$, sin embargo la cepa tolerante a la sequía *Microbacterium* sp. 3J1K presentó un porcentaje de supervivencia del $91,47\% \pm 15,8$ en un suelo sometido a condiciones de sequía. Dicho suelo presentó una humedad del $4,7\% \pm 0,0$ en el momento del muestreo.

Discusión

La biorremediación de ambientes sometidos a condiciones de estrés por falta de agua supone el uso de organismos que soporten dichas condiciones y que realicen la

función para la que se destinan. Tal y como indicamos en el capítulo III (*Resultados*) para recuperar un suelo contaminado con hidrocarburos y sometido a condiciones de estrés por falta de agua, proponemos el uso de plantas (bioacumuladoras o no bioacumuladoras) y microorganismos que toleren las condiciones de sequía. De modo que los microorganismos protejan a plantas frente a dicho estrés y degraden los compuestos recalcitrantes. Tal y como indicamos en el Capítulo mencionado antes, tras varios intentos no conseguimos aislar ningún microorganismo que presentara dichas propiedades, por lo que nos planteamos la combinación de microorganismos. De modo que comprobamos si un microorganismo tolerante a la desecación, podía proporcionar un aumento de la supervivencia de la población de un microorganismo clasificado como xerosensible (con capacidad para degradar compuestos recalcitrantes) en un suelo sometido a condiciones de estrés hídrico.

Tal y como hemos indicado en la *Introducción*, la síntesis de grandes cantidades de azúcares, en particular disacáridos no reductores (como trehalosa y sacarosa), está asociada a la habilidad de aquellos microorganismos para sobrevivir en estado de sequía (Crowe et al. 1987; Billi et al. 2000; de Castro et al. 2000). Sin embargo, hay estudios que indican que algunos organismos anhidrobiontes poseen un mecanismo para tolerar la desecación no sólo produciendo azúcares, sino también varios osmolitos, antioxidantes e incluso proteínas (Crowe et al. 2005; Illing et al., 2005). Entre las diferentes estrategias desarrolladas por los microorganismos, la síntesis de solutos compatibles y proteínas especializadas son los más importantes. Nuestra hipótesis se basa en suponer que la cepa xerosensible puede beneficiarse del microclima generado por la cepa xerotolerante en el suelo. Y que la cepa xerosensible presente la capacidad para metabolizar determinados compuestos, que la cepa xerotolerante no posee, en las condiciones de sequía.

Para comprobar nuestra hipótesis seleccionamos la cepa *Microbacterium* sp. 3J1, clasificada como tolerante a la desecación (Narváez-Reinálido et al. 2010) y protectora de plantas (Vílchez et al. en preparación) y la cepa *P. putida* MAX40, clasificada como sensible a las condiciones de estrés por falta de agua (Manzanera et al. 2002; Narváez-Reinálido et al. 2010), que además se utiliza en técnicas de biorremediación debido a su versatilidad para colonizar lugares y para metabolizar determinados compuestos xenobióticos (Franklin et al. 1981; Ramos-Gonzalez & Molin 1998). Tal y como hemos indicado en la *Introducción* según Narváez y colaboradores (2010) los

xeroprotectores producidos por la cepa *Microbacterium* sp. 3J1 (xerotolerante) fueron, en orden de mayor a menor, trehalosa, lactato, piruvato, glutamina y ácido oxoglucurónico. Dichos xeroprotectores presentaron resultados positivos en cuanto a la estabilización de la enzima lipasa, aunque los resultados obtenidos fueron menores que los logrados utilizando la trehalosa como xeroprotector. Al igual que ocurrió cuando se probó la capacidad estabilizadora de dichos xeroprotectores en células procariontas sometidas a secado (Narváez-Reinálido et al. 2010).

Según los resultados, la cepa sensible a las condiciones de estrés por falta de agua, *P. putida* KT2440 aumentó su supervivencia cuando se inoculó junto con la cepa *Microbacterium* sp. 3J1, en un suelo compuesto por vermiculita sometido a condiciones de estrés hídrico. De modo que presentó un porcentaje de supervivencia similar a los de la cepa considerada como control positivo en los ensayos de tolerancia a la desecación en placas, *Acinetobacter calcoaceticus* PADD68. Sin embargo, el porcentaje de supervivencia de la cepa *P. putida* KT2440 aumentó considerablemente cuando se inoculó junto con la cepa xerotolerante en un suelo franco-arenoso como sustrato, en vez de vermiculita. Según los resultados de supervivencia de la cepa *P. putida* KT2440 junto con la cepa xerosensible, habría que comprobar si es rentable su utilización en un tratamiento de suelos contaminados sometidos a condiciones de estrés por sequía.

Es probable que la cepa *Microbacterium* sp. 3J1 al producir los xeroprotectores cuando se encuentra en condiciones de estrés por falta de agua, genere un microclima propicio para que la cepa xerosensible *P. putida* MAX40 sobreviva a tales condiciones. Aún así la producción de los xeroprotectores es intracelular, hecho por el cual también nos planteamos la posibilidad de que ambas cepas formaran una biopelícula, quizás también junto con otros microorganismos presentes en el suelo. Ya que una de las ventajas importantes de la formación de biopelículas por las bacterias del suelo (rizobacterias) es la protección contra la escasez de agua (desecación o efecto osmótico). Las biopelículas están formadas por comunidades microbianas que se adhieren a superficies bióticas o abióticas, las cuales quedan encerradas en una matriz protectora de compuestos extracelulares. Aún así, la composición de las biopelículas bacterianas en suelos es poco conocida (Bogino et al. 2013).

Para nuestro conocimiento no existen estudios acerca de la protección de un microorganismo sensible a las condiciones de estrés por falta de agua, por un microorganismos tolerante a dichas condiciones.

CAPÍTULO IV

CAPÍTULO IV

PROTECCIÓN DE PLANTAS FRENTE A LA FALTA DE AGUA POR MICROORGANISMOS

Introducción

La escasez de agua afecta negativamente a varios sectores de la sociedad, como por ejemplo la agricultura. La sequía junto con las actividades humanas pueden conducir a la desertificación de zonas vulnerables mediante la cual la fertilidad de los suelos se degradan y disminuyen los recursos bio-productivos o desaparecen (Kundzewicz 1997). Las principales causas de las sequías son anomalías en el clima, que conducen a menos precipitaciones, lo que pasa a ser insuficientes para la demanda de agua en la agricultura (Panu & Sharma 2002).

La gestión de los recursos hídricos da lugar a conflictos en los países áridos o semiáridos, como España, por lo que garantizar un uso sostenible del agua es una tarea que presenta serias dificultades (Rodríguez et al. 2008). España es el país europeo más árido y que más recursos hídricos dedica a la irrigación. Según datos del Ministerio de Medio Ambiente (2007), el sector agrario usa aproximadamente el 70% del total de agua captada en España. Dicho país presenta ventajas como son la localización respecto a grandes mercados, la disponibilidad de suelo, las horas de sol y sus infraestructuras, aún así dichas ventajas se ven disminuidas por una gran desventaja, que es hacer frente a la disponibilidad limitada de agua con un régimen

irregular de precipitaciones y sequías recurrentes. En esas condiciones, disponer de cantidades suficientes de agua se convierte en un elemento estratégico que garantiza la viabilidad de muchas explotaciones agrícolas (Maestu, 2008). Las limitaciones climáticas y edáficas de determinados territorios impiden que muchos de los cultivos de mayor productividad agraria puedan cultivarse en régimen de secano.

La huella hidrológica de una persona, colectivo o país se define como el total de agua usada para producir los bienes y servicios consumidos por esa persona, colectivo o país. Según Rodríguez y colaboradores (2008) la huella hidrológica de España se sitúa en unos 1.150 m³ de agua per cápita al año, siendo el volumen anual total cercano a los 48.000 hm³. La agricultura es responsable de algo más del 80% de la huella hidrológica, siendo los cereales y los cultivos industriales los grupos de cultivos con mayor peso.

Tal y como hemos indicado en el capítulo II, existen microorganismos rizosféricos capaces de facilitar el crecimiento de la planta en condiciones ambientales adversas (Glick & Bashan 1997; Timmusk & Wagner 1999), como son las condiciones de falta de agua (Mayak et al. 2004b) y otros estreses como la presencia de metales pesados (Burd et al. 1998), inundación (Grichko & Glick 2001), elevada salinidad (Mayak et al. 2004a) o presencia de fitopatógenos (Wang et al. 2000).

Los mecanismos de las PGPR que se han sugerido para estimular el crecimiento en condiciones ambientales adversas, es que presentan la capacidad para reducir la producción de etileno, a través de la acción de la enzima 1-aminociclopropano-1 ácido carboxílico (ACC) deaminasa (Glick & Bashan 1997), tal y como indicamos en el Capítulo II y en el aumento de la expresión del gen ERD15, el cual responde a las condiciones de estrés por falta de agua (Timmusk & Wagner 1999)

Resultados

Una vez aislados los microorganismos con capacidad para la tolerar la falta de agua, con un 30% o más de supervivencia, descritos en el Capítulo II, nuestro objetivo fue determinar el efecto que dichos microorganismos ejercen sobre las plantas en condiciones de humedad y sometidas a condiciones de estrés hídrico. Para evaluar los

efectos de las bacterias en la tolerancia de las plantas frente a condiciones de sequía, se realizaron medidas de la longitud del tallo y de la raíz. También determinamos el peso fresco, el peso totalmente túrgido y el peso seco para calcular el Contenido Relativo de Agua (CRA) y el Índice de Recuperación de Agua (IRA) de cada una de las plantas y así estudiar el efecto que causa la adición de las bacterias sobre las plantas en condiciones de sequía. Dichos análisis también se realizaron cuando la planta se incubó en condiciones de humedad para así evaluar los posibles efectos de las bacterias en la promoción del crecimiento.

IV.1 SELECCIÓN DE MICROORGANISMOS Y PLANTAS

IV.1.a Microorganismos seleccionados

En este capítulo se evaluó el efecto protector de determinados microorganismos previamente aislados y que han sido descritos en el Capítulo II, sobre la tolerancia de las plantas frente a la falta de agua y la capacidad de estos microorganismos para estimular el crecimiento en plantas (PGPR) en condiciones óptimas de humedad. Para ello se seleccionaron las cepas 56FL1 y 56PL3, ambas aisladas de la raíz de la Gayomba, en medio mínimo con ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) como única fuente de nitrógeno y con una supervivencia a la desecación mayor del 30%. También se seleccionó la cepa *Arthrobacter* sp. LNX25 aislada en nuestro grupo, con un porcentaje de supervivencia a la falta de agua superior al 30%. El grado de protección frente a la sequía que ofrecen los microorganismos seleccionados se compararon con el obtenido con las plantas inoculadas con la cepa tolerante a la sequía *Microbacterium* sp. 3J1 (Narváez-Reinálido et al. 2010), ya utilizada en ensayos de protección de plantas frente a condiciones de estrés hídrico (Vílchez et al. en preparación). Además utilizamos la cepa *P. putida* KT2440 clasificada como rizobacterias promotora del crecimiento en plantas (PGPR) y sensible a la falta de agua (Manzanera et al. 2002). La simbiosis planta-microorganismos es en general muy específica, por lo que con este ensayo podemos probar el uso ubicuo de los inóculos.

En primer lugar se identificaron taxonómicamente las cepas 56FL1 y 56PL3. Para ello se recurrió a la secuenciación del gen ARNr 16S, tal y como se indica en el apartado

M9.c. Tal y como se observa en la Figura IV.1, se obtuvieron dos bandas como producto de amplificación del tamaño esperado, de aproximadamente 1.500 pb.

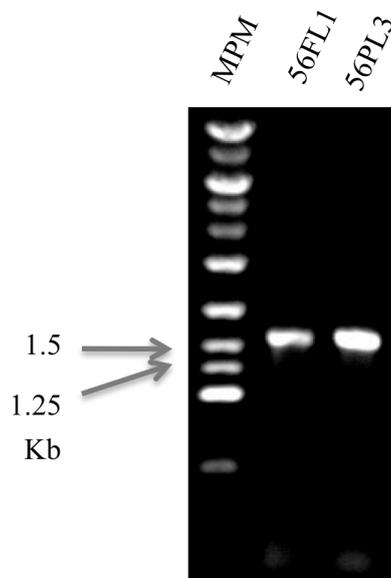


Figura IV.1. Electroforesis de la reacción de amplificación del gen ARNr 16S de las cepas 56FL1 y 56PL3. La calle nombrada como MPM se corresponde con el marcador de peso molecular, DNA ladder 500 pb-10 kb, de la casa Molecular Biology Laboratory (MBL), las siguientes calles, nombradas como 56FL1 y 56PL3 se corresponde con el producto de PCR del gen ARNr 16S de las cepas objeto de estudio.

Los productos de PCR se limpiaron, tal y como se indica en el apartado M9.d. Tras su limpieza y una vez contrastado el tamaño y calidad de los amplicones, se procedió a la secuenciación de los mismos. Así pues, en el caso del producto correspondiente a la amplificación del gen ARNr 16S de la cepa 56FL1, se logró una lectura de 1.388 pb. Por otra parte, del producto correspondiente a la amplificación del gen ARNr 16S de la cepa 56PL3, se consiguió una lectura de 1.405 pb. Dicha secuenciación se realizó utilizando los oligonucleótidos fd1, rd2, fd2 y rd1 (Weisburg et al. 1991b), tal y como se indica en el apartado M9.e. Para la construcción de las secuencias se procedió al ensamblaje del producto de las cuatro secuenciaciones obtenidas de cada una de las cepas. Dichas construcciones fueron comparadas con todas las secuencias de las cepas tipo que existen en la base de datos EzTaxon (Tabla IV.1), mediante el servidor EzBioCloud (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>, Kim et al. 2012), tal y como se indica en el apartado M10.

Tabla IV.1. Identificación taxonómica de las cepas 56FL1 y 56PL3 en base al gen ARNr 16S. En la primera columna se indica la cepa objeto de estudio, en la segunda columna el número de acceso de la especie más cercana y el porcentaje de similitud, en la tercera columna se indica la especie más relacionada filogenéticamente. Y en la última columna se indica la referencia.

Cepa	Número de accesión especie más cercana (% similitud)	Especie	Referencia
56FL1	FJ214355 (99,86)	<i>Micrococcus yunnanensis</i> YIM 65004 ^T	(Zhao et al. 2009)
	CP001628 (99,57)	<i>Micrococcus luteus</i> NCTC 2665 ^T	(Wieser et al. 2002)
56PL3	FJ214355 (100)	<i>Micrococcus yunnanensis</i> YIM 65004 ^T	(Zhao et al. 2009)

En base a la secuencia del gen ARNr 16S de la cepa 56FL1, se observó una máxima similitud con las especies *Micrococcus yunnanensis* YIM 65004^T y la cepa *Micrococcus luteus* NCTC 2665^T. Por otra parte, en base a la secuencia del gen ARNr 16S de la cepa 56PL3, se observó un 100% de máxima identidad con la especie *Micrococcus yunnanensis* YIM 65004^T. Dicha especie bacteriana se clasificó como endofítica (Zhao et al. 2009). Siddikee y colaboradores identificaron una cepa aislada del suelo como perteneciente a la especie bacteriana *M. yunnanensis* y la clasificaron como rizobacteria halotolerante, PGPR e indol acética positiva. Por tanto, según el gen ARNr 16S las cepas se clasificaron dentro de la clase *Actinobacteria*, pertenecientes al género *Micrococcus*.

De este modo se utilizaron los microorganismos indicados en la Tabla IV.2 para determinar el efecto que ejercen sobre las plantas en condiciones de humedad y sometidas a condiciones de estrés hídrico.

Tabla IV.2. Microorganismos utilizados en ensayos de promoción del crecimiento en plantas y protección frente a condiciones de estrés hídrico. En la primera columna se indica el nombre de la cepa, en la segunda columna el fenotipo de cada una de ellas, en la tercera la fuente de carbono y nitrógeno utilizada en el aislamiento y en la cuarta la referencia.

Cepas	Fenotipo	Aislamiento	Referencia
<i>Micrococcus</i> sp. 56FL1	Tolerante a la sequía	HAP/ACC	Este trabajo
<i>Micrococcus</i> sp. 56PL3	Tolerante a la sequía	HAP/ACC	Este trabajo
<i>Arthrobacter</i> sp. LNX25	Tolerante a la sequía	HAP/NH ₄ Cl	En el grupo de investigación
<i>Microbacterium</i> sp. 3J1	Tolerante a la sequía	Glucosa/NH ₄ Cl	(Narváez-Reinálido et al. 2010)
<i>P. putida</i> KT2440	PGPR. Sensible a la sequía		(Franklin et al 1981)

IV.1.b Plantas seleccionadas y diseño experimental

Dado que los estudios anteriores de protección de plantas contra la sequía por parte de microorganismos se han realizado con plantas de pimiento (*Capsicum annum*) como modelo (Mayak et al. 2004), decidimos utilizar esta misma planta para estos estudios. Estas plantas fueron inoculadas con distintos microorganismos caracterizados como tolerantes a la desecación. Dichas plantas se incubaron en condiciones de humedad para determinar como afectaba la colonización del microorganismo sobre el crecimiento de la planta. También se sometieron a condiciones de estrés hídrico para evaluar el efecto de los microorganismos antes descritos, sobre la tolerancia a la falta de agua de las plantas. Para ello se utilizaron macetas de polietileno negro con forma redondeada con sustrato compuesto por vermiculita estéril, tal y como se indica en el apartado M.5.b. Dichas macetas se distribuyeron utilizando la metodología de los cuadrados latinos, tal y como se indica en la Figura IV.2, para minimizar el efecto de la iluminación .

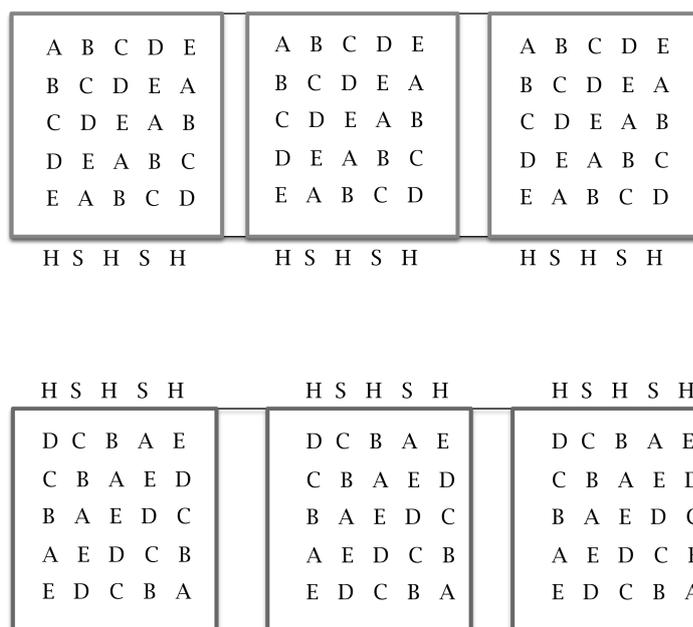


Figura IV.2. Disposición de las macetas. En la imagen se muestra la distribución de cada una de las macetas, donde cada letra corresponde a cada una de las cepas, la letra A corresponde a la cepa *Micrococcus* sp. 56FL1, la letra B a la cepa *Micrococcus* sp. 56PL3, la letra C a *P. putida* KT2440, la letra D a *Microbacterium* sp. 3J1 y la letra E a *Arthrobacter* sp. LNX25. La letra H indica que las macetas están en condiciones de humedad y la letra S en condiciones de sequía.

Para identificar qué microorganismos fueron capaces de estimular el crecimiento de las plantas de pimiento en condiciones óptimas de humedad y en condiciones de estrés hídrico, se esterilizaron semillas de pimiento, tal y como se indica en el apartado M6.b. Transcurridos 14 días desde su germinación las plántulas se dividieron en dos grupos, donde las plantas de cada grupo se inocularon con cada una de las cepas objeto de estudio *Micrococcus* sp. 56FL1, *Micrococcus* sp. 56PL3, *Arthrobacter* sp. LNX25, *Microbacterium* sp. 3J1 y *P. putida* KT2440. Al primer grupo se les eliminó el regado durante todo el periodo de ensayo, mientras que las otras macetas se regaron cada 96 horas con 20 ml de agua destilada. Se realizaron 3 replicas de cada una de las macetas inoculadas y se tomaron muestras a los 7, 14, 21 y 34 días (Figura IV.3).

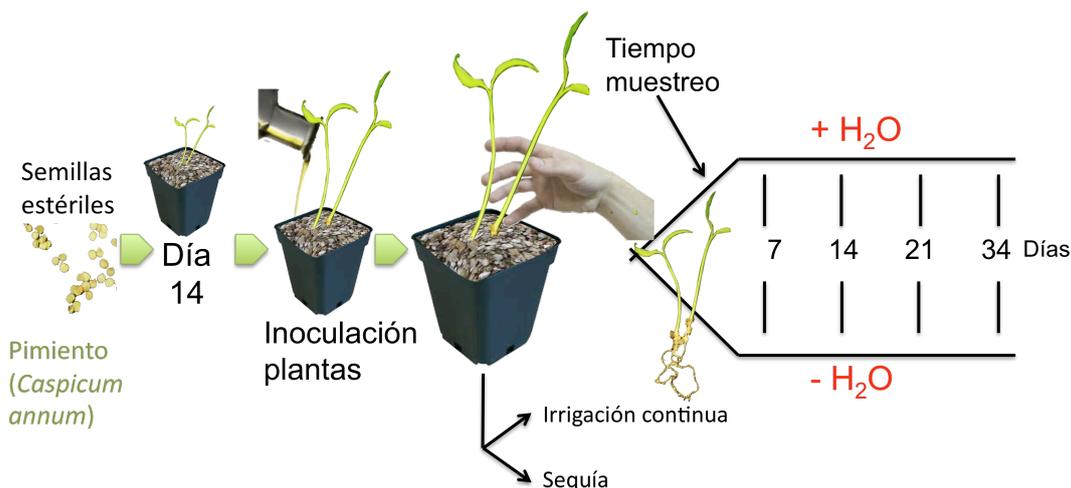


Figura IV.3. Esquema del proceso de la preparación de las plantas.

Para añadir las células a las macetas se inocularon previamente 5 matraces de 1.000 ml con 500 ml de TSB. Cada uno de ellos se inocularon con una colonia de 24 horas de crecimiento procedentes de una placa de TSA de las cepas *Micrococcus* sp. 56FL1, *Micrococcus* sp. 56PL3, *Arthrobacter* sp. LNX25, *Microbacterium* sp. 3J1 y *P. putida* KT2440. Dichos matraces se incubaron en un agitador orbital a una temperatura de 30°C y una agitación de 150 rpm durante 24 horas. Una vez alcanzada una alta densidad celular (Abs_{600nm} de 9 o superior) cada cultivo se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos, tras los cuales se recogieron aproximadamente 3 g de biomasa. Dicha biomasa se resuspendió en medio 1xM9 hasta alcanzar la Abs_{600nm} de 1. Tras ellos se inocularon cada una de las plantas con 20 ml de cultivo.

IV.2 EFECTO DE LAS CEPAS SOBRE EL CRECIMIENTO DE LA PLANTA

IV.2.a Efecto de las cepas en el crecimiento de la planta en condiciones de sequía

Como hemos indicado en la *Introducción*, ciertos PGPR poseen la enzima 1-aminociclopropano-1 ácido carboxílico (ACC) deaminasa (Glick et al. 1998), la cual descompone el ACC, precursor inmediato de la vía de biosíntesis del etileno, a α -acetobutirato y amoníaco (Glick et al. 2007). La adición de inoculantes de bacterias tolerantes a la falta de agua y PGPR productoras de ácido indol-3-acético (IAA del

inglés *Indol Acetic Acid*), supone para la planta un mayor desarrollo de raíces laterales y adventicias (Manzanera et al. 2004; Manzanera et al. 2002a). Dichas bacterias pueden contrarrestar los efectos negativos ante el estrés hídrico disminuyendo la producción de etileno mediante la enzima ACC deaminasa o incrementando la producción de IAA (Mayak et al. 2004).

Para evaluar los efectos de las cepas *Micrococcus* sp. 56FL1, *Micrococcus* sp. 56PL3, *Arthrobacter* sp. LNX25, *Microbacterium* sp. 3J1 y *P. putida* KT2440 en plantas sometidas a condiciones de estrés hídrico, se midió la longitud de la raíz y del tallo, así como se determinó el contenido relativo de agua (CRA), mediante el registro del peso fresco (PF), peso totalmente túrgido (PTT) y peso seco (PS), a los 7, 14, 21 y 34 días.

En la Figura IV.4 se muestra el aspecto de las plantas inoculadas con cada una de las cepas objeto de estudio tras 34 días sin recibir ningún aporte de agua. Todas las plantas presentaron un aspecto saludable a los 34 días de muestreo a excepción de las plantas inoculadas con la cepa sensible *P. putida* KT2440, las cuales presentaron un aspecto totalmente marchito al final del periodo de ensayo.

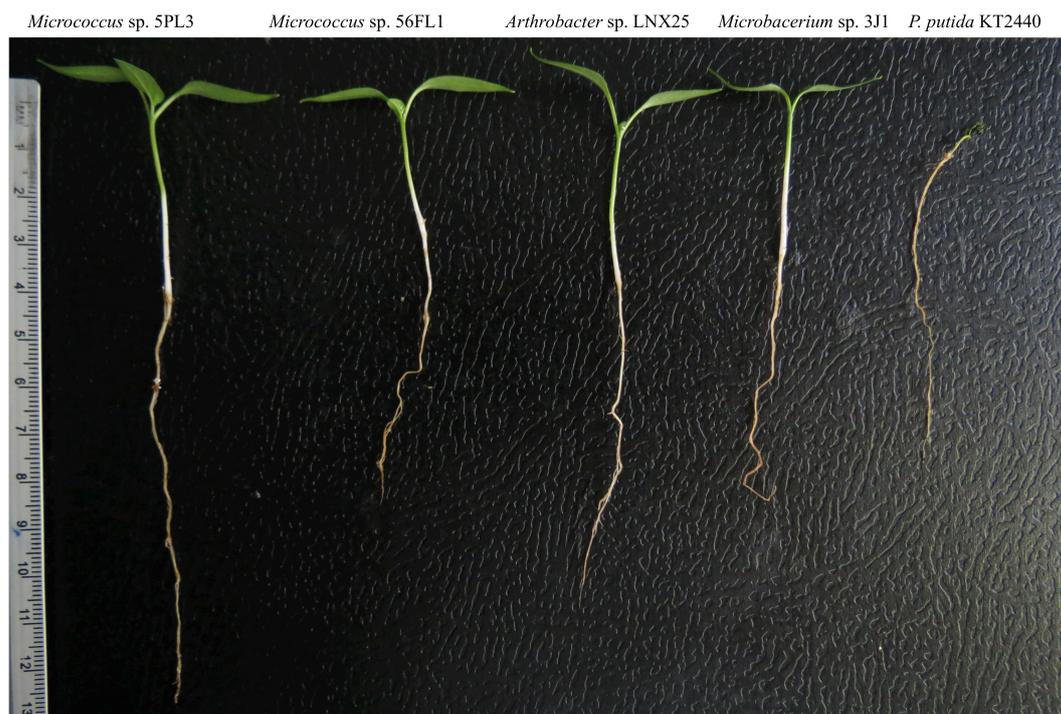


Figura IV.4. Aspecto de las plantas inoculadas tras 34 días sin aporte de agua. De izquierda a derecha se sitúan las plantas inoculadas con las cepas *Micrococcus* sp. 56PL3, *Micrococcus* sp. 56FL1, *Arthrobacter* sp. LNX25, *Microbacterium* sp. 3J1 y *P. putida* KT2440.

La producción de pigmentos fotosintéticos en las partes expuestas a la luz de las plantas inoculadas con las cepas *Microbacterium* sp. 3J1, *Micrococcus* sp. 56FL1, *Micrococcus* sp. 56PL3 y *Arthrobacter* sp. LNX25, aparentemente no estuvieron afectadas por el déficit hídrico. Las plantas inoculadas con la cepa *P. putida* KT2440 no sobrevivieron 34 días sin ningún aporte de agua. Por otra parte, la planta inoculada con la cepa *Microbacterium* sp. 3J1 no desarrolló hojas secundarias, al igual que ninguna de sus replicas. Sin embargo las plantas inoculadas con la cepa *Micrococcus* sp. 56PL3 presentaron un aspecto muy saludable con el desarrollo de hojas secundarias de un tamaño aproximado al de las hojas principales. Al igual que la planta inoculada con la cepa *Micrococcus* sp. 56FL1 de la imagen y sus replicas, las cuales también desarrollaron las hojas secundarias pero con un tamaño menor que el de las hojas principales. En la planta inoculada con la cepa *Arthrobacter* sp. LNX25 se observó el inicio del desarrollo de las hojas secundarias, al igual que ocurrió con las replicas.

IV.2.a Longitud de la raíz y el tallo en plantas sometidas a condiciones de estrés hídrico

Para evaluar el desarrollo de las plantas se tomaron registros de la longitud de la raíz y del tallo a lo largo de 34 días. Para comparar la longitud de las raíces de las plantas inoculadas con cada una de las cepas se realizó un análisis de comparaciones múltiples, utilizando el método Tukey, con un grado de significancia de 0,05, tal y como se indica en el apartado M10.a. En la Figura IV.5 se puede observar la longitud de las raíces de las plantas inoculadas con las cepas *Micrococcus* sp. 56FL1, *Micrococcus* sp. 56PL3, *Arthrobacter* sp. LNX25, *Microbacterium* sp. 3J1 y *P. putida* KT2440.

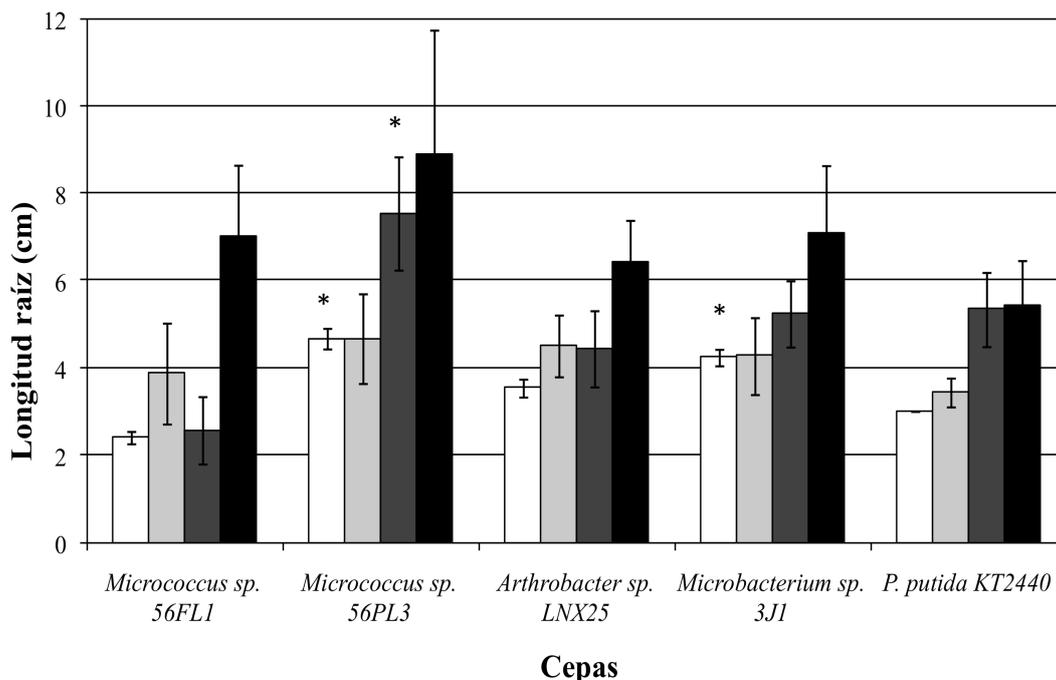


Figura IV.5. Longitud de las raíces de plantas en condiciones de sequía. Se indica la longitud de raíces de cada una de las plantas inoculadas con las cepas a los 7 días de muestreo (blanco), 14 días (gris claro), 22 días (gris oscuro) y 34 días (negro). Se indica con un asterisco (*) la diferencia significativa. Se incluye en forma de barras de error la desviación estándar a la media de tres experiencias.

Como resultado del ensayo para determinar el efecto de las cepas en el desarrollo de las plantas sometidas a condiciones de estrés hídrico, se observó que todas las plantas aumentaron la longitud de las raíces desde el inicio del muestreo (7 días) hasta el final del periodo de ensayo (34 días). La raíz de las plantas inoculadas con la cepa *Microbacterium sp.* 3J1 incrementaron de media $2,8 \pm 1,7$ cm a lo largo del ensayo. De forma similar aumentó la longitud de las raíces de las plantas inoculadas con la cepa *P. putida* KT2440 ($2,4 \pm 1,02$ cm), a lo largo del periodo de muestreo. Por otra parte, las raíces de las plantas inoculadas con la cepa *Micrococcus sp.* 56FL1 presentaron el mayor incremento registrado a lo largo del periodo con un valor medio de $4,6 \pm 1,8$ cm. Las raíces de las plantas inoculadas con la cepa *Micrococcus sp.* 56PL3 también presentaron un incremento similar con un valor medio registrado de $4,2 \pm 2,7$ cm a lo largo del periodo. Según el análisis estadístico multivariante las plantas inoculadas con la cepa *Micrococcus sp.* 56PL3 y *Microbacterium sp.* 3J1 presentaron diferencias significativas en la longitud de las raíces con respecto a las demás plantas, en el tiempo 7 días. Sin embargo, la longitud de las raíces de las

plantas inoculadas con la cepa *Micrococcus* sp. 56PL3 presentaron diferencia significativa con respecto a las demás plantas inoculadas a los 21 días.

Igualmente para determinar el efecto de las cepas objeto de estudio en el desarrollo de las plantas sometidas a condiciones de sequía se tomaron registros de la longitud de los tallos de las plantas inoculadas con las cepas objeto de estudio, tal y como se indica en la Figura IV.6.

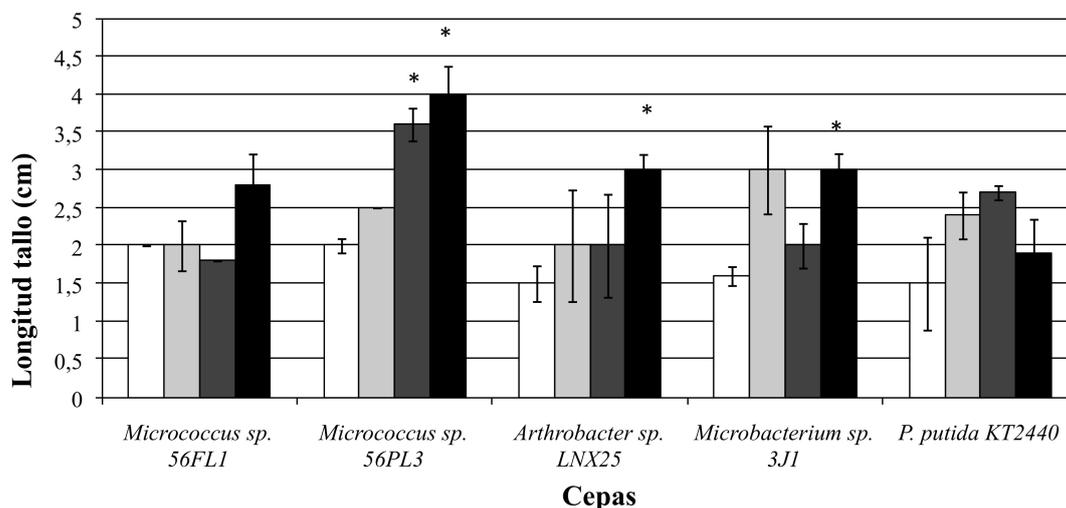


Figura IV.6. Longitud del tallo de plantas en condiciones de sequía. Se indica la longitud de los tallos de cada una de las plantas inoculadas con las cepas a los 7 días de muestreo (blanco), 14 días (gris claro), 22 días (gris oscuro) y 34 días (negro). Se indica con un asterisco (*) la diferencia significativa. Se incluye en forma de barras de error la desviación estándar a la media de tres experiencias.

Como se puede observar en la Figura IV.6, la longitud de los tallos de las plantas inoculadas con las cepas tolerantes a la sequía presentaron un aumento desde el principio del muestreo (7 días) hasta el final del ensayo (34 días). Sin embargo, la longitud de los tallos de las plantas inoculadas con la cepa sensible *P. putida* KT2440, no presentaron diferencias significativas en el final del ensayo con respecto al inicio. Los tallos de las plantas inoculadas con la cepa *Microbacterium* sp. 3J1 aumentaron $1,2 \pm 0,12$ cm a lo largo del periodo. Por otra parte, la longitud de los tallos de las plantas inoculadas con la cepa *P. putida* KT2440 presentaron una disminución del tallo a los 34 días de ensayo. Sin embargo, los tallos de las plantas inoculadas con la cepa *Micrococcus* sp. 56PL3 presentaron el mayor aumento desde el inicio del ensayo hasta el final, con un valor medio de $2,1 \pm 0,37$ cm. Según el tratamiento estadístico multivariante basado en el método de Tukey ($p < 0,05$), las plantas inoculadas con la

cepa *Micrococcus* sp. 56PL3 presentaron diferencias significativas en la longitud de los tallos con las demás plantas inoculadas a los 21 días de muestreo y a los 34 días de muestreo. Por otro lado, las plantas inoculadas con las cepas *Arthrobacter* sp. LNX25 y *Microbacterium* sp. 3J1 presentaron diferencias significativas en la longitud del tallo con respecto a las plantas inoculadas con las cepas *Micrococcus* sp. 56FL1 y *P. putida* KT2440.

IV2.b Contenido relativo de agua e índice de retención de agua de las plantas inoculadas

Para conocer el estado hídrico de las plantas inoculadas con las cepas *Micrococcus* sp. 56FL1, *Micrococcus* sp. 56PL3, *Arthrobacter* sp. LNX25, *Microbacterium* sp. 3J1 y *P. putida* KT2440, calculamos el Contenido Relativo de Agua (CRA) y el Índice de Retención del Agua (IRA), mediante el registro del peso fresco (PF), el peso totalmente túrgido (PPT) y el peso seco (PS) de cada una de las plantas, a lo largo del tiempo de muestreo.

Primero realizamos registros del peso fresco de cada una de las plantas inoculadas, tal y como se indica en la Figura IV.7.

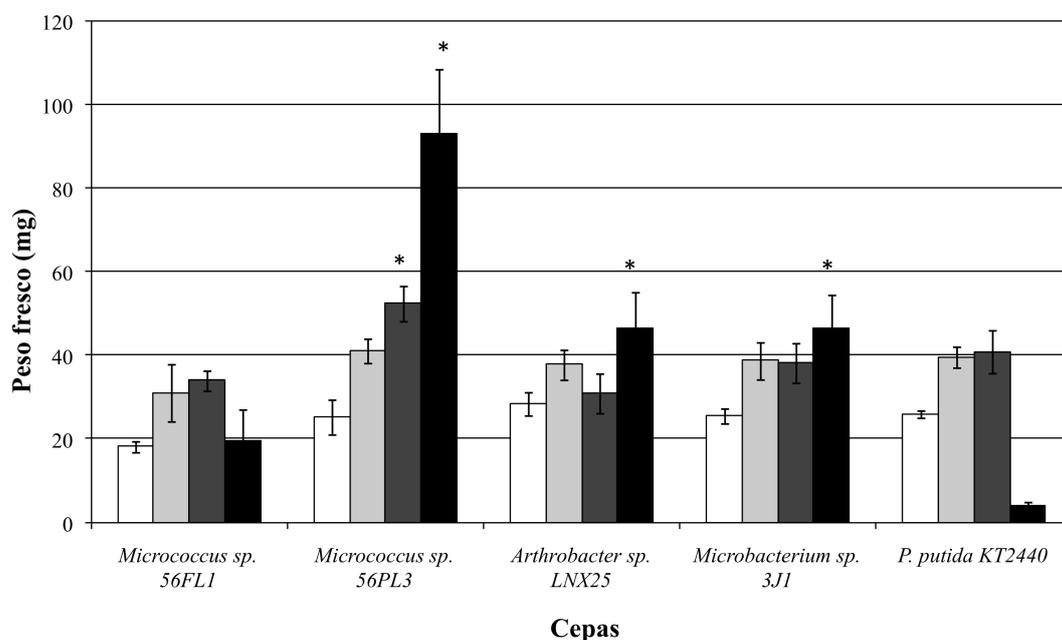


Figura IV.7. Peso fresco de las plantas sometidas a condiciones de sequía. Se indica el peso fresco en cada una de las plantas inoculadas con las cepas a los 7 días (blanco), 14 días (gris claro), 22 días (gris oscuro) y 34 días (negro). En el eje de abscisas se indica la cepa y en el eje de ordenadas el peso

fresco (mg). Se indica con asterisco (*) las diferencias significativas. Se incluye en forma de barras de error la desviación estándar a la media de tres experiencias.

Como se puede observar en la Figura IV.7, el peso fresco (PF) de las plantas inoculadas con las cepas incrementa conforme aumenta el tiempo, a excepción de las plantas inoculadas con las cepas *Micrococcus* sp. 56FL1 y *P. putida* KT2440, cuyos pesos disminuyen a los 34 días de muestreo. El peso fresco de las plantas inoculadas con la cepa *Microbacterium* sp. 3J1 presentaron un incremento medio de $20,9 \pm 9,6$ mg. Sin embargo, el peso fresco de las plantas inoculadas con la cepa *P. putida* KT2440 presentaron una disminución pronunciada a los 34 días de ensayo, de modo que el peso fresco disminuyó $22 \pm 1,07$ mg al final del periodo de ensayo. Por otra parte, el peso fresco de las plantas inoculadas con la cepa *Micrococcus* sp. 56PL3 presentaron el mayor aumento a lo largo del periodo de ensayo con un valor medio registrado de $67,8 \pm 18,1$ cm. Según el tratamiento estadístico multivariante, las plantas inoculadas con la cepa *Micrococcus* sp. 56PL3 presentaron diferencia significativa en el PF con respecto a las demás plantas inoculadas a los 21 y 34 días de ensayo. Las plantas inoculadas con las cepas *Arthrobacter* sp. LNX25 y *Microbacterium* sp. 3J1 también presentaron diferencias significativas con respecto a todas las demás plantas inoculadas menos con aquellas inoculadas con la cepa *Micrococcus* sp. 56PL3.

Para medir el peso totalmente túrgido (PTT), se procedió del mismo modo que en el ensayo anterior, de modo que se colocaron cada una de las plantas en tubos de ensayo con un volumen de agua suficiente para cubrir las raíces y se incubó en oscuridad durante un periodo de 48 horas, a temperatura ambiente. Tal y como se indica en la Figura IV.8, se midió el PTT de las plantas sometidas a condiciones de sequía inoculadas con las cepas, *Micrococcus* sp. 56FL1, *Micrococcus* sp. 56PL3, *Arthrobacter* sp. LNX25, *Microbacterium* sp. 3J1 y *P. putida* KT2440.

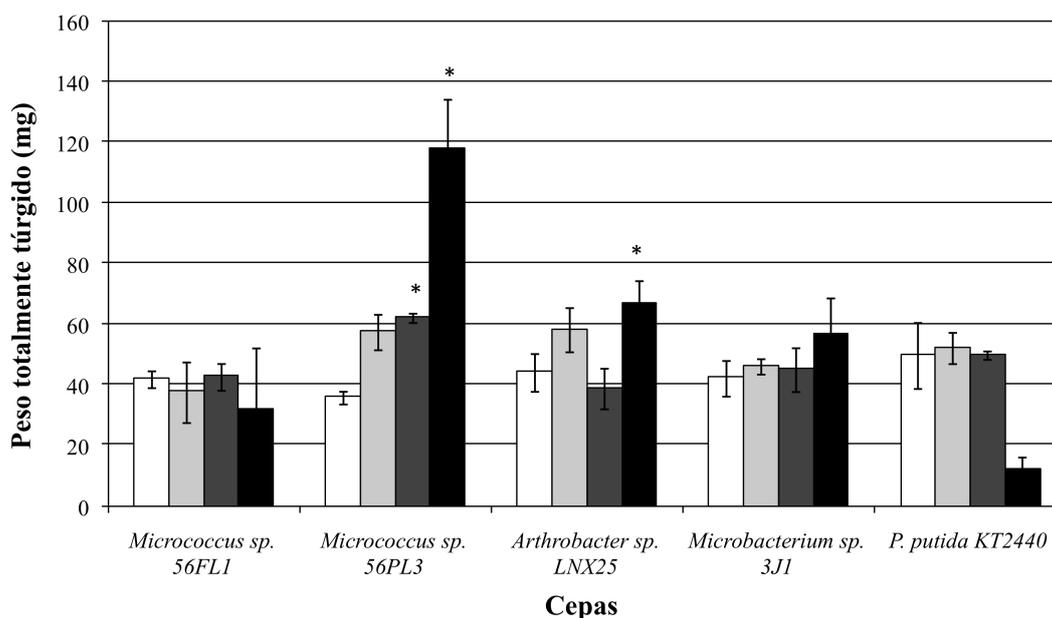


Figura V.8. Peso totalmente túrgido de las plantas sometidas a condiciones de sequía. Se indica el peso totalmente túrgido en cada una de las plantas inoculadas con las cepas a los 7 días (blanco), 14 días (gris claro), 22 días (gris oscuro) y 34 días (negro). En el eje de abscisas se indica la cepa y en el eje de ordenadas el peso totalmente túrgido (mg). Se indica con asterisco (*) las diferencias significativas. Se incluye en forma de barras de error la desviación estándar a la media de tres experiencias.

Como se puede observar en la Figura IV.8 el peso totalmente túrgido de las plantas inoculadas con las cepas *Micrococcus sp. 56PL3* y *Arthrobacter sp. LNX25* aumentó significativamente durante el periodo que dura el ensayo, sin embargo el PTT disminuyó en las plantas inoculadas con las cepas *Micrococcus sp. 56FL1* y *P. putida KT2440*. El peso totalmente túrgido de las plantas inoculadas con la cepa *P. putida KT2440* disminuyó $37,56 \pm 8,3$ mg a los 34 días de ensayo. Sin embargo, el peso totalmente túrgido de las plantas inoculadas con la cepa *Microbacterium sp. 3J1* no presentaron incremento significativo a lo largo del periodo de ensayo. Por otra parte, las plantas inoculadas con la cepa *Micrococcus sp. 56PL3* presentaron el mayor aumento en el peso totalmente túrgido a lo largo del periodo de muestreo, cuyo valor medio registrado fue $82,4 \pm 19,6$ mg. Según el análisis estadístico el PTT de las plantas inoculadas con la cepa *Micrococcus sp. 56PL3* fue significativamente diferente al resto de las plantas a los 21 y 34 días de muestreo. Las plantas inoculadas con la cepa *Arthrobacter sp. LNX25* presentaron diferencias significativas con respecto a las demás plantas excepto aquellas inoculadas con la cepa *Micrococcus sp. 56PL3*, a los 34 días de ensayo.

Para determinar el peso seco (PS) se colocaron cada una de las plantas envueltas en papel de filtro en un horno pasteur a 100°C durante 24 horas, trascurridas las cuales se pesaron en una balanza de precisión para determinar el peso (Figura IV.9).

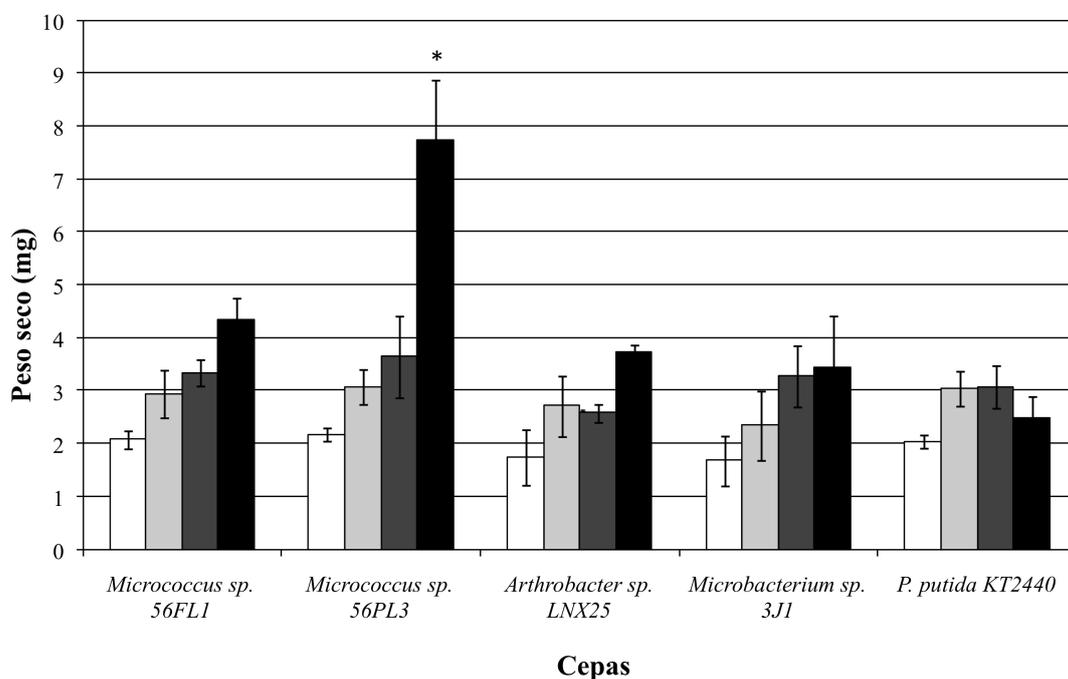


Figura IV.9. Peso seco de las plantas sometidas a condiciones de sequía. Se indica el peso seco de cada una de las plantas inoculadas con las cepas a los 7 días (blanco), 14 días (gris claro), 22 días (gris oscuro) y 34 días (negro). En el eje de abscisas se indica la cepa y en el eje de ordenadas el peso seco (mg). Se indica con asterisco (*) las diferencias significativas. Se incluye en forma de barras de error la desviación estándar a la media de tres experiencias.

Tras el ensayo para determinar el peso seco de las plantas objeto de estudio se observó que todas las plantas inoculadas con las cepas tolerantes a la falta de agua *Micrococcus sp.* 56FL1, *Micrococcus sp.* 56PL3, *Arthrobacter sp.* LNX25 y *Microbacterium sp.* 3J1 incrementó a lo largo del periodo de ensayo, sin embargo en las plantas inoculadas con la cepa *P. putida* KT2440 se registró una disminución significativa del peso seco desde el día 21 hasta el 34 días de ensayo. Se registró un aumento aproximado de $1,8 \pm 1,3$ mg en las plantas inoculadas con la cepa *Microbacterium sp.* 3J1 desde el inicio hasta el final de ensayo. Por otra parte, el mayor incremento en cuanto al PS se registró en las plantas inoculadas con la cepa *Micrococcus sp.* 56PL3, con un valor medio de $5,6 \pm 1$ mg. Según el análisis estadístico multivariante las plantas inoculadas con la cepa *Micrococcus sp.* 56PL3

presentaron diferencias significativas con respecto a las demás plantas en el peso seco registrado a los 34 días de ensayo.

Una vez determinados cada uno de los pesos (PF, PTT, PS) de las plantas inoculadas con cada una de las cepas *Micrococcus* sp. 56FL1, *Micrococcus* sp. 56PL3, *Arthrobacter* sp. LNX25, *Microbacterium* sp. 3J1 y *P. putida* KT2440, se calculó el contenido relativo de agua (CRA) (Figura IV.10). El contenido relativo de agua (CRA) es un índice que se utiliza para medir el estado fisiológico de la planta (Fisher, 2000), el cual es uno de los factores que afectan a la concentración de nutrientes. Las variables de las que depende el CRA son el peso fresco de la planta (PF), el peso totalmente túrgido (PTT) y el peso seco (PS). Dicho índice se calcula como la diferencia del PF y el PS entre la diferencia del PTT y el PS, tal y como se indica en el apartado M6.b.

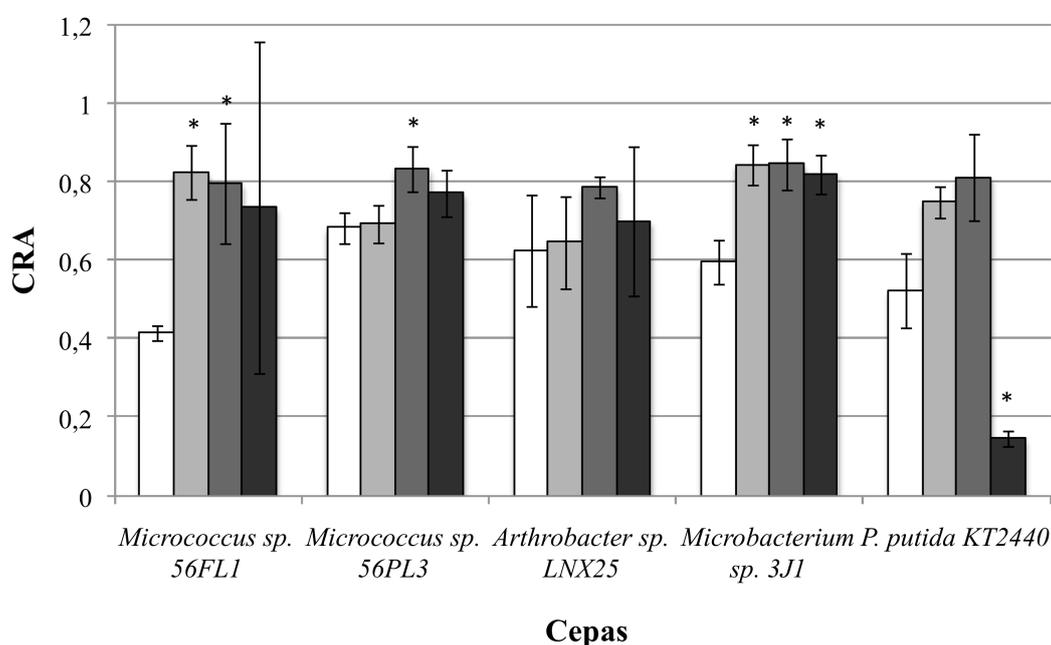


Figura IV.10. Contenido relativo de agua de las plantas sometidas a condiciones de sequía. Se indica el contenido relativo de agua de cada una de las plantas inoculadas con las cepas *Micrococcus* sp. 56FL1 *Micrococcus* sp. 56PL3, *Arthrobacter* sp. LNX25, *Microbacterium* sp. 3J1 y *P. putida* KT2440 (cuadrado negro) a los 7 (blanco), 14 (gris claro), 21 (gris) y 34 días (gris oscuro). En el eje de abscisas se indica el tiempo (días) y en el eje de ordenadas el CRA. Se incluye en forma de barras de error la desviación estándar a la media de tres experiencias.

Según la Figura IV.10, todas las plantas inoculadas presentaron un aumento en el CRA desde el inicio del periodo de muestreo hasta los 21 días de ensayo. Sin embargo, todas las plantas presentaron una disminución del contenido relativo de

agua a los 34 días de muestreo, siendo el más pronunciado el de las plantas inoculadas con la cepa *P. putida* KT2440. Las plantas inoculadas con la cepa *P. putida* KT2440 presentaron una disminución del índice CRA con un valor medio registrado de $0,37 \pm 0,1$, la disminución más pronunciada ocurrió a los 34 días sin aporte de agua. Las plantas inoculadas con la cepa *Microbacterium* sp. 3J1 presentaron un aumento del índice CRA de $0,22 \pm 0,09$ a lo largo del periodo. Por otra parte, las plantas inoculadas con las cepas *Micrococcus* sp. 56PL3 y *Arthrobacter* sp. LNX25 no presentaron un incremento significativo en el índice CRA. Según el tratamiento estadístico multivariante las plantas inoculadas con la cepa *P. putida* KT2440 presentaron diferencias significativas a los 34 días con respecto a las demás plantas inoculadas con las cepas tolerantes a la sequía.

Para continuar con el estudio del estado hídrico de la planta también se calculó el Índice de Retención del Agua (IRA) de cada una de las plantas inoculadas con las cepas *Micrococcus* sp. 56FL1, *Micrococcus* sp. 56PL3, *Arthrobacter* sp. LNX25, *Microbacterium* sp. 3J1 y *P. putida* KT2440 (Figura IV.11), para así determinar el agua presente en el sistema plantas en el momento del muestreo. Dicho índice se calcula como la diferencia entre el peso fresco (PF) y el peso seco (PS), tal y como se indica en el apartado M6.b.

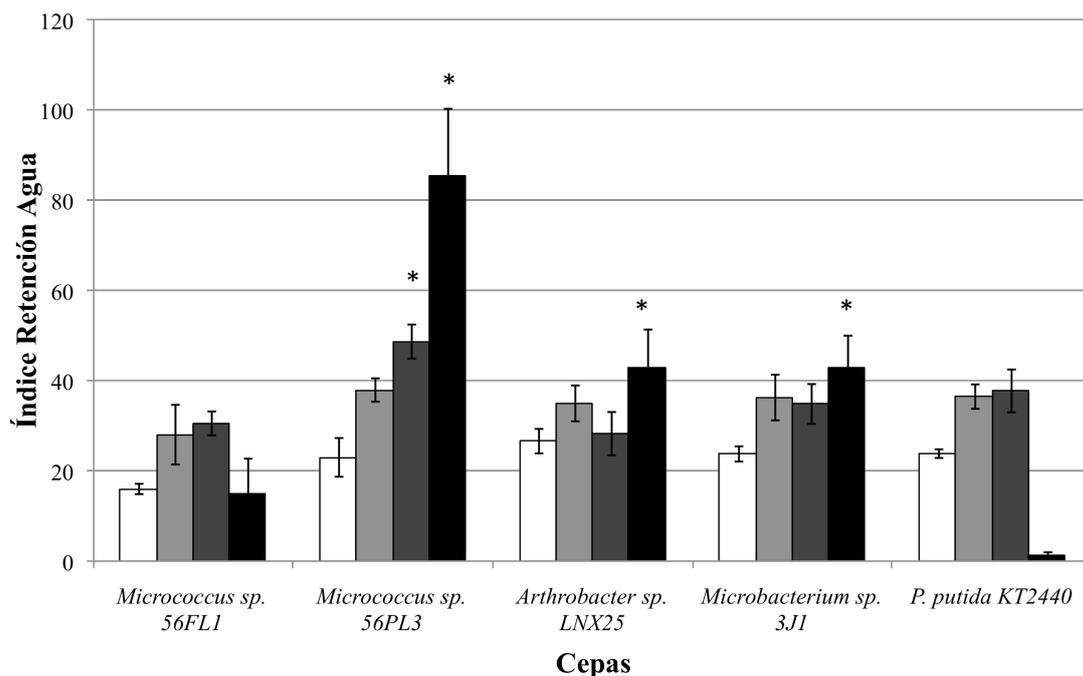


Figura IV.11. Índice de Retención de Agua de las plantas sometidas a condiciones de sequía. Se indica el índice de retención de agua de cada una de las plantas inoculadas con las cepas a los 7 días (blanco), 14 días (gris claro), 22 días (gris oscuro) y 34 días (negro). En el eje de abscisas se indica la cepa y en el eje de ordenadas el peso seco (mg). Se indica con asterisco (*) las diferencias significativas. Se incluye en forma de barras de error la desviación estándar a la media de tres experiencias.

Según la Figura IV.11, el índice de retención de agua de las plantas inoculadas con las cepas *Micrococcus sp. 56PL3*, *Arthrobacter sp. LNX25* y *Microbacterium sp. 3J1* aumentaron significativamente el índice de retención de agua al final del periodo de ensayo. Las plantas inoculadas con la cepa *Microbacterium sp. 3J1* presentaron un aumento significativo del índice de retención de agua (IRA) de $19,1 \pm 8,4$ desde el inicio del ensayo hasta el final. Sin embargo, las plantas inocuadas con la cepa *P. putida* KT2440 presentaron la mayor disminución en cuanto al IRA a lo largo de los 34 días de ensayo, con un valor de $22,4 \pm 0,9$. Por otra parte, las plantas inoculadas con la cepa *Micrococcus sp. 56PL3* presentaron el mayor aumento significativo con un valor medio registrado de $62,2 \pm 17,6$ desde el inicio del muestreo hasta el final. Para las plantas inoculadas con la cepa *Arthrobacter sp. LNX25* se registró un aumento medio de IRA de $16,2 \pm 6,3$, muy próximo al valor registrado para las plantas inoculadas con la cepa *Microbacterium sp. 3J1*. Por otra parte, se registró una disminución, aunque no significativa del IRA en las plantas inoculadas con la cepa *Micrococcus sp. 56FL1*.

IV2.b Efecto de las cepas en el crecimiento de la planta en condiciones de regadío

Al igual que en el ensayo anterior para evaluar los efectos de las cepas *Micrococcus* sp. 56FL1, *Micrococcus* sp. 56PL3 y *Arthrobacter* sp. LNX25, *Microbacterium* sp. 3J1 y *P. putida* KT2440 en las plantas expuestas a condiciones de humedad, se midió la longitud del tallo y de la raíz, así como se determinó el Contenido Relativo de Agua (CRA) y el Índice de Retención de Agua (IRA), mediante el registro del peso fresco (PF), el peso totalmente túrgido (PTT) y el peso seco (PS) a los 7, 14, 21 y 34 días, tal y como se indica en el apartado M6.b.

En la Figura IV.12 se muestra el aspecto de las plantas inoculadas con cada una de las cepas tras 34 días con irrigación continua, donde se seleccionaron aquellas plantas del triplicado más representativas de cada uno de los inóculo. Todas las plantas presentaron un aspecto saludable durante todo el periodo de muestreo.



Figura IV.12. Aspecto de las plantas inoculadas tras 34 días con irrigación continua. De izquierda a derecha se sitúan las plantas inoculadas con las cepas *Micrococcus* sp. 56PL3, *Micrococcus* sp. 56FL1, *Arthrobacter* sp. LNX25, *Microbacterium* sp. 3J1 y *P. putida* KT2440.

Como se puede observar en la Figura IV.12 la planta inoculada con cepa *P. putida* KT2440 presentó un aspecto saludable, pero no formó hojas secundarias tras los 34 días de ensayo con irrigación continua, al igual que ocurrió con las replicas. Sin embargo, la planta inoculada con la cepa *Microbacterium* sp. 3J1 presentó un gran desarrollo de las hojas secundarias, al igual que sus replicas. Por otra parte, la planta inoculada con la cepa *Micrococcus* sp. 56PL3 y sus replicas desarrollaron las hojas secundarias, con un tamaño menor al de las hojas principales. La planta inoculada con la cepa *Micrococcus* sp. 56FL1 de la imagen no presentó desarrollo de hojas secundarias al igual que sus replicas.

IV3.a. Longitud de la raíz y el tallo

Para medir el crecimiento de las plantas realizamos registros tanto de la longitud de la raíz como de la longitud del tallo de la planta. Para los datos de la altura se tomó como medida la longitud en cm desde la base blanquecina del tallo o el punto donde se encontraban las primeras raíces, hasta el plano horizontal formado por el primer par de hojas (hojas seminales). Mientras que para las raíces se tomó como medida la longitud en cm desde la base blanquecina del tallo o el punto donde se encontraban las primeras raíces, hasta la punta del ápice radical más largo sin forzar el estiramiento del mismo. En la Figura IV.13 se representa la longitud de la raíz de cada una de las plantas inoculadas con las cepas *Micrococcus* sp. 56FL1, *Micrococcus* sp. 56PL3 y *Arthrobacter* sp. LNX25, además de la cepa *Microbacterium* sp. 3J1 y *P. putida* KT2440. Para comparar la longitud de las raíces de las plantas inoculadas con cada una de las cepas se realizó un análisis de comparaciones múltiples, utilizando el método Tukey o método de la diferencia significativa honesta de Tukey (DSH), con un grado de significancia de 0,05, tal y como se indica en el apartado M10.a.

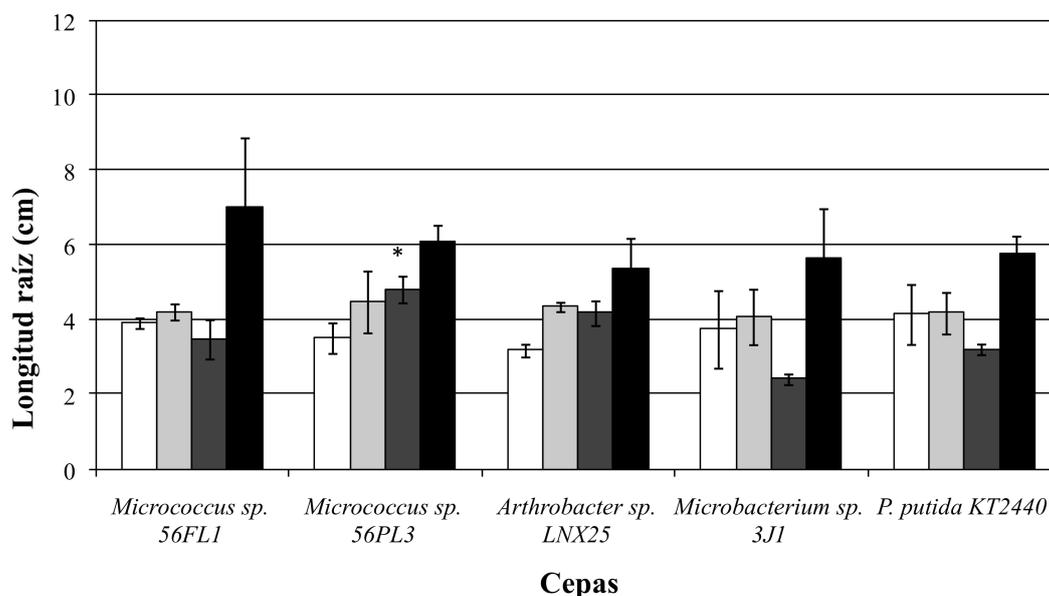


Figura IV.13. Longitud de las raíces de plantas en condiciones de humedad. Se indica la longitud de las raíces de cada una de las plantas inoculadas con las cepas a los 7 días de muestreo (blanco), 14 días (gris claro), 22 días (gris oscuro) y 34 días (negro). Se indica con un asterisco (*) la diferencias significativas. Se incluye en forma de barras de error la desviación estándar a la media de tres experiencias.

Como resultado del ensayo para determinar el efecto de las cepas *Micrococcus sp.* 56FL1, *Micrococcus sp.* 56PL3, *Arthrobacter sp.* LNX25, *Microbacterium sp.* 3J1 y *P. putida* KT2440 en el crecimiento de las plantas, se observó que todas promovieron el aumento en la longitud de la raíz desde el inicio del ensayo (7 días) hasta llegar al final del periodo (34 días). Por otra parte, el menor aumento en la longitud de las raíces de las plantas se observó cuando éstas se inocularon con la cepa *P. putida* KT2440, donde se registró un aumento de $1,6 \pm 1,2$ cm a lo largo del periodo de ensayo. Las raíces de las plantas inoculadas con la cepa *Microbacterium sp.* 3J1 aumentaron $1,9 \pm 1$ cm desde el inicio hasta el final del periodo de muestreo. Sin embargo, el mayor aumento significativo en la longitud de las raíces de las plantas se observó cuando éstas fueron inoculadas con la cepa *Micrococcus sp.* 56FL1 con un incremento medio de $3,1 \pm 1,8$ cm. Por otra parte, se registró un aumento significativo de $2,6 \pm 0,7$ cm en las plantas inoculadas con la cepa *Micrococcus sp.* 56PL3. De forma similar la aumentó la longitud de las raíces de las plantas inoculadas con la

cepa *Arthrobacter* sp. LNX25, con un valor medio registrado de $2,2 \pm 0,7$ cm. Según el análisis estadístico multivariante ($p < 0,05$) las plantas inoculadas con la cepa *Micrococcus* sp. 56PL3 presentaron diferencias significativas a los 21 días de ensayo, con respecto a las demás plantas inoculadas.

Otro de los factores que se utilizaron para medir el crecimiento de las plantas, expuestas a condiciones de humedad inoculadas con las cepas *Micrococcus* sp. 56FL1, *Micrococcus* sp. 56PL3, *Arthrobacter* sp. LNX25, *Microbacterium* sp. 3J1 y *P. putida* KT2440, fue la medida de la longitud del tallo de cada una de dichas plantas (Figura IV.14).

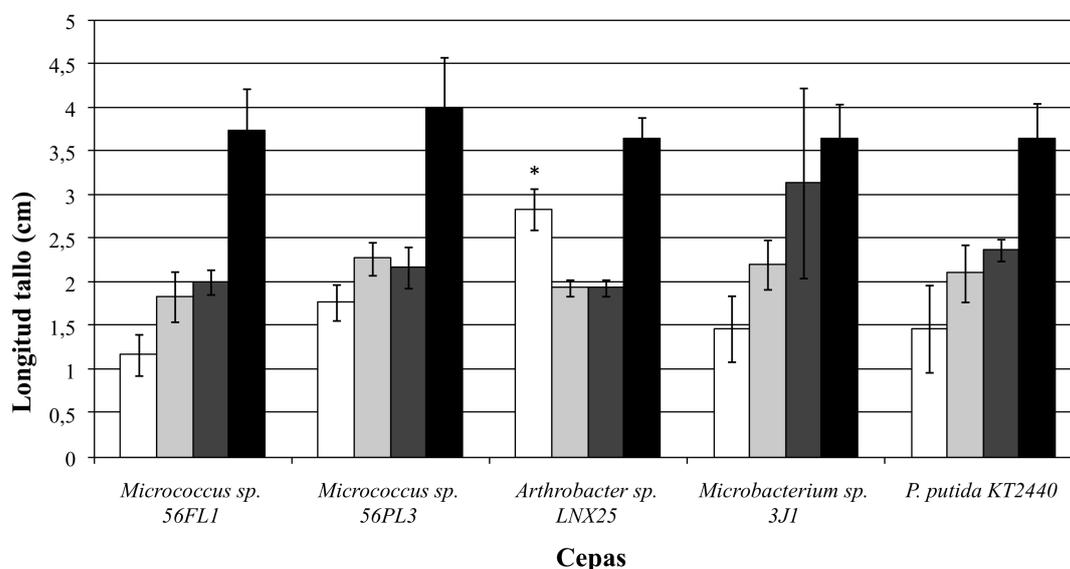


Figura IV.14. Longitud del tallo de plantas inoculadas en condiciones de humedad. Se indica la longitud de los tallos de cada una de las plantas inoculadas con las cepas a los 7 días de muestreo (blanco), 14 días (gris claro), 22 días (gris oscuro) y 34 días (negro). Se indica con un asterisco (*) la diferencias significativas. Se incluye en forma de barras de error la desviación estándar a la media de tres experiencias.

Como se puede observar en la Figura IV.14, la longitud del tallo de las plantas inoculadas con las cepas objeto de estudio aumentaron a lo largo del periodo de ensayo. La longitud del tallo de las plantas inoculadas con la cepa *P. putida* KT2440 aumentaron significativamente $2,1 \pm 0,9$ cm a lo largo del periodo de ensayo. Al igual que las plantas inoculadas con la cepa *Microbacterium* sp. 3J1 cuyos tallos presentaron un aumento medio de $2,1 \pm 0,65$ cm a lo largo del periodo de ensayo. Sin

embargo, las plantas inoculadas con la cepa *Micrococcus* sp. 56FL1 presentaron el mayor aumento significativo con $2,6 \pm 0,25$ cm a lo largo del periodo que dura el ensayo. También se observó que las plantas inoculadas con la cepa *Micrococcus* sp. 56PL3 presentaron un aumento similar con un valor de $2,23 \pm 0,61$ cm. Según el análisis multivariante ($p < 0,05$) sólo las plantas inoculadas con la cepa *Arthrobacter* sp. LNX25 presentaron diferencias significativas con respecto a la longitud del tallo, en el tiempo 7 días.

IV3.b Contenido relativo de agua e índice de retención el agua de las plantas inoculadas

Tal y como hemos indicado anteriormente tanto el contenido relativo de agua (CRA) como el índice de retención de agua son índices que se utilizan para medir el estado hídrico y por tanto fisiológico de la planta (Fisher, 2000). Las variables de las que dependen ambos índices son el peso fresco de la planta (PF), el peso totalmente túrgido (PTT) y el peso seco (PS). El contenido relativo de agua se calcula como la diferencia del PF y el PS entre la diferencia del PTT y el PS, tal y como se indica en el apartado M.5.b. Y el índice de retención de agua se calcula como la diferencia entre el peso fresco (PF) y el peso seco (PS), indicado en el mismo apartado de *Material y Métodos* mencionado con anterioridad. Al igual que en los demás análisis para comparar el peso de las plantas con diferentes inoculantes, se realizó un análisis de comparaciones múltiples, utilizando el método Tukey, con un grado de significancia de 0,05.

Para calcular tanto el contenido relativo de agua como el índice de retención, de las plantas inoculadas con cada una de las cepas *Micrococcus* sp. 56FL1, *Micrococcus* sp. 56PL3, *Arthrobacter* sp. LNX25, *Microbacterium* sp. 3J1 y *P. putida* KT2440 se realizaron registros del peso fresco de cada una de ellas, tal y como se indica en la Figura IV.15.

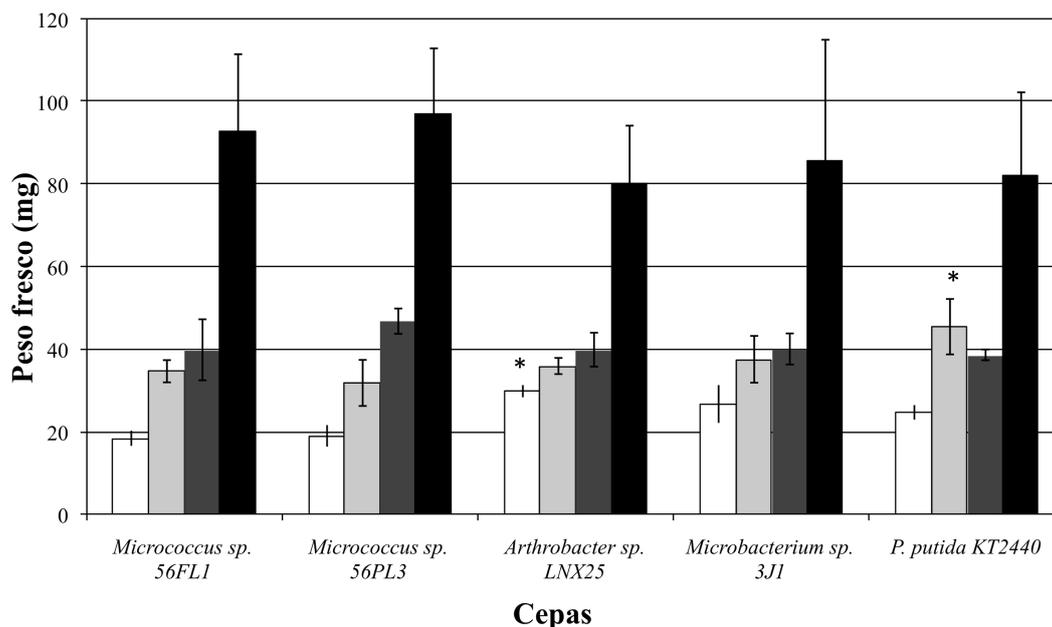


Figura IV.15. Peso fresco de las plantas en condiciones de humedad. Se indica el peso fresco en cada una de las plantas inoculadas con las cepas a los 7 días (blanco), 14 días (gris claro), 22 días (gris oscuro) y 34 días (negro). En el eje de abscisas se indica la cepa y en el eje de ordenadas el peso fresco (mg). Se indica con asterisco (*) las diferencias significativas. Se incluye en forma de barras de error la desviación estándar a la media de tres experiencias.

Según los resultados obtenidos el peso fresco (PF) de las plantas inoculadas aumentó con el tiempo, observándose el mayor incremento en el tiempo 34 días. Por otra parte, el peso fresco de las plantas inoculadas con la cepa *P. putida* KT2440 incrementó en $57,26 \pm 22,02$ mg a lo largo del periodo de ensayo. Las plantas inoculadas con la cepa *Microbacterium sp.* 3J1 incrementaron $59 \pm 32,7$ mg su peso fresco. Sin embargo, las plantas inoculadas con la cepa *Micrococcus sp.* 56PL3 presentaron el mayor aumento significativo con un valor medio registrado de $78 \pm 18,3$ mg a lo largo del periodo de ensayo. También se observó un aumento significativo en el peso de las plantas inoculadas con la cepa *Micrococcus sp.* 56FL1, con un valor medio registrado de $74,3 \pm 19,7$ mg. Las plantas inoculadas con la cepa *Arthrobacter sp.* LNX25 presentaron el menor incremento con un valor medio de $50,2 \pm 13,8$ mg. Según el análisis estadístico multivariante ($p < 0,05$), el peso de las plantas inoculadas con la cepa *Arthrobacter sp.* LNX25 mostraron diferencia significativa con respecto a las demás plantas a los 7 días de ensayo. Por otra parte, las plantas inoculadas con la cepa *P. putida* KT2440 presentaron diferencias significativas con respecto a las demás plantas a los 14 días de ensayo.

Para medir el peso totalmente túrgido (PTT) se colocaron cada una de las plantas en tubos de ensayo con un volumen de agua suficiente para cubrir las raíces. Tras ello los tubos se dejaron en oscuridad durante 48 horas, registrando su peso en ese momento, con una balanza de precisión. Tal y como se indica en la Figura IV.16, se midió el PTT de las plantas sometidas a condiciones de humedad inoculadas con las cepas *Micrococcus* sp. 56FL1, *Micrococcus* sp. 56PL3, *Arthrobacter* sp. LNX25, *Microbacterium* sp. 3J1 y *P. putida* KT2440.

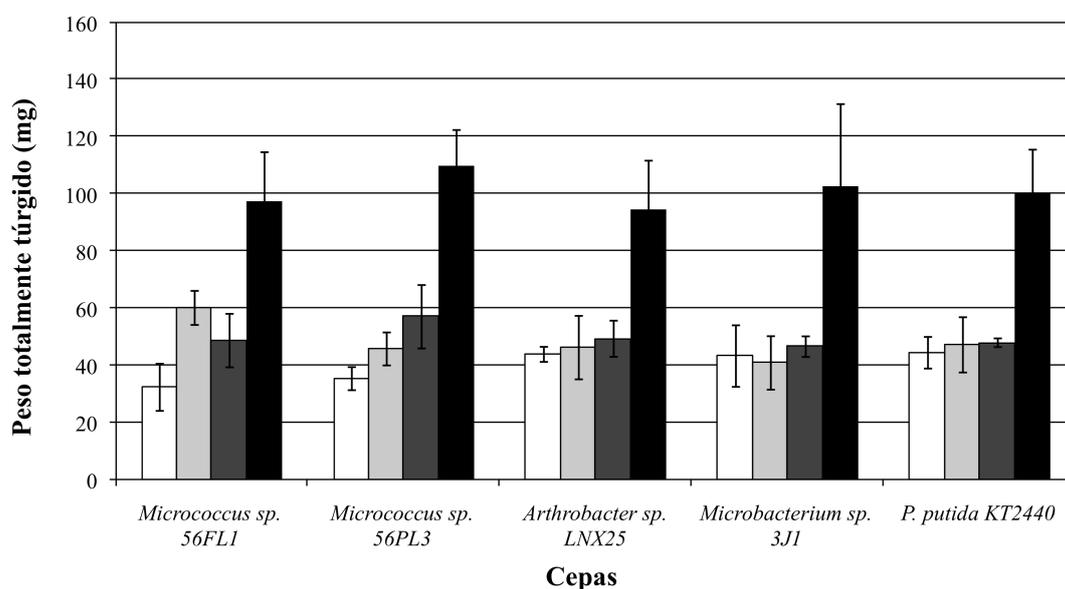


Figura IV.16. Peso totalmente túrgido de las plantas en condiciones de humedad. Se indica el peso totalmente túrgido de cada una de las plantas inoculadas con las cepas a los 7 días (blanco), 14 días (gris claro), 22 días (gris oscuro) y 34 días (negro). En el eje de abscisas se indica la cepa y en el eje de ordenadas el peso totalmente túrgido (mg). Se indica con asterisco (*) las diferencias significativas. Se incluye en forma de barras de error la desviación estándar a la media de tres experiencias.

Como se puede observar todas las plantas presentaron un incremento en cuanto el peso totalmente túrgido (PPT) a lo largo del periodo de ensayo, siendo el aumento más pronunciado a los 34 días de muestreo. Por otro lado, las plantas inoculadas con la cepa *P. putida* KT2440 aumentaron su peso totalmente túrgido en un $55,93 \pm 19,7$ mg a lo largo del periodo de ensayo. Cuando las plantas se inocularon con la cepa *Microbacterium* sp. 3J1, incrementaron su PTT $59,6 \pm 38,5$ mg al final del periodo de ensayo. Sin embargo, las plantas inoculadas con la cepa *Micrococcus* sp. 56PL3 presentaron el mayor aumento significativo en el PTT, con un valor de $74,5 \pm 10,7$ mg desde que se inició el muestreo hasta el final, siendo el aumento progresivo a lo largo del ensayo. Las plantas inoculadas con la cepa *Micrococcus* sp. 56FL1

incrementaron el PTT a lo largo del ensayo con un valor medio de $65,27 \pm 25,3$ mg. Las plantas inoculadas con la cepa *Arthrobacter* sp. LNX25 presentaron el menor aumento de PTT a lo largo del periodo de ensayo, registrándose un valor medio de $50,20 \pm 19,2$ mg. Según el análisis multivariante con un nivel de significancia de 0,05 no se observaron diferencias significativas, entre ninguna de las plantas por causas del inóculo empleado en ninguno de los puntos de muestreo.

Para determinar el peso seco se colocaron cada una de las plantas envueltas en papel de filtro en un horno pasteur a 100°C durante 24 horas, trascurridas las cuales se pesaron en una balanza de precisión para determinar el peso seco, tal y como se indica en la Figura IV.17.

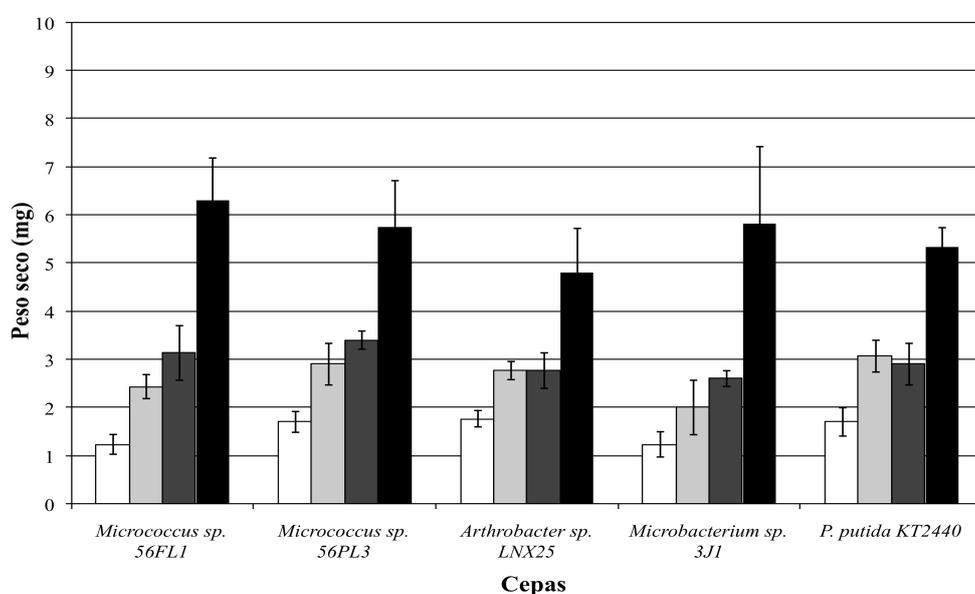


Figura IV.17. Peso seco de las plantas en condiciones de humedad. Se indica el peso seco de cada una de las plantas inoculadas con las cepas a los 7 días (blanco), 14 días (gris claro), 22 días (gris oscuro) y 34 días (negro). En el eje de abscisas se indica la cepa y en el eje de ordenadas el peso seco (mg). Se indica con asterisco (*) las diferencias significativas. Se incluye en forma de barras de error la desviación estándar a la media de tres experiencias.

En la Figura IV.17 se observa que todas las plantas inoculadas presentaron un aumento en cuanto al peso seco (PS) durante todo el periodo del ensayo, siendo a los 34 días cuando presentaron el mayor incremento. Las plantas inoculadas con la cepa *P. putida* KT2440 incrementaron su PS en $3,6 \pm 0,25$ mg a lo largo del periodo de ensayo. Las plantas inoculadas con la cepa *Microbacterium* sp. 3J1 incrementaron su peso $4,6 \pm 1,51$ mg a lo largo del ensayo. Sin embargo, las plantas inoculadas con la

cepa *Micrococcus* sp. 56FL1 presentaron el mayor incremento significativo de PS con un valor medio de $5,1 \pm 1$ mg. Por otra parte, las plantas inoculadas con la cepa *Arthrobacter* sp. LNX25 presentaron el menor incremento en el peso seco con un valor de $3 \pm 0,9$ mg, a lo largo del ensayo. Las plantas inoculadas con la cepa *Micrococcus* sp. 56PL3 presentaron un valor incremental de $4,1 \pm 0,8$ mg, a lo largo del periodo de ensayo. Según el análisis de comparaciones múltiples, utilizando el método de Tukey ($p > 0,05$), ninguna de las plantas inoculadas presentaron diferencia significativa entre ellas en ningún momento del periodo de ensayo.

Una vez determinados cada uno de los pesos (PF, PTT y PS) de las plantas inoculadas con cada una de las cepas *Micrococcus* sp. 56FL1, *Micrococcus* sp. 56PL3, *Arthrobacter* sp. LNX25, *Microbacterium* sp. 3J1 y *P. putida* KT2440, se calculó el Contenido Relativo de Agua (CRA) y el índice de Retención del Agua (IRA).

Mediante el cálculo del índice CRA, como la diferencia del PF y el PS entre la diferencia del PTT y el PS, evaluamos los efectos de las bacterias en el estado hídrico de las plantas (Figura IV.18).

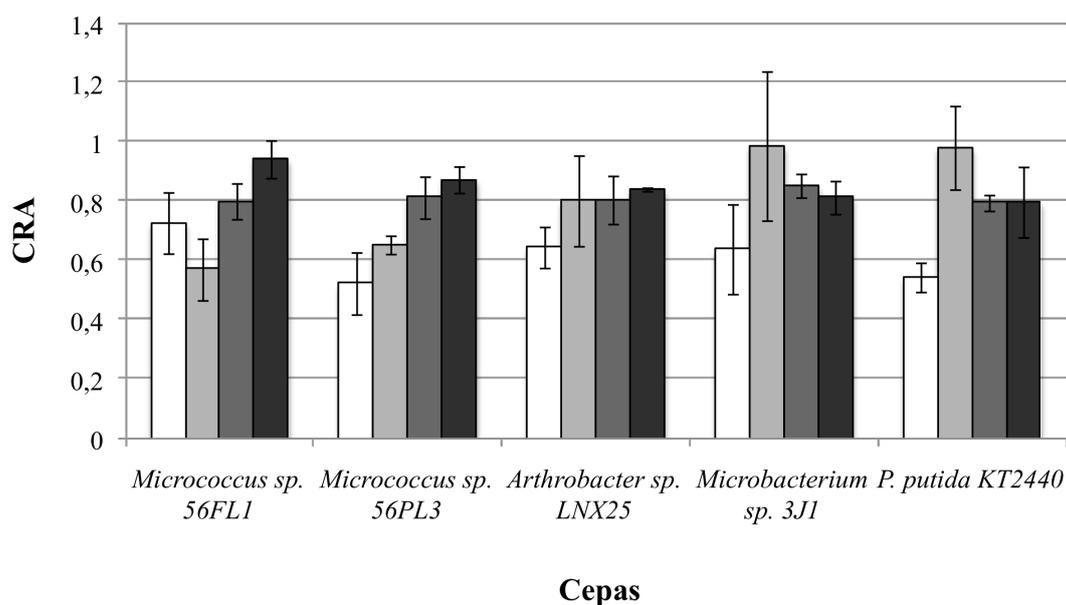


Figura IV.18. Contenido relativo de agua de las plantas en condiciones de humedad. Se indica el contenido relativo de agua de cada una de las plantas inoculadas con las cepas *Micrococcus* sp. 56FL1 *Micrococcus* sp. 56PL3, *Arthrobacter* sp. LNX25, *Microbacterium* sp. 3J1 y *P. putida* KT2440 (cuadrado negro) a los 7 (blanco), 14 (gris claro), 21 (gris) y 34 días (gris oscuro). En el eje de abscisas se indica el tiempo (días) y en el eje de ordenadas el CRA. Se incluye en forma de barras de error la desviación estándar a la media de tres experiencias.

Todas las plantas inoculadas presentaron un contenido relativo de agua entre 0,8 y 1 al final del periodo de ensayo (34 días). Las plantas inoculadas con la cepa *P. putida* KT2440 presentaron un aumento del índice CRA de $0,25 \pm 0,16$, a lo largo del periodo de ensayo. Por otra parte, las plantas inoculadas con la cepa *Micrococcus* sp. 56PL3 presentaron el mayor aumento significativo de CRA desde el inicio del muestreo hasta el final del ensayo, con un valor medio de $0,35 \pm 0,15$, junto con las plantas inoculadas con las cepas *Micrococcus* sp. 56FL1 presentaron un valor similar con un incremento de $0,35 \pm 0,1$. Por otra parte las plantas inoculadas con las cepas *Arthrobacter* sp. LNX25 y *Microbacterium* sp. 3J1 presentaron un aumento similar del índice CRA desde el inicio hasta el final del ensayo. Según el análisis estadístico multivariante mediante el método de Tukey, las plantas inoculadas con cada una de las cepas presentaron diferencia significativa en el inicio del experimento (CRA_{i7d}) con respecto al final (CRA_{f34d}). Sin embargo, dichas plantas no presentaron diferencias significativas entre ellas en ningún tiempo de muestreo.

Al igual que en el ensayo anterior se calculó el Índice de Retención de Agua (IRA) de cada una de las plantas inoculadas con las cepas (Figura IV.19) para continuar con el análisis del estado hídrico de las plantas.

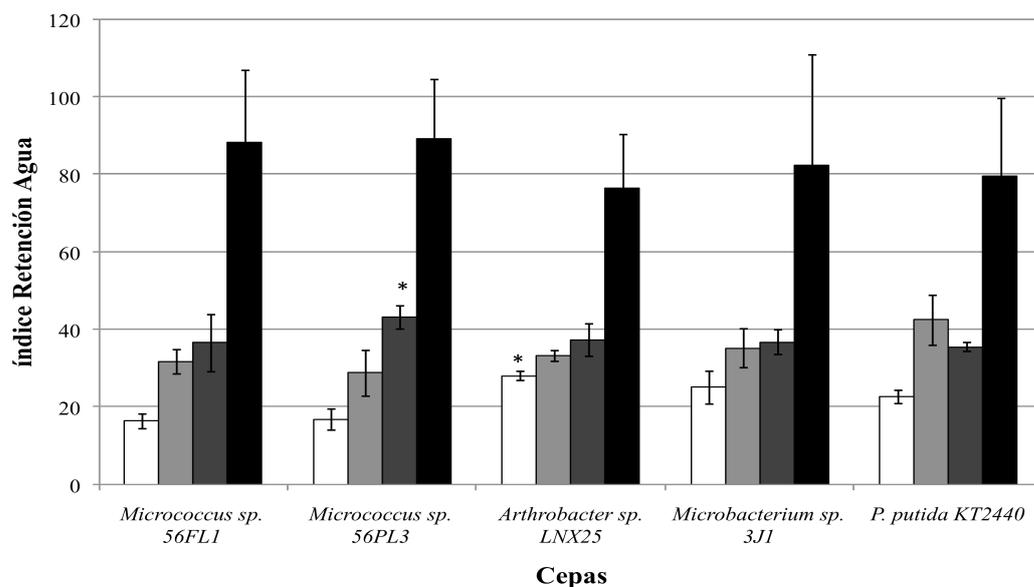


Figura IV.19. Índice de Retención de Agua de las plantas en condiciones de humedad. Se indica el índice de retención de agua de cada una de las plantas inoculadas con las cepas a los 7 días (blanco), 14 días (gris claro), 22 días (gris oscuro) y 34 días (negro). En el eje de abscisas se indica la cepa y en el eje de ordenadas el peso seco (mg). Se indica con asterisco (*) las diferencias significativas. Se incluye en forma de barras de error la desviación estándar a la media de tres experiencias.

Según la Figura IV.19, todas las plantas inoculadas presentaron un aumento significativo desde el comienzo del muestreo hasta el final del mismo. Las plantas inoculadas con la cepa *P. putida* KT2440 fueron las que menos aumentaron con un valor medio registrado de $56,8 \pm 21,81$ a lo largo del periodo de ensayo. Las plantas inoculadas con la cepa *Microbacterium* sp. 3J1 presentaron un aumento similar con un valor medio registrado de $57,2 \pm 31,5$ a lo largo del periodo de ensayo. Por otra parte, las plantas inoculadas con la cepa *Micrococcus* sp. 56PL3 presentaron el mayor aumento significativo desde el inicio del muestreo hasta final, con un valor medio registrado $72,5 \pm 17,7$. Un valor similar presentaron las plantas inoculadas con la cepa *Micrococcus* sp. 56FL1, las cuales aumentaron el índice de retención de agua con un valor medio registrado de $71,9 \pm 19,41$ a lo largo del ensayo. Por último, las plantas inoculadas con la cepa *Arthrobacter* sp. LNX25 representaron un aumento en el valor de IRA de $48,2 \pm 13,4$. Según el análisis estadístico multivariante ($p < 0,05$) sólo las plantas inoculadas con la cepa *Micrococcus* sp. 56PL3 presentaron diferencia significativa en cuanto al IRA en el día 14 y las plantas inoculadas con la cepa *Arthrobacter* sp. LNX25 presentaron diferencias significativas a los 7 días de ensayo.

Discusión

Los microorganismos clasificados como PGPRs presentan la capacidad de promover el crecimiento de las plantas mediante estimulaciones directas o indirectas. Además dichas bacterias pueden proteger a las plantas del deterioro debido a estreses ambientales, como puede ser debido a condiciones de sequía (Mayak et al. 2004; Yowono et al. 2005). Dichos microorganismos son denominados como DPPR (del inglés *Drought Plant Protecting Rhizobacteria*) por Vílchez y colaboradores (2008). En general, los DPPRs son capaces de contrarrestar los efectos negativos del estrés por falta de agua sobre la planta, mediante la producción de ACCd, reduciendo la producción de ácido abscísico (ABA) o incrementando la producción de ácido Indol-acético (IAA) (Mayak et al. 2004). El ácido Indol-acético (IAA) juega un papel central en la regulación del crecimiento de las raíces, promueve la elongación del tallo e inhibe el crecimiento de brotes laterales manteniendo la dominancia apical (Galston & Davies, 1969). El ácido abscísico juega un papel importante durante muchas fases

del ciclo de vida de una planta, incluyendo el desarrollo de las semillas y latencia, además como respuesta ante varios estreses ambientales (Koornneef et al. 1998; Seo & Koshiba, 2002; Zhu, 2011).

En situaciones de estrés hídrico, la producción de ABA induce el cierre de los estomas para prevenir la pérdida de agua (Zhang et al. 1987; Steuer et al. 1988), por lo que también disminuye la fotosíntesis. Además dicha fitohormona producida en condiciones de estrés por falta de agua, es en parte responsable de la inhibición del desarrollo lateral de las raíces (Xiong et al. 2006). Sin embargo, la enzima ACC deaminasa (ACCd) participa en la regulación del etileno, mediante la desaminación del ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) (Penrose & Glick 2003a). El etileno es una hormona que produce la planta, la cual juega un importante papel en la iniciación de la raíz y la elongación, nodulación, senescencia, abscisión y en la madurez, así como en señales de estrés (Mattoo & Suttle, 1991; Abeles & Morgan, 1992; Arshad & Frankenberger, 2002). Durante los periodos ambientales estresantes, la planta produce altos niveles de etileno, lo cual se traduce en una inhibición en la elongación de la raíz, nodulación y el transporte de auxinas, hipertrofia, aceleración del proceso de envejecimiento y promoción de la senescencia y abscisión (Glick, 2010). Las plantas tratadas con una PGPR que posea la enzima ACCd, son más resistente a los efectos de deterioro debido al estrés por etileno, el cual se sintetiza como consecuencia de condiciones de estrés ambiental como puede ser el estrés hídrico y alta concentración salina (Penrose & Glick 2003b; Mayak et al. 2004a). Dicha actividad ACCd podría ser utilizada tanto en agricultura y horticultura, así como también para la limpieza de ambientes contaminados (fitorremediación/rizorremediación) (Penrose & Glick 2003a).

Es por ello por lo que se seleccionaron para el ensayo, los microorganismos aislados en medio mínimo con ACC como única fuente de nitrógeno, descritos en el capítulo II. Dichos microorganismos se sometieron a un ensayo para comprobar si promocionaban el crecimiento en plantas (PGPR) en condiciones óptimas de humedad y además las protegen frente a condiciones de sequía (DPPR). El crecimiento de una bacteria en medio mínimo con ACC como única fuente de nitrógeno, es indicativo de que dicha bacteria posee la enzima ACCd (Glick et al. 1995) y por tanto será más probable que las bacterias presenten la capacidad de proteger a la planta frente condiciones de estrés ambiental y de promocionar el

crecimiento en las mismas. Las cepas seleccionadas fueron las denominadas 56FL1 y 56PL3, las cuales superaron el umbral por encima del cual se considera potencialmente DPPR (Vílchez et al. en preparación). La identificación taxonómica en base al gen ANRr 16S, las clasificó dentro del género *Micrococcus*. La cepa 5PL3 se clasificó como perteneciente a la especie bacteriana *Micrococcus yunnanensis*, dicha especie bacteriana se aisló de la superficie de las raíces de la planta *Polyspora axillaris* y se clasificó como bacteria endofítica, de modo que coloniza el interior del tejido de la planta sin mostrar señales externas de infección o efectos negativos en su hospedador (Holliday, 1989; Schulz & Boyle, 2006).

Al igual que en los ensayos de Mayak y colaboradores (2004), utilizamos la planta del pimiento como modelo para los ensayos de promoción del crecimiento y protección frente a la sequía. Para evaluar los efectos en el estado de hídrico de la planta inoculadas con las cepas *Micrococcus* sp. 56FL1 y *Micrococcus* sp. 56PL3, además de la cepa *Arthrobacter* sp. LNX25 (aislada en el grupo con un 30% de supervivencia), la cepa considerada como control positivo *Microbacterium* sp. 3J1 y la cepa considerada como xerosensible *P. putida* KT2440, se determinó el contenido relativo de agua (CRA) y el índice de retención de agua (IRA), de forma análoga a los estudios realizados por Mayak y colaboradores sólo que éstos utilizaron la cepa *Achromobacter piechaudii* ARV8 aislada de la rizosfera de la planta *Lycium Saji*, situada en el cauce seco de un río en la región del sur de Israel (Mayak, 2004a; Mayak, 2004b). Para calcular el CRA e IRA se analizó el peso fresco (PF), peso totalmente túrgido (PTT) y peso seco (PS). Además medimos la longitud del tallo y las raíces como medida del crecimiento y desarrollo de las plantas.

Cuando las plantas se sometieron a las condiciones de estrés por falta de agua, todas aumentaron progresivamente la longitud de las raíces hasta el final del periodo de ensayo, incluidas las plantas inoculadas con la cepa xerosensible *P. putida* KT2440, la cual quizás para amortiguar el estrés hídrico aumentó el desarrollo apical de la raíz para conseguir una mayor penetración de ésta en el suelo (Alami et al. 2000) para buscar zonas más húmedas. La inhibición del desarrollo de las raíces laterales es una respuesta adaptativa al estrés por falta de agua y el ácido abscísico (ABA) es en parte responsable de dicha inhibición (Xiong et al. 2006). Dicha inhibición pudo provocar una disminución en el desarrollo del tallo, lo cual se refleja al final del periodo de ensayo sólo en las plantas que fueron tratadas con la cepa xerosensible *P. putida*

KT2440. En condiciones de sequía el tallo es más sensible que la raíz, ya que ésta mantiene el estado hídrico del tallo (Sharp and Davies, 1989; Sharp & LeNoble 2002). Además la producción de ABA pudo provocar el cierre de los estomas y por tanto provocar una disminución progresiva de la fotosíntesis, todo ello provocó la muerte de la planta. La cepa xerosensible aún siendo caracterizada como PGPR, no pudo proteger a la planta del pimiento ante las condiciones de estrés por falta de agua. Sin embargo, la longitud de la raíz y del tallo de aquellas plantas inoculadas con las cepas tolerantes a la desecación *Micrococcus* sp. 56FL1, *Micrococcus* sp. 56PL3, *Arthrobacter* sp. LNX25 y *Microbacterium* sp. 3J1, aumentaron a lo largo del periodo que duró el ensayo. Lo cual puede deberse a que dichas bacterias presentaron la capacidad de disminuir la producción de ABA en las raíces de la planta y/o disminuir la concentración de etileno y/o aumentar la producción de IAA.

El contenido relativo de agua (CRA) probablemente es el índice más apropiado para medir el estado hídrico de la planta en términos fisiológicos, como consecuencia del estrés por falta de agua. Las plantas inoculadas con las cepas *Microbacterium* sp. 3J1 presentaron el mayor incremento significativo en el CRA desde que se inició el experimento hasta el final del periodo de ensayo, es decir, las plantas aumentaron su biomasa estructural conforme pasaron los días, reflejado en el aumento de peso fresco que se registró a lo largo del periodo de ensayo, además del peso totalmente túrgido y el peso seco. Las plantas inoculadas con la cepa *Microbacterium* sp. 3J1 amortiguaron el estrés por falta de agua durante los 34 días sin ningún aporte de agua, debido a la presencia de la cepa. Dichos resultados concuerdan con los expuestos por Vílchez y colaboradores en su trabajo, el cual está en proceso de elaboración. Dichos autores demuestran que la cepa *Microbacterium* sp. 3J1 disminuye la concentración de etileno en una planta de pimiento expuesta a condiciones de estrés por falta de agua. Por el contrario las plantas inoculadas con la cepa *P. putida* KT2440 presentaron una disminución de CRA a partir del día 21 de ensayo, demostrando que la cepa xerosensible no presentó la capacidad para proteger a la planta del pimiento frente a condiciones de estrés hídrico prolongadas, por lo que dichas plantas no soportaron las condiciones ambientales adversas. El peso seco no descendió tan bruscamente probablemente debido a que la planta presentaba un buen desarrollo de la biomasa estructural pero en su interior no había suficiente agua para poder sobrevivir a las condiciones de estrés hídrico.

Las plantas inoculadas con la cepa *Micrococcus* sp. 56PL3, al igual que las plantas inoculadas con la cepa *Microbacterium* sp. 3J1, mantuvieron a la planta en buen estado hídrico, ya que su contenido relativo de agua se mantuvo cercano al límite superior. El contenido hídrico de las plantas no presentó grandes diferencias entre los diferentes puntos de muestreo, lo cual nos indicó que las plantas presentaron buen estado hídrico desde el primer punto de muestreo (7 días) hasta el final del periodo de incubación. Además las hojas secundarias se había desarrollado a lo largo del periodo sometido a condiciones de estrés por falta de agua. La cepa *Micrococcus* sp. 56PL3, al igual que la cepa *Microbacterium* sp. 3J1 considerada como control positivo del ensayo (Vílchez et al. en preparación), se consideró como DPPR ya que según los resultados la cepa proporcionó a la planta protección frente a las condiciones adversas por falta de agua. Para nuestro conocimiento, no hay descrita ninguna especie del género *Micrococcus* como tolerante a la desecación, aunque se ha aislado y caracterizado una cepa perteneciente a dicho género como halotolerante, PGPR y ACC positiva, cuya identificación taxonómica en base al gen ARNr 16S, la relacionó con la especie *M. yunnanensis* (Siddikee et al. 2011), a igual que ocurrió con las especies 56PL3 y 56FL1, las cuales tiene la relación filogenética más estrecha con dicha especie del género *Micrococcus*.

La cepa *Micrococcus* sp. 56FL1 también perteneciente al género *Micrococcus* presentó resultados positivos en cuanto a la protección de la planta del pimiento de las condiciones de estrés por falta de agua. Las planta inoculadas con la cepa presentaron un incremento considerable del CRA a partir de los 7 días de ensayo, aunque al final del periodo tanto el peso fresco como el peso totalmente túrgido descendieron considerablemente, lo cual provocó una desestabilización del CRA en el último punto de muestreo, aunque según las imágenes tomadas en dicho punto de muestreo las plantas sobrevivieron al ensayo. Aún así tendríamos que realizar más pruebas con plantas inoculadas con la cepa. Las planta inoculadas con la cepa tolerante a la desecación *Arthrobacter* sp. LNX25 también sobrevivieron a las condiciones de estrés por falta de agua. El CRA de las plantas inoculadas con dicha cepa no presentaron diferencias significativas entre los diferentes puntos de muestreo, dichas plantas presentaron un aumento en el peso fresco y totalmente túrgido a lo largo del periodo de ensayo. Existen casos de especies descritas como anhidrobiontes dentro del género *Arthrobacter* (Mulder & Antheunisse 1963). Es muy común encontrar especies de

dicho género en ambientes con escasez de nutrientes (oligotrófos), además hay especies descritas caracterizadas como rizobacterias halotolerantes, como son *A. globiformis* y *A. tumescens* (Ahmad et al. 2008). También se ha caracterizado una cepa de la especie *A. citreus* como bacterias promotoras del crecimiento en la planta de la canola (*Brassica napus*) (Kloepper et al. 1998).

Las plantas sometidas a condiciones de estrés hídrico parecen diferenciarse a partir de los 21 días, ya que es cuando se aprecian las diferencias entre la inoculación con cepas tolerantes a la sequía o cepas que por el contrario no lo son, según las condiciones de ensayo. El índice de retención de agua (IRA) nos proporciona una idea del contenido hídrico que la planta presenta en el momento del muestreo. Los resultados obtenidos tras el cálculo concuerdan con los obtenidos con el índice CRA, a excepción de las plantas inoculadas con la cepa *Micrococcus* sp. 56FL1, donde el índice disminuye al final del periodo de ensayo, es decir, la planta presentó muy poco contenido de agua al final del periodo de ensayo.

Las plantas inoculadas con cada una de las cepas e incubadas en condiciones de humedad, nos permitió conocer que cepas presentaban la capacidad de promocionar el crecimiento en plantas, considerando la cepa xerosensible *P. putida* KT2440 y la cepa xerotolerante *Microbacterium* sp. 3J1 como controles positivos en el ensayo (Vichez et al. en preparación). En general, todas las plantas aumentaron la longitud de la raíz y del tallo a lo largo del ensayo y también presentaron un aumento del CRA e IRA a lo largo del periodo de incubación, con un gran aumento al final del periodo de ensayo. Por lo que dichas plantas presentaron un estado hídrico bueno durante todo el periodo de ensayo, lo cual es corroborado por las imágenes del aspecto de las plantas. Los resultados nos permitieron clasificar a las especies tolerantes a la desecación, *Micrococcus* sp. 56FL1, *Micrococcus* sp. 56PL3 y *Arthrobacter* sp. LNX25 como promotoras del crecimiento en plantas.

CAPÍTULO V

CAPÍTULO V

RIZORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON DIESEL EN CONDICIONES DE SEQUÍA MEDIANTE LA INOCULACIÓN DE MICROORGANISMOS DEGRADADORES

Introducción

La popularidad de la técnica de rizorremediación ha ido aumentando entre los científicos, como una estrategia atractiva, ya que las raíces de las plantas proporcionan un nicho rico para que las bacterias crezcan a expensas de los exudados radicales. A su vez, las bacterias actúan como biocatalizadores que eliminan los contaminantes. La complejidad de las relaciones beneficiosas entre plantas y bacterias es una interesante área de investigación que ha mostrado un progreso constante en la última década. Aún así a pesar de los avances en el campo, los aspectos específicos de las interacciones entre la rizobacteria degradadora y plantas son aún desconocidos, incluyendo la expresión de genes de degradación en la rizosfera, la influencia de la transferencia horizontal de genes en la rizorremediación y las posibilidades de la selección de bacterias específicas en la rizosfera de la planta (Segura & Ramos 2013).

La utilización de microorganismos de laboratorio en la eliminación de contaminantes del suelo utilizando la bioaumentación se ha empleado con diferentes grados de éxito. La biorremediación sin éxito puede ser causada por la falta de nutrientes en el suelo, propiedades de la superficie de éste, toxicidad o reducción de la biodisponibilidad del contaminante, ineficacia de la competencia de microorganismos extraños con las comunidades autóctonas y el hecho de no expresar las funciones catabólicas requeridas para la degradación, entre otros (Segura et al. 2009). Uno de los principales problemas encontrados es la dificultad de establecer un número adecuado de bacterias degradadoras de contaminantes en los suelos contaminados y su persistencia. Una solución para superar algunas de estas limitaciones es la utilización de bacterias rizosféricas (adaptadas para colonizar y competir por el espacio y los recursos que les ofrece la rizosfera) con las propiedades catabólicas apropiadas (Kuiper et al. 2001). La rizosfera es un entorno rico en nutrientes que contiene un mayor número de microbios, los cuales son metabólicamente más activos, que en el suelo (Hartmann et al. 2008). Además, algunas plantas pueden estimular las actividades de degradación requeridas para la eliminación de contaminantes (Toussaint et al. 2012).

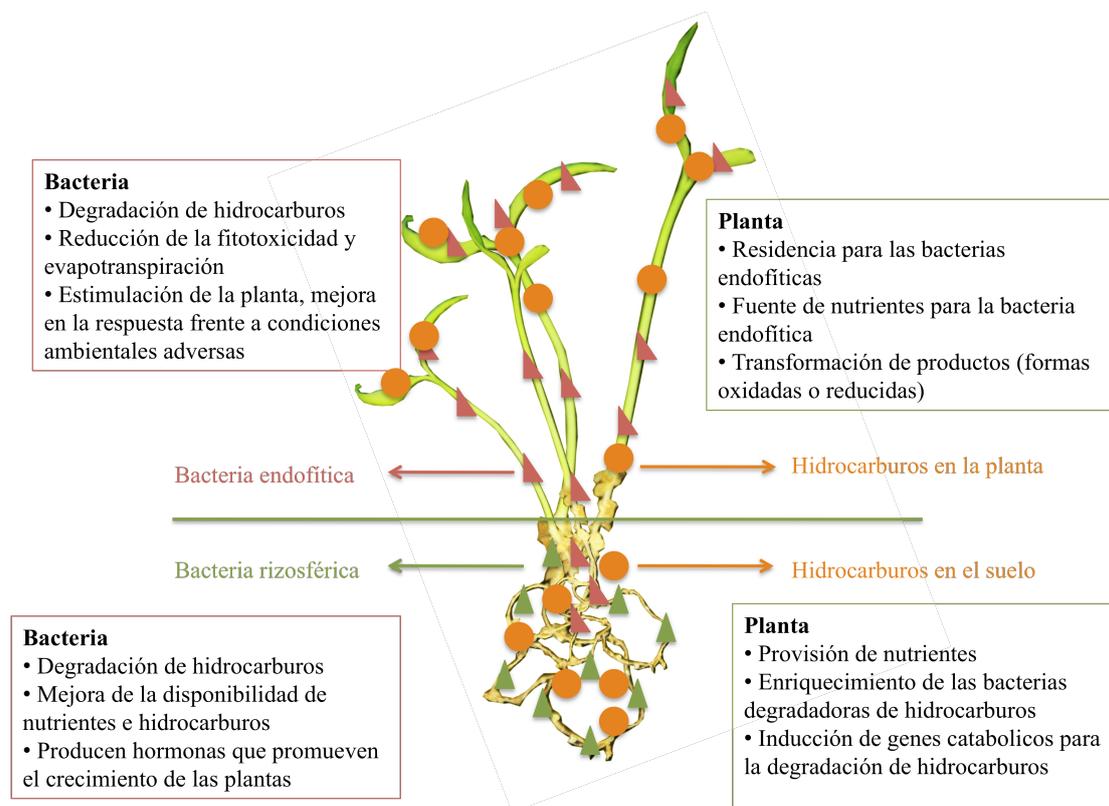


Figura V.1. Relación planta-microorganismo para la biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos.

Las bacterias promotoras del crecimiento en plantas (PGPR) incrementan la viabilidad y la salud de las plantas hospedadoras, cuando colonizan las raíces de las plantas y participan en la simbiosis asociativa (Bashan et al. 2004). A cambio la viabilidad de las PGPRs se incrementa debido a que la planta suministra nutrientes y por tanto genera un ambiente más protector (Richardson et al. 2009). Las PGPRs tienen un gran potencial en la agricultura ya que la combinación de ciertos microorganismos y plantas pueden aumentar la productividad de los cultivos, además pueden aumentar la protección contra las heladas, salinidad, la sequía y otros problemas ambientales, como la presencia de contaminantes xenobióticos (Glick & Bashan 1997; Timmusk & Wagner 1999). Pero hay un gran desafío en la combinación de plantas y microorganismos sin comprometer la viabilidad de los microorganismos o las semillas. Manzanera y colaboradores (2011) realizan una revisión para determinar la utilización de organismos anhidrobiontes como herramienta biotecnológica que garanticen la estabilidad de la planta y los

microorganismos, en condiciones de sequía. También describen dicha tecnología para la selección de PGPRs tolerantes a la desecación (DPPR) para la degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en suelos sometidos a condiciones de sequía estacional, mediante el proceso de rizorremediación (Vilchez & Manzanera 2011).

Resultados

El objetivo principal de este Capítulo fue mejorar y acelerar el proceso natural de degradación de un suelo contaminado por diesel, sometido a condiciones de estrés hídrico, mediante la técnica de rizorremediación adaptada a las condiciones ambientales de estrés por sequía. Para cumplir con el objetivo planteado recurrimos a la cepa *Microbacterium* sp. 3J1 (Narváez-Reinálido et al. 2010), clasificada como PGPR y DPPR y utilizada en los ensayos de protección de la planta del pimiento (Vilchez et al. en preparación). Tal y como indicamos en el Capítulo II, tras varios aislamientos no encontramos ninguna cepa tolerante a la sequía que presentara la capacidad de degradar los hidrocarburos objeto de estudio, aún así conseguimos demostrar en el Capítulo III que existe una cierta transferencia de la tolerancia a la desecación por parte de la cepa xerotolerante hacia una cepa xerosensible. Por ello además de la cepa *Microbacterium* sp. 3J1, seleccionamos la cepa F3.1, la cual fue una de las mejores cepas aisladas de la planta piloto, que creció en medio mínimo con HAPs como única fuente de carbono (fenantreno).

Para evaluar el proceso de rizorremediación de un suelo contaminado con diesel, sometido a condiciones de falta de agua, se estudiaron parámetros biológicos como son la cuantificación de células viables de la cepa *Microbacterium* sp. 3J1 y la cepa F3.1 a lo largo del periodo de ensayo, para analizar como les afectaban las condiciones de estrés debido a la falta de agua y la presencia de hidrocarburos. Sin embargo, con el fin de conocer el efecto de dichas condiciones adversas en el desarrollo y crecimiento de la planta, se realizó un registro de la longitud de la raíz y el tallo. Por otro lado, como parámetro químico se determinó la cantidad de TPHs (y sus fracciones) a lo largo del ensayo, para determinar si la técnica de rizorremediación era factible en las condiciones de ensayo. Se determinaron los TPHs tanto en el suelo como en la planta (raíz y tallo).

V.1 SELECCIÓN DE MICROORGANISMOS Y PLANTAS

V.1.a Microorganismos seleccionados

En primer lugar decidimos identificar taxonómicamente la cepa F3.1 mediante el gen ARNr 16S, tal y como se indica en el apartado M.8.c. Como se puede observar en la Figura V1, se obtuvieron una banda como producto de amplificación del tamaño esperado, de aproximadamente 1.500 pb.

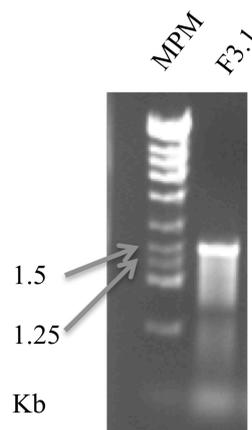


Figura V.2. Electroforesis de la reacción de amplificación del gen ARNr 16S de la cepa F3.1. La calle nombrada como MPM se corresponde con el marcador de peso molecular, DNA ladder 500 pb-10 kb, de la casa Molecular Biology Laboratory (MBL), las siguiente calle nombrada como F3.1 se corresponde con el producto de PCR del gen ARNr 16S de la cepa.

El producto correspondiente a la amplificación del gen ARNr 16S de la cepa F3.1 fue de 1.263 pb. Para la construcción de las secuencias se procedió de forma análoga a las descritas en otros capítulos y comparadas igualmente con todas las secuencias de las cepas tipo que existen en la base de datos EzTaxon. En base a la secuencia del gen ARNr 16S la cepa F3.1 presentó máxima similitud con las especies bacterianas *Achromobacter dentrificans* DSM 30026^T (Rüger & Tan, 1983; Coenye et al. 2003) y con *Achromobacter xylofidans* DSM 10346^T (Yabuuchi & Yano 1981). Ambas con un porcentaje de similitud del 99,68%.

V.1.b Plantas y suelo seleccionados

Dado que existen estudios en protección de plantas realizados por nuestro grupo, decidimos seleccionar aquellas plantas que presentaron, en las condiciones ensayadas, resultados favorables en tolerancia a la desecación, cuando se combinaron con la cepa seleccionada *Microbacterium* sp. 3J1. Dichas plantas fueron la soja (*Glycine max*) y el maíz (*Zea mays*) (Vílchez et al. en preparación). Ambas se adaptan bien a cualquier tipo de suelo, además la soja puede crecer en un amplio rango de texturas (Ohlrogge & Kamprath, 1968). Por otra parte también se seleccionó la planta de la canola (*Brassica napus* var. *oleifera*) ya que según Adam y Duncan (1999) dicha variedad de planta presentaba un 100% de germinación en suelos contaminados con diesel a una concentración de 25 g por Kg de suelo y un 95% de germinación en suelos contaminados con el doble de contaminante (50 g/Kg). La planta de la canola presenta requerimientos altos en nitrógeno y crece tanto en suelos arenosos como en suelos orgánicos, además crece en suelos con un pH comprendido entre 5,5 y 6,8. Crece en un amplio rango de temperaturas tanto a 28°C (Qaderi et al. 2006) como a 0°C (Stefanowska et al. 1999), con algunas modificaciones en su fisiología. Por lo general, cuando la planta está expuesta a altas temperaturas disminuye la producción de etileno (Yu et al. 1980), sin embargo dicha producción incrementa cuando la planta está expuesta a condiciones de estrés hídrico (Nilsen & Orcutt, 1996). Además dicha planta tolera las condiciones de estrés por falta de agua (Wright et al. 1995; Gunasekera et al. 2006).

Para desarrollar el ensayo de rizorremediación se utilizó un suelo artificial generado en el laboratorio, cuya composición granulométrica fue la misma que la composición del suelo empleado en el Capítulo IV, por lo que el suelo presentó un 80% de arena y 20% de arcilla (textura franco-arenosa). Todos los ensayos de este Capítulo se realizaron con el suelo estéril, para ello una vez realizada la mezcla homogénea de arena y arcilla, se adicionó el volumen de agua necesario para que quedara totalmente humedecido, tras lo cual se autoclavó dos veces a 121°C durante 30 min con 24 horas entre cada autoclavado. Tras ello se procedió al secado del mismo en un horno Pasteur a 50°C durante 24 horas. Una vez finalizado el secado se adicionó 20 mg de diesel por Kg de suelo y se homogenizó.

V.2 RIZORREMEDIACIÓN DE UN SUELO CONTAMINADO CON DIESEL EN CONDICIONES DE SEQUÍA

Para determinar si la combinación de la cepa tolerante a la sequía *Microbacterium* sp. 3J1 y la cepa xerosensible *Achromobacter* sp. F3.1, junto con algunas de las plantas seleccionadas aceleraba (mejoraba) el proceso natural de degradación de compuestos hidrocarbonados que forman parte del diesel, decidimos estudiar el crecimiento tanto de cada uno de los microorganismos inoculados, así como de cada una de las plantas en un suelo franco-arenoso contaminado con 20 mg de diesel por Kg de suelo.

V.2.1 Viabilidad de la cepa *Microbacterium* sp. 3J1 en un suelo contaminado con diesel

Para evaluar el crecimiento de la cepa *Microbacterium* sp. 3J1 en un suelo franco-arenoso contaminado con diesel y así examinar los efectos negativos de los contaminantes en dicha población, realizamos microcosmos edáficos en recipientes de 500 ml de volumen con 300 g de suelo estéril contaminado con diesel a una concentración de 20.000 mg/Kg de suelo. Como control del proceso se realizaron microcosmos igualmente en recipientes de 500 ml de volumen, con 300 g de suelo franco-arenoso sin contaminar. De cada uno de los microcosmos se realizaron 3 réplicas. Para adicionar las células a los microcosmos se procedió tal y como se indica en el apartado M6.a. Tras ello se inocularon cada uno de los microcosmos con 50 ml de inóculo (1xM9). Para lograr el grado de humedad óptimo (aprox. 28%) se regaron cada uno de los microcosmos con 20 ml de agua una vez por semana.

Para determinar la viabilidad de la cepa *Microbacterium* sp. 3J1 en cada uno de los microcosmos edáficos elaborados, se realizó un recuento de células viables en forma de UFC/g suelo de la cepa objeto de estudio, tal y como se indica en la Figura V.3. Para ello se tomó 1 gramo de suelo de cada uno de los microcosmos, contaminado y sin contaminar, los cuales se resuspendieron en 1xM9. Tras ello se realizaron diluciones seriadas en dicha solución salina a los 1, 2, 7, 12 y 22 días, las cuales se sembraron en placas de TSA.

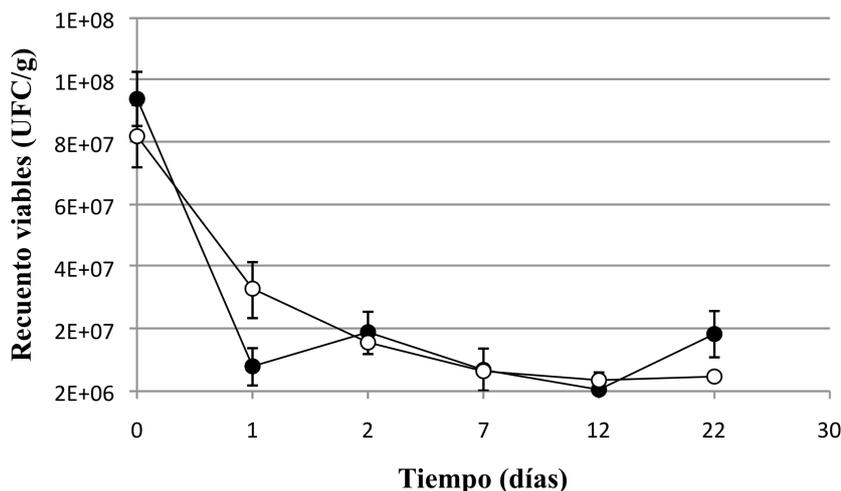


Figura V.3. Crecimiento de la cepa *Microbacterium* sp. 3J1 en un suelo contaminado con diesel y sin contaminar. Se indica la viabilidad en forma de UFC/g de suelo de la cepa *Microbacterium* sp. 3J1 en un suelo franco-arenoso contaminado con diesel (círculo negro) y en un suelo franco-arenoso sin contaminar (círculo blanco). En el eje de abscisas se indica el tiempo (días) y en el eje de ordenadas se indica las UFC/g suelo. Se incluye en forma de barras de error la desviación estándar a la media de tres experiencias.

Como se puede observar en la Figura V.3, en los microcosmos cuyo suelo se contaminó con diesel, se estimaron $9,6 \cdot 10^7$ UFC/g de suelo de la cepa *Microbacterium* sp. 3J1 en el tiempo 0 días, sin embargo transcurridas 24 horas de ensayo disminuyeron hasta llegar a $9,3 \cdot 10^6$ UFC/g de suelo, manteniéndose entorno dicho valor hasta llegar a los 22 días que duró el ensayo, donde se estimaron $2 \cdot 10^7$ UFC/g de suelo. Por otro lado, cuando la cepa *Microbacterium* sp. 3J1 se inoculó en el suelo sin contaminar se estimaron $8,4 \cdot 10^7$ UFC/g de suelo al inicio del experimento, las cuales descendieron conforme transcurrió el tiempo de ensayo hasta llegar a las $6 \cdot 10^6$ UFC/g de suelo. Según el análisis estadístico realizado, la cepa *Microbacterium* sp. 3J1 sólo presentó diferencias significativas en cuanto al crecimiento en un suelo contaminado con respecto al crecimiento en un suelo sin contaminar en el día 1 y 22 de muestreo.

Análogamente determinamos el crecimiento de la cepa *Achromobacter* sp. F3.1 en un suelo contaminado con diesel a una concentración de 20.000 mg/Kg. Para ello se procedió de la misma forma que la anteriormente descrita. En este ensayo se realizó un recuento de UFC/g de suelo a los 1, 2, 7, 12, 22 y 30 días, tal y como se indica en la Figura V.4.

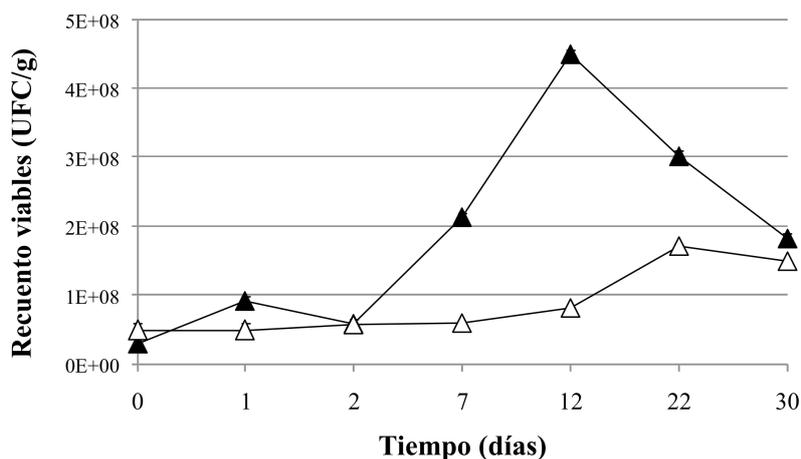


Figura V.4. Crecimiento de la cepa *Achromobacter* sp. F3.1 en un suelo contaminado y sin contaminar. Se indica la viabilidad en forma de UFC/ g de suelo de la cepa *Achromobacter* sp. 3J1 en un suelo franco-arenoso contaminado con diesel (triángulo negro) y en un suelo franco-arenoso sin contaminar (triángulo blanco). En el eje de abscisas se indica el tiempo (días) y en el eje de ordenadas se indica las UFC/g suelo. Se incluye en forma de barras de error la desviación estándar a la media de tres experiencias.

Tal y como se observa en la Figura V.4, la cepa *Achromobacter* sp. F3.1 creció mejor en un suelo franco-arenoso contaminado con diesel (20.000 mg/Kg), que en un suelo sin contaminar. De modo que se detectaron $3 \cdot 10^7$ UFC/g de suelo al inicio del ensayo. A partir del día 2 de ensayo se detectó un aumento de la población de la cepa *Achromobacter* sp. F3.1, donde se estimaron $2,1 \cdot 10^8$ UFC/g de suelo a los 7 días desde que se inició el ensayo. Dicha población continuó creciendo hasta llegar su máximo crecimiento a los 12 días de ensayo, donde se estimaron $4,5 \cdot 10^8$ UFC/g de suelo. A partir de los 12 días de ensayo las células viables descendieron, donde se estimaron $1,8 \cdot 10^8$ (UFC/g) al final del periodo de ensayo (30 días). Por otra parte, cuando el suelo no se contaminó con diesel se detectaron $4,9 \cdot 10^7$ UFC/g de suelo al inicio del ensayo, sin embargo la población bacteriana presentó el máximo crecimiento a los 22 días de ensayo, donde se detectaron $1,7 \cdot 10^8$ UFC/g de suelo. Según el análisis estadístico la cepa *Achromobacter* sp. F3.1 presentó diferencias significativas cuando creció en un suelo contaminado, con respecto al crecimiento en un suelo sin contaminar, a partir de día 7 de ensayo.

V.2.b Viabilidad de las plantas seleccionadas en un suelo contaminado con diesel

Para determinar si las plantas seleccionadas (soja, maíz y canola) eran capaces de germinar y crecer en un suelo franco-arenoso contaminado con 20 mg de diesel por Kg de suelo, procedimos a la elaboración de microcosmos edáficos de 1.000 ml de volumen con 700 g de suelo artificial sin esterilizar. Como control se procedió a la realización de microcosmos edáficos con suelo franco-arenoso sin contaminar para cada uno de los tipos de semillas (soja, maíz y canola). Se realizaron 3 replicas de cada tipo de microcosmos.

Para comprobar si la soja (*Glycine max*) era capaz de crecer en un suelo franco-arenoso contaminado con diesel, se suministró a dicho suelo un total de 20 semillas de soja. Igualmente se suministró dicha cantidad al suelo franco-arenoso sin contaminar (Figura V4). Para mantener el grado de humedad en el suelo, se regaron cada uno de los microcosmos con 50 ml de agua destilada estéril 1 vez por semana.

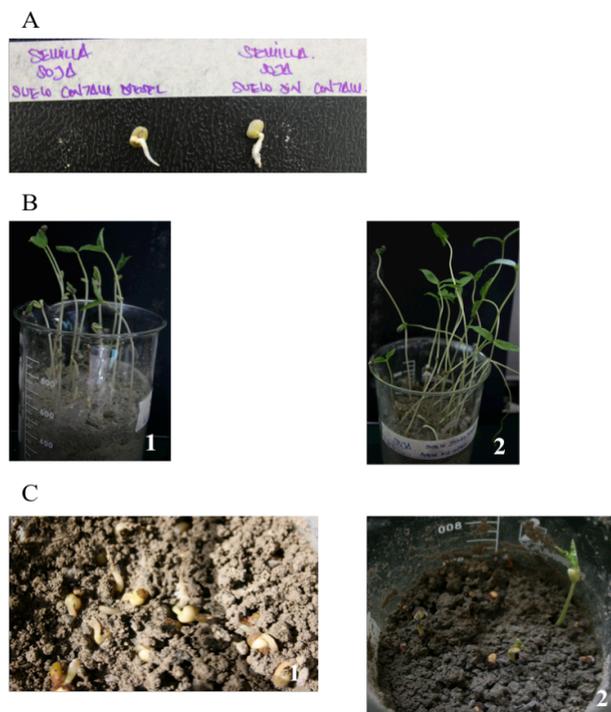


Figura V.5. Viabilidad de las semillas de soja (*Glycine max*) en un suelo franco-arenoso. En el panel A se muestra el germinado de las semillas en un suelo franco-arenoso contaminado y en un suelo sin contaminar. En el panel B se muestra el estado de la planta tras 6 días (imagen 1) y tras 18 días (imagen 2) de germinado, en un suelo sin contaminar. En el panel C se muestra el estado de la planta tras 6 días (imagen 1) y tras 18 días (imagen 2) de germinado, en un suelo contaminado con 20.000 mg/Kg de suelo.

Tal y como se observa en la Figura V.5, las semillas de soja germinaron a las 48 horas tanto en el suelo franco-arenoso sin contaminar, como en el suelo franco-arenoso contaminado con diesel (20.000 mg/Kg suelo). Dichas semillas germinadas no presentaron diferencia visual. Trascurridos los 6 días tras la siembra de las semillas, se observaron grandes diferencias en el crecimiento de la planta, ya que en el suelo franco-arenoso sin contaminar ya se visualizaban plántulas, sin embargo en el suelo contaminado con diesel las semillas todavía estaban germinando. Tras 18 días desde el sembrado de las semillas aquellas presentes en el suelo sin contaminar crecieron hasta alcanzar la mayoría de ellas un tamaño de tallo entre 15 y 20 cm. Pero entre las semillas sembradas en el suelo contaminado con diesel sólo creció una, la cual no presentó supervivencia transcurridas las 24 horas desde que se realizó la fotografía (Figura V.5C.2).

Para analizar comportamiento de la planta de soja ante la contaminación por diesel, una vez alcanzado el tamaño de plántula, se realizaron microcosmos como los mencionados anteriormente. De modo que una vez la semilla salió de su estado de latencia, germinó y alcanzó el tamaño de plántula el suelo se contaminó con diesel a una concentración de 20.000 mg/Kg de suelo (Figura V.6).

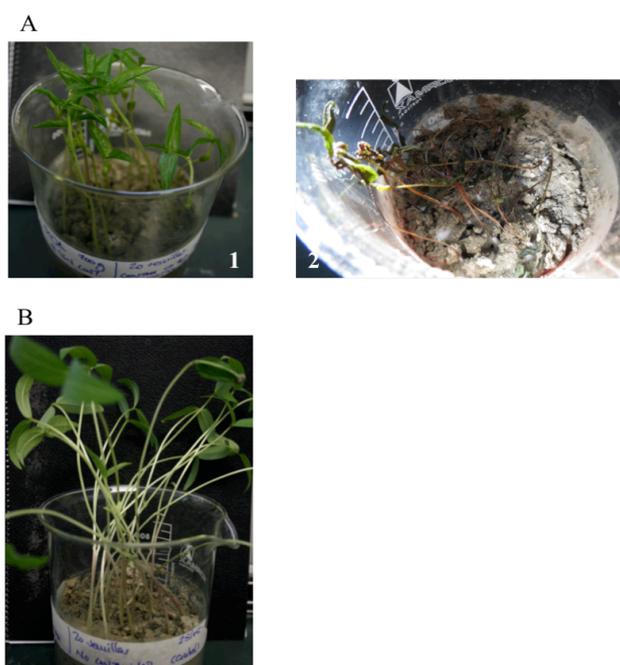


Figura V.6. Viabilidad de la plántula de soja (*Glycine max*) en un suelo franco-arenoso. En el panel A se muestra el estado de la planta 48 horas tras la adición del contaminante (imagen 1) y el estado de la planta tras 16 días en contacto con el contaminante (imagen 2). En el panel B se muestra el estado del la planta tras 16 días creciendo en un suelo sin contaminar.

Como se puede observar en la Figura V.6, en el panel A (1), las hojas de la plántula se tornaron a una textura oleosa tras 24 horas de exposición al contaminante. Sin embargo, transcurridos 16 días se comprobó que las plántulas no presentaron capacidad para crecer en un suelo contaminado por diesel. Por otro lado, al igual que en el ensayo anterior crecieron sin problemas cuando el suelo franco-arenoso no se contaminó con dicho contaminante.

De manera análoga, para comprobar la viabilidad de la planta de maíz (*Zea mays*) en un suelo franco-arenoso contaminado, se realizaron microcosmos edáficos con suelo franco-arenoso contaminado con diesel (20.000 mg/Kg) y microcosmos con suelo franco-arenoso sin contaminar, tal y como se indica en la Figura V.7.

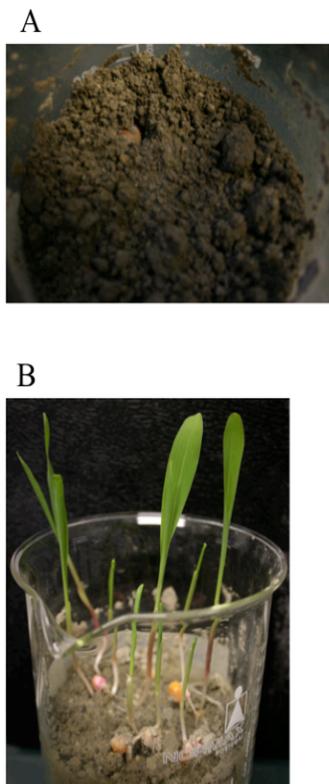


Figura V.7. Viabilidad de la planta de maíz (*Zea mays*) en un suelo franco-arenoso. En el panel A se muestra el aspecto de la semilla de maíz tras 6 días después del sembrado en un suelo franco-arenoso contaminado con diesel. En el panel B se muestra el aspecto de la planta de maíz tras 6 días en un suelo franco-arenoso sin contaminar.

Las semillas de la planta del maíz no germinaron cuando el suelo franco-arenoso se contaminó con diesel, pero si germinaron en un suelo franco-arenoso sin contaminar.

Para comprobar la germinación y supervivencia de la planta de la canola (*Brassica napus* var. *oleifera*) en un suelo franco-arenoso contaminado con diesel a una concentración de 20.000 mg/Kg de suelo, se procedió de la misma forma que con las plantas mencionadas anteriormente. Debido al tamaño tan reducido de la semilla de la planta de canola, se sembraron 0,5 g de semillas tanto en un suelo contaminado con diesel y en un suelo sin contaminar (Figura V.8).

A



B



Figura V.8. Viabilidad de la planta de canola (*Brassica napus* var. *oleifera*) en un suelo franco-arenoso. En el panel A se muestra el aspecto la planta de canola tras 7 días después del sembrado en un suelo franco-arenoso contaminado con diesel. En el panel B se muestra el aspecto de la planta de canola tras 7 días en un suelo franco-arenoso sin contaminar.

Las semillas sembradas en el suelo contaminado con diesel germinaron transcurridos 4 días desde la siembra, al igual que las semillas presentes en el suelo sin contaminar. A partir de los 4 días desde el sembrado de las semillas de la canola, se observó que las plantas presentes en el suelo sin contaminar crecieron a mayor velocidad que aquellas presentes en el suelo franco-arenoso contaminado con diesel. La planta en el suelo contaminado, en condiciones óptimas de humedad y a una temperatura de 30°C presentó una viabilidad prolongada (>30 días).

A continuación se representa en la Figura V.9 cada uno de los porcentajes de germinación de las plantas de soja, maíz y canola, en un suelo franco-arenoso contaminado con diesel y en un suelo sin contaminar.

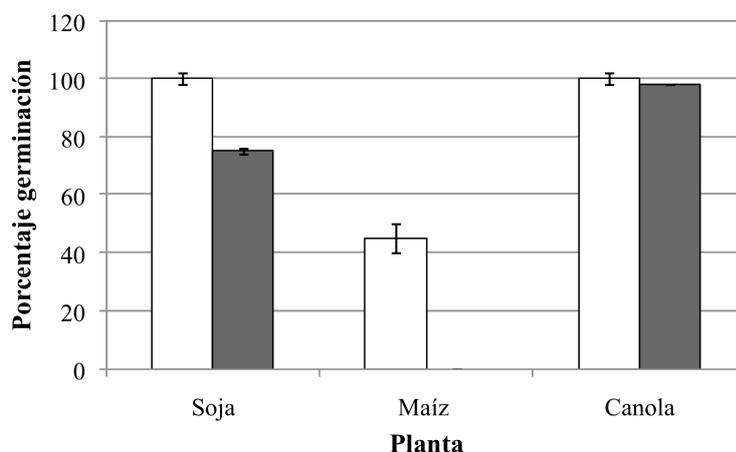


Figura V.9. Germinación de las plantas de Soja, Maíz y Canola. Se representa en abscisas el nombre de la planta y en el eje de ordenadas el porcentaje de germinación de cada una de las semillas en un suelo franco-arcilloso sin contaminar (barra blanca) y en un suelo contaminado con diesel a una concentración de 20.000 mg/Kg de suelo (barra gris).

Como se observa en la Figura V.9, las semillas de la planta de la soja (*Glicine max*) presentaron un alto porcentaje de germinación ($75\% \pm 1$), aunque tal y como mencionamos anteriormente dichas semillas no sobrevivieron en un suelo franco-arenoso contaminado con diesel (20.000 mg/Kg), debido a la presencia del contaminante. Por otro lado, las semillas de maíz (*Zea mays*) no fueron capaces de germinar en un suelo contaminado con diesel, debido también a la presencia del contaminante, aunque si lo hicieron cuando el suelo no se contaminó. Sin embargo, las semillas de la planta de canola (*Brassica napus var. oleifera*) germinaron un 98% en un suelo franco-arenoso contaminado con diesel a una concentración de 20.000 mg/Kg de suelo, con respecto a la germinación de las semillas en un suelo franco-arenoso sin contaminar.

Según los resultados obtenidos se seleccionó la planta *Brassica napus var. oleifera* ya que las semillas germinaron un 98% en un suelo franco-arenoso contaminando con diesel a una concentración de 20.000 mg/Kg de suelo y crecieron durante un largo periodo de tiempo.

V.2.c Desarrollo de un ensayo de rizorremediación en un suelo franco-arenoso contaminados con diesel, sometido a condiciones de sequía

Una vez comprobado la viabilidad de la cepa *Microbacterium* sp. 3J1 y el crecimiento de la cepa *Achromobacter* sp. F3.1 en un suelo franco-arenoso artificial contaminado con diesel a una concentración de 20.000 mg/Kg de suelo. Además del crecimiento de la planta *Brassica napus* var. *oleífera* en dicho suelo contaminado. Se procedió a la realización de un ensayo de rizorremediación en un suelo franco-arenoso sometido a condiciones de estrés debido a la presencia de diesel y a la falta de agua. Para ello prepararon microcosmos edáficos en vasos de precipitado de plástico de 100 ml de volumen, con 100 g de suelo franco-arenoso estéril (Figura V.10). El suelo contenido en cada uno de los microcosmos se contaminó con diesel a una concentración 20.000 mg/Kg.



Figura V.10. Microcosmos edáficos. La imagen de la izquierda presentan los microcosmos con plantas y la imagen de la derecha aquellos microcosmos sin plantas.

Tal y como se indica en la Tabla V.1, los microcosmos se dividieron en 4 grupos, el primero de ellos denominado dQ, se preparó sin inoculante y sin planta. Dichos microcosmos estaban destinados a determinar la pérdida del contaminante por dispersión, dilución, sorción, volatilización y estabilización química. El segundo de ellos denominado sM, cuyo suelo se inoculó con la combinación de las cepas *Microbacterium* sp. 3J1 y *Achromobacter* sp. F3.1 (bioaumentación), el tercero de ellos denominado sP se destinó al tratamiento del suelo con la planta de la *Brassica napus* var. *oleífera* (fitorremediación), donde en cada uno de los microcosmos se

transplantaron 9 plantas de canola. Y finalmente el denominado sPM en cuyo suelo se transplantaron 9 plantas de canola y se inocularon con la combinación de las cepas *Microbacterium* sp. 3J1 y *Achromobacter* sp. F3.1 (rizorremediación). Se realizaron tres replicas para cada tiempo de muestreo. El suelo contenido en cada uno de los microcosmos mencionados se mantuvieron en condiciones de estrés hídrico. Se realizaron muestreos a los 0, 1, 7 y 11 días.

Tabla V.1. Tratamientos empleados en un suelo franco-arenoso contaminado con diesel. En la primera columna se indica el tratamiento empleado, en la segunda columna el nombre designado a cada microcosmos, en la tercera y cuarta columna se indica si se utilizó inóculo y/o planta mediante un signo (+) si se utilizó o un signo (-) si por el contrario no se utilizó. Y en la última columna las condiciones a las que se sometieron los microcosmos.

Tratamientos	Microcosmos	Inóculo (Combinación cepas)	Planta	Condiciones
Degradación química	sDQ	-	-	· Diesel (20.000 ppm) · Estrés hídrico
Bioamento	sM	+	-	· Diesel (20.000 ppm) · Estrés hídrico
Fitorremediación	sP	-	+	· Diesel (20.000 ppm) · Estrés hídrico
Rizorremediación	sPM	+	+	· Diesel (20.000 ppm) · Estrés hídrico

Para añadir las células a los microcosmos se inocularon previamente dos matraces de 500 ml con 250 ml de TSB, tal y como se indica en el apartado M6.a. Una vez obtenida y resuspendida la biomasa en 1xM9, se mezclaron los inóculos de la cepa *Microbacterium* sp. 3J1 y la cepa *Achromobacter* sp. F3.1 en volúmenes iguales para proceder a la inoculación de los microcosmos denominados como sM y sPM, con 7,6 ml del inóculo-mezcla.

Para conocer que tratamiento aceleraba y mejoraba el proceso de degradación de suelos contaminados por diesel en condiciones de sequía, se determinaron los hidrocarburos totales del petróleo (TPHs), así como las fracciones de TPHs (alcanos

lineales, alcanos ramificados y naftalenos) contenido en el suelo contenido en cada uno de los microcosmos (sDQ, sM, sP y sPM). Además se determinó la presencia de dichos compuestos en el tallo/hoja y las raíces de las plantas en los microcosmos sP y sPM. También se realizó un recuento de las células viables de las cepas *Microbacterium* sp. 3J1 y *Achromobacter* sp. F3.1 en el suelo contenido en los microcosmos denominados como sM y sPM y en las raíces de las plantas presentes en los microcosmos denominados como sPM. Para controlar el crecimiento de la planta se tomaron medidas de la longitud del tallo y de la raíz de las mismas en los microcosmos sP y sPM. La humedad se controló en cada uno de los microcosmos para que se mantuviera por debajo del 10%. La habitación se mantuvo a 28°C durante el periodo de ensayo.

V.2.c.1 Contenido hídrico de los microcosmos compuestos por un suelo contaminado con diesel

Para controlar la humedad se realizó un seguimiento del contenido hídrico del suelo en cada uno de los microcosmos a los 0, 1, 7 y 11 días. De esta manera se trató de que el suelo no alcanzara humedades superiores al 10%. Para ello se pesó 1 gramo de suelo por triplicado en viales de vidrio y se procedió tal y como se indica en el apartado M5.d.2.

En la Figura VI.11 se representa la evolución del contenido hídrico de cada uno de los microcosmos a lo largo del periodo de muestreo. Para comparar la humedad en cada uno de los tratamientos se realizó un análisis de la probabilidad *t*-student, utilizando, tal y como se indica en el apartado M11.a. Los microcosmos se regaron con 6 ml de agua estéril destilada cada 3 días, para así evitar el completo secado de los mismos.

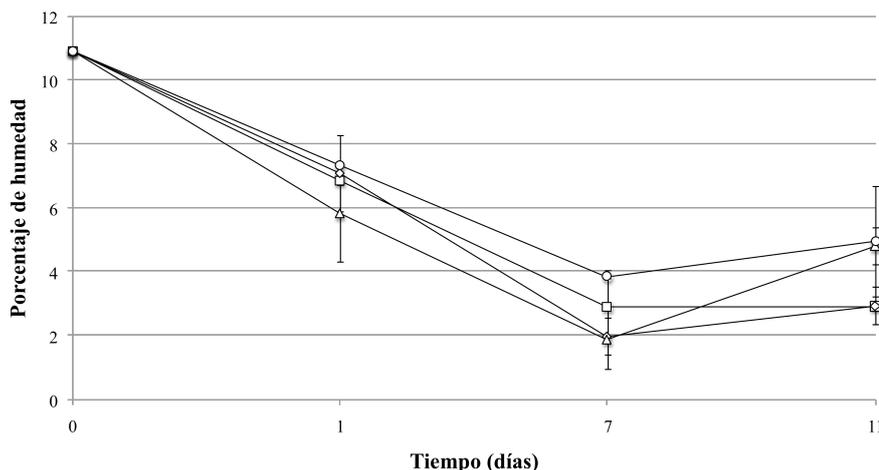


Figura V.11. Contenido hídrico del suelo en cada uno de los microcosmos contaminados con diesel. Se representa el contenido hídrico del suelo en cada uno de los microcosmos, sDQ (cuadrado), sM (rombo), sP (triángulo) y sPM (círculo). En el eje de abscisas se indica el tiempo en días y en el eje de ordenadas se representa la humedad en porcentaje. Se incluye en forma de barras de error la desviación estándar a la media de las tres experiencias.

Se procuró que la humedad inicial del suelo contenido en cada uno de los microcosmos fuese del 10%. Para ello se añadió 2,4 ml de diesel (20.000 mg/Kg) y 7,6 ml de inóculo mezcla (combinación cepas), es decir un total de 10 ml. Primero se añadió el diesel y luego el inóculo (resuspendido en 1xM9) en los microcosmos sM y sPM. Sin embargo, los microcosmos sDQ y sP se añadió 10 ml de solución salina 1xM9. La humedad media registrada fue de 10,92% en el inicio del ensayo. La humedad en cada uno de los microcosmos descendió bruscamente durante los primeros 7 días de ensayo. Según el tratamiento estadístico ninguno de los tratamientos presentaron diferencias significativas en el día 1 de ensayo. A los 7 días de ensayo, la humedad del suelo contenido en cada uno de los microcosmos continuó descendiendo hasta valores comprendidos entre el 4 y el 2%, siendo el tratamiento sM y sP, los que más descendieron. Tras el tratamiento estadístico se observó que el suelo contenido en los microcosmos sDQ y sPM presentaron diferencias significativas con respecto al suelo contenido en los microcosmos sP y sPM, en cuanto a la humedad contenida en cada uno de ellos. Al final del ensayo (11 días) se observó un ligero aumento de la humedad en los suelos contenidos en cada uno de los microcosmos, con un rango comprendido entre 5 y 2.5% de humedad. Siendo los microcosmos sDQ y sM, los que menos humedad presentaron. Así los microcosmos denominados sP y

sPM presentaron diferencias significativas con respecto a los microcosmos sDQ y sM, en cuanto al contenido hídrico del suelo.

V.2.c.2 Recuento de células viables de la cepa *Microbacterium* sp. 3J1 y *Achromobacter* sp. F3.1

Para comprobar la viabilidad de la cepa tolerante a la sequía *Microbacterium* sp. 3J1 y la cepa sensible a la sequía *Achromobacter* sp. F3.1, en los microcosmos denominados como sM y sPM, se realizó un recuento de células viables en forma de UFC/g de suelo de cada una de las cepas objeto de estudio. Para ello se tomó 1 gramo de suelo de cada uno de los tratamientos, los cuales se resuspendieron por separado en 1xM9, tal y como se indica en el apartado M6.a.1. Tras ello se realizaron diluciones seriadas en dicha solución salina a los 0, 1, 7 y 11 días.

Tal y como se indica en la Figura V.12 se estimaron las células viables en forma de UFC/g de suelo de las cepas objeto de estudio, *Microbacterium* sp. 3J1 y *Achromobacter* sp. F3.1, en los microcosmos sM (bioaumentación).

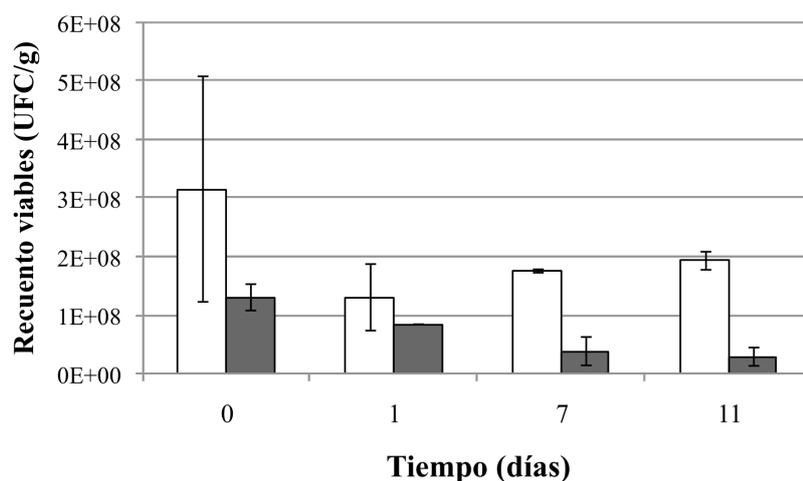


Figura V.12. Células viables presentes en el suelo contenido en los microcosmos sM. Se indica en forma de UFC/g de suelo las células viables de la cepa *Microbacterium* sp. 3J1 (barra blanca) y la cepa *Achromobacter* sp. F3.1 (barra gris), en un suelo franco-arenoso contaminado con 20.000 mg/Kg de suelo y sometido a condiciones de sequía. En el eje de abscisas se indica el tiempo (días) y en el eje de ordenadas se indica las UFC/g de suelo. Se incluye en forma de barras de error la desviación estándar a la media de tres experiencias.

Como resultado del ensayo para determinar la viabilidad de las cepas objeto de estudio *Microbacterium* sp. 3J1 y *Achromobacter* sp. F3.1, en un suelo franco-arenoso contaminado con diesel y sometido a condiciones de sequía, se observó que el recuento de células viables la cepa *Microbacterium* sp. 3J1 no presentó diferencias significativas entre ninguno de los puntos de muestreo. Sin embargo, el recuento de células viables de la cepa *Achromobacter* sp. F3.1 disminuyó durante la primera semana, manteniéndose hasta llegar a los 11 días de ensayo, presentando diferencias significativas en los dos últimos puntos de muestreo con respecto a los demás. De modo que, se estimaron $3,1 \cdot 10^8$ UFC/g de suelo de la cepa *Microbacterium* sp. 3J1 y $1,3 \cdot 10^8$ UFC/g de suelo de la cepa *Achromobacter* sp. F3.1 en el inicio del experimento (0 días). Y al final del periodo de ensayo se detectaron $1,9 \cdot 10^8$ UFC/g de suelo de la cepa tolerante a la sequía *Microbacterium* sp. 3J1 y $2,85 \cdot 10^7$ UFC/g de suelo de la cepa sensible a la sequía *Achromobacter* sp. F3.1. Cuando se realizó el tratamiento estadístico entre ambas cepas se observó que ambas presentaron diferencias significativas en el día 7 y 11.

Del mismo modo se estimó la viabilidad de las células de la cepa *Microbacterium* sp. 3J1 y la cepa *Achromobacter* sp. F3.1 en forma de UFC/g de suelo, en el tratamiento donde se combinan ambas cepas, junto con la planta de la canola (rizorremediación), es decir, los microcosmos denominados sPM (Figura V.13).

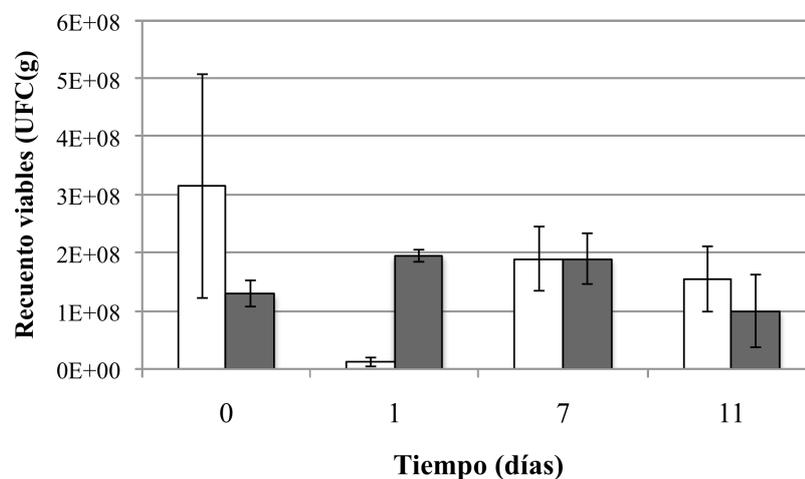


Figura V.13. Células viables presentes en el suelo de los microcosmos sPM. Se indica el número de células viables en forma de UFC/g de suelo de la cepa *Microbacterium* sp. 3J1 (barra blanca) y la cepa *Achromobacter* sp. F3.1 (barra gris), en un suelo franco-arenoso contaminado con diesel a una concentración de 20.000 mg/Kg de suelo y sometido a condiciones de sequía. En el eje de abscisas se indica el tiempo (días) y en el eje de ordenadas se indica las UFC/g de suelo. Se incluye en forma de barras de error la desviación estándar a la media de tres experiencias.

Como resultado del ensayo para determinar la viabilidad celular de las cepas objeto de estudio, en el tratamiento donde ambas se combinan de forma conjunta y junto con la planta, se observó que la cepa *Microbacterium* sp. 3J1, sólo presentó una disminución significativa en el recuento de viables en el día 1, con respecto a los demás puntos de muestreo. Sin embargo, la cepa *Achromobacter* sp. F3.1 aumentó la viabilidad celular en el primer día de ensayo manteniéndose entorno al mismo valor hasta llegar al final del periodo de ensayo por lo que sólo presentó diferencias significativas en el inicio del ensayo. Cuando se realizó el tratamiento estadístico entre ambas cepas en cada punto de muestreo, se observó que sólo presentaron diferencias significativas en el día 1 de muestreo. De modo que, se detectaron $3,15 \cdot 10^8$ UFC/g de suelo de la cepa tolerante a la sequía *Microbacterium* sp. 3J1 y $1,3 \cdot 10^8$ UFC/g de suelo de la cepa sensible a la falta de agua *Achromobacter* sp. F3.1, al inicio del ensayo (0 días). Y al final de ensayo se detectaron $1,55 \cdot 10^8$ UFC/g de suelo de la cepa tolerante a la sequía *Microbacterium* sp. 3J1 y 10^8 UFC/g de suelo de la cepa sensible a la sequía *Achromobacter* sp. F3.1, al final del periodo de ensayo.

Por otra parte, se estimaron las células viables en forma de UFC/mg de raíz de las cepas objeto de estudio, en las raíces de las plantas de los microcosmos denominados sPM, tal y como se indica en la Figura V13. Para ello se cortaron las raíces de las plantas presentes en cada uno de los microcosmos, tras lo cual se realizó un homogenizado de dichas raíces en un microtubo con 1 ml de solución salina 1xM9. Una vez homogenizado se realizaron diluciones seriadas en la misma solución salina a los 0, 1, 7 y 11 días.

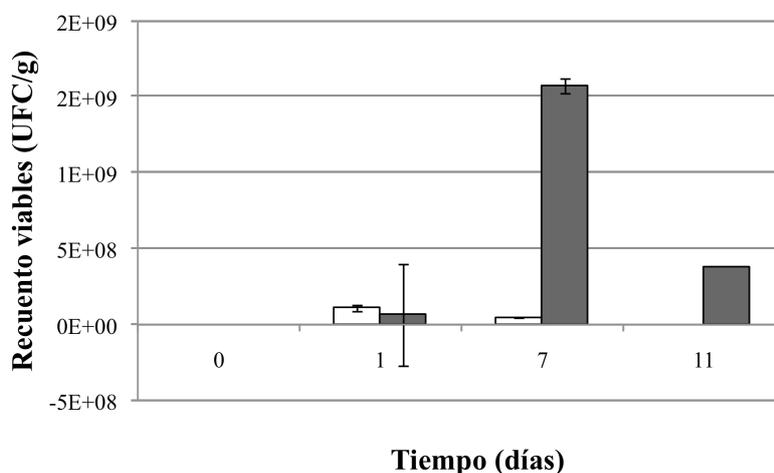


Figura V.14. Células viables presentes en las raíces de las plantas de los microcosmos sPM. Se indica las células viables en forma de UFC/mg de raíz de la cepa *Microbacterium* sp. 3J1 (barra blanca)

y la cepa *Achromobacter* sp. F3.1 (barra gris), en un suelo franco-arenoso contaminado con 20.000 mg/Kg de suelo. En el eje de abscisas se indica el tiempo (días) y en el eje de ordenadas se indica las UFC/g de suelo. Se incluye en forma de barras de error la desviación estándar a la media de tres experiencias.

Según el recuento de viables la cepa *Microbacterium* sp. 3J1 no estuvo presente en la raíz de las plantas a los 11 días de muestreo. Además presentó una viabilidad muy reducida en todos los puntos de muestreo. Sin embargo, la cepa *Achromobacter* sp. F3.1 presentó una alta viabilidad en las raíces de la planta de la canola, cuyo recuento presentó diferencias significativas con respecto a la cepa xerotolerante (3J1), en todos los puntos de muestreo a excepción del día 1.

V.2.c.3 Longitud del tallo y raíces de las plantas de *Brassica napus* var. *oleífera*

Para medir el crecimiento de las plantas realizamos registros tanto de la longitud de la raíz como de la longitud del tallo de la planta. Para los datos de la altura, al igual que en otros ensayos se tomó como medida la longitud en cm desde la base blanquecina del tallo o el punto donde se encontraban las primeras raíces, hasta el plano horizontal formado por el primer par de hojas (hojas seminales). Mientras que para las raíces se tomó como medida la longitud en cm desde la base blanquecina del tallo o el punto donde se encontraban las primeras raíces, hasta el punto del ápice radical más largo sin forzar el estiramiento del mismo. Para comparar tanto la longitud de las raíces como del tallo de las plantas inoculadas con cada una de las cepas, se realizó un análisis de comparaciones múltiples, utilizando el método Tukey o método de la diferencia significativa honesta de Tukey (DSH), con un grado de significancia de 0,05, tal y como se indica en el apartado M11.a.

En la Figura V.15, se representa la longitud del tallo de las plantas presentes en los microcosmos sP (planta) y sPM (planta y combinación de microorganismos).

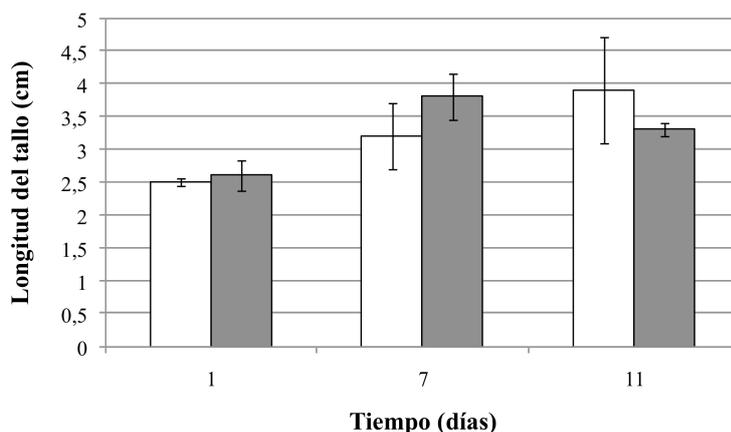


Figura V.15. Longitud del tallo de las plantas presentes en los microcosmos sP y sPM. Se indica la longitud de las raíces de las plantas presentes en los microcosmos sP (barra blanca) y sPM (barra gris). Se incluye en forma de barras de error la desviación estándar a la media de tres experiencias.

Los tallos de las plantas presentes en los microcosmos sP presentaron una longitud media de $2,5 \pm 0,05$ cm en el día 1 de ensayo, la longitud aumenta conforme pasan los días hasta llegar a $3,9 \pm 0,8$ cm al final del periodo de ensayo (11 días). Por lo que, la longitud del tallo de las plantas presentes en los microcosmos sP aumentó $1,4 \pm 0,75$ cm en un suelo contaminado y expuesto a condiciones de sequía, a lo largo del periodo. Por otra parte, la longitud del tallo de las plantas presentes en los microcosmos sPM midieron $2,6 \pm 0,23$ cm en el día 1 de muestreo y $3,3 \pm 0,1$ cm a los 11 días de ensayo, por lo que aumentaron $0,6 \pm 0,25$ cm. Dichas plantas no presentaron diferencias significativas con respecto a las plantas presentes en los microcosmos sP, en cuanto a la longitud del tallo, en cada uno de los tiempos de muestreo.

A continuación se tomaron medidas de la longitud de la raíz de cada una de las plantas presentes en los microcosmos sP (planta) y sPM (planta y combinación de microorganismos), tal y como se indica en la Figura V.16.

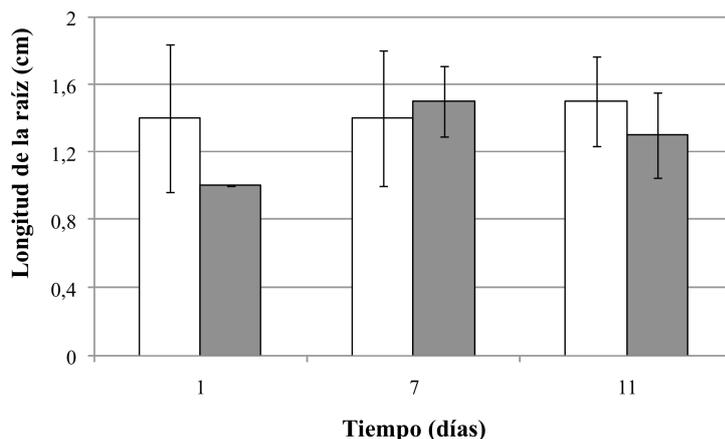


Figura V.16. Longitud de raíz de las plantas presentes en los microcosmos sP y sPM. Se indica la longitud de las raíces de las plantas presentes en los microcosmos sP (barra blanca) y sPM (barra gris). Se indica con un asterisco (*) la diferencias significativas. Se incluye en forma de barras de error la desviación estándar a la media de tres experiencias.

Las raíces de las plantas presentes en los microcosmos sP (planta) presentaron una longitud media de $1,4 \pm 0,4$ cm en el día 1 de ensayo, manteniéndose entorno dicho valor a lo largo del periodo de ensayo (11 días). Por otra parte, la longitud de las raíces de las plantas presentes en los microcosmos sPM (planta y combinación de microorganismos) fue de 1 cm al inicio del ensayo y $1,3 \pm 0,25$ cm al final del periodo. La longitud de las raíces de las plantas presentes en los microcosmos sP no presentó diferencias significativas con respecto a la longitud de las plantas presentes en los microcosmos sPM.

V.2.c.4 Degradación de hidrocarburos totales del petróleo (TPHs)

Tras analizar como afectaba la contaminación por diesel y las condiciones de sequía en el crecimiento de la cepas *Microbacterium* sp. 3J1 y *Achromobacter* sp. F3.1 tanto en el suelo como en las raíces de las plantas. Así como también al crecimiento de las plantas, se determinó la concentración de TPHs presente en cada uno de los tratamientos, tanto en el suelo como en las plantas (tallo, hoja y raíces). Además se determinó los n-alcános de cadena lineal de longitud intermedia ($C_{10} - C_{20}$), los n-alcános de cadena lineal larga ($C_{20} - C_{40}$), alcános ramificados y naftalenos.

V.2.c.3.1 Determinación de hidrocarburos en el suelo

La presencia de dichos hidrocarburos se evaluó según la norma EPA 8015 mediante la determinación gravimétrica de hidrocarburos del petróleo totales (TPHs), y tal y como se indica en el apartado M5.d.3. Tanto los TPHs como las fracciones descritas anteriormente se analizaron en el Centro de Instrumentación Científica (CIC) de la Universidad de Granada, mediante cromatografía de gases/espectrometría de masas, tal y como se indica en el apartado M5.d.4. Con ellos determinamos la eficiencia del proceso de degradación en cada uno de los tratamientos. Para comparar cada uno de los tratamientos se realizó un análisis de comparaciones múltiples, utilizando el método de Tukey, con un grado de significancia de 0,05, tal y como se indica en el apartado M11.a.

Se determinó la concentración de TPHs al inicio y al final de los tratamientos en cada una de las condiciones experimentales ensayadas. Tal y como se indica en la Figura V.17 se determinaron los TPHs en el tiempo inicial y el tiempo final (11 días) del experimento.

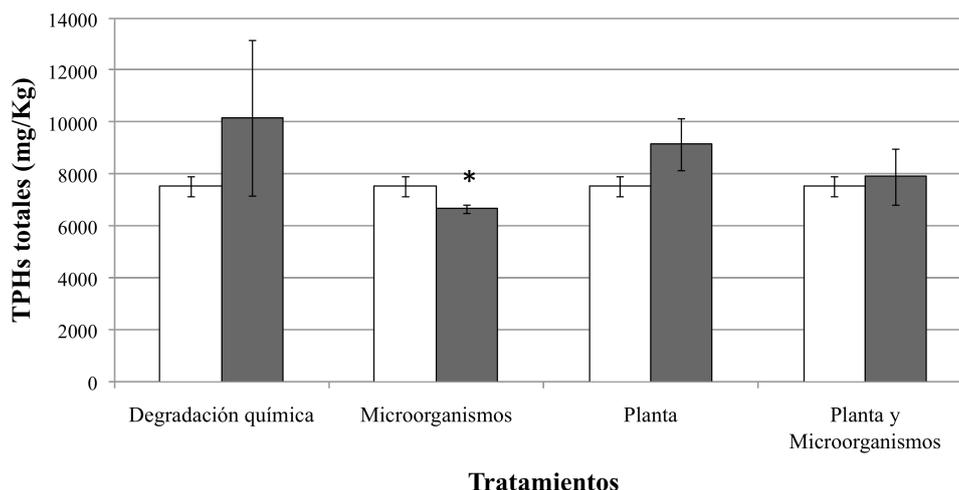


Figura V.17. Determinación de los hidrocarburos totales del petróleo en cada uno de los tratamientos. En el eje de abscisas se representa cada uno de los tratamientos al inicio del periodo (barra blanca) y al final del periodo de ensayo (barra gris) y en el eje de ordenadas la concentración de TPHs (mg/Kg). Se indica con asterisco (*) las diferencias significativas. Se incluye en forma de barras de error la desviación estándar a la media de tres experiencias.

La concentración de TPHs inicial en el suelo franco-arenoso fue igual en todos los tratamientos, donde se registró una concentración media de $9.511,1 \pm 392,55$ mg/Kg de suelo. Partiendo de dicha concentración de TPHs totales en el suelo, el suelo contenido en los microcosmos sDQ presentó una concentración media de TPHs de $10.807,8 \pm 900,9$ al final de periodo de ensayo (11 días). Según el análisis estadístico los microcosmos DQ no presentaron diferencias significativas al final del periodo de ensayo, con respecto a la concentración del contaminante registrada en el inicio del ensayo. Por otra parte, en el suelo contenido en los microcosmos denominados sM donde se evaluó la combinación de las cepas *Microbacterium* sp. 3J1 y *Achromobacter* sp. F3.1, se registraron $7.080,4 \pm 279,1$ mg/Kg de suelo lo que supuso una disminución de $2.430,7 \pm 220$ mg/Kg de TPHs durante los 11 días de ensayo. Según el análisis estadístico dicho tratamiento presentó diferencias significativas a los 11 días de ensayo, en comparación con el inicio del ensayo y con respecto a los demás tratamientos. El suelo contenido en los microcosmos sP, donde se evalúa el uso de la planta de *Brassica napus* var. *oleífera* para la descontaminación de un suelo, presentó la concentración de TPHs de $10.112,72 \pm 159,75$ mg/Kg de suelo al final del periodo de ensayo. Según el análisis estadístico realizado dicho tratamiento no presentó diferencias significativas con respecto al tiempo inicial y por tanto con respecto al resto de tratamientos. Por otro lado, el suelo contenido en los microcosmos sPM, donde se evalúa la acción de la planta junto con la combinación de microorganismos, presentó una concentración de TPHs totales de $8.790,9 \pm 777,5$ mg/Kg al final de periodo de ensayo. Según el análisis estadístico dicho tratamiento no presentó diferencias significativas con respecto tiempo inicial y por tanto con respecto a los demás tratamientos.

Análogamente se determinaron los n-alcenos de longitud intermedia con un número de átomos de carbono entre 10 y 20 ($C < 20$), en cada uno de los tratamientos, al inicio (0 días) y al final del periodo de ensayo (11 días), tal y como se indica en la Figura V.18.

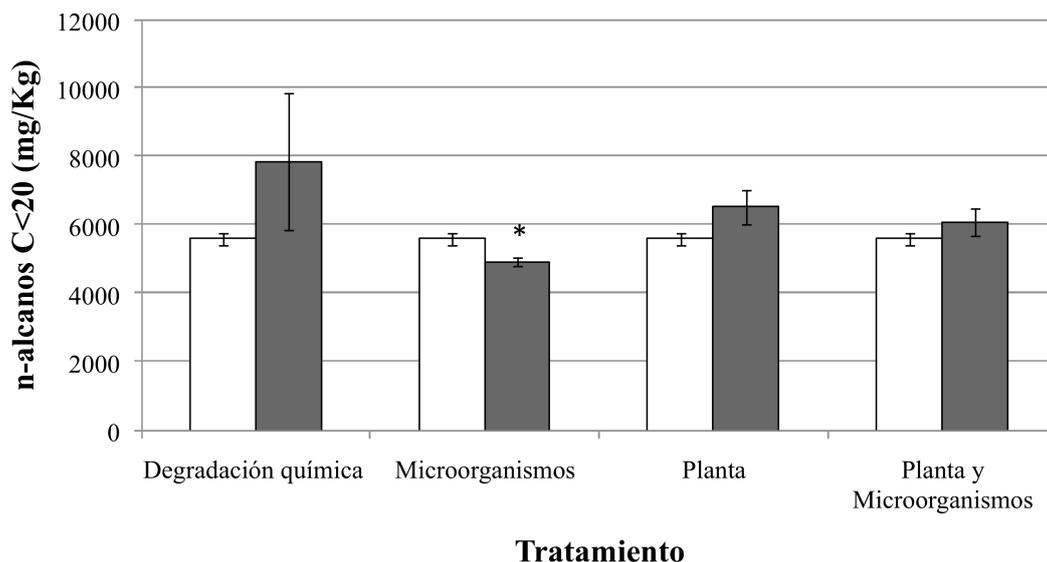


Figura V.18. Determinación de n-alcenos C<20 en cada uno de los tratamientos. En el eje de abscisas se representa cada uno de los tratamientos al inicio del periodo de ensayo (barra blanca) y al final del periodo (barra gris) y en el eje de ordenadas la cantidad de n-alcenos C<20 (mg/Kg de suelo). Se indica con asterisco (*) las diferencias significativas. Se incluye en forma de barras de error la desviación estándar a la media de tres experiencias.

Según los datos obtenidos la cantidad de n-alcenos C<20 presentes en el suelo al inicio del ensayo en cada uno de los microcosmos fue $5.581,5 \pm 177$ mg/Kg de suelo. De modo que, en el suelo contenido en los microcosmos sDQ (degradación química) se registró una concentración media de n-alcenos C<20 de $7.850,4 \pm 407,3$ mg/Kg de suelo, por lo que no presentó disminución significativa en el periodo que duró el ensayo. Por otro lado, en el suelo contenido en los microcosmos denominados sM (combinación de microorganismos) se registró una concentración media de n-alcenos C<20 de $4.922,25 \pm 124,6$ mg/Kg de suelo. Según el análisis estadístico dicho tratamiento presentó diferencias significativas, en cuanto a la concentración de n-alcenos C<20 detectados en el tiempo final con respecto al tiempo inicial y con respecto a los demás tratamientos. En el suelo contenido en los microcosmos donde se evaluó la acción de la planta sobre la descontaminación del suelo (sP) se detectaron una concentración de n-alcenos C<20 de $6.516,95 \pm 195,06$ mg/Kg de suelo, al final del periodo de ensayo. Dicho tratamiento no presentó disminución en la concentración de diesel. Por otra parte, en el suelo contenido en los microcosmos sPM (planta y combinado de microorganismos) se registraron $6.080,9 \pm 970,2$ mg/Kg de

suelo. Dicho tratamiento tampoco presentó disminución en cuanto a la concentración de n-alcanos $C < 20$ presentes en el diesel.

De igual modo, se determinaron los n-alcanos de cadena lineal larga con un número de átomos de carbono entre 20 y 40 ($C > 20$) en cada uno de los tratamientos, al inicio del ensayo y al final del periodo del mismo (11 días), tal y como se indica en la Figura V.19.

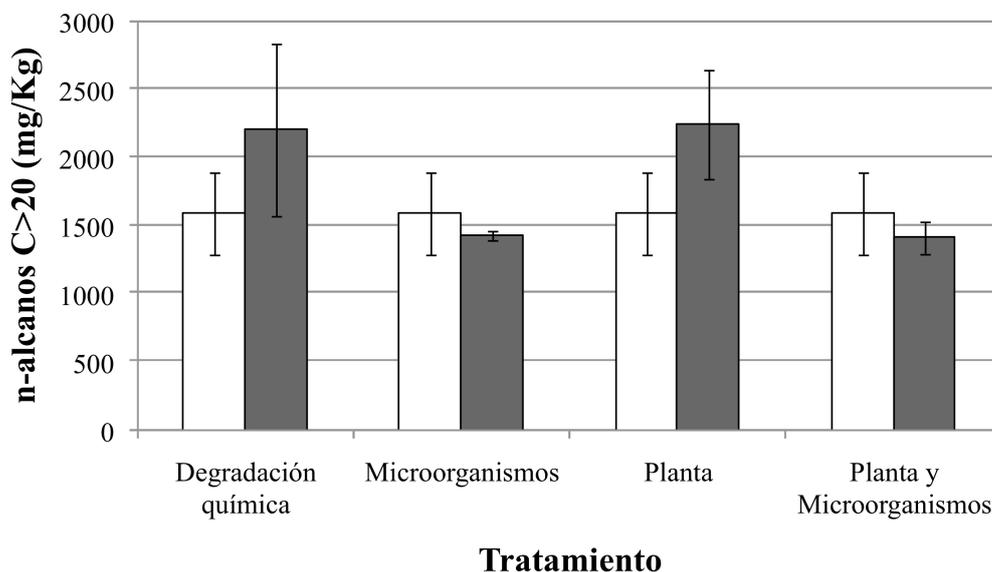


Figura V.19. Determinación de n-alcanos $C > 20$ en cada uno de los tratamientos. En el eje de abscisas se representa cada uno de los tratamientos, al inicio del periodo de ensayo (barra blanca) y al final del periodo (barra gris) y en el eje de ordenadas la cantidad de n-alcanos $C > 20$ (mg/Kg). Se indica con asterisco (*) las diferencias significativas. Se incluye en forma de barras de error la desviación estándar a la media de tres experiencias.

Se detectó una concentración media de n-alcanos $C > 20$ de $1.584,1 \pm 301,7$ mg/Kg de suelo, en cada uno de los tratamientos al inicio del ensayo. En el suelo contenido en los microcosmos sDQ (degradación química) se registró una concentración media de alcanos $C > 20$ de $2.198, \pm 632,06$ mg/Kg de suelo al final del periodo de ensayo (11 días). Dichos microcosmos no presentaron diferencias significativas con respecto al tiempo inicial ni con respecto a los demás tratamientos. Por otro lado, en el suelo contenido en los microcosmos denominados sM (combinación de microorganismos) se detectó una concentración media de n-alcanos $C > 20$ de $1.422,9 \pm 33,96$ mg/Kg de suelo al final del periodo de ensayo (11 días). Según el análisis estadístico dicho tratamiento no presentó diferencias significativas con respecto al tiempo inicial y por

tanto con respecto a los demás tratamientos. En el suelo contenido en los microcosmos sP (planta) se registró una concentración media de n-alcenos C>20 de $2.238,02 \pm 200,8$ mg/Kg de suelo al final del periodo de ensayo. Dicho tratamiento con plantas no presentó diferencias significativas con respecto al tiempo inicial ni con respecto a los demás tratamientos. Por otra parte, en el suelo donde se aplicó el tratamiento en el cual se combinan la planta (*Brassica napus* var. *oleifera*) y ambos microorganismos (*Microbacterium* sp. 3J1 y *Achromobacter* sp. F3.1) se detectó una concentración de n-alcenos C>20 de $1.406 \pm 118,8$ mg/Kg de suelo, al final del periodo de ensayo. Dicho tratamiento no presentó diferencias significativas con respecto al tiempo inicial ni tampoco con respecto a los demás tratamientos.

De manera análoga, se estimó la concentración de alcanos ramificados presentes en el suelo contaminado con diesel en cada uno de los microcosmos donde se evalúa la degradación química (sDQ), el bioaeramiento (sM), fitorremediación (sP) y rizorremediación (sPM), al comienzo del experimento y en el tiempo final (11 días), tal y como se indica en la Figura V.20.

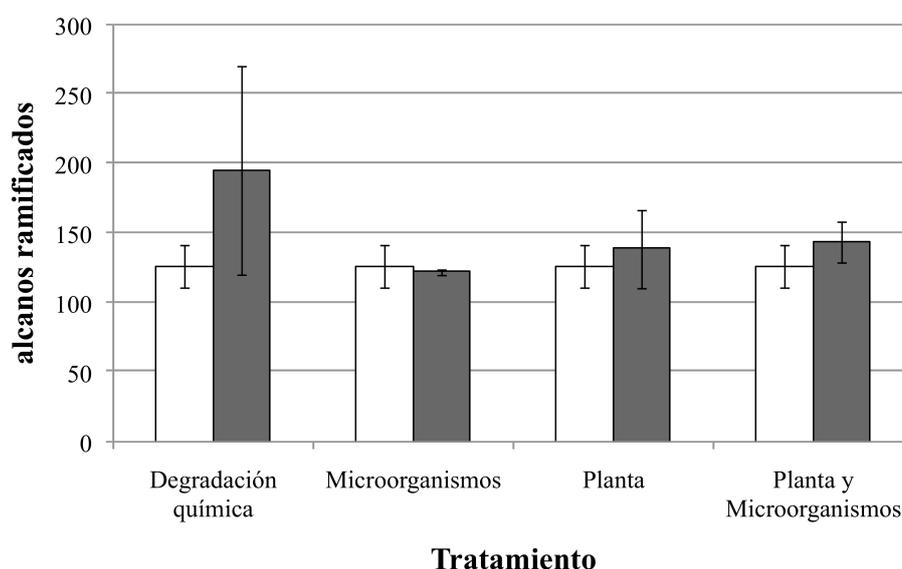


Figura V.20. Determinación de alcanos ramificados en cada uno de los tratamientos. En el eje de abscisas se representa cada uno de los tratamientos, al inicio del periodo de ensayo (barra blanca) y al final del periodo (barra gris) y en el eje de ordenadas la cantidad alcanos ramificados (mg/Kg de suelo). Se indica con asterisco (*) las diferencias significativas. Se incluye en forma de barras de error la desviación estándar a la media de tres experiencias.

Como se puede observar en la Figura V.20, la concentración de alcanos ramificados detectada en el suelo en cada uno de los microcosmos al inicio de experimento fue de $125,71 \pm 15,31$ mg/Kg de suelo. En el suelo contenido en los microcosmos donde se evalúa la degradación química (sDQ) se detectó una concentración media de alcanos ramificados de $194,7 \pm 23,25$ mg/Kg de suelo. Dichos microcosmos no presentaron diferencias significativas con respecto a los demás tratamientos. Por otra parte, en el suelo de los microcosmos donde se aplicó el tratamiento de bioaumentación (combinación de microorganismos) se detectaron $121,4 \pm 2$ mg/Kg de suelo. Según el tratamiento estadístico dicho tratamiento no presentó diferencias significativas con respecto al inicio del ensayo y por tanto con respecto a ningún tratamiento. En el suelo contenido en los microcosmos denominados sP, donde se evalúa la presencia de la planta en la descontaminación del suelo, se detectaron $138,1$ mg/Kg de suelo al final del periodo de ensayo (11 días). Por otro lado, en el suelo contenido en los microcosmos sPM, donde se evalúa la acción tanto del inoculante como de la planta, se registró una media de alcanos ramificados de $143,2 \pm 14,7$ mg/Kg de suelo. Dichos microcosmos no presentaron diferencias significativas con respecto al tiempo inicial ni con respecto a los demás tratamientos incluido los microcosmos control.

Por último, se determinó la presencia de algunos compuestos naftalenos presentes en el diesel en cada uno de los tratamientos al inicio y al final de periodo de ensayo, tal y como se indica en la Figura V.21.

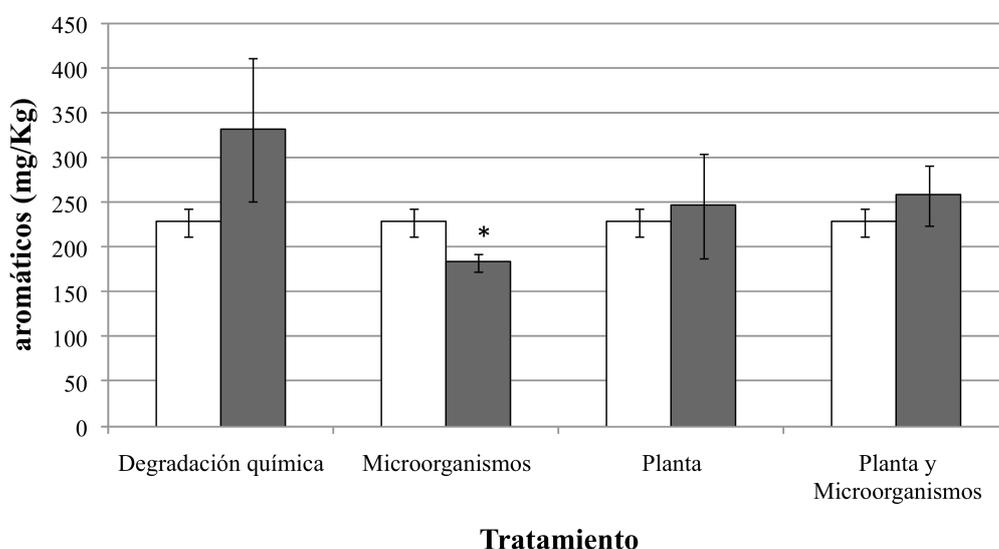


Figura V.21. Determinación de compuestos naftalenos en cada uno de los tratamientos. En el eje de abscisas se representa cada uno de los tratamientos, al inicio del periodo de ensayo (barra blanca) y al final del periodo (barra gris) y en el eje de ordenadas la cantidad alcanos ramificados (mg/Kg de

suelo). Se indica con asterisco (*) las diferencias significativas. Se incluye en forma de barras de error la desviación estándar a la media de tres experiencias.

Como se puede observar en la figura V.21, tras el análisis por cromatografía de las muestras se registró una concentración media de algunos compuestos naftalenos de $227,05 \pm 15,6$ mg/Kg de suelo al inicio del ensayo, en cada uno de los tratamientos. Por otra parte, en el suelo contenido en los microcosmos sDQ (degradación química) se registró una concentración media de compuestos naftalenos de $330,72 \pm 26,7$ mg/Kg de suelo, al final del periodo de ensayo (11 días). Sin embargo, en el suelo contenido en los microcosmos sM (combinación de microorganismos) se registró una concentración media de compuestos naftalenos de $182,2 \pm 9,8$ mg/Kg de suelo, a los 11 días de ensayo. Dichos microcosmos presentaron diferencias significativas con respecto al tiempo inicial y con respecto a los demás tratamientos. Por otro lado, en el suelo contenido en los microcosmos denominados sP (planta) se registró una concentración media de compuestos naftalenos de $245,5 \pm 58,3$ mg/Kg de suelo. Los microcosmos tratados con plantas no presentaron diferencias significativas con respecto al tiempo inicial, ni con respecto a los demás tratamientos. Por último, en el suelo contenido en los microcosmos donde se evaluó la acción de la planta y los microorganismos, se registró una concentración media de compuestos naftalenos de $257,2 \pm 33,5$ mg/Kg de suelo. Dicho tratamiento no presentó diferencias significativas con respecto al inicio del experimento ni con respecto a los demás tratamientos.

V.2.c.3.2 Determinación de hidrocarburos en el tallo, hoja y raíces

Al igual que en el suelo, la presencia de las fracciones de TPHs tanto en el tallo y hoja como en las raíces de la planta, se evaluó según la norma EPA 8015 mediante determinación gravimétrica. Para ello, se congelaron las muestras de planta de cada uno de los microcosmos donde se utilizó la planta de *Brassica napus* var. *oleífera*, es decir, los denominados como sP (planta) y sPM (planta y combinación microorganismos). Por un lado se realizó la extracción de TPHs del tallo y las hojas y por otro lado se realizó la extracción de TPHs de las raíces de las plantas. De modo que tras el congelado, se procedió tal y como se indica en el apartado M5.d.3.

Así pues se procedió al análisis de cada una de las muestras provenientes de los microcosmos sP (planta) y sPM (planta y combinación de microcosmos). Para ello primero analizamos la parte aérea de la planta, es decir, tallo y hojas (Figura V.22).

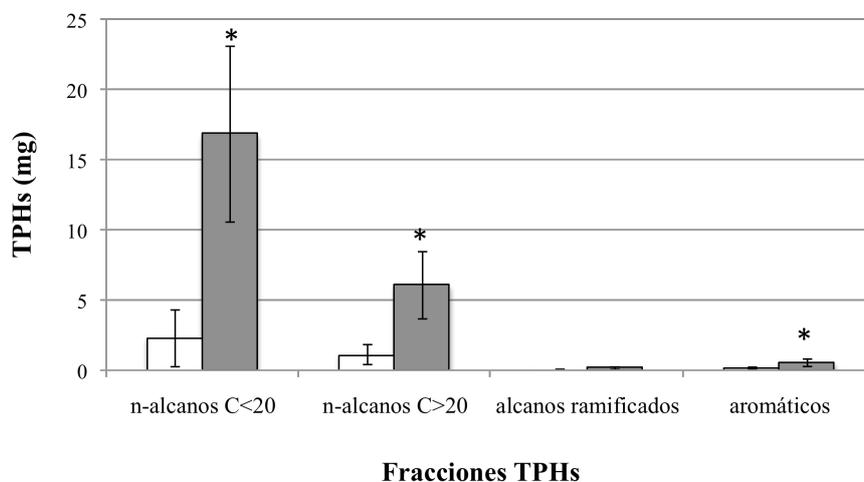


Figura V.22. Fracciones de TPHs presentes en los microcosmos sP y sPM. Se representan las fracciones de TPHs (n-alcanos C<20; n-alcanos C>20, alcanos ramificados y compuestos naftalenos) presentes en los microcosmos sP (barra blanca) y en los microcosmos sPM (barra gris), al final del periodo de ensayo (11 días). En el eje de abscisas se indica las fracciones de TPHs y en el eje de ordenadas la cantidad de TPHs (mg). Se indica con asterisco (*) las diferencias significativas. Se incluye en forma de barras de error la desviación estándar a la media de tres experiencias.

Los microcosmos sPM donde se evaluó la presencia de la planta y el combinado de microorganismos, presentaron diferencias significativas en todas las fracciones de TPHs, a excepción de los alcanos ramificados, con respecto a los microcosmos sP. En el tallo/hoja de las plantas presentes en los microcosmos donde se evaluó el potencial de la planta de *Brassica napus* var. *oleifera* (sP) se registró una cantidad media de n-alcanos C<20 de $2,27 \pm 2$ mg, al final del periodo de ensayo (11 días), sin embargo en el tallo/hojas de las plantas presentes en los microcosmos donde se evaluó el potencial de la planta junto con la combinación de los microorganismos *Microbacterium* sp. 3J1 y *Achromobacter* sp. F3.1 (sPM) se registró una cantidad media de n-alcanos C<20 de $16,81 \pm 6,3$ mg, al final del periodo de ensayo. Por otra parte, en el tallo/hojas de las plantas presentes en los microcosmos sP se registró una cantidad media de n-alcanos C>20 de $1,12 \pm 0,7$ mg, al final del periodo de ensayo, sin embargo en el tallo/hoja de las plantas presentes en los microcosmos sPM se registró una cantidad media de n-alcanos C>20 de $6,1 \pm 2,4$ mg al final de ensayo. En el tallo/hojas de las plantas presentes en los microcosmos sP se determinó $0,04 \pm 0,03$ mg de alcanos ramificados, sin embargo en las plantas

presentes en los microcosmos sPM se registró una media de $0,15 \pm 0,08$ mg. Por último, en el tallo/hojas de las plantas presentes en los microcosmos sP se detectó la cantidad de $0,15 \pm 0,07$ mg de compuestos naftalenos, al final del periodo de ensayo, sin embargo en el tallo/hojas de las plantas presentes en los microcosmos sPM se registró una cantidad media de $0,53 \pm 0,26$ mg, a los 11 días de ensayo.

El aspecto de las plantas inoculadas con la combinación de cepas, *Microbacterium* sp. 3J1 y *Achromobacter* sp. F3.1 fue diferente que el de las plantas no inoculadas, de modo que las hojas de las plantas inoculadas eran de menor tamaño y con coloración verde oleosa (Figura V.23). Sin embargo, las plantas de *Brassica napus* que no fueron inoculadas presentaron un mayor tamaño de hoja, cuya coloración fue verde menos intenso y sin aspecto oleoso.

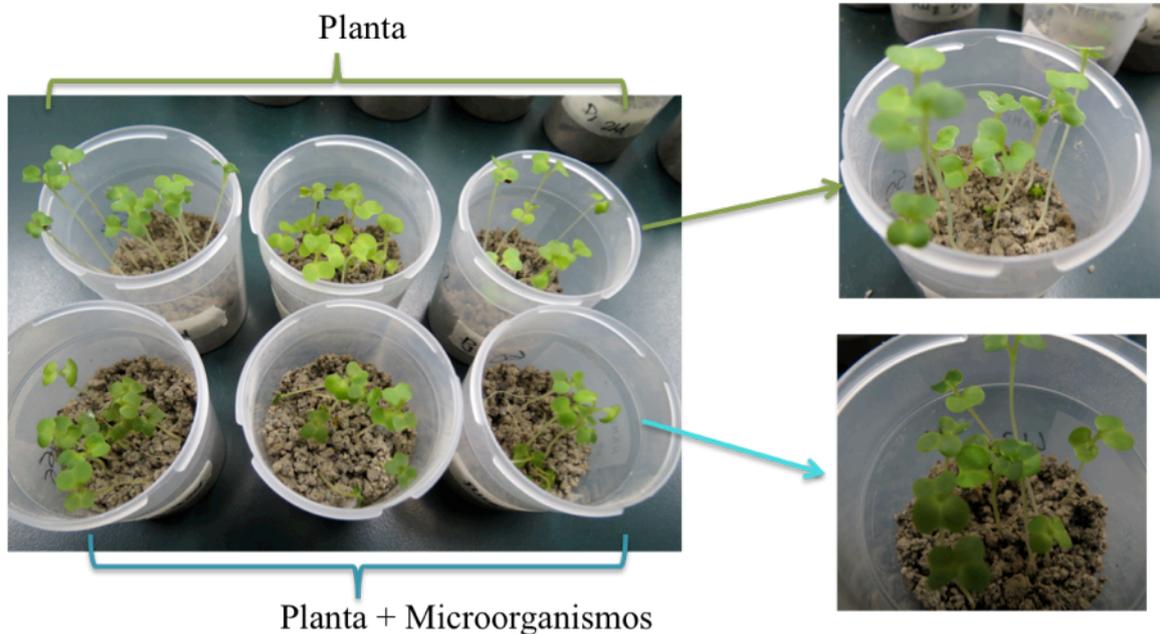


Figura V.23. Aspecto de las plantas a los 11 días de ensayo. Los 3 microcosmos de la parte superior de la imagen muestran el aspecto de las plantas sin inocular y los 3 de abajo muestran el aspecto de las plantas inoculadas.

De manera análoga se extrajo y determinó la cantidad de TPHs presentes en las raíces de el conjunto de plantas de cada microcosmos (sP y sPM). Según los datos obtenidos

del Centro de Instrumentación Científica (CIC), las raíces de las plantas de ambos tipos de microcosmos no presentaron ninguna cantidad de ninguna fracción de TPHs.

Discusión

La interacción planta-microorganismo (PGPR) está extensamente estudiada y aplicada para la mejora de la agricultura. El efecto beneficioso de las rizobacterias en las plantas ha sido estudiada durante más de tres décadas, desde el comienzo de los ensayos de Rovira y colaboradores (1974). Un campo prometedor es la explotación de dicha interacción en la remediación de suelos contaminados con hidrocarburos (Vilchez & Manzanera 2011; Khan et al. 2013). La aplicación de una combinación efectiva de planta y bacteria para la rizorremediación de hidrocarburos, depende en gran medida de la actividad metabólica de la planta asociada a la rizobacteria, la cual posee los genes requeridos para la degradación de los contaminantes hidrocarbonados. Las plantas son una fuente de carbono que estimula a la bacteria para degradar los contaminantes orgánicos. En cambio, la planta en su asociación con la rizobacteria mejora su respuesta ante los cambios ambientales adversos y por tanto aumenta su crecimiento y desarrollo, el desarrollo de las raíces implica una mejora en la estructura del suelo. Los microorganismos al tener el potencial de degradar los compuestos hidrocarbonados, mejoran la mineralización de los contaminantes y por tanto disminuyen la fitotoxicidad y evaporación de los compuestos volátiles (Khan et al. 2013). Hay una alta diversidad de bacterias degradadoras de hidrocarburos que poseen los genes implicados en la degradación de alcanos, como son el gen alcano monooxigenasa (*alkB*) y el gen citocromo P450 alcano hidroxilasa (CYP153). El factor de inhibición primaria son los considerados compuestos de bajo peso molecular, que debido a su carácter hidrofóbico limita la capacidad de la planta para absorber agua y nutrientes (Tesar 2002; Peng et al. 2009; Wyszowski & Ziolkowska 2009). El microorganismo en su interacción con la planta también puede mejorar la respuesta de la misma frente a condiciones estresantes generadas por la falta de agua.

Para comprobar la eficiencia en el proceso de degradación de la técnica de rizorremediación utilizamos un microorganismos DPPR como herramienta

biotecnológica para garantizar la supervivencia de la planta y otros microorganismos xerosensibles, a su vez seleccionados por presentar las características necesarias para la biodegradación de los compuestos contaminantes. Tal y como indicamos en el capítulo II, las cepas aisladas que presentaron la capacidad de tolerar la falta de agua, no crecieron en presencia de hidrocarburos como única fuente de carbono. Por ello propusimos la combinación de dos microorganismos, uno de ellos tolerante a la desecación y con la capacidad para proteger a microorganismos xerosensibles (capítulo III) y a plantas (capítulo IV) y el otro sensible a la falta de agua pero con capacidad para crecer en presencia de hidrocarburos. Por tanto, seleccionamos a la cepa xerotolerante *Microbacterium* sp. 3J1 y la cepa xerosensible *Achromobacter* sp. F3.1.

Previo al ensayo se realizó un estudio del crecimiento de cada una de las cepas en un suelo contaminado con diesel, en condiciones óptimas de humedad, para ello se procedió a la preparación de microcosmos con suelo franco-arenoso y se inocularon con las cepa *Microbacterium* sp. 3J1 y *Achromobacter* sp. F3.1, por separado. De modo que la cepa *Microbacterium* sp. 3J1 toleró la presencia de diesel en un suelo franco-arenoso en condiciones óptimas de humedad, durante 22 días. Según Narváez y colaboradores (2010) la cepa *Microbacterium* sp. 3J1 presenta la capacidad para tolerar la falta de agua (comprobado en este trabajo), además según Vilchez y colaboradores (en preparación) dicha cepa promovió el crecimiento de plantas frente a condiciones de estrés por falta de agua, por lo que se clasificó como PGPR/DPPR (comprobado en este trabajo). Hay estudios de cepas pertenecientes al género *Microbacterium* caracterizadas como promotoras del crecimiento en plantas y productoras de ácido indolacético (IAA) (Karlidag et al. 2007; Egamberdieva 2008; Sheng et al. 2009). La cepa *Microbacterium* sp. F10a aislada por Sheng y colaboradores, además de promocionar el crecimiento en plantas (PGPR) presentó la capacidad para degradar compuestos aromáticos policíclicos (fenantreno y pireno).

Sin embargo, la cepa *Achromobacter* sp. F3.1 presentó mayor viabilidad celular en un suelo franco-arenoso contaminado con diesel que en un suelo sin contaminar, en condiciones óptimas de humedad. Hay estudios de cepas pertenecientes al género *Achromobacter*, descritas como degradadoras de n-alcanos de cadena intermedia (Ciric et al. 2010; Tanase et al. 2013). Dichas cepas pertenecen a la especie *Achromobacter xylosoxidans*, con la que la cepa objeto de estudio *Achromobacter* sp.

F3.1 comparte el más alto porcentaje de similaridad en base al gen ARNr 16S. Por otro lado, Kaczorek y colaboradores (2013) aislaron de un suelo contaminado con diesel una cepa perteneciente a dicho género con resultados significantes en cuanto a la degradación del diesel. También se ha caracterizado una cepa perteneciente a la especie bacteriana *A. xylosoxidans* como rizobacteria promotora del crecimiento en la planta de la *Brassica napus*, dichas plantas inoculadas con la cepa aumentaron considerablemente el peso seco del tallo y las raíces, además aumentó el consumo de NO_3^- por parte de todo el sistema radical (Bertrand et al. 2000).

Para la realización del ensayo se seleccionó la planta de la canola (*Brassica napus* var. oleífera), debido a su capacidad para germinar en un suelo contaminado con diesel (Adam & Duncan 2000), comprobado en nuestro estudio con resultados similares. Además dicha planta creció en un suelo franco-arenoso contaminado con diesel durante un tiempo prolongado. También hay estudios donde analizan el crecimiento de la planta de la canola (*Brassica napus*) en presencia de una bacteria PGPR, para biorremediar suelos contaminados por hidrocarburos aromáticos policíclicos (Reed & Glick 2005).

Para comprobar si la combinación de las bacterias, *Microbacterium* sp. 3J1 y *Achromobacter* sp. F3.1, junto con la planta de la canola (*Brassica napus*) mejora y acelera el proceso de degradación en un ambiente sometido a condiciones de estrés por falta de agua, elaboramos microcosmos con suelo franco-arenoso contaminados con diesel. Con ello analizamos la acción en el proceso de degradación de ambos microorganismos y la planta en combinación y por separado, mediante el estudio algunos parámetros biológicos y químicos.

El aspecto de las plantas en los microcosmos donde se evaluó la acción de ésta (sP) en la degradación del diesel, fue saludable durante todo el periodo, ya que las hojas con de color verdoso aumentaron de tamaño conforme pasaban los días. La longitud del tallo aumentó a lo largo del ensayo, en valores absolutos. Aún así, la longitud de las raíces se mantuvo más o menos igual durante el ensayo. Sin embargo, el aspecto de las plantas presentes en los microcosmos donde se evaluó la acción de la planta junto con la combinación de microorganismos (sPM) fue diferente, ya que conforme pasaron los días la hoja no crecían en tamaño y se tornaron a un color verde intenso y de aspecto oleoso. Dicho aspecto nos llevó a pensar que la planta bioacumuló una

mayor cantidad de hidrocarburos en su parte aérea (hoja/tallo), que las presentes en los microcosmos sin inocular (comprobado después mediante cromatografía de gases masa). Además dicha bioacumulación provocó un menor crecimiento del tallo y la raíz, sobretudo al final del periodo de ensayo. Debido muy probablemente a la acción de las bacterias (*Microbacterium* sp. 3J1 y *Achromobacter* sp. F3.1), que pudieron hacer más accesible la incorporación de compuestos hidrocarbonados parcialmente degradados por éstas.

Según el ensayo en microcosmos, tanto las plantas inoculadas (sPM) como las no inoculadas (sP) soportaron las condiciones de estrés hídrico en un suelo contaminado con diesel, a lo largo del periodo de ensayo (11 días). Estudios como los de Gunasekera y colaboradores (2006) muestran la adaptabilidad de la planta de la canola (*Brassica napus*) y la mostaza (*Brassica juncea*) en un ambiente tipo mediterráneo, donde hay periodos de escasez de lluvias y altas temperaturas. En dichas condiciones ambos tipos de planta pertenecientes al género *Brassica* son capaces de adaptarse a las condiciones de estrés por falta de agua y producir semillas con un buen rendimiento, aún así la planta de la mostaza está mejor adaptada a las condiciones asociadas a la escasez de agua y altas temperaturas, que la planta de la canola. Las plantas presentes en los microcosmos crecieron a lo largo del periodo de ensayo. Según Qaderi y colaboradores (2006), las altas temperaturas y condiciones de sequía provocan en la planta de la canola una mayor producción de Chl *a* y Chl *b* en comparación con las plantas expuestas a bajas temperaturas. Por otra parte, las plantas sometidas a estrés hídrico presentan hojas más pequeñas y tallos más finos y cortos, que las plantas incubadas en condiciones óptimas de humedad (Gunasekera et al. 2006).

En los microcosmos (sPM) donde se comprueba la acción de la planta y de la combinación de microorganismos, se analizó la viabilidad de las células bacterianas de *Microbacterium* sp. 3J1 y *Achromobacter* sp. F3.1, tanto en el suelo como en las raíces de las plantas. De modo que, tras dicho análisis se observó que las cepas estuvieron presentes a lo largo de los 11 días de ensayo. Sin presentar diferencias estadísticas entre ellas en cada punto de muestreo. Por lo que probablemente la cepa *Microbacterium* sp. 3J1 protegió a la cepa *Achromobacter* sp. F3.1 de las condiciones de falta de agua. Sin embargo, la presencia de la cepa *Microbacterium* sp. 3J1 en las raíces de las plantas fue casi nula hasta los 7 días y a los 11 no se determinó su

presencia, probablemente debido a que en el homogenizado de las raíces no fue suficiente la rotura de la raíz para extraer a la cepa ya que ésta es endofítica (Santacruz et al. no publicado) o que dicha no presentara la capacidad para colonizar la raíz de la planta de la canola, aunque según ensayos llevados a cabo en nuestro grupo la cepa presentó poder de colonización en una amplia gamas de plantas como el tomate, pimiento, colza, rábano, trébol y otras (Vílchez et al. en preparación).

Por otro lado, analizamos el crecimiento de las cepas objeto de estudio en los microcosmos donde ambas se combinan (sM). En este caso, la cepa *Microbacterium* sp. 3J1 presentó una mayor supervivencia significativa que la de la cepa *Achromobacter* sp. F3.1 a los 7 y 11 días. Ambas cepas sobrevivieron a lo largo del periodo de ensayo en un suelo contaminado con diesel y expuesto a condiciones de estrés por falta de agua. Según los resultados, la cepa *Achromobacter* sp. F3.1 creció mejor en el suelo, en presencia de la planta (sPM) que en ausencia de ésta (sM).

En referencia a la degradación que se produjo en cada uno de los microcosmos, en el microcosmos donde se evaluó la degradación química (sDQ) no se produjo disminución de los TPHs presentes en el suelo, ni de sus fracciones, a lo largo del periodo de ensayo. Sin embargo, en los microcosmos donde se combinan ambos microorganismos (sM) se determinó una disminución significativa de TPHs, debido muy probablemente a la acción de ambas cepas. Cuando se determinaron las fracciones de TPHs (alcanos lineales C<20 y C>40, alcanos ramificados y naftalenos), se observó que el suelo contenido en dichos microcosmos presentó una disminución significativa de los alcanos lineales C<20 y determinados compuestos naftalenos. Debido muy probablemente a la acción de la cepa *Achromobacter* sp. F3.1, ya que como indicamos anteriormente existen cepas pertenecientes a dicho género capaces de degradar los compuestos alcanos de cadena intermedia. Así como también debido probablemente a la acción de la cepa *Microbacterium* sp. 3J1, ya que según Manzanera y colaboradores (no publicado), dicha cepa presentó en su genoma genes con homología a los implicados en el ciclo de degradación de compuestos naftalenos.

Por otra parte, los microcosmos donde se evalúa la acción de planta (sP) no presentó disminuciones significativas de TPHs al final del periodo de ensayo, ni por tanto en ninguna de sus fracciones, al igual que le ocurrió al suelo contenido en los

microcosmos donde se evaluó la presencia de la planta junto con ambos microorganismos.

Para comprobar si el aspecto oleoso de las hojas de la planta se debía a una mayor acumulación de los compuestos hidrocarbonados en su interior, se determinó el contenido de dichos compuestos en la hoja/tallo de los microcosmos donde la planta estaba presente. Según los ensayos, las plantas inoculadas (sPM) presentaron una mayor cantidad significativa de hidrocarburos en su interior, que las plantas sin inocular. Dicha acumulación provocó que las plantas presentaran menor capacidad para sobrevivir a las condiciones de estrés hídrico ya que probablemente la acumulación provocó una disminución de la fotosíntesis y por tanto una disminución en la capacidad de crecimiento de las mismas.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, así como la bibliografía consultada, concluimos que:

- En base a los estudios de hibridación ADN-ADN de la cepa 4J27 con la cepa tipo *A. phenanthrenivorans* DSM 18606^T y los realizados con las cepas, *A. oxydans* DMS20119^T y *A. polychromogenes* DSM 20136^T, proponemos a ésta como una nueva especie dentro del género *Arthrobacter*, que denominaremos como *Arthrobacter siccitolerans* 4J27^T (sic.ci.to'le.rans. L. adj. siccus, dry, L. part. adj. tolerans, tolerating; N.L. part. adj. siccitolerans, dry-tolerating).
- El empleo del cloroformo como agente selectivo no es necesario en un ambiente sometido a condiciones de sequía prolongadas en el tiempo, ya que dicho disolvente disminuye la diversidad de microorganismos tolerantes a la desecación.
- La cepa sensible a la desecación *Pseudomonas putida* KT2440 aumenta su tolerancia a la falta de agua, en presencia de la cepa tolerante a la desecación *Microbacterium* sp. 3J1, en un suelo sometido a condiciones de estrés hídrico.
- Las cepas *Micrococcus* sp. 56FL1 y *Micrococcus* sp. 56PL3 protegen a la planta del pimiento frente a condiciones de estrés por falta de agua. Y ambas promueven el crecimiento de dicha planta en condiciones óptimas de humedad.

CONCLUSIONES

- La combinación de las cepas *Microbacterium* sp. 3J1 y *Achromobacter* sp. F3.1 mejoran el proceso de degradación de TPHs, en un suelo sometido a condiciones de estrés hídrico.
- La planta de la canola (*Brassica napus* var. oleífera) acumula mayor cantidad de diesel cuando es inoculada con la combinación de cepas *Microbacterium* sp. 3J1 y *Achromobacter* sp. F3.1.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

M1 MEDIOS DE CULTIVO

La composición de los medios de cultivo utilizados durante el desarrollo del trabajo se detalla a continuación. Todos ellos se esterilizaron en autoclave por calor húmedo a 121°C durante 30 minutos y 1 atmósfera de presión, o por filtración usando filtros de 0,22 μm de diámetro de poro.

M1.a Medios enriquecidos

Como medio enriquecido habitual de crecimiento de las cepas bacterianas se utilizaron *Tryptone soya agar* (TSA) como medio sólido y *Tryptone soya broth* (TSB) como medio líquido, ambos del laboratorio OXOID. La composición de TSA fue: triptona, 15 g; peptona de soja, 5 g; cloruro sódico, 5 g; agar, 15 g y H₂O hasta 1 litro.

La composición del medio líquido TSB fue: digerido pancreático de caseína, 17 g; digerido papaíco de harina de soja, 3 g; fosfato potásico di-básico, 2,5 g; cloruro sódico, 5 g; glucosa, 2,5 g y H₂O hasta 1 litro.

Como medio líquido para la caracterización de las cepas bacterianas se utilizó *Luria Bertani* (LB). La composición de este medio fue: bacto-triptona, 10 g; NaCl, 10 g; extracto de levadura, 5 g y H₂O hasta 1 litro.

M1.b Medios mínimos

Para el cultivo de las células en medio mínimo se utilizó una modificación del medio M9, cuya composición fue la siguiente: solución 10xM9, 100 ml; solución A9 (“goodies”), 2,5 ml; MgSO₄ 1 M, 1 ml; citrato férrico amónico 6‰ (p/v), 1 ml y H₂O hasta 1 litro (Abril *et al.*, 1991). Las soluciones utilizadas en este medio se prepararon y esterilizaron en el autoclave por separado.

La composición del 10xM9 fue: Na₂HPO₄ x 7H₂O, 70 g; KH₂PO₄, 30 g; NH₄Cl, 10 g; NaCl, 5 g; y H₂O hasta 1 litro.

La solución de A9 (“goodies”) se compuso de: HBO₃, 300 mg; ZnCl₂, 50 mg; MnCl₂ x 4H₂O, 30 mg; CoCl₂, 200 mg; CuCl₂ x 2H₂O, 10 mg; NiCl₂ x 6H₂O, 20 mg; NaMoO₄ x 2H₂O, 30 mg y H₂O hasta 1 litro.

También se utilizó solución salina disolviendo 9 g de NaCl en 1 L de agua destilada, para resuspender las muestras de suelo.

Como fuente de carbono para el medio mínimo se utilizaron cuatro hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), naftaleno, antraceno, fenantreno y pireno, además de diesel, cada uno por separado. Para la preparación de medio mínimo sólido se añadió agar a una concentración de 2,5% (p/v). El agar se esterilizó previamente mediante autoclave en soluciones en H₂O.

M1.c Condiciones del cultivo

Todas las cepas se cultivaron a una temperatura de 30°C y a 150 rpm en un agitador, excepto cuando se indique lo contrario en el texto.

M2 CEPAS BACTERIANAS

Las estirpes bacterianas utilizadas en este trabajo, junto con sus fenotipos más relevantes se recogen en la Tabla M1.

Tabla M1. Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo.

ESPECIE	FENOTIPO	Fuente o referencia
<i>Arthrobacter</i> sp. 5J12A	Tolerante a la sequía	(Narváez-Reinálido et al. 2010)
<i>Arthrobacter koreensis</i> 16760 ^T	Aislado del suelo	(Lee et al. 2003)
<i>Arthrobacter luteolus</i> 13067 ^T	Aislado de sangre	(Wauters et al. 2000)
<i>Arthrobacter</i> sp. 4J27	Tolerante a la sequía	(Narváez-Reinálido et al. 2010)
<i>Arthrobacter phenantrenivorans</i> 18606 ^T	Aislado del suelo	(Kallimanis et al. 2009)
<i>Arthrobacter oxydans</i> 20119 ^T	Aislado del tabaco	(Sgueros 1954)
<i>Arthrobacter polychromogenes</i> 20136 ^T	Productor indigoidina (pigmento soluble)	(Schippers-lammertse et al. 1963)
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> PADD68	Resistente a la desecación	(Manzanera et al. 2002)
<i>Microbacterium</i> sp. 3J1	Resistente a la desecación	(Narváez-Reinálido et al. 2010)
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	Sensible a la desecación	(Franklin et al. 1981)
<i>Pseudomonas putida</i> MAX40	Sensible a la desecación. Rifampicina y tetraciclina resistente	(Manzanera et al. 2004)
<i>Escherichia coli</i> (HB101)	Cloramfenicol resistente. Motil	(Winson et al. 1998)

M3 CRECIMIENTO DE LAS CEPAS A DISTINTAS CONDICIONES

M3.1 Caracterización de la temperatura máxima tolerada y mínima inhibitoria

Para caracterizar la temperatura máxima, por encima de la cual no se produce un crecimiento aparente de las cepas objeto de estudio, se procedió a inocular las cepas en 5 ml de medio TSB, incubando el cultivo a una temperatura de 30°C y una agitación de 150 rpm durante 12 horas, hasta alcanzar la fase estacionaria, tras lo cual cada inóculo se diluyeron a una Abs_{600nm} inicial de 0,05 en 5 matraces con 30 ml de medio LB. Una vez realizada esta dilución cada cultivo se incubó a 30, 35, 40, 45 y 50°C en las mismas condiciones de agitación. A continuación se registró la absorbancia, a una longitud de onda de 600 nm a las 6, 12, y 24 horas de incubación.

Análogamente, para identificar la temperatura mínima aproximada, por debajo de la cual no se registró aumento aparente de la absorbancia, se procedió a la realización del ensayo en las mismas condiciones citadas arriba, pero incubando los matraces a las temperaturas de 5, 10, 15 y 20°C.

M3.2 Caracterización del pH máximo tolerado y mínimo inhibitorio

Para caracterizar el pH máximo, por encima del cual no se produce un crecimiento aparente de las cepas objeto de estudio, se procedió a inocular las cepas en 5 ml de medio TSB a una temperatura de 30°C y una agitación de 150 rpm durante 12 horas, para que así alcanzaran la fase estacionaria, tras lo cual se diluyeron a la Abs_{600nm} inicial de 0,05 en 30 ml de medio LB, cuyo pH se había ajustado previamente a 9, 12 y 13. Una vez alcanzada esta dilución, los 3 matraces se incubaron en las mismas condiciones de temperatura y agitación, es decir, a una temperatura de 30°C y una agitación de 150 rpm. A continuación se tomaron medidas de absorbancia (600 nm) a las 6, 12 y 24 horas de incubación.

Para identificar el pH mínimo inhibitorio aproximado al cual no se produce un crecimiento aparente de las cepas objeto de estudio, se procedió de manera análoga a la anteriormente descrita pero el pH del medio LB se ajustó previamente a 3, 5 y 7. Una vez alcanzada esta dilución cada cultivo se incubó en las mismas condiciones de temperatura y agitación. A continuación se tomaron medidas de absorbancia a la

longitud de onda de 600 nm a las 6, 12 y 24 horas de incubación.

M3.3 Caracterización de la concentración de NaCl máxima tolerada y mínima inhibitoria

Para caracterizar la concentración de NaCl por encima de la cual no se produce un crecimiento aparente de las cepas objeto de estudio, se procedió a inocular las cepas en 5 ml de medio TSB a una temperatura de 30°C y una agitación de 150 rpm durante 12 horas, para que alcanzara la saturación celular en el cultivo, tras lo cual los mismos se diluyeron a la Abs_{600nm} inicial de 0,05 en 30 ml de medio LB, a las concentraciones de NaCl de 0,6; 0,8; 1; 1,2; 1,6 M. Una vez alcanzada esta dilución, cada uno de los cultivos se incubaron en las mismas condiciones de temperatura y agitación, es decir a una temperatura de 30°C y una agitación de 150 rpm. A continuación se tomaron medidas de la absorbancia a la longitud de onda de 600 nm a las 6, 12 y 24 horas de incubación.

Para identificar la concentración de NaCl mínima aproximada, a la cual se produjo un crecimiento aparente de las cepas objeto de estudio, se procedió a inocular a ésta en medio TSB a una temperatura de 30°C y una agitación de 150 rpm durante 12 horas, para que así los cultivos alcanzasen la saturación celular, tras lo cual se diluyeron a una Abs_{600nm} inicial de 0,05 en medio LB, a la concentración de NaCl de 0; 0,2; 0,4 M. Una vez alcanzada esta dilución cada cultivo se incubó en las mismas condiciones de temperatura y agitación. A continuación se tomaron medidas de absorbancia a una longitud de onda de 600 nm a las 6, 12 y 24 horas de incubación.

M4 AISLAMIENTO DE CÉLULAS BACTERIANAS TOLERANTES A LA DESECACIÓN Y POTENCIALMENTE DEGRADADORAS

M4.a Recogida de muestras

Para realizar los aislamientos se tomaron muestras de suelo seco de la rizosfera de la gayomba, retama de olor (*Spartium junceum*), cercanos a la circunvalación, procedentes de Granada (37°9,48.39'' Latitud N y 3°36'33.19'' Longitud O), no expuesto a lluvia, ni riego, por un periodo superior a tres meses. También se tomaron muestras de una planta piloto, contaminada con 20.000 ppm de diesel y sometida a

diferentes tratamientos de bioestimulación mediante la adición de fertilizantes y surfactantes (Silva-Castro et al. 2013). Dicha planta piloto, consistió en un contenedor de polietileno con un volumen de 1 m³, 1,5 m de largo; 1,5 m de ancho y 1 m de alto, y se mantuvo en ausencia de riego durante aproximadamente 2 años.

M4.b Tratamiento de muestras de suelo mediante el método del cloroformo

Para el aislamiento de cepas bacterianas resistentes al tratamiento con cloroformo, se tomaron muestras de suelo secas que fueron homogenizadas para obtener un grano de tierra fino que garantizará su contacto con el cloroformo (Narváez-Reinálido et al. 2010). Se depositó 1 g de muestra en un vial al que se le añadió 3 ml de cloroformo puro. Paralelamente y por cada uno de estos viales sometidos a tratamientos se utilizó 1 vial no tratado con cloroformo y que sirvió como control para realizar el recuento de bacterias cultivables totales. Tras la adición del cloroformo se incubaron a temperatura ambiente durante 60 minutos con agitación esporádica para maximizar el contacto de la muestra con el disolvente (Figura M.1). Para eliminar el cloroformo de las muestras una vez transcurrido el tiempo de contacto, estas fueron depositadas en una placa Petri de vidrio estéril sin tapadera hasta completar la evaporación del cloroformo, en una campana de extracción de gases. Una vez libre de cloroformo se tomó el gramo de suelo de la muestra sin tratar y se resuspendieron en 10 ml de solución salina 1xM9. Tras lo cual se realizaron diluciones seriadas de cada una de las muestras (tratada y no tratada con cloroformo) en placas de TSA y se incubaron durante 24/48 horas en una estufa a una temperatura de 30°C. Trascendido dicho tiempo se cuantificó el número de unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro de muestra. Por otra parte, de la muestra tratada con cloroformo se dividieron 200 mg entre 4 matraces con 30 ml de medio mínimo M9 adicionado con cada uno de los HAPs (naftaleno, antraceno, fenantreno y pireno) y otros 200 mg se utilizaron para el recuento de xerotolerantes cultivables (XC).

De los matraces antes mencionados se realizaron 3 traspasos de 1 ml a nuevos medio mínimos con cada uno de los HAPs a una concentración final del 1% (p/v), cada 4 días. Tras ello se traspasó un 1 ml de cada uno de los 4 matraces a otros 4 matraces con medio mínimo modificado. De modo que se substituyó la fuente de Nitrógeno del medio M9 por ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), a una concentración

final de 3mM y se le denominó medio mínimo M8. Además el medio mínimo M8 contenía cada uno de los HAPs antes mencionados. Se realizaron un total de 2 traspasos en el medio M8 con HAP, cada 4 días. Tras lo cual se realizó el recuento y los aislamientos de colonias.

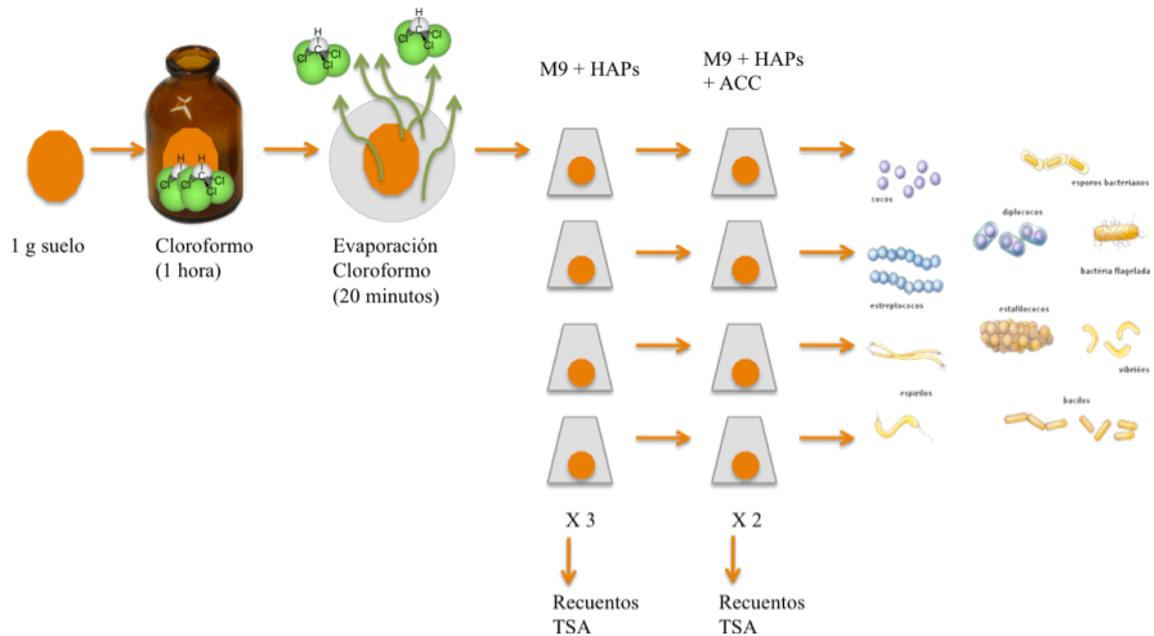


Figura M1. Esquema del tratamiento de muestras con el método del cloroformo modificado.

Para el aislamiento de microorganismos de muestras de la rizosfera de la planta de la gayomba, así como de una planta piloto, tolerantes a la sequía y potencialmente degradadores, se resuspendió 1 g de suelo sometido al tratamiento con cloroformo en matraces con 30 ml de medio mínimo, suplementado con hidrocarburos, al 1% (p/v), es decir, naftaleno, antraceno, fenantreno, pireno, y diesel, como única fuente de carbono.

M4.c Ensayo de esporulación

Para identificar las cepas que producían esporas realizamos un ensayo basado en la diferente sensibilidad de las células vegetativas con respecto a las esporas al tratamiento con calor, en base al método descrito por Vílchez y colaboradores (Vílchez et al. 2008). De esta forma se tomaron colonias independientes procedentes

de placas de TSA de al menos una semana de antigüedad. Estas colonias se resuspendieron en 1 ml de solución 1xM9 en microtubos estériles de 1,5 ml. Seguidamente se sembraron 10 μ l de esta suspensión en TSA. A continuación se incubó el resto de la suspensión en un termobloque Mixing Block MB-102 a 72°C durante 30 minutos. Nuevamente se tomaron 10 μ l de cada muestra y se sembraron en placa de TSA. Aquellas cepas con capacidad para tolerar el tratamiento con calor se consideraron como esporulantes, mientras que aquellas que no toleraron el tratamiento por calor se consideraron no esporulantes.

M4.d Ensayo de tolerancia a la desecación

Para calcular la tolerancia a la desecación se partió de colonias aisladas procedentes de placas de TSA de 48 horas de crecimiento. Utilizando un asa estéril se tomó una única colonia que se resuspendió en 1 ml de solución 1xM9 estéril. Partiendo de esta suspensión celular se realizaron diluciones seriadas, que se sembraron en placas de TSA con objeto de identificar el número de UFC/ml de partida. Por otra parte, se tomaron 100 μ l de cada suspensión y se depositaron en gotas de 5-10 μ l sobre microplacas de petri estériles sin medio. Las microplacas se situaron bajo una corriente de aire estéril en una campana de flujo laminar marca Telstar modelo Biostar, durante 24 horas. Las placas quedaron secas tras 2-3 horas de incubación. Trascorridas 24 horas de incubación se resuspendieron en 1 ml de solución 1xM9 estéril. Partiendo de esta solución se realizaron diluciones seriadas que se sembraron en placas de TSA. Del recuento de UFC/ml de esta segunda siembra se calcularon las proporciones de supervivencia en referencia al número de UFC/ml antes del proceso de secado. Estos ensayos se realizaron por triplicado. Los resultados se expresaron como la media de los tres ensayos, en porcentaje, tomando como referencia del 100% los datos húmedos.

Para la realización del ensayo con cepas marcadas con antibióticos, procedimos a la realización del ensayo partiendo de colonias aisladas procedentes de placas de TSA con el antibiótico al que es resistente la cepa objeto, de estudio de 48 h de crecimiento. Utilizando un asa estéril se tomó una única colonia que se resuspendió en 1 ml de solución 1xM9 estéril. Partiendo de esta suspensión celular se realizaron diluciones seriadas que se sembraron en placas de TSA con el antibiótico al que es

resistente la cepa en estudio, con objeto de identificar el número de UFC/ml de partida. Por otra parte se tomaron 100 µl de cada suspensión y se depositaron en gotas de 5-10 µl sobre microplacas de petri estériles sin medio. Las microplacas se situaron bajo una corriente de aire estéril en una campana de flujo laminar, las cuales quedaron secas tras 2-3 horas de incubación. Trascorridas 24 horas de incubación se resuspendieron en 1 ml de solución 1xM9 estéril. Partiendo de esta solución se realizaron diluciones seriadas que se sembraron en placas de TSA con el antibiótico correspondiente. Del recuento de UFC/ml de esta segunda siembra se calcularon las proporciones de supervivencia en referencia al primer conteo. Estos ensayos se realizaron por triplicado. Los resultados se expresaron como la media de los tres ensayos en porcentaje, tomando como referencia del 100% los datos obtenidos en humedad.

Cuando el ensayo se realizó con dos cepas de forma conjunta, previo a la combinación de ambas colonias se procedió al lavado de cada una de ellas para eliminar restos de antibiótico, para lo cual se resuspendió una colonia de cada una de las cepas por separado en 1 ml de solución 1xM9 estéril. Las suspensiones bacterianas se centrifugaron a 14.000 rpm durante 1 minuto, transcurrido dicho tiempo se retiró el sobrenadante. Tras ello se procedió a la realización del ensayo de tolerancia a la desecación de forma análoga al descrito anteriormente, pero se suspendieron ambas biomasas celulares de cada una de las cepas, en un único microtubo con 1 ml de 1xM9 estéril. De dicha suspensión celular se realizaron diluciones seriadas que se sembraron en placas de TSA con el antibiótico al que es resistente cada cepa. A partir de aquí se procedió de igual forma a la explicada al principio del apartado.

M4.e Conservación de las cepas bacterianas

La conservación de las cepas a corto plazo se hizo en cultivos en estrías en placas de medios enriquecidos a 4°C. Para la conservación a largo plazo se realizaron dos copias de cultivos en 40% (v/v) de glicerol por la cepa, quedando cada una de las copias en congeladores a -20°C y -80°C.

M5. ENSAYOS DE CRECIMIENTO EN PRESENCIA DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS

M5.a Crecimiento de las cepas en medio líquido

Para comprobar que cepas de las aisladas eran capaces de crecer en presencia de los hidrocarburos de los que se han aislado, se partió de un preinóculo de la cepas objeto de estudio, incubado durante 16-20 horas a una temperatura de 30°C, en medio enriquecido TSB, hasta alcanzar la fase estacionaria, tras lo cual cada uno de los inóculos se diluyeron a una Abs_{600nm} aproximada de 0,05 en matraces, cada uno de ellos adicionado con 30 ml de medio mínimo (M9) y con cada uno de los HAPs antraceno, fenantreno y pireno en lascas al 1% (p/v). Tras lo cual se incubaron a una temperatura de 30°C y una agitación de 150 rpm. Se realizaron diluciones seriadas en los tiempos seleccionados para cada experimento y se sembraron en medio TSA. Estas placas se incubaron a una temperatura de 30°C durante 24 horas, al cabo de las cuales se estimó el número de células viables en forma de UFC/ml. Así mismo, como control negativo, se analizó de manera análoga el crecimiento de las cepas objeto de estudio en medio mínimo M9 sin fuente de carbono.

M5.b Crecimiento de las cepa en medio mínimo sólido

Para crecimiento/aislamiento de cepas potencialmente degradadoras de hidrocarburos se prepararon 15 ml de dicho medio mínimo con 1,25% (p/v) de agar y se adicionó el hidrocarburo en cuestión a una concentración de 0,5% (p/v). Tras ello, se agitó vigorosamente hasta conseguir una mezcla homogénea. Una vez homogenizado se vertió en una placa de Petri estéril y se dejó enfriar. Una vez el medio solidificó se añadieron otros 15 ml de medio mínimo M9 (agar) pero sin hidrocarburo, para evitar que la suspensión de la muestra (dilución) estuviera en contacto directo con el contaminante. Las placas de Petri con diesel se prepararon vertiendo directamente el diesel al 0,5% (v/v) en 30 ml de medio mínimo M9 con 1,25% (p/v) de agar

M5.b Crecimiento de las cepas en un suelo franco-arenoso contaminado

La disposición de los microcosmos consistió en recipientes de vidrio de 500 ml de volumen, a los que se le añadieron 300 g de suelo franco-arenoso, elaborado en el laboratorio, compuesto por un 80% de arena y un 20% de arcilla, contaminado con 20.000 mg/Kg de diesel. Análogamente, como control negativo, se prepararon microcosmos con suelo franco-arenoso sin contaminar, tanto a los microcosmos adicionados con el contaminante como sin contaminante se suplementaron con 20 ml de cultivo según procediera. Se estimó el número de células adicionadas mediante diluciones seriadas en 1xM9 sembradas en TSA, para calcular las UFC/ml a los 0, 1, 2, 3, 7, 14 y 31 días.

M5.c Crecimiento de las plantas en un suelo franco-arenoso contaminado

Para los ensayos de rizorremediación se seleccionaron tres tipos de plantas, *Glycine max* (soja), *Zea mays* (maíz) y *Brassica napus* var. *Oleifera* (rape), en base a características como, requerimientos de suelo, tolerancia a la escasez de agua y tolerancia al contaminante diesel. Para determinar la tolerancia al contaminante de cada una de las plantas, se sembraron semillas estériles de cada una de las especies seleccionadas en 700 g de suelo franco-arenoso contaminado. Análogamente, se sembraron semillas igualmente estériles para determinar el crecimiento normal de la planta en suelo no contaminado como control negativo.

M5.d Análisis físico-químicos

M5.d.1 pH

Cuando fue necesario determinar el pH del suelo se tomaron 20 g del mismo y se dispusieron en un vaso de precipitado de 50 ml al que se le añadieron 20 ml de agua destilada, tras una agitación continua durante 5 minutos, se dejó reposar la suspensión durante 1 h aproximadamente y se determinó el valor de pH con un pH-metro marca Crison modelo GLP 22.

M5.d.2 Porcentaje de humedad

Para calcular el contenido hídrico de la muestra de suelo, se pesaron tres viales vacíos en una balanza de precisión, tras lo cual se dispuso 1 g de suelo en cada uno de ellos y se incubó a 100°C durante 24 horas hasta alcanzar un peso constante. Con los datos del peso antes y después del tratamiento con calor se obtuvo el porcentaje de humedad, tal y como se indica en la siguiente fórmula.

$$H = \left(\frac{Ps * 100}{Ph} \right) - 100$$

H; Humedad
Ph; Peso húmedo
Ps; Peso seco

M5.d.3 Hidrocarburos totales (TPHs)

El análisis de hidrocarburos totales (TPHs) presentes en el suelo, se determinó por gravimetría según la norma EPA 8015. La extracción se realizó utilizando 25 g de suelo en matraces de 250 ml con 50 ml de hexano/acetona (1:1), los matraces se agitaron a 100 rpm durante 5 minutos en un agitador marca Selecta modelo Rotavit, tras lo cual se sometieron a ultrasonidos durante 5 minutos marca Selecta y modelo Rotavit o Ultrasons. La solución se filtró mediante papel de celulosa, recogiendo el filtrado en un nuevo matraz (250 ml), al cual se le añadió 0,1 g de sodio-sulfato-anhidro, a continuación se filtró nuevamente utilizando un papel de celulosa a un recipiente/matraz previamente pesado. Estos pasos se realizaron por triplicado. Los recipientes/matraces se llevaron a un rotavapor marca Heidolph y modelo Laborota 4000 efficient, a 90 rpm, una vez eliminado el disolvente, se procedió a pesar los balones nuevamente. La diferencia entre ambos pesos corresponde a la concentración de TPHs.

M5.d.4 Fracción de hidrocarburos

La mezcla de hidrocarburos extraídos según se ha descrito en el apartado anterior, se disolvió en 1 ml de cloroformo para su determinación por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Las muestras se analizaron en el centro de

Instrumentación científica (CIC) de Granada se realizaron con un cromatógrafo de gases *AGILENT modelo 7890A*, con inyectores splits/splitless y PTV para columnas capilares y un espectrómetro de masas con analizador de triple cuadrupolo (triple-quad) *WATERS modelo QUATTRO micro GS*. Dichas muestras se prepararon de la misma manera que las analizadas en el laboratorio.

M6. PROTECCIÓN DE PLANTAS Y MICROORGANISMOS FRENTE A LA SEQUÍA POR ESPECIES MICROBIANAS TOLERANTES A LA DESECACIÓN

M6.a Protección de microorganismos frente a condiciones de sequía

Para determinar la supervivencia de las cepas objeto de estudio, se realizaron microcosmos edáficos, unos compuestos por 71,5 g de vermiculita estéril (recipientes de 500 ml de volumen) y otros con 3.5 Kg suelo sin esterilizar (recipientes de 5 litros de volumen). El suelo se compuso de un 80% de arena y 20% de arcilla (textura franco-arenosa). En el fondo de los recipientes se colocó grava de tamaño de canto de aproximadamente 3 cm de diámetro, para proporcionar drenaje al sistema.

Para añadir las células de las cepas objeto de estudio a los microcosmos con vermiculita, se inocularon previamente matraces de 500 ml con 250 ml de TSB. Cada uno de los cuales se inoculó con cada una de las cepas objeto de estudio, procedentes de una placa fresca de TSA con el antibiótico al que es resistente cada cepa. A los matraces no se les añadió antibiótico, ya que previo al ensayo se comprobó la estabilidad de los marcadores. Para ello se inocularon dos tubos de ensayo con cada una de las cepas y se incubaron en un agitador orbital a una temperatura de 30°C y una agitación de 150 rpm durante 24 horas. Una vez transcurrido el periodo de tiempo de incubación se realizaron diluciones seriadas y se sembraron 100 µl de cada dilución tanto en placas de TSA como en placas de TSA con el antibiótico en cuestión (1:1.000).

Una vez comprobado la estabilidad de los marcadores, se procedió a añadir las células de las cepas objeto de estudio a cada uno de los microcosmos, para ello se inocularon 5 ml de TSB con una colonia procedente de una placa fresca de TSA, de cada una de las cepas. Tras ello se incubaron durante 24 horas a una temperatura de 30°C y una agitación de 150 rpm. Una vez alcanzada una alta densidad celular (Abs_{600nm} de 9 o

superior) cada cultivo se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos, tras los cuales se recogieron aproximadamente 1,5 g de biomasa. Dicha biomasa se resuspendió en medio 1xM9 hasta alcanzar la Abs_{600nm} de 1, para los microcosmos que fueron inoculados con cada una de las cepas de manera individual y a la Abs_{600nm} de 2 para aquellos microcosmos que fueron inoculados con las cepas de forma simultánea. Los microcosmos inoculados con cada una de las cepas se inocularon con 30 ml de cultivo de cada una de éstas. Sin embargo, los microcosmos donde las cepas se combinan se inocularon con 15 ml de cada una de las cepas objeto de estudio.

Para los microcosmos con suelo franco-arenoso se procedió de la misma forma pero se utilizó un matraz de 1 L con 500 ml de TSB, ya que se requería un mayor volumen de inóculo. Con lo que se obtuvieron 3 g de biomasa, la cual se resuspendió, al igual que en el otro ensayo en medio 1xM9, hasta alcanzar la Abs_{600nm} de 1, para los microcosmos que fueron inoculados con cada una de las cepas de manera individual y a la Abs_{600nm} de 2 para aquellos microcosmos que fueron inoculados con las cepas de forma simultánea. Tras ello se inocularon cada uno de los microcosmos con 500 ml de volumen, para los microcosmos inoculados con las cepas de forma individual se añadió una mezcla de 250 ml de inóculo y 250 ml de solución salina estéril (1xM9). Sin embargo, para el microcosmos donde ambas cepas se inoculan de forma conjunta se añadieron 250 ml del inóculo de cada una de las cepas, en una mezcla homogénea. A los microcosmos sin inocular se añadieron 500 ml de 1xM9 para lograr un grado de humedad y sales similares a los microcosmos inoculados.

M6.a.1 Recuento viables en muestras de suelo

Para proceder la recuento de viables de las cepas objeto de estudio en muestras de suelo, se tomó 1 g de suelo de cada uno de los microcosmos. Tras ello, el gramo de suelo se suspendió en 10 ml de solución salina 1xM9 y se realizaron diluciones seriadas en dicha solución salina, en los tiempos correspondientes a cada ensayo. Dichas diluciones seriadas se sembraron en placas de TSA suplementado con el antibiótico al que es resistente cada cepa. Además se realizaron siembras de las diluciones en TSA con los antibióticos al que es resistente la cepa con la que se combina para así detectar si se producía la aparición de resistencias espontáneas a los antibióticos.

M6.b Protección de plantas frente a condiciones de sequía

Para analizar si las cepas seleccionadas por ser tolerantes a la sequía, eran capaces de proteger, frente a condiciones de falta de agua, a la planta de pimiento (*Capsicum annuum* L. cv. Maor), caracterizada por ser sensible a la sequía, se prepararon macetas de polietileno negro con forma redondeada y con un volumen de 0,4 cm³, con aproximadamente 0,3 cm³ de sustrato compuesto por vermiculita estéril. Tras ello se sembraron 4 semillas por cada maceta, las cuales se esterilizaron previamente con hipoclorito sódico al 5% (v/v). Dichas macetas se taparon con papel de aluminio y se dejaron germinar durante 7 días en una habitación a una temperatura de 30°C y una humedad del 40%. Transcurrido dicho tiempo, una vez que las semillas hayan germinado las macetas se destaparon y se incubaron a una temperatura de 25°C y una humedad del 40%. Se generaron mediante halógenos 12 horas de luz a una intensidad lumínica de 1.000 lux y 12 horas de oscuridad. Tras 14 días desde la siembra las macetas se inocularon con 40 ml de cultivo con una densidad óptica (Abs₆₀₀) de 1. Las macetas se mantuvieron en condiciones de humedad y de sequía controladas. Se tomaron muestras de las plantas a los 7, 14, 21 y 34 días. En cada punto de muestreo se midió la longitud del tallo y de la raíz, así como se analizó el peso fresco (PF), el peso totalmente túrgido (PTT) y el peso seco (PS), los ensayos fueron realizados por triplicado. Con ello calculamos la fórmula el Contenido Relativo de Agua (CRA) y el Índice de Retención de Agua (IRA).

$$\text{CRA} = \frac{\text{PF} - \text{PS}}{\text{PTT} - \text{PS}} \quad ; \quad \text{IRA} = \text{PF} - \text{PS}$$

M7 CARACTERÍSTICAS METABÓLICAS Y CELULARES.

M7.a Características metabólicas.

Para la caracterización de las bacterias se utilizó el kit comercial Biolog MicroPlate™ (Cat. No. 1014), cuya química está basada en la reducción de tetrazolium, en respuesta a procesos metabólicos como la fermentación y oxidación. La reducción del tetrazolium produce formazan el cual tiene una variedad de colores desde el azul

oscuro hasta el rojo y naranja, dependiendo del tetrazolium (sal) original usado para la reacción. Las fuentes de carbono probadas se localizaron en pocillos de microplaca de 96 pocillos (entre paréntesis se indica la posición relativa en la placa que ocupaban), que según GP2 MicroPlate fueron: α -ciclodextrina (A2), β -ciclodextrina (A3), dextrina (A4), glucógeno (A5), inulina (A6), manan (A7), tween 40 (A8), tween 80 (A9), N-acetil-D-glucosamina (A10), N-acetil-D-manosamina (A11), amigdalina (A12), L-arabinosa (B1), D-arabitol (B2), D-arbutina (B3), D-celobiosa (B4), D-fructosa (B5), L-fucosa (B6), D-galactosa (B7), ácido D-galacturónico (B8), gentiobiosa (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-galactosida (C9), β -metil D-galactosida (C10), 3-metil glucosa (C11), α -metil D-glucósido (C12), β -metil D-glucósido (D1), α -metil D-manosida (D2), palatinosa (D3), D-psicosa (D4), D-rafinosa (D5), L-ramnosa (D6), D-ribosa (D7), salicina (D8), sedoheptulosa (D9), D-sorbitol (D10), estaquiosa (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 *p*-hidroxifenilacético (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-piroglutámico (G8), L-serina (G9), putrescina (G10), 2,3-butanodiol (G11), glicerol (G12), adenosina (H1), 2'-deoxiadenosina (H2), inosina (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). Además uno de los pocillos presentaba agua (A1), como control negativo del ensayo.

Para la determinación de las fuentes de carbono que fermenta/oxida cada bacteria se siguieron las instrucciones del fabricante. Para ello se partió de un cultivo incubado en medio TSA durante 12-16 horas, del cual se tomó una cantidad aproximada de 3 mg evitando arrastrar el agar del medio. Se resuspendió en 15 ml GN/GP-IF Prod.

No.72101, adicionado con 3 gotas de tioglicolato concentrado, que actúa como agente antiencapsulante, hasta alcanzar una transmitancia del 20%. Una vez alcanzada dicha transmitancia se depositaron 150 μ l de la suspensión bacteriana obtenida en cada uno de los 96 pocillos. El resultado se registró mediante un lector de fluorescencia en microplacas BMG, modelo Fluostar Óptima a la longitud de onda de 585 nm, trascurridas las 12 horas tras la inoculación.

M7.b Caracterizaciones enzimáticas

Para la caracterización enzimática de las cepas objeto de estudio se empleó el kit comercial API coryne, API 20E y API 20NE siguiendo, para cada uno de ellos las instrucciones del fabricante. Mediante el kit API coryne se analizaron enzimas nitrato y nitrito reductasa, pirazinamidasa, pirrolidonil arilamidasa, fosfatasa alcalina, β -glucuronidasa, β -galactosidasa, α -glucosidasa, N-acetil- β -glucosaminidasa, β -glucosidasa (esculina), ureasa, hidrólisis (gelatina origen bovino), oxidación de la glucosa, ribosa, xilosa, manitol, maltosa, lactosa, sacarosa, glucógeno y la prueba catalasa. Por razón del API 20E se analizaron las enzimas β -galactosidasa, arginina-dihidrolasa, lisina decarboxilasa, ornitina decarboxilasa, utilización del citrato, producción del H₂S, ureasa, triptófano deaminasa, producción de indol, producción de acetoina, gelatina, fermentación/oxidación glucosa, manitol inositol, sorbitol, ramnosa, sacarosa, melibiosa, amigdalina, arabinosa y por último citocromo-oxidasa. Según el API 20NE determinamos la presencia o no de las siguientes enzimas mediante las siguientes reacciones: reducción de nitratos en nitritos, reducción de nitratos en nitrógeno, formación de indol (triptófano), fermentación de la glucosa, arginina dihidrolasa, β -galactosidasa (*p*-nitrofenil- β D-galactopiranosidasa), asimilación glucosa, arabinosa, manosa, manitol, N-acetil-glucosamina, maltosa, gluconato potásico, ácido cáprico, ácido adípico, malata, citrato trisódico y ácido fenilacético y por último citocromo-oxidasa.

M7.c Motilidad. Manitol. Reducción nitratos a nitritos. Oxidasa. Catalasa.

Para analizar si las cepas bacterianas objeto de estudio presentaban la capacidad de moverse espontánea e independientemente, se sembró una colonia por picadura en medio de cultivo semi-sólido manitol-movilidad (código 413782 Ultimed). Así se considera que hay motilidad si se observa crecimiento más allá de la picadura, tras 24 horas en incubación en una estufa a una temperatura de 30°C. De este modo, añadiendo a dicho medio los reactivos Griess-Ilosvay A (α -naftilamina al 0,5%) y B (ácido sulfanílico al 0,8%) en partes iguales, se determinó la actividad nitrato reductora y el catabolismo del manitol. Para la determinación de la actividad nitrato reductora el medio incorpora 1 g/l de potasio nitrato, un cambio de color hacia el amarillo en los 30 segundos de incubación indicó un resultado positivo. En el caso de mantenerse el color, se agregó 20 mg de zinc puro, totalmente exento de nitratos o nitritos, y se observó el cambio de color pasados otros 30 segundos, al cabo de los cuales se realizó la lectura final. Por otra parte, para determinar el posible catabolismo del manitol, el medio contiene 7,5 g/l de D-manita. El cambio de color del medio a amarillo indicó que la prueba fue positiva, ya que en la degradación del manitol se liberan productos ácidos detectados mediante dicho cambio de color.

La prueba oxidasa se realizó añadiendo reactivo Kovac's (N,N,N',N'-tetramethyl-*p*-phenylenediamin) al 1% (v/v) a un papel de filtro sobre el cual se extendió una colonia proveniente de una placa de TSA de 24 horas de crecimiento, el cambio de coloración a un púrpura intenso indicó que la prueba fue positiva. La prueba catalasa se determinó añadiendo peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 3% (v/v), a una colonia proveniente de una placa de TSA de 24 h de crecimiento, la formación de burbujas indicó que la prueba fue positiva, ya que la degradación de dicho compuesto supone la liberación de agua y oxígeno al medio.

M7.d Solubilización de fosfatos, producción de indol y H₂S

Para determinar que cepas eran capaces de solubilizar fosfatos se utilizó el medio SMRS1 con indicador de pH. De modo que se tomó una colonia proveniente de una placa de TSA de 24 h de crecimiento, y se realizó una suspensión en 1 ml de 1xM9. De la suspensión se sembraron 20 μ l en 5 puntos diferentes en la misma placa. Dicha

placa se incubó a 30°C durante 24 h, transcurridas las cuales se midió el halo de solubilización definido por el cambio de color del medio de púrpura a amarillo intenso.

La composición del medio SMRS1 fue la siguiente: (NH₄)₂SO₄, 0,5 g; KCl, 0,2 g; MgSO₄ x H₂O, 0,3 g; MnSO₄ x H₂O, 0,004 g; FeSO₄ x 7 H₂O, 0,0004 g; NaCl, 0,2 g; glucosa, 10 g; extracto de levadura, 0,5 g; púrpura de bromocresol, 0,1 g; Ca₃(PO₄)₂, 5 g; agar, 18 g y agua destilada hasta completar 1 litro. Tras adicionar todos los componentes a excepción del agar y el Ca₃(PO₄)₂ al agua, se ajusta el pH a 7,2 con NaOH 1 N o HCl 1N. Posteriormente se adiciona el agar y se esteriliza en el autoclave a 116,9°C y 1 atmósfera de presión, durante 15 min. El Ca₃(PO₄)₂ se esteriliza en seco por separado y se adiciona al medio una vez el medio esté estéril.

Para determinar la producción de indol y H₂S se utilizó medio SIM (Sigma, 85438), de modo que una vez preparado el medio y dispuesto en tubos de ensayo, se sembró con una colonias proveniente de una placa de TSA de 24 horas de crecimiento. Tras lo cual se incubó durante 24 horas en una estufa a una temperatura de 30°C. La producción de H₂S era positiva si el medio tornaba a una coloración negra. Y la producción de indol se comprobó adicionando unas gotas de reactivo de Kovac's, de modo que si el medio tornaba a una coloración rosa en la parte superficial del medio.

M7.e Ensayo tolerancia a antibióticos. Antibiograma

Las soluciones de antibióticos se prepararon 1.000 veces concentradas en H₂O destilada, excepto el cloramfenicol que se preparó en etanol absoluto, y la rifampicina y la tetraciclina que se disolvieron en metanol. Las soluciones preparadas en H₂O se esterilizaron por filtración y se almacenaron a -20°C. Los antibióticos se utilizaron a las concentraciones finales indicadas en µg/ml: estreptomina (Sm), 25; rifampicina (Rif), 30; cloramfenicol (Cm), 50; kanamicina (Km), 30; tetraciclina (Tc), 10.

Para medir la sensibilidad o resistencia a los antibióticos citados anteriormente se utilizaron discos de susceptibilidad antimicrobiana, del laboratorio OXOID, siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello se partió de un cultivo saturado de las cepas en medio TSB incubado a 30°C durante 12 horas, en un orbital modelo Gallenkamp Cat. 100x400.xxi.c. De este cultivo se tomaron 100 µl y se sembraron en placas de

TSA. Tras ello se colocó el disco con 0,5 µl de antibiótico, en el centro de la placa y se incubó a 30°C durante 24 horas, tras las cuales se midió el halo de inhibición del crecimiento y se volvió a incubar otras 24 horas, para el conteo de mutantes espontáneos y aislamiento de éstos (Bondi *et al.*, 1947). La difusión del antibiótico a través del agar produce un halo alrededor del disco indicativa de la zona de acción del antibiótico. Si el diámetro de la zona está entre 30-35 mm es indicativo de la susceptibilidad de la bacteria al antibiótico y si dicho halo presenta un diámetro de 15-20 mm es resistente.

M7.f Características celulares. Tinción Gram

A partir de un cultivo líquido de las células a teñir se realizó un frotis en un portaobjetos, tras ello con la ayuda de un mechero se fijo el extendido bacteriano al cristal. A continuación se cubrió con cristal violeta y se dejó durante 1 minuto. Una vez transcurrido dicho tiempo se lavó con agua corriente con cuidado de no arrastrar la preparación. Tras ello se cubrió la extensión con solución de lugol y se dejó 1 minuto y se lavó con agua corriente. Para decolorar la solución se utilizó un decolorante compuesto por acetona (30 ml) y etanol al 95% (p/v) (70 ml), dicho colorante se dejó actuar aproximadamente durante 10 segundos, tras lo cual se lavó con agua corriente. Una vez lavado, se volvió a cubrir la extensión bacteriana con safranina y se dejó actuar durante 1 minuto. Trascendido dicho tiempo se lavó con agua corriente durante 10 segundos y se secó al aire. Para finalizar se colocó una gota de aceite de inmersión sobre la preparación y se observó al microscopio.

M8 PROPIEDADES QUIMIOTAXONÓMICAS

M8.a Peptidoglicanos, azúcares de la pared celular, ácidos grasos y quinonas respiratorias

Todos los análisis fueron llevados a cabo en el DSMZ (Deutsche Sammlung Von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH). Para la determinación de los ésteres metilos se necesitaron 30 mg de células liofilizadas para su envío al DSMZ. Las células liofilizadas se obtuvieron mediante siembra por estría de dichas cepas en 5 ml

de medio TSA inclinado (pico de flauta), tras lo cual se incubaron durante 24 horas a una temperatura de 30°C, para que el cultivo alcanzase la fase exponencial. Una vez transcurrido dicho periodo de tiempo se añadieron 4 ml de leche en polvo estéril (agente protector) y se resuspendió la biomasa de cada una de las cepas con ayuda de un asa estéril. La leche con la biomasa resuspendida se vertió en un vial estéril y se congeló a -80°C durante 24 horas, transcurrido dicho periodo de tiempo los viales se llevaron al liofilizador. A partir de las células liofilizadas se extrajeron los ácidos grasos mediante el método de Miller (1982) y Kuykendall (1988). La separación de la mezcla de ácidos grasos se realizó mediante el sistema de identificación microbiana (MIS del inglés *Microbial Identification System*) (MIDI, Microbial ID, Newark, DE 19711 U.S.A.), para ello se utilizó un cromatógrafo de gases Agilent modelo 6890N equipado con una columna de 5% fenil-metil con un capilar de silicona y un detector de ionización de llama marca Agilent modelo 7683^a con muestreador automático y un equipo HP con la base de datos MIDI. Los pico se integraron automáticamente mediante el software estándar MIDI. Las menaquinonas se analizaron mediante el método descrito por Tindall (1990a; b), mediante cromatografía UV de capa fina (TLC) y un espectrofotómetro de masas. Los peptidoglicanos se aislaron y sus estructuras analizadas según Schleifer & Kandler (1972). Tras la derivación según Mackenzie (1987), la proporción molar de aminoácidos se determinó por cromatografía. La detección de grupos de aminoácidos libres dentro en los peptidoglicanos se realizó por unión al 1-fluoro-2,4-dinitrobenceno (Schleifer, 1985). Para el análisis de los azúcares presentes en la pared celular, las células se hidrolizaron en H₂SO₄, 1N (2 h a 100°C), se analizaron por cromatografía de capa fina (TLC) en placa, según Staneck & Roberts (1974). El análisis de quinonas respiratorias se realizó en cromatografía en capa fina y por U.V. y espectrofotometría de masas.

M9. MANIPULACIÓN DEL ADN

M9.a Aislamiento del ADN total

Para la preparación del ADN total se utilizó el sistema QIA quick “Blood and Tissue” kit 50 (Cat No 69504), para la extracción de ADN de procariotas, siguiendo las instrucciones del fabricante.

M9.b Electroforesis de ADN en gel de agarosa

La separación y visualización tanto de fragmentos de PCR, así como de ADN cromosómico se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa. Por cada 5 μ l de muestra a analizar se añadió 1 μ l de tampón de carga, y esta mezcla se depositó en un pocillo de gel de agarosa al 0,7% (p/v) en TAE, sumergido en una cubeta con el mismo tampón. La separación se realizó por electroforesis horizontal sumergida a un voltaje entre 70-90 V.

Las moléculas de ADN se tiñeron con bromuro de etidio. Para ello se añadió 0,5 μ l de bromuro de etido al 1% (p/v) a 30 ml de solución de agarosa en tampón Tris, acetato, EDTA (TAE) previamente fundida. El ADN se visualizó mediante exposición del gel a la luz ultravioleta a una longitud de onda de 254 nm. El registro fotográfico se realizó con un equipo de documentación de imágenes Volver Lourmat, modelo DOC-print II.

M9.c Reacción de amplificación en cadena con ADN polimerasa termorresistente (PCR)

Éste método se utilizó para la amplificación del gen codificante para el ARNr 16S partiendo de ADN total. La reacción de amplificación constó de: ADN molde, 0,2 ng de ADN cromosómico; cebadores, 50-100 pmoles; Taq ADN-polimerasa, 0,5 U/100 μ l; H₂O hasta 100 μ l. Las condiciones estándar de la reacción de amplificación fueron las siguientes: Fase de inicialización a 95°C durante tres 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 la temocicladora (Eppendorf, modelo Mastercycler pro) se realizó a 10°C por tiempo indefinido.

Tabla M2. Oligonucleótidos utilizados en la PCR

Cebador	Secuencia 5'→3	Utilización	Referencia
fd1	CCGAATTCGTCGACAA CAGAGTTTGATCCTGGC TCAG	Amplificación y secuenciación	(Weisburg et al. 1991)
rD1	CCCGGGATCCAAGCTT AAGGAGGTGATCCAGC C	Amplificación y secuenciación	(Weisburg et al. 1991)
fd2	GTGCCAGCAGCCGCGG TAATAC	Amplificación y secuenciación	(Weisburg et al. 1991)
rD2	GACTACCAGGGTATCT AATCC	Amplificación y secuenciación	(Weisburg et al. 1991)

M9.d Purificación del producto de PCR y comprobación de la pureza

Las muestras se limpiaron para eliminar sales, nucleótidos, taq polimerasa y oligonucleótidos como paso previo a la secuenciación. Para ello se utilizó el sistema comercial QIA quick PCR Purification Kit 50 (Cat. No 28104) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para comprobar la pureza, así como determinar la concentración del producto de amplificación se utilizó un Nanodrop marca Thermo Scientific modelo 2000 Spectrophotometer, para ello se midió el ratio de absorbancia de 260/280, el cual indica como de pura es la muestra, este ratio debe estar entre 1.8-2.0. Y el ratio 230/260 deb e ser de 2.0 o mayor, un ratio menor podría significar que hay contaminación por fenol en la muestra.

M9.e Secuenciación del ADN

La secuenciación de los distintos fragmentos del ADN, se realizó por el servicio de secuenciación del Instituto de Biomedicina y Parasitología “López-Neyra” del CSIC en Granada. Para ello se emplearon muestras amplificadas por PCR de entre 500-1000 pb, con una concentración de 40 ng, junto con 6,4 pmoles de oligonucleótidos (fd1, fd2, rd2 y rd1).

M10 HIBRIDACIÓN ADN-ADN Y DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO GC DEL DNA

La hibridación ADN-ADN se realizó por el servicio de hibridación de DSMZ (Dutsche Sammlung van Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH), para ello se inoculó la cepa objeto de estudio en matraces de 1.000 ml con 500 ml de TSB, con una colonia proveniente de una placa fresca de TSA. Dicho matraz se incubó durante 24 horas a una temperatura de 30°C y 150 rpm. Una vez alcanzada una Abs_{600nm} de 8 en cada cultivo, se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos y se recogieron 3 g de biomasa, que se resuspendió en 10 ml de iso-propanol y agua (1:1, v/v), para su envío. La hibridación ADN-ADN se realizó según la siguiente metodología: El ADN se aisló usando la prensa de French (Thermo Spectronic) y se purificó por cromatografía en hidroxipatito siguiendo el protocolo descrito por (Cashion et al. 1977). La hibridación ADN-ADN se llevó a cabo como es descrito por (Ley et al. 1970), considerando las modificaciones descritas por Huss et al. (1983), usando un espectrofotómetro modelo Cary 100 Bio UV/VIS equipado. El contenido GC del DNA de las cepas objeto de estudio se llevó a cabo por el DSMZ. La proporción de desoxiguanosina (dG) y timidina (dT) se calculó de acuerdo con el método de Mesbah et al. (1989).

M11 PROGRAMAS INFORMÁTICOS

Los análisis taxonómicos, en base al gen ARNr 16S, se realizaron con la base de datos EzTaxon (Kim *et al.*, 2012), disponible en el servidor de internet EzBioCloud (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>, Kim et al. 2012). Las secuencias, casi completas, del gen ARNr 16S (aprox. 1.500 pb) se compararon con las de otras especies con otras especies del género *Arthrobacter* relacionadas filogenéticamente, mediante el programa informático ClustalX2 (Larkin et al. 2007). El árbol filogenético se construyó en base al gen ARNr 16S, con el programa MEGA v5.1 (Tamura et al. 2007) usando el método del vecino más próximo (Saitou & Nei 1987), y también mediante el método de máxima probabilidad (Felsenstein 1981). Las distancias evolutivas fueron calculadas usando el modelo de Kimura's two parametes (K2P) (Kimura, 1980). La topología del árbol filogenético se evaluó mediante el análisis bootstrap basado en 1000 iteraciones (Felsenstein 1985).

M11.a Análisis estadístico

Para la realización del dendograma se utilizó el programa estadístico SPSS14.0 para MS-Windows, usando el método del vecino más próximo con el coeficiente de correlación de Pearson. Con dicho programa se realizó el cálculo de la media y la desviación estándar de los parámetros microbiológicos y químicos a partir de los valores obtenidos en cada medición de las muestras por triplicado. Para determinar si existe diferencia estadísticamente significativa entre las variables seleccionadas utilizó el método de Tukey o método de la diferencia significativa honesta de Tukey (DSH), con un grado de significancia de 0,05 (confianza 95%).

REFERENCIAS

- Adam, G., & Duncan, H. J. (2000). Effect of diesel fuel on growth of selected plant species. *Environmental Geochemistry and Health*, 21(4), 353–357.
- Adams, D. O., & Yang, S. F. (1979). Ethylene biosynthesis: Identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(1), 170–4.
- Ahmad, F., Ahmad, I., & Khan, M. S. (2008). Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Research*, 163(2), 173–81. doi:10.1016/j.micres.2006.04.001
- Ali, B., Sabri, A., & Hasnain, S. (2010). Rhizobacterial potential to alter auxin content and growth of *Vigna radiata* (L.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(8), 1379–1384. doi:10.1007/s11274-010-0310-1
- Anderson, T., Guthrie, E., & Walton, B. (1993). Bioremediation in the rhizosphere. *Environmental Science & ...*, 27(3), 2630–2636.
- Arakawa, T., & Timasheff, S. N. (1982). Stabilization of protein structure by sugars. *Biochemistry*, 21(25), 6536–6544. doi:10.1021/bi00268a033
- Ashraf, W., Mihdhir, A., & Colin Murrell, J. (1994). Bacterial oxidation of propane. *FEMS Microbiology Letters*, 122(1), 1–6.
- Atlas, R., & Bartha, R. (1992). Hydrocarbon Biodegradation and Oil Spill Bioremediation. In K. C. Marshall (Ed.), *Advances in Microbial Ecology SE - 6* (Vol. 12, pp. 287–338). Springer US. doi:10.1007/978-1-4684-7609-5_6
- Atlas, R. M. (1981). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiological Reviews*, 45(1), 180–209.
- Auger, R. (1995). Effect of nonionic surfactant addition on bacterial metabolism of naphthalene: Assessment of toxicity and overflow metabolism potential. *Journal of Hazardous Materials*, 43(3), 263–272. doi:10.1016/0304-3894(95)00038-V
- Avramova, T., Sotirova, A., Galabova, D., & Karpenko, E. (2008). Effect of Triton X-100 and rhamnolipid PS-17 on the mineralization of phenanthrene by *Pseudomonas* sp. cells. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 62(4), 415–420. doi:10.1016/j.ibiod.2008.03.008
- Ayotamuno, J. M., Kogbara, R. B., & Taleat, M. O. (2006). Bioremediation of a petroleum-hydrocarbon polluted agricultural soil at different levels of water application in Port Harcourt , Nigeria. *Journal of Food, Agriculture & Environmental*, 4(3 & 4), 1–4.
- Baboshin, M., Akimov, V., Baskunov, B., Born, T., Khan, S., & Golovleva, L. (2008). Conversion of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Sphingomonas* sp. VKM B-2434. *Biodegradation*, 19(4), 567–576. doi:10.1007/s10532-007-9162-2
- Balba, M. ., Al-Awadhi, N., & Al-Daher, R. (1998). Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. *Journal of Microbiological Methods*, 32(2), 155–164. doi:10.1016/S0167-7012(98)00020-7
- Barathi, S., & Vasudevan, N. (2001). Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens* isolated from a petroleum-contaminated soil. *Environment International*, 26(5-6), 413–6.
- Bartha, R., & Pramer, D. (1965). Features of a Flask and Method for Measuring the Persistence and Biological Effects of Pesticides in Soil. *Soil Science*, 100(1).

- Bascomb, S., & Manafi, M. (1998). Use of enzyme tests in characterization and identification of aerobic and facultatively anaerobic gram-positive cocci. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(2), 318–40.
- Bashan, Y., Holguin, G., & de-Bashan, L. E. (2004). Azospirillum-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). *Canadian Journal of Microbiology*, 50(8), 521–577. doi:10.1139/w04-035
- Bento, F. M., Camargo, F. a O., Okeke, B. C., & Frankenberger, W. T. (2005). Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Bioresource Technology*, 96(9), 1049–55. doi:10.1016/j.biortech.2004.09.008
- Bertrand, H., Plassard, C., Pinochet, X., Touraine, B., Normand, P., & Cleyet-Marel, J. C. (2000). Stimulation of the ionic transport system in Brassica napus by a plant growth-promoting rhizobacterium (*Achromobacter* sp.). *Canadian Journal of Microbiology*, 46(3), 229–36.
- Billi, D., & Potts, M. (2002). Life and death of dried prokaryotes. *Research in Microbiology*, 153(1), 7–12. doi:10.1016/S0923-2508(01)01279-7
- Bobbie, R. J., & White, D. C. (1980). Characterization of Benthic Microbial Community Structure by High-Resolution Gas Chromatography of Fatty Acid Methyl Esters Characterization of Benthic Microbial Community Structure by High-Resolution Gas Chromatography of Fatty Acid Methyl Esters. *Applied and Environmental Microbiology*, 39, 1212–1222.
- Bogino, P., Abod, A., Nievas, F., & Giordano, W. (2013). Water-limiting conditions alter the structure and biofilm-forming ability of bacterial multispecies communities in the alfalfa rhizosphere. *PloS One*, 8(11), e79614. doi:10.1371/journal.pone.0079614
- Bognolo, G. (1999). Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 152(1-2), 41–52. doi:10.1016/S0927-7757(98)00684-0
- Boonchan, S., Britz, M. L., & Stanley, G. A. (1998). Surfactant-enhanced biodegradation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Stenotrophomonas maltophilia*. *Biotechnology and Bioengineering*, 59(4), 482–494. doi:10.1002/(SICI)1097-0290(19980820)59:4<482::AID-BIT11>3.0.CO;2-C
- Bosma, T. N. P., Middeldorp, P. J. M., Scharaa, G., & Zehnder, A. J. B. (1997). Mass Transfer Limitation of Biotransformation: Quantifying Bioavailability. *Environmental Science and Technology*, 31(1), 248–252.
- Boylen, C. W. (1973). Survival of *Arthrobacter crystallopoietes* during prolonged periods of extreme desiccation. *Journal of Bacteriology*, 113(1), 33–7.
- Brown, A. D. (1976). Microbial water stress. *Bacteriological Reviews*, 40(4), 803–46.
- Burd, G. I., Dixon, D. G., & Glick, B. R. (1998). A Plant Growth-Promoting Bacterium That Decreases Nickel Toxicity in Seedlings. *Appl. Envir. Microbiol.*, 64(10), 3663–3668.
- Calvo, C., Manzanera, M., Silva-Castro, G. a, Uad, I., & González-López, J. (2009). Application of bioemulsifiers in soil oil bioremediation processes. Future prospects. *The Science of the Total Environment*, 407(12), 3634–40. doi:10.1016/j.scitotenv.2008.07.008
- Casellas, M., Grifoll, M., Bayona, J. M., & Solanas, A. M. (1997). New metabolites in the degradation of fluorene by *Arthrobacter* sp . strain F101 . New Metabolites in the Degradation of Fluorene by *Arthrobacter* sp . Strain F101, 63(3).

- Cashion, P., Holder-Franklin, M. A., McCully, J., & Franklin, M. (1977). A rapid method for the base ratio determination of bacterial DNA. *Analytical Biochemistry*, *81*(2), 461–466. doi:10.1016/0003-2697(77)90720-5
- Casida, L. E. (1977). Microbial metabolic activity in soil as measured by dehydrogenase. *Microbial Metabolic Activity in Soil as Measured by Dehydrogenase Determination*. *Applied and Environmental Microbiology*, *34*, 630.
- Cerniglia, C. E. (1993). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology*, *4*(3), 331–338. doi:10.1016/0958-1669(93)90104-5
- Chaîneau, C. H., Morel, J. L., & Oudot, J. (1997). Phytotoxicity and Plant Uptake of Fuel Oil Hydrocarbons.
- Chang, B.-V., Chang, I. T., & Yuan, S. Y. (2008). Anaerobic Degradation of Phenanthrene and Pyrene in Mangrove Sediment. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, *80*(2), 145–149. doi:10.1007/s00128-007-9333-1
- Cho, B.-H., Chino, H., Tsuji, H., Kunito, T., Nagaoka, K., Otsuka, S., ... Oyaizu, H. (1997). Laboratory-scale bioremediation of oil-contaminated soil of Kuwait with soil amendment materials. *Chemosphere*, *35*(7), 1599–1611. doi:10.1016/S0045-6535(97)00220-8
- Christofi, N., & Ivshina, I. B. (2002). Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. *Journal of Applied Microbiology*, *93*(6), 915–929. doi:10.1046/j.1365-2672.2002.01774.x
- Ciric, L., Philp, J. C., & Whiteley, A. S. (2010). Hydrocarbon utilization within a diesel-degrading bacterial consortium. *FEMS Microbiology Letters*, *303*(2), 116–22. doi:10.1111/j.1574-6968.2009.01871.x
- Clegg, J. S. (2001). Cryptobiosis — a peculiar state of biological organization. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, *128*(4), 613–624. doi:10.1016/S1096-4959(01)00300-1
- Clemens, S., Palmgren, M. G., & Krämer, U. (2002). A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends in Plant Science*, *7*(7), 309–315. doi:10.1016/S1360-1385(02)02295-1
- Clements, W. H., Oris, J. T., & Wissing, T. E. (1994). Accumulation and food chain transfer of fluoranthene and benzo[a]pyrene in *Chironomus riparius* and *Lepomis macrochirus*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, *26*(3), 261–266. doi:10.1007/BF00203550
- Cobbett, C., & Goldsbrough, P. (2002). PHYTOCHELATINS AND METALLOTHIONEINS: Roles in Heavy Metal Detoxification and Homeostasis. *Annual Review of Plant Biology*, *53*(1), 159–182. doi:10.1146/annurev.arplant.53.100301.135154
- Collins, M. D., Pirouz, T., Goodfellow, M., & Minnikin, D. E. (1977). Distribution of menaquinones in actinomycetes and corynebacteria. *Journal of General Microbiology*, *100*(2), 221–30.
- Cosentino, D., Chenu, C., & Le Bissonnais, Y. (2006). Aggregate stability and microbial community dynamics under drying–wetting cycles in a silt loam soil. *Soil Biology and Biochemistry*, *38*(8), 2053–2062. doi:10.1016/j.soilbio.2005.12.022
- Crowe, J. H., & Crowe, L. M. (1992). Membrane Integrity in Anhydrobiotic Organisms: Toward a Mechanism for Stabilizing Dry Cells. In G. Somero, C. Osmond, & C. Bolis (Eds.), *Water and Life SE - 7* (pp. 87–103). Springer Berlin Heidelberg. doi:10.1007/978-3-642-76682-4_7

- Crowe, L. M. (2002). Lessons from nature: the role of sugars in anhydrobiosis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 131(3), 505–513. doi:10.1016/S1095-6433(01)00503-7
- Crowe, L. M., & Crowe, J. H. (1992). Anhydrobiosis: A strategy for survival. *Advances in Space Research*, 12(4), 239–247. doi:10.1016/0273-1177(92)90178-Z
- Csonka, L. N. (1989). Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiological Reviews*, 53(1), 121–47.
- Cummins, C. S., & Harris, H. (1956). The chemical composition of the cell wall in some gram-positive bacteria and its possible value as a taxonomic character. *Journal of General Microbiology*, 14(3), 583–600.
- Denef, K., Six, J., Paustian, K., & Merckx, R. (2001). Importance of macroaggregate dynamics in controlling soil carbon stabilization: short-term effects of physical disturbance induced by dry–wet cycles. *Soil Biology and Biochemistry*, 33(15), 2145–2153. doi:10.1016/S0038-0717(01)00153-5
- Denome, S. A., Stanley, D. C., Olson, E. S., & Young, K. D. (1993). Metabolism of dibenzothiophene and naphthalene in *Pseudomonas* strains: complete DNA sequence of an upper naphthalene catabolic pathway. *J. Bacteriol.*, 175(21), 6890–6901.
- Dibble, J. T., & Bartha, R. (1979). Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge . Effect of Environmental Parameters on the Biodegradation of Oil Sludget. *Applied and Environmental Microbiology*, 37(4).
- Duncan, K., Jennings, E., Buck, P., Wells, H., Kolhatkar, R., Sublette, K., ... Todd, T. (2003). Multi-Species Ecotoxicity Assessment of Petroleum-Contaminated Soil. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*, 12(2), 181–206. doi:10.1080/713610969
- Egamberdieva, D. (2008). Plant Growth Promoting Properties of Rhizobacteria Isolated from Wheat and Pea Grown in Loamy Sand Soil. *Turkish Journal of Microbiology*, 32, 9–15.
- Evans, F. F., Rosado, A. S., Sebastián, G. V, Casella, R., Machado, P. L. O. A., Holmström, C., ... Seldin, L. (2004). Impact of oil contamination and biostimulation on the diversity of indigenous bacterial communities in soil microcosms. *FEMS Microbiology Ecology*, 49(2), 295–305. doi:10.1016/j.femsec.2004.04.007
- Felsenstein, J. (1981). Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution*, 17(6), 368–76.
- Felsenstein, J. (1985). Felsenstein 1985. Confidence limits on phylogenies- an approach using the bootstrap.pdf.
- Forney, F. ., & Markovetz, A. . (1970). Subterminal Oxidation of Aliphatic Hydrocarbons. *Journal of Bacteriology*, 102(1), 281–282.
- Forney, F. W., & Markovetz, A. J. (1968). Oxidative Degradation of Methyl Ketones II. Chemical Pathway for Degradation of 2-Tridecanone by *Pseudomonas multivorans* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 96(4), 1055–1064.
- Forney, F. W., Markovetz, A. J., & Kallio, R. E. (1967). Bacterial Oxidation of 2-Tridecanone to 1-Undecanol. *J. Bacteriol.*, 93(2), 649–655.
- Franklin, F. C., Bagdasarian, M., Bagdasarian, M. M., & Timmis, K. N. (1981). Molecular and functional analysis of the TOL plasmid pWWO from *Pseudomonas putida* and cloning of genes for the entire regulated aromatic ring meta cleavage pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(12), 7458–62.

- Gallego, J. L., Loredó, J., Llamas, J. F., Vázquez, F., & Sánchez, J. (2001). Bioremediation of diesel-contaminated soils: evaluation of potential in situ techniques by study of bacterial degradation. *Biodegradation*, *12*(5), 325–35.
- García-Pérez, A., & Burg, M. (1991). Role of organic osmolytes in adaptation of renal cells to high osmolality. *The Journal of Membrane Biology*, *119*(1), 1–13. doi:10.1007/BF01868535
- Gerhardt, K. E., Huang, X.-D., Glick, B. R., & Greenberg, B. M. (2009). Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: Potential and challenges. *Plant Science*, *176*(1), 20–30. doi:10.1016/j.plantsci.2008.09.014
- Glick, B., Penrose, D., & Li, J. (1998). A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. *Journal of Theoretical Biology*, *190*(1), 63–8. doi:10.1006/jtbi.1997.0532
- Glick, B. R. (1995). The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, *41*(2), 109–117. doi:10.1139/m95-015
- Glick, B. R. (2005). Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. *FEMS Microbiology Letters*, *251*(1), 1–7. doi:10.1016/j.femsle.2005.07.030
- Glick, B. R. (2010). Using soil bacteria to facilitate phytoremediation. *Biotechnology Advances*, *28*(3), 367–74. doi:10.1016/j.biotechadv.2010.02.001
- Glick, B. R., & Bashan, Y. (1997). Genetic manipulation of plant growth -promoting bacteria to enhance biocontrol of phytopathogens. *Biotechnology Advance*, *15*(2), 353–378.
- Glick, B. R., Cheng, Z., Czarny, J., & Duan, J. (2007). Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. *European Journal of Plant Pathology*, *119*(3), 329–339. doi:10.1007/s10658-007-9162-4
- Glick, B. R., Karaturović, D. M., & Newell, P. C. (1995). A novel procedure for rapid isolation of plant growth promoting pseudomonads. *Canadian Journal of Microbiology*, *41*(6), 533–536. doi:10.1139/m95-070
- Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H.-J., Trujillo, M. E., Suzuki, K.-I., Ludwig, W., & Whitman, W. B. (2012). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. (M. Goodfellow, P. Kämpfer, H.-J. Busse, M. E. Trujillo, K.-I. Suzuki, W. Ludwig, & W. B. Whitman, Eds.) (Second edi., pp. 578–624). Athens, GA.
- Goyal, A. K., & Zylstra, G. J. (1997). Genetics of naphthalene and phenanthrene degradation by *Comamonas testosteroni*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *19*(5-6), 401–407. doi:10.1038/sj.jim.2900476
- Goyal, A., & Zylstra, G. (1996). Molecular cloning of novel genes for polycyclic aromatic hydrocarbon degradation from *Comamonas testosteroni* GZ39. *Appl. Envir. Microbiol.*, *62*(1), 230–236.
- Gray, M. R., Banerjee, D. K., Dudas, M. J., & Pickard, M. A. (2000). Protocols To Enhance Biodegradation of Hydrocarbon Contaminants in Soil. *Bioremediation Journal*, *4*(4), 249–257. doi:10.1080/10889860091114220
- Grichko, V. P., & Glick, B. R. (2001). Amelioration of flooding stress by ACC deaminase-containing plant growth-promoting bacteria. *Plant Physiology and Biochemistry*, *39*(1), 11–17. doi:10.1016/S0981-9428(00)01212-2
- Grosser, R. J., Warshawsky, D., & Vestal, J. R. (1991). Indigenous and enhanced mineralization of pyrene, benzo[a]pyrene, and carbazole in soils. *Appl. Envir. Microbiol.*, *57*(12), 3462–3469.
- Gu, Y., Wang, P., & Kong, C. H. (2009). Urease, invertase, dehydrogenase and polyphenoloxidase activities in paddy soil influenced by allelopathic rice variety.

- European Journal of Soil Biology*, 45(5-6), 436–441.
doi:10.1016/j.ejsobi.2009.06.003
- Guazzaroni, M.-E., Herbst, F.-A., Loes, I., Tamames, J., Peláez, A. I., López-Cortés, N., ... Ferrer, M. (2013). Metaproteogenomic insights beyond bacterial response to naphthalene exposure and bio-stimulation. *The ISME Journal*, 7(1), 122–36. doi:10.1038/ismej.2012.82
- Guerra-Santos, L., Käppeli, O., & Fiechter, A. (1986). Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 24(6), 443–448. doi:10.1007/BF00250320
- Gunasekera, C. P., Martin, L. D., Siddique, K. H. M., & Walton, G. H. (2006). Genotype by environment interactions of Indian mustard (*Brassica juncea* L.) and canola (*B. napus* L.) in Mediterranean-type environments. *European Journal of Agronomy*, 25(1), 1–12. doi:10.1016/j.eja.2005.08.002
- Haines, J. R., & Alexander, M. (1974). Microbial degradation of high-molecular-weight alkanes. *Applied Microbiology*, 28(6), 1084–5.
- Harayama, S., Kasai, Y., & Hara, A. (2004). Microbial communities in oil-contaminated seawater. *Current Opinion in Biotechnology*, 15(3), 205–14. doi:10.1016/j.copbio.2004.04.002
- Harris, J. F. (1981). Effect of Water Potential on Microbial Growth and Activity (pp. 23–95).
- Hartmann, A., Rothballer, M., & Schmid, M. (2008). Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. *Plant and Soil*, 312(1-2), 7–14. doi:10.1007/s11104-007-9514-z
- Heidelberg, J. F., Paulsen, I. T., Nelson, K. E., Gaidos, E. J., Nelson, W. C., Read, T. D., ... Fraser, C. M. (2002). Genome sequence of the dissimilatory metal ion-reducing bacterium *Shewanella oneidensis*. *Nat Biotech*, 20(11), 1118–1123.
- Heitkamp, M. A., & Cerniglia, C. E. (1987). Effects of chemical structure and exposure on the microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in freshwater and estuarine ecosystems. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 6(7), 535–546. doi:10.1002/etc.5620060706
- Hickey, A., Gordon, L., Dobson, A. W., Kelly, C., & Doyle, E. (2007). Effect of surfactants on fluoranthene degradation by *Pseudomonas alcaligenes* PA-10. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(4), 851–856. doi:10.1007/s00253-006-0719-5
- Hoekstra, F. A., Golovina, E. A., & Buitink, J. (2001). Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends in Plant Science*, 6(9), 431–438. doi:10.1016/S1360-1385(01)02052-0
- Huang, Y., Zhao, N., He, L., Wang, L., & Liu, Z. (2005). *Arthrobacter scleromae* sp. nov. Isolated from Human from Human Clinical Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(3), 1451–1455. doi:10.1128/JCM.43.3.1451
- Huesemann, M. H., & Moore, K. O. (1993). Compositional changes during landfarming of weathered michigan crude oil-contaminated soil. *Journal of Soil Contamination*, 2(3), 245–264. doi:10.1080/15320389309383442
- Huss, V. A., Festl, H., & Schleifer, K. H. (1983). Studies on the spectrophotometric determination of DNA hybridization from renaturation rates. *Systematic and Applied Microbiology*, 4(2), 184–92. doi:10.1016/S0723-2020(83)80048-4
- Iwamoto, T., & Nasu, M. (2001). Current bioremediation practice and perspective. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92(1), 1–8. doi:10.1016/S1389-1723(01)80190-0

- Jackson, W. A., & Pardue, J. (1999). Potential for Enhancement of Biodegradation of Crude Oil in Louisiana Salt Marshes using Nutrient Amendments. *Water, Air, and Soil Pollution*, 109(1-4), 343–355. doi:10.1023/A:1005025809014
- Jacobson, C. B., Pasternak, J. J., & Glick, B. R. (1994). Partial purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. *Canadian Journal of Microbiology*, 40(12), 1019–1025. doi:10.1139/m94-162
- Javaheri, M., Jenneman, G. E., McInerney, M. J., & Knapp, R. M. (1985). Anaerobic Production of a Biosurfactant by *Bacillus licheniformis* JF-2. *Appl. Envir. Microbiol.*, 50(3), 698–700.
- Jin, D., Jiang, X., Jing, X., & Ou, Z. (2007). Effects of concentration, head group, and structure of surfactants on the degradation of phenanthrene. *Journal of Hazardous Materials*, 144(1-2), 215–21. doi:10.1016/j.jhazmat.2006.10.012
- Juck, D., Charles, T., Whyte, L. G., & Greer, C. W. (2000). Polyphasic microbial community analysis of petroleum hydrocarbon-contaminated soils from two northern Canadian communities. *FEMS Microbiology Ecology*, 33(3), 241–249. doi:10.1111/j.1574-6941.2000.tb00746.x
- Kallimanis, a, Kavakiotis, K., Perisynakis, a, Spröer, C., Pukall, R., Drainas, C., & Koukkou, a I. (2009a). *Arthrobacter phenanthrenivorans* sp. nov., to accommodate the phenanthrene-degrading bacterium *Arthrobacter* sp. strain Sphe3. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(Pt 2), 275–9. doi:10.1099/ijs.0.000984-0
- Kallimanis, a, Kavakiotis, K., Perisynakis, a, Spröer, C., Pukall, R., Drainas, C., & Koukkou, a I. (2009b). *Arthrobacter phenanthrenivorans* sp. nov., to accommodate the phenanthrene-degrading bacterium *Arthrobacter* sp. strain Sphe3. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(Pt 2), 275–9. doi:10.1099/ijs.0.000984-0
- Kaneda, T. (1991). Iso- and anteiso-fatty acids in bacteria: biosynthesis, function, and taxonomic significance. *Microbiological Reviews*, 55(2), 288–302.
- Karlidag, H., Esitken, A., Turan, M., & Sahin, F. (2007). Effects of root inoculation of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient element contents of leaves of apple. *Scientia Horticulturae*, 114(1), 16–20. doi:10.1016/j.scienta.2007.04.013
- Kasai, Y., Kishira, H., Syutsubo, K., & Harayama, S. (2001). Molecular detection of marine bacterial populations on beaches contaminated by the Nakhodka tanker oil-spill accident. *Environmental Microbiology*, 3(4), 246–255. doi:10.1046/j.1462-2920.2001.00185.x
- Kastner, M., Breuer-Jammali, M., & Mahro, B. (1998). Impact of Inoculation Protocols, Salinity, and pH on the Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) and Survival of PAH-Degrading Bacteria Introduced into Soil. *Appl. Envir. Microbiol.*, 64(1), 359–362.
- Kempf, B., & Bremer, E. (1998). Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Archives of Microbiology*, 170(5), 319–330. doi:10.1007/s002030050649
- Khan, a G., Kuek, C., Chaudhry, T. M., Khoo, C. S., & Hayes, W. J. (2000). Role of plants, mycorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation. *Chemosphere*, 41(1-2), 197–207.
- Khan, S., Afzal, M., Iqbal, S., & Khan, Q. M. (2013). Plant-bacteria partnerships for the remediation of hydrocarbon contaminated soils. *Chemosphere*, 90(4), 1317–32. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.09.045

- Kim, K. K., Lee, K. C., Oh, H.-M., Kim, M. J., Eom, M. K., & Lee, J.-S. (2008). *Arthrobacter defluvii* sp. nov., 4-chlorophenol-degrading bacteria isolated from sewage. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(Pt 8), 1916–21. doi:10.1099/ijs.0.65550-0
- Kim, O.-S., Cho, Y.-J., Lee, K., Yoon, S.-H., Kim, M., Na, H., ... Chun, J. (2012). Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(Pt 3), 716–21. doi:10.1099/ijs.0.038075-0
- Kim, T., Lee, E., Kim, Y., Cho, K.-S., & Ryu, H. (2003). Degradation of polyaromatic hydrocarbons by *Burkholderia cepacia* 2A-12. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19(4), 411–417. doi:10.1023/A:1023998719787
- Kimura, M. (1980). *Journal of Molecular Evolution* ©, 16(1330).
- Kindzewicz, Z. ., Radziejewski, M., & Pinskiwar, I. (2006). Precipitation extremes in the changing climate of Europe. *Climate Research*, 31, 51–58.
- King, J. M., Digrazia, P. M., Applegate, B., Burlage, R., Sanseverino, J., Dunbar, P., ... Sayler, G. S. (1990, August 17). Rapid, sensitive bioluminescent reporter technology for naphthalene exposure and biodegradation. *Science (New York, N.Y.)*. doi:10.1126/science.249.4970.778
- Kiyohara, H., Torigoe, S., Kaida, N., Asaki, T., Iida, T., Hayashi, H., & Takizawa, N. (1994). Cloning and characterization of a chromosomal gene cluster, pah, that encodes the upper pathway for phenanthrene and naphthalene utilization by *Pseudomonas putida* OUS82. *J. Bacteriol.*, 176(8), 2439–2443.
- Klähn, S., & Hagemann, M. (2011). Compatible solute biosynthesis in cyanobacteria. *Environmental Microbiology*, 13(3), 551–562. doi:10.1111/j.1462-2920.2010.02366.x
- Kloepper, J. W., Hume, D. ., Scher, F. ., Singleton, C., Tipping, B., Laliberté, M., ... Lee, L. (1998). Plant growth-promoting rhizobacteria on canola (Rapeseed).
- Kloepper, J. W., Lifshitz, R., & Zablotowicz, R. M. (1989). Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity, (February).
- Kuiper, I., Bloemberg, G. V., & Lugtenberg, B. J. J. (2001). Selection of a Plant-Bacterium Pair as a Novel Tool for Rhizostimulation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Degrading Bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 14(10), 1197–1205. doi:10.1094/MPMI.2001.14.10.1197
- Kuiper, I., Lagendijk, E. L., Bloemberg, G. V., & Lugtenberg, B. J. J. (2004). Rhizoremediation: A Beneficial Plant-Microbe Interaction Bioremediation: A natural method. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 17(1), 6–15.
- Kundzewicz, Z. W. (1997). Water resources for sustainable development. *Hydrological Sciences Journal*, 42(4), 467–480. doi:10.1080/02626669709492047
- Larkin, M. a, Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. a, McWilliam, H., ... Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 23(21), 2947–8. doi:10.1093/bioinformatics/btm404
- Leahy, J. G., & Colwell, R. R. (1990a). Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 54(3), 305–315.
- Leahy, J. G., & Colwell, R. R. (1990b). Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological Reviews*, 54(3), 305–15.

- Lee J. S., Lee K. C., P. Y. R. and S. K. (2003). *Arthrobacter koreensis* sp. nov., a novel alkalitolerant bacterium from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(5), 1277–1280. doi:10.1099/ijs.0.02492-0
- Lee, J. S., Lee, C. K., Pyun, Y. R., & Bae, K. S. (2003). *Arthrobacter koreensis* sp. nov., a novel alkalitolerant bacterium from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(5), 1277–1280. doi:10.1099/ijs.0.02492-0
- Lee, J.-S., Lee, K. C., Pyun, Y.-R., & Bae, K. S. (2003). *Arthrobacter koreensis* sp. nov., a novel alkalitolerant bacterium from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(5), 1277–128. doi:10.1099/ijs.0.02492-0
- Ley, J. De, Cattoir, H., & Reynaerts, A. (1970). The Quantitative Measurement of DNA Hybridization from Renaturation Rates. *European Journal of Biochemistry*, 12(1), 133–142. doi:10.1111/j.1432-1033.1970.tb00830.x
- Liang, Y., Britt, D., McLean, J., Sorensen, D., & Sims, R. (2007). Humic acid effect on pyrene degradation: finding an optimal range for pyrene solubility and mineralization enhancement. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(6), 1368–1375. doi:10.1007/s00253-006-0769-8
- Liebeg, E. W., & Cutright, T. J. (1999). The investigation of enhanced bioremediation through the addition of macro and micro nutrients in a PAH contaminated soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 44(1), 55–64. doi:10.1016/S0964-8305(99)00060-8
- Liu, X., Lindemann, W. C., Whitford, W. G., & Steiner, R. L. (2000). Microbial diversity and activity of disturbed soil in the northern Chihuahuan Desert. *Biology and Fertility of Soils*, 32(3), 243–249. doi:10.1007/s003740000242
- Liu, Y.-C., Li, L.-Z., Wu, Y., Tian, W., Zhang, L.-P., Xu, L., ... Shen, B. (2010). Isolation of an alkane-degrading *Alcanivorax* sp. strain 2B5 and cloning of the *alkB* gene. *Bioresource Technology*, 101(1), 310–6. doi:10.1016/j.biortech.2009.08.028
- Lu, X.-Y., Zhang, T., & Fang, H.-P. (2011). Bacteria-mediated PAH degradation in soil and sediment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(5), 1357–1371. doi:10.1007/s00253-010-3072-7
- Magan, N. (2008). *Ecology of Saprotrophic Basidiomycetes*. *British Mycological Society Symposia Series* (Vol. 28, pp. 63–78). Elsevier. doi:10.1016/S0275-0287(08)80006-9
- Maki, H., Hirayama, N., Hiwatari, T., Kohata, K., Uchiyama, H., Watanabe, M., ... Furuki, M. (2003). Crude oil bioremediation field experiment in the Sea of Japan. *Marine Pollution Bulletin*, 47(1-6), 74–7. doi:10.1016/S0025-326X(02)00412-5
- Makkar, R. S., & Rockne, K. J. (2003). Comparison of synthetic surfactants and biosurfactants in enhancing biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Toxicology and Chemistry / SETAC*, 22(10), 2280–92.
- Manzanera, M., Castro, A. G. De, Tøndervik, A., Strøm, A. R., & Tunnacliffe, A. (2002a). Hydroxyectoine Is Superior to Trehalose for Anhydrobiotic Engineering of *Pseudomonas putida* KT2440. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(9), 4328–4333. doi:10.1128/AEM.68.9.4328
- Manzanera, M., Castro, A. G. De, Tøndervik, A., Strøm, A. R., & Tunnacliffe, A. (2002b). Hydroxyectoine Is Superior to Trehalose for Anhydrobiotic Engineering of *Pseudomonas putida* KT2440 Hydroxyectoine Is Superior to

- Trehalose for Anhydrobiotic Engineering of *Pseudomonas putida* KT2440. doi:10.1128/AEM.68.9.4328
- Manzanera, M., Vilchez, S., & Tunnacliffe, A. (2004). High survival and stability rates of *Escherichia coli* dried in hydroxyectoine. *FEMS Microbiology Letters*, 233(2), 347–52. doi:10.1016/j.femsle.2004.03.005
- Manzanera, M., Vilchez, S., & Tunnacliffe, A. (2004). Plastic Encapsulation of Stabilized *Escherichia coli* and *Pseudomonas putida*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(5), 3143–3145. doi:10.1128/AEM.70.5.3143-3145.2004
- Margesin, R., & Schinner, F. (1997). Efficiency of indigenous and inoculated cold-adapted soil microorganisms for biodegradation of diesel oil in alpine soils . Efficiency of Indigenous and Inoculated Cold-Adapted Soil Microorganisms for Biodegradation of Diesel Oil in Alpine Soils, 63(7).
- Margesin, R., & Schinner, F. (2001a). Bioremediation (Natural Attenuation and Biostimulation) of Diesel-Oil-Contaminated Soil in an Alpine Glacier Skiing Area Bioremediation (Natural Attenuation and Biostimulation) of Diesel-Oil-Contaminated Soil in an Alpine Glacier Skiing Area, 67(7). doi:10.1128/AEM.67.7.3127
- Margesin, R., & Schinner, F. (2001b). Bioremediation (natural attenuation and biostimulation) of diesel-oil-contaminated soil in an alpine glacier skiing area. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(7), 3127–33. doi:10.1128/AEM.67.7.3127-3133.2001
- Margesin, R., Zimmerbauer, A., & Schinner, F. (2000). Monitoring of bioremediation by soil biological activities. *Chemosphere*, 40(4), 339–346. doi:10.1016/S0045-6535(99)00218-0
- Mayak, S., Tirosh, T., & Glick, B. R. (2004a). Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42(6), 565–72. doi:10.1016/j.plaphy.2004.05.009
- Mayak, S., Tirosh, T., & Glick, B. R. (2004b). Plant growth-promoting bacteria that confer resistance to water stress in tomatoes and peppers. *Plant Science*, 166(2), 525–530. doi:10.1016/j.plantsci.2003.10.025
- Meagher, R. B. (2000). Phytoremediation of toxic elemental and organic pollutants. *Current Opinion in Plant Biology*, 3(2), 153–162. doi:10.1016/S1369-5266(99)00054-0
- Messina, C. G. ., Reeves, E. P., Roes, J., & Segal, A. W. (2002). Catalase negative *Staphylococcus aureus* retain virulence in mouse model of chronic granulomatous disease. *FEBS Letters*, 518(1-3), 107–110. doi:10.1016/S0014-5793(02)02658-3
- Moeskops, B., Buchan, D., Sleutel, S., Herawaty, L., Husen, E., Saraswati, R., ... De Neve, S. (2010). Soil microbial communities and activities under intensive organic and conventional vegetable farming in West Java, Indonesia. *Applied Soil Ecology*, 45(2), 112–120. doi:10.1016/j.apsoil.2010.03.005
- Mongodin, E. F., Shapir, N., Daugherty, S. C., DeBoy, R. T., Emerson, J. B., Shvartzbeyn, A., ... Sadowsky, M. J. (2006). Secrets of soil survival revealed by the genome sequence of *Arthrobacter aurescens* TC1. *PLoS Genetics*, 2(12), e214. doi:10.1371/journal.pgen.0020214
- Mulder, E. G., & Antheunisse, J. (1963). Morphologie, physiologie et écologie des arthrobacter. *Annales de l'Institut Pasteur*, 105, 46–74.
- Mulligan, C. ., Yong, R. ., & Gibbs, B. . (2001). Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. *Engineering Geology*, 60(1-4), 371–380. doi:10.1016/S0013-7952(00)00117-4

- Namkoong, W. (2002). Bioremediation of diesel-contaminated soil with composting. *Environmental Pollution*, 119(1), 23–31. doi:10.1016/S0269-7491(01)00328-1
- Narváez-Reinaldo, J. J., Barba, I., González-López, J., Tunnacliffe, a, & Manzanera, M. (2010). Rapid method for isolation of desiccation-tolerant strains and xeroprotectants. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(15), 5254–62. doi:10.1128/AEM.00855-10
- Narváez-Reinaldo, J. J., Barba, I., González-López, J., Tunnacliffe, A., & Manzanera, M. (2010). Rapid method for isolation of desiccation-tolerant strains and xeroprotectants. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(15), 5254–62. doi:10.1128/AEM.00855-10
- Navon-Venezia, S., Zosim, Z., Gottlieb, A., Legmann, R., Carmeli, S., Ron, E., & Rosenberg, E. (1995). Alasan, a new bioemulsifier from *Acinetobacter radioresistens*. *Appl. Envir. Microbiol.*, 61(9), 3240–3244.
- Oliver, J. D., Nilsson, L., & Kjelleberg, S. (1991). Formation of nonculturable *Vibrio vulnificus* cells and its relationship to the starvation state. *Appl. Envir. Microbiol.*, 57(9), 2640–2644.
- Olivera, N. L., Commendatore, M. G., Morán, A. C., & Esteves, J. L. (2000). Biosurfactant-enhanced degradation of residual hydrocarbons from ship bilge wastes. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 25(2), 70–73. doi:10.1038/sj.jim.7000037
- Ortiz, I., Auria, R., Sigoillot, J.-C., & Revah, S. (2003). Enhancing Phenanthrene Biomineralization in a Polluted Soil Using Gaseous Toluene as a Cosubstrate. *Environmental Science & Technology*, 37(4), 805–810. doi:10.1021/es0260061
- Ortiz, I., Velasco, A., & Revah, S. (2006). Effect of toluene as gaseous cosubstrate in bioremediation of hydrocarbon-polluted soil. *Journal of Hazardous Materials*, 131(1-3), 112–7. doi:10.1016/j.jhazmat.2005.09.013
- Panu, U. S., & Sharma, T. C. (2002). Challenges in drought research: some perspectives and future directions. *Hydrological Sciences Journal*, 47(sup1), S19–S30. doi:10.1080/02626660209493019
- Patten, C. L., & Glick, B. R. (1996). Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Canadian Journal of Microbiology*, 42(3), 207–220. doi:10.1139/m96-032
- Peng, S., Zhou, Q., Cai, Z., & Zhang, Z. (2009). Phytoremediation of petroleum contaminated soils by *Mirabilis Jalapa L.* in a greenhouse plot experiment. *Journal of Hazardous Materials*, 168(2-3), 1490–6. doi:10.1016/j.jhazmat.2009.03.036
- Penrose, D. M., & Glick, B. R. (2003a). Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiologia Plantarum*, 118(1), 10–15. doi:10.1034/j.1399-3054.2003.00086.x
- Penrose, D. M., & Glick, B. R. (2003b). Technical focus Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria, 10–15.
- Potts, M. (1994). Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiological Reviews*, 58(4), 755–805.
- Qaderi, M. M., Kurepin, L. V., & Reid, D. M. (2006). Growth and physiological responses of canola (*Brassica napus*) to three components of global climate change: temperature, carbon dioxide and drought. *Physiologia Plantarum*, 128(4), 710–721. doi:10.1111/j.1399-3054.2006.00804.x
- Quantin, C., Joner, E. J., Portal, J. M., & Berthelin, J. (2005). PAH dissipation in a contaminated river sediment under oxic and anoxic conditions. *Environmental*

- Pollution (Barking, Essex : 1987)*, 134(2), 315–22.
doi:10.1016/j.envpol.2004.07.022
- Quilchano, C., & Marañón, T. (2002). Dehydrogenase activity in Mediterranean forest soils. *Biology and Fertility of Soils*, 35(2), 102–107. doi:10.1007/s00374-002-0446-8
- Ramos-Gonzalez, M. I., & Molin, S. (1998). Cloning, Sequencing, and Phenotypic Characterization of the rpoS Gene from *Pseudomonas putida* KT2440. *J. Bacteriol.*, 180(13), 3421–3431.
- Reed, M., & Glick, B. (2005). Growth of canola (*Brassica napus*) in the presence of plant growth-promoting bacteria and either copper or polycyclic aromatic hydrocarbons. *Canadian Journal of Microbiology*, 1069, 1061–1069. doi:10.1139/W05-094
- Reed, M. L. E., & Glick, B. R. (2005). Growth of canola (*Brassica napus*) in the presence of plant growth-promoting bacteria and either copper or polycyclic aromatic hydrocarbons. *Canadian Journal of Microbiology*, 51(12), 1061–1069. doi:10.1139/w05-094
- Rhykerd, R. L., Crews, B., McInnes, K. J., & Weaver, R. W. (1999). Impact of bulking agents, forced aeration, and tillage on remediation of oil-contaminated soil, 67, 279–285.
- Richard, J. ., & Vogel, T. . (1999). Characterization of a soil bacterial consortium capable of degrading diesel fuel. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 44(2-3), 93–100. doi:10.1016/S0964-8305(99)00062-1
- Richardson, A., Barea, J.-M., McNeill, A., & Prigent-Combaret, C. (2009). Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant and Soil*, 321(1-2), 305–339. doi:10.1007/s11104-009-9895-2
- Rojo, F. (2009). Degradation of alkanes by bacteria. *Environmental Microbiology*, 11(10), 2477–2490. doi:10.1111/j.1462-2920.2009.01948.x
- Rosenberg, E., Legmann, R., Kushmaro, A., Taube, R., Adler, E., & Ron, E. (1993). Petroleum bioremediation — a multiphase problem. In E. Rosenberg (Ed.), *Microorganisms to Combat Pollution SE - 15* (pp. 213–226). Springer Netherlands. doi:10.1007/978-94-011-1672-5_15
- Rosenberg, E., & Ron, E. Z. (1999). High- and low-molecular-mass microbial surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52(2), 154–162. doi:10.1007/s002530051502
- Rouse, J. D., Sabatini, D. A., Suflita, J. M., & Harwell, J. H. (1994). Influence of surfactants on microbial degradation of organic compounds. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 24(4), 325–370. doi:10.1080/10643389409388471
- Rovira, A. D., Newman, E. I., Bowen, H. J., & Campbell, R. (1974). Quantitative assessment of the rhizoplane microflora by direct microscopy. *Soil Biology and Biochemistry*, 6(4), 211–216. doi:10.1016/0038-0717(74)90053-4
- Saetre, P., & Stark, J. (2005). Microbial dynamics and carbon and nitrogen cycling following re-wetting of soils beneath two semi-arid plant species. *Oecologia*, 142(2), 247–260. doi:10.1007/s00442-004-1718-9
- Safronova, V. I., Stepanok, V. V., Engqvist, G. L., Alekseyev, Y. V., & Belimov, A. a. (2005). Root-associated bacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase improve growth and nutrient uptake by pea genotypes cultivated in cadmium supplemented soil. *Biology and Fertility of Soils*, 42(3), 267–272. doi:10.1007/s00374-005-0024-y

- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406–25.
- Salazar, S., Sánchez, L. E., Alvarez, J., Valverde, A., Galindo, P., Igual, J. M., ... Santa-Regina, I. (2011). Correlation among soil enzyme activities under different forest system management practices. *Ecological Engineering*, 37(8), 1123–1131. doi:10.1016/j.ecoleng.2011.02.007
- Saleem, M., Arshad, M., Hussain, S., & Saeed, A. (2007). Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture, 635–648. doi:10.1007/s10295-007-0240-6
- SantaCruz-Calvo, L., González-López, J., & Manzanera, M. (2013). *Arthrobacter siccitolerans* sp. nov., a highly desiccation-tolerant, xeroprotectant-producing strain isolated from dry soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(Pt 11), 4174–80. doi:10.1099/ij.s.0.052902-0
- Sarkar, D., Ferguson, M., Datta, R., & Birnbaum, S. (2005). Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: comparison of biosolids addition, carbon supplementation, and monitored natural attenuation. *Environmental Pollution (Barking, Essex : 1987)*, 136(1), 187–95. doi:10.1016/j.envpol.2004.09.025
- Schimel, J., Balser, T. C., & Wallenstein, M. (2007). MICROBIAL STRESS-RESPONSE PHYSIOLOGY AND ITS IMPLICATIONS. *Ecological Society of America*, 88(6), 1386–1394.
- Schimel, J. P., Gullledge, J. M., Clein-Curley, J. S., Lindstrom, J. E., & Braddock, J. F. (1999). Moisture effects on microbial activity and community structure in decomposing birch litter in the Alaskan taiga. *Soil Biology and Biochemistry*, 31(6), 831–838. doi:10.1016/S0038-0717(98)00182-5
- Schippers-lammertse, A. F., Muijsers, A. O., & Klatser-oedekerck, K. B. (1963). a Bacteriophage of this Species, 29, 1–15.
- Schleifer, K. H., & Kandler, O. (1972). Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriological Reviews*, 36(4), 407–77.
- Schwab, A. ., & Banks, M. . (1994). Biologically Mediated Dissipation of Polyaromatic Hydrocarbons in the Root Zone. In *Bioremediation through Rhizosphere Technology* (Vol. 563, pp. 12–132). American Chemical Society. doi:doi:10.1021/bk-1994-0563.ch012
- Scow, K. M., Schuidt, S. K., & Alexander, M. (1989). Kinetics of biodegradation of mixture of substrates in soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 21(5), 703–708.
- Segura, A., & Ramos, J. L. (2013). Plant–bacteria interactions in the removal of pollutants. *Current Opinion in Biotechnology*, 24(3), 467–473. doi:10.1016/j.copbio.2012.09.011
- Segura, A., Rodríguez-Conde, S., Ramos, C., & Ramos, J. L. (2009). Bacterial responses and interactions with plants during rhizoremediation. *Microbial Biotechnology*, 2(4), 452–464. doi:10.1111/j.1751-7915.2009.00113.x
- Seklemova, E., Pavlova, a, & Kovacheva, K. (2001). Biostimulation-based bioremediation of diesel fuel: field demonstration. *Biodegradation*, 12(5), 311–6.
- Sharp, R. E., & LeNoble, M. E. (2002). ABA, ethylene and the control of shoot and root growth under water stress. *Journal of Experimental Botany*, 53(366), 33–7.
- Sharp, R. E., Poroyko, V., Hejlek, L. G., Spollen, W. G., Springer, G. K., Bohnert, H. J., & Nguyen, H. T. (2004). Root growth maintenance during water deficits: physiology to functional genomics. *Journal of Experimental Botany*, 55(407), 2343–51. doi:10.1093/jxb/erh276

- Sheng, X. F., He, L. Y., Zhou, L., & Shen, Y. Y. (2009). Characterization of Microbacterium sp. F10a and its role in polycyclic aromatic hydrocarbon removal in low-temperature soil. *Canadian Journal of Microbiology*, 55(5), 529–535. doi:10.1139/W09-005
- Shum, A. C., & Markovetz, A. J. (1974). Purification and Properties of Undecyl Acetate Esterase from *Pseudomonas cepacia* Grown on 2-Tridecanone. *J. Bacteriol.*, 118(3), 880–889.
- Siddikee, M. A., Chauhan, P. S., & Sa, T. (2011). Regulation of Ethylene Biosynthesis Under Salt Stress in Red Pepper (*Capsicum annum* L.) by 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid (ACC) Deaminase-producing Halotolerant Bacteria. *Journal of Plant Growth Regulation*, 31(2), 265–272. doi:10.1007/s00344-011-9236-6
- Silva-Castro, G. A., Rodelas, B., Perucha, C., Laguna, J., González-López, J., & Calvo, C. (2013). Bioremediation of diesel-polluted soil using biostimulation as post-treatment after oxidation with Fenton-like reagents: assays in a pilot plant. *The Science of the Total Environment*, 445-446, 347–55. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.12.081
- Silva-Castro, G. a., SantaCruz-Calvo, L., Uad, I., Perucha, C., Laguna, J., González-López, J., & Calvo, C. (2012). Treatment of diesel-polluted clay soil employing combined biostimulation in microcosms. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 9(3), 535–542. doi:10.1007/s13762-012-0060-8
- Simkins, S., & Alexander, M. (1984). Models for mineralization kinetics with the variables of substrate concentration and population density. *Appl. Envir. Microbiol.*, 47(6), 1299–1306.
- Simon, M. J., Osslund, T. D., Saunders, R., Ensley, B. D., Suggs, S., Harcourt, A., ... Zylstra, G. J. (1993). Sequences of genes encoding naphthalene dioxygenase in *Pseudomonas putida* strains G7 and NCIB 9816-4. *Gene*, 127(1), 31–37. doi:10.1016/0378-1119(93)90613-8
- Sørensen, L. H. (1974). Rate of decomposition of organic matter in soil as influenced by repeated air drying-rewetting and repeated additions of organic material. *Soil Biology and Biochemistry*, 6(5), 287–292. doi:10.1016/0038-0717(74)90032-7
- Spain, J. C., & Van Veld, P. A. (1983). Adaptation of Natural Microbial Communities to Degradation of Xenobiotic Compounds : Effects of Adaptation of Natural Microbial Communities to Degradation of Xenobiotic Compounds : Effects of Concentration , Exposure Time , Inoculum , and Chemical Structu.
- Stackebrandt, E., & Goebel, B. M. (1994). Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44(4), 846–849. doi:10.1099/00207713-44-4-846
- Steel, K. J. (1961). The Oxidase Reaction as a Taxonomic Tool. *Journal of General Microbiology*, 25(2), 297–306. doi:10.1099/00221287-25-2-297
- Steenwerth, K., Jackson, L., Calderon, F., Scow, K., & Rolston, D. (2005). Response of microbial community composition and activity in agricultural and grassland soils after a simulated rainfall. *Soil Biology and Biochemistry*, 37(12), 2249–2262. doi:10.1016/j.soilbio.2005.02.038
- Stefanowska, M., Kuras, M., Kubacka-Zebalska, M., & Kacperska, A. (1999). Low Temperature Affects Pattern of Leaf Growth and Structure of Cell Walls in Winter Oilseed Rape (*Brassica napus* L ., var . *oleifera* L .), 313–319.

- Steuer, B., Stuhlfauth, T., & Fock, H. (1988). The efficiency of water use in water stressed plants is increased due to ABA induced stomatal closure. *Photosynthesis Research*, 18(3), 327–336. doi:10.1007/BF00034837
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., & Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24(8), 1596–9. doi:10.1093/molbev/msm092
- Tanase, A.-M., Ionescu, R., Chiciudean, I., Vassu, T., & Stoica, I. (2013). Characterization of hydrocarbon-degrading bacterial strains isolated from oil-polluted soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 84, 150–154. doi:10.1016/j.ibiod.2012.05.022
- Teng, Y., Luo, Y., Ping, L., Zou, D., Li, Z., & Christie, P. (2010). Effects of soil amendment with different carbon sources and other factors on the bioremediation of an aged PAH-contaminated soil. *Biodegradation*, 21(2), 167–178. doi:10.1007/s10532-009-9291-x
- Tesar, M. (2002). Bacterial rhizosphere populations of black poplar and herbal plants to be used for phytoremediation of diesel fuel. *Soil Biology and Biochemistry*, 34(12), 1883–1892. doi:10.1016/S0038-0717(02)00202-X
- Thurmann, U., Zanto, C., Schmitz, C., Vomberg, A., Püttmann, W., & Klinner, U. (1999). Correlation between microbial ex situ activities of two neighbouring uncontaminated and fuel oil contaminated subsurface sites. *Biotechnology Techniques*, 13(4), 271–275. doi:10.1023/A:1008966517344
- Timmusk, S., & Wagner, E. G. (1999). The plant-growth-promoting rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* induces changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression: a possible connection between biotic and abiotic stress responses. *Molecular Plant-Microbe Interactions : MPMI*, 12(11), 951–9. doi:10.1094/MPMI.1999.12.11.951
- Tindall, B. J., Rosselló-Móra, R., Busse, H.-J., Ludwig, W., & Kämpfer, P. (2010). Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60, 249–66. doi:10.1099/ijs.0.016949-0
- Toussaint, J.-P., Pham, T., Barriault, D., & Sylvestre, M. (2012). Plant exudates promote PCB degradation by a rhodococcal rhizobacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95(6), 1589–1603. doi:10.1007/s00253-011-3824-z
- Van Beilen, J. ., & Funhoff, E. . (2007). Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(1), 13–21. doi:10.1007/s00253-006-0748-0
- Van Beilen, J. B., Funhoff, E. G., Loon, A. Van, Just, A., Kaysser, L., Bouza, M., ... Ro, M. (2006). Cytochrome P450 Alkane Hydroxylases of the CYP153 Family Are Common in Alkane-Degrading Eubacteria Lacking Integral Membrane Alkane Hydroxylases. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(1), 59–65. doi:10.1128/AEM.72.1.59
- Vidali, M. (2001). Bioremediation. An overview. *Pure and Applied Chemistry*, 73(7), 1163–1172. doi:10.1351/pac200173071163
- Vilchez, S., & Manzanera, M. (2011). Biotechnological uses of desiccation-tolerant microorganisms for the rhizoremediation of soils subjected to seasonal drought. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91(5), 1297–304. doi:10.1007/s00253-011-3461-6
- Vilchez, S., Tunnacliffe, A., & Manzanera, M. (2008a). Tolerance of plastic-encapsulated *Pseudomonas putida* KT2440 to chemical stress. *Extremophiles*, 12(2), 297–299. doi:10.1007/s00792-007-0123-9

- Vilchez, S., Tunnacliffe, A., & Manzanera, M. (2008b). Tolerance of plastic-encapsulated *Pseudomonas putida* KT2440 to chemical stress. *Extremophiles : Life under Extreme Conditions*, 12(2), 297–9. doi:10.1007/s00792-007-0123-9
- Volkering, F., Breure, A. M., Andel, J. G. Van, Rulkens, W. H., Volkering, F., Breure, A. M., & Johan, G. (1995). Influence of nonionic surfactants on bioavailability and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons . These include : Influence of Nonionic Surfactants on Bioavailability and Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(5), 1699–1705.
- Vollmer, W., Blanot, D., & de Pedro, M. a. (2008). Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(2), 149–67. doi:10.1111/j.1574-6976.2007.00094.x
- Walworth, J. L., & Reynolds, C. M. (1995). Bioremediation of a petroleum-contaminated cryic soil: Effects of phosphorus, nitrogen, and temperature. *Journal of Soil Contamination*, 4(3), 299–310. doi:10.1080/15320389509383499
- Wang, C., Knill, E., Glick, B. R., & Défago, G. (2000). Effect of transferring 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase genes into *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 and its *gacA* derivative CHA96 on their growth-promoting and disease-suppressive capacities. *Canadian Journal of Microbiology*, 46(10), 898–907. doi:10.1139/w00-071
- Wang, L., Wang, W., Lai, Q., & Shao, Z. (2010). Gene diversity of CYP153A and AlkB alkane hydroxylases in oil-degrading bacteria isolated from the Atlantic Ocean. *Environmental Microbiology*, 12(5), 1230–1242. doi:10.1111/j.1462-2920.2010.02165.x
- Watanabe, K. (2001). Microorganisms relevant to bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology*, 12(3), 237–241. doi:10.1016/S0958-1669(00)00205-6
- Watkinson, R., & Morgan, P. (1991). Physiology of aliphatic hydrocarbon-degrading microorganisms. In C. Ratledge (Ed.), *Physiology of Biodegradative Microorganisms SE - 1* (pp. 79–92). Springer Netherlands. doi:10.1007/978-94-011-3452-1_1
- Wauters, G., Charlier, J., Janssens, M., & Delmée, M. (2000). Identification of *Arthrobacter oxydans*, *Arthrobacter luteolus* sp. nov., and *Arthrobacter albus* sp. nov., isolated from human clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(6), 2412–5.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. a, & Lane, D. J. (1991a). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173(2), 697–703.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. a, & Lane, D. J. (1991b). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173(2), 697–703.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. (1991c). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.*, 173(2), 697–703.
- Wentzel, A., Ellingsen, T., Kotlar, H.-K., Zotchev, S., & Throne-Holst, M. (2007). Bacterial metabolism of long-chain n-alkanes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76(6), 1209–1221. doi:10.1007/s00253-007-1119-1
- Westerberg, K., Elväng, a M., Stackebrandt, E., & Jansson, J. K. (2000). *Arthrobacter chlorophenicus* sp. nov., a new species capable of degrading high concentrations of 4-chlorophenol. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50 Pt 6, 2083–92.

- Wang, L.-M., Liu, P.-W. G., Ma, C.-C., & Cheng, S.-S. (2008). Application of biosurfactants, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil. *Journal of Hazardous Materials*, 151(1), 155–63. doi:10.1016/j.jhazmat.2007.05.063
- Wieser, M., Denner, E. B. M., Kämpfer, P., Schumann, P., Tindall, B., Steiner, U., ... Busse, H.-J. (2002). Emended descriptions of the genus *Micrococcus*, *Micrococcus luteus* (Cohn 1872) and *Micrococcus lylae* (Kloos et al. 1974). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(Pt 2), 629–37.
- Wilkinson, S. G., & Galbraith, L. (1975). Studies of Lipopolysaccharides from *Pseudomonas aeruginosa*. *European Journal of Biochemistry*, 52(2), 331–343. doi:10.1111/j.1432-1033.1975.tb04001.x
- Williams, M. A. (2007). Response of microbial communities to water stress in irrigated and drought-prone tallgrass prairie soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(11), 2750–2757. doi:10.1016/j.soilbio.2007.05.025
- Wong, J. W. C., Fang, M., Zhao, Z., & Xing, B. (2004, November). Effect of Surfactants on Solubilization and Degradation of Phenanthrene under Thermophilic Conditions.
- Wright, P. R., Morgan, J. M., Jessop, R. S., & Cass, A. (1995). Comparative adaptation of canola (*Brassica napus*) and Indian mustard (*B . juncea*) to soil water deficits : yield and yield components. *Field Crops Research*, 42, 1–13.
- Wyszkowski, M., & Ziolkowska, A. (2009). Role of compost, bentonite and calcium oxide in restricting the effect of soil contamination with petrol and diesel oil on plants. *Chemosphere*, 74(6), 860–5. doi:10.1016/j.chemosphere.2008.10.035
- Xiong, L., Wang, R.-G., Mao, G., & Koczan, J. M. (2006). Identification of drought tolerance determinants by genetic analysis of root response to drought stress and abscisic Acid. *Plant Physiology*, 142(3), 1065–74. doi:10.1104/pp.106.084632
- Yabuuchi, E., & Yano, I. (1981). *Achromobacter* gen. nov. and *Achromobacter xylosoxidans* (ex Yabuuchi and Ohyama 1971) nom. rev. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 31, 477–478.
- Yakimov, M. M., Timmis, K. N., & Golyshin, P. N. (2007). Obligate oil-degrading marine bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(3), 257–66. doi:10.1016/j.copbio.2007.04.006
- Yang, J., Kloepper, J. W., & Ryu, C.-M. (2009). Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends in Plant Science*, 14(1), 1–4. doi:10.1016/j.tplants.2008.10.004
- Yu, Y. B., Adams, D. O., & Yang, S. F. (1980). Inhibition of ethylene production by 2,4-dinitrophenol and high temperature. *Plant Physiology*, 66(2), 286–90.
- Yuan, B.-C., & Yue, D.-X. (2012). Soil Microbial and Enzymatic Activities Across a Chronosequence of Chinese Pine Plantation Development on the Loess Plateau of China. *Pedosphere*, 22(1), 1–12. doi:10.1016/S1002-0160(11)60186-0
- Yuan, S. , Chang, J. , Yen, J. , & Chang, B.-V. (2001). Biodegradation of phenanthrene in river sediment. *Chemosphere*, 43(3), 273–278. doi:10.1016/S0045-6535(00)00139-9
- Zhao, B., Chen, J., Zhang, J., & Qin, S. (2010). Soil microbial biomass and activity response to repeated drying–rewetting cycles along a soil fertility gradient modified by long-term fertilization management practices. *Geoderma*, 160(2), 218–224. doi:10.1016/j.geoderma.2010.09.024
- Zhao, G.-Z., Li, J., Qin, S., Zhang, Y.-Q., Zhu, W.-Y., Jiang, C.-L., ... Li, W.-J. (2009). *Micrococcus yunnanensis* sp. nov., a novel actinobacterium isolated from

- surface-sterilized *Polyspora axillaris* roots. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(Pt 10), 2383–7. doi:10.1099/ijs.0.010256-0
- Zhou, E., & Crawford, R. (1995). Effects of oxygen, nitrogen, and temperature on gasoline biodegradation in soil. *Biodegradation*, 6(2), 127–140. doi:10.1007/BF00695343

Los resultados expuestos en la presente tesis ha dado lugar a la siguiente producción científica:

Publicaciones en Revistas

Título. *Arthrobacter siccitolerans* sp. nov., a highly desiccation-tolerant, xeroprotectant-producing strain isolated from dry soil.

Revista: International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology

Año: 2013

Volumen:

Número:

Autores: SantaCruz-Calvo, Lucía, González-López, Jesús, Manzanera, Maximino

Capítulos de Libros

1. Título del capítulo: CONTRIBUCIÓN DE LOS MICROORGANISMOS EN EL MANTENIMIENTO DE LA BIODIVERSIDAD EN SUELOS ÁRIDOS Y SEMIÁRIDOS

Autores del capítulo: Vilchez-Morillas, Juan Ignacio; Manzanera-Ruiz, Maximino; SantaCruz-Calvo, Lucía; González-López, Jesús; Narváez-Reinaldo, Juan Jesús; Picazo-Espinosa, Rafael

Título del libro: III CONGRESO NACIONAL DE BIODIVERSIDAD

Lugar: Granada, España

Editorial: CSIC, UGR

Año: 2011

2. Título del capítulo: NEW ISOLATION METHOD OF DESICCATION-TOLERANT MICROORGANISMS FOR THE BIOREMEDIATION OF ARID AND SEMIARID SOILS

Autores del capítulo: Manzanera-Ruiz, Maximino; Narváez-Reinaldo, Juan Jesús; Santa Cruz-Calvo, Lucía; Vilchez-Morillas, Juan Ignacio; González-López, Jesús; Calvo-Sainz, Concepción

Título del libro: ENVIRONMENTAL TOXICOLOGY III

Autores del libro:

Lugar: SOUTHAMPTON, REINO UNIDO

Editorial: WITPRESS

ISBN: 978-1-84564-438-3

Año: 2010

Título del capítulo: PLANT GROWTH PROMOTING RHIZOBACTERIA FOR PROTECTION AGAINST DROUGHT

Autores del capítulo: Narváez-Reinaldo, Juan Jesús; Vilchez-Morillas, Juan Ignacio; SantaCruz-Calvo, Lucía; Picazo-Espinosa, Rafael; González-López, Jesús; Manzanera- Ruiz, Maximino

Título del libro: BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION AND PLANT ASSOCIATED MICROORGANISMS

Lugar: Zaragoza

Editorial: Gráficas ALÓS, S.A.

Año: 2010

Aportaciones a Congresos

1. Título de la aportación: Improvement in the rhizoremediation efficiency by the use of xeroprotective microorganisms.

Nombre del congreso: 5º International Symposium on Biosorption and Bioremediation

Tipo de evento: Comunicación en congreso

Ámbito: Internacional

Año: 2010

Lugar: Praga (Rep. Checa)

Autores: Manzanera M.; Vilchez J.I.; Narváez-Reinaldo J.J., SantaCruz-Calvo L., Picazo-Espinosa R., González-López J.

2. Título de la aportación: New method for the isolation of Drought Plant Protecting Rhizobacteria

Nombre del congreso: Biotecnología Habana 2011

Tipo de evento: Poster en Exposición

Ámbito: Internacional

Año: 2011

Lugar: Cuba

Autores: Manzanera-Ruiz, Maximino; Narváez-Reinaldo, Juan Jesús; Vilchez Morillas, Juan Ignacio; SantaCruz-Calvo, Lucía; Picazo-Espinosa, Rafael; Julca-Chavez, Irene Consuelo; Calvo-Sainz, Concepción; González-López, Jesús

3. Título de la aportación: UTILIZACIÓN DE GRASAS DE AGUAS RESIDUALES PARA LA PRODUCCIÓN DE MICRO-COMBUSTIBLES

Nombre del congreso: XXIII Congreso Nacional de Microbiología

Tipo de evento: Poster en Congreso

Ámbito: Nacional

Año: 2011

Lugar: Salamanca (España)

Autores: Picazo-Espinosa, Rafael; SantaCruz-Calvo, Lucía; Vilchez-Morillas, Juan Ignacio; Narváez-Reinaldo, Juan Jesús; González-López, Jesús; Manzanera-Ruiz, Maximino

4. Título de la aportación: UTILIZACIÓN DE LA APLICACIÓN MULTIPLATAFORMA I-TUNES COMO HERRAMIENTA DE APOYO PARA LA DOCENCIA UNIVERSITARIA (I-LABBOOK)

Nombre del congreso: XXIII Congreso Nacional de Microbiología

Tipo de evento: Poster en Congreso

Ámbito: Nacional

Año: 2011

Lugar: Salamanca (España)

Autores: Picazo-Espinosa, Rafael; SantaCruz-Calvo, Lucía; Vilchez-Morillas, Juan Ignacio; Narváez-Reinaldo, Juan Jesús; Manzanera-Ruiz, Maximino; Vilchez-Tornero, Susana

5. Título de la aportación: RIZORREMEDIACIÓN DE SUELOS SOMETIDOS A SEQUÍA CON ESPECIESTOLERANTES A LA FALTA DE AGUA

Nombre del congreso: XXIII Congreso Nacional de Microbiología

Tipo de evento: Poster en Congreso

Ámbito: Nacional

Año: 2011

Lugar: Salamanca (España)

Autores: Picazo-Espinosa, Rafael; SantaCruz-Calvo, Lucía; Vilchez-Morillas, Juan Ignacio; Narváez-Reinaldo, Juan Jesús; Calvo-Sainz, Concepción; González-López, Jesús

6. Título de la aportación: CONTRIBUCIÓN DE LOS MICROORGANISMOS EN EL MANTENIMIENTO DE LA BIODIVERSIDAD EN SUELOS ÁRIDOS Y SEMIÁRIDOS

Nombre del congreso: III Congreso Nacional de Biodiversidad (Granada, 2011)

Tipo de evento: Conferencia Congreso no publicada

Ámbito: Nacional

Año: 2011

Lugar: Granada (España)

Autores: Manzanera-Ruiz, Maximino; SantaCruz-Calvo, Lucía; Vilchez-Morillas, Juan Ignacio; Narváez-Reinaldo, Juan Jesús; Oliver-Jacobo, Amparo; Picazo-Espinosa, Rafael; González-López, Jesús

7. Título de la aportación: Isolation of desiccation tolerant micro-organisms for the rhyzoremediation of soils subjected to seasonal drought

Nombre del congreso: Environmental Toxicology 2010

Tipo de evento: Comunicación en congreso

Ámbito: Internacional

Año: 2010

Lugar: Chipre

Autores: SantaCruz-Calvo, Lucía; Vilchez-Morillas, Juan Ignacio; Narváez-Reinaldo, Juan Jesús; Picazo-Espinosa, Rafael; González-López, Jesús; Manzanera-Ruiz, Maximino

8. Título de la aportación: PLANT GROWTH PROMOTING RHIZOBACTERIA FOR PROTECTION AGAINST DROUGHT

Nombre del congreso: National meeting of the Spanish society of nitrogen fixation (SEFIN) (13th Zaragoza, 2010) Portuguese-Spanish congress on nitrogen fixation (2nd Zaragoza, 2010) España

Tipo de evento: Comunicación en congreso

Ámbito: Internacional

Año: 2010

Lugar: Zaragoza (España)

Autores: Narváez-Reinaldo, Juan Jesús; Vilchez-Morillas, Juan Ignacio; SantaCruz-Calvo, Lucía; Picazo-Espinosa, Rafael; González-López, Jesús; Manzanera-Ruiz, Maximino

9. Título de la aportación: USE OF DESICCATION TOLERANT ACTINOBACTERIA ISOLATES FOR STABILIZATION OF BIOLOGICAL MATERIAL OF BIOTECHNOLOGICAL INTEREST

Nombre del congreso: 14th International Byotechnology Symposium and Exhibition (2010, Rimini (Italia))

Tipo de evento: Poster en Congreso

Ámbito: Internacional

Año: 2010

Lugar: Rimini (Italia)

Autores: Vilchez-Morillas, Juan Ignacio; Narváez-Reinaldo, Juan Jesús; SantaCruz-Calvo, Lucía; Picazo-Espinosa, Rafael; González-López, Jesús; Manzanera-Ruiz, Maximino

10. Título de la aportación: BIOTECHNOLOGICAL USES OF DESICCATION TOLERANT MICROORGANISMS FOR THE RHYZOREMEDIATION OF SOILS SUBJECTED TO SEASONAL DROUGHT

Nombre del congreso: 14th International Byotechnology Symposium and Exhibition (2010, Rimini (Italia))

Tipo de evento: Poster en Congreso

Ámbito: Internacional

Año: 2010

Lugar: RIMINI (ITALIA)

Autores: SantaCruz-Calvo, Lucía; Vilchez-Morillas, Juan Ignacio; Narváez-Reinaldo, Juan Jesús; Picazo-Espinosa, Rafael; González-López, Jesús; Manzanera-Ruiz, Maximino

Propiedad Industrial e Intelectual

1. Nombre: CEPA BACTERIANA CECT7623, USOS Y PRODUCTO XEROPROTECTOR PRODUCIDO POR LA MISMA.

Número de patente: P200931116

Fecha de concesión: 04/12/09

Institución: UGR

Tipo de protección: Nacional

Autores: González-López, Jesús; SantaCruz-Calvo, Lucía; Manzanera-Ruiz, Maximino; Narváez-Reinaldo, Juan Jesús

2. Nombre: CEPA BACTERIANA CECT7626, USO DE DICHA CEPA PARA AUMENTAR LA TOLERANCIA AL ESTRÉS HÍDRICO DE UNA PLANTA Y COMPUESTO XEROPROTECTOR PRODUCIDO POR LA MISMA.

Número de patente: P200931118

Fecha de concesión: 04/12/09

Institución: UGR

Tipo de protección: Nacional

Autores: González-López, Jesús; Santa Cruz-Calvo, Lucía; Vilchez-Morillas, Juan Ignacio; Manzanera-Ruiz, Maximino; Narváez-Reinaldo, Juan Jesús

3. Nombre: CEPA BACTERIANA CECT7623, USOS Y PRODUCTO XEROPROTECTOR PRODUCIDO POR LA MISMA.

Número de patente: P201100031

Fecha de concesión: 03/12/09

Institución: UGR

Tipo de protección: Nacional

Autores: González-López, Jesús; Manzanera-Ruiz, Maximino; Narváez-Reinaldo, Juan Jesús; SantaCruz-Calvo, Lucía

4. Nombre: CEPA BACTERIANA CECT7624, USO DE DICHA CEPA PARA AUMENTAR LA TOLERANCIA AL ESTRÉS HÍDRICO DE UNA PLANTA Y COMPUESTO XEROPROTECTOR PRODUCIDO POR LA MISMA.

Número de patente: P201100032

Fecha de concesión: 03/12/09

Institución: UGR

Tipo de protección: Nacional

Autores: González-López, Jesús; Narváez-Reinaldo, Juan Jesús; SantaCruz-Calvo, Lucía; Vilchez-Morillas, Juan Ignacio; Manzanera-Ruiz, Maximino

5. Nombre: CEPA BACTERIANA CECT7624, USO DE DICHA CEPA PARA AUMENTAR LA TOLERANCIA AL ESTRÉS HÍDRICO DE UNA PLANTA Y COMPUESTO XEROPROTECTOR PRODUCIDO POR LA MISMA.

Número de patente: P201100033

Fecha de concesión: 03/12/09

Institución: UGR

Tipo de protección: Nacional

Autores: González-López, Jesús; Manzanera-Ruiz, Maximino; SantaCruz-Calvo, Lucía; Vilchez-Morillas, Juan Ignacio; Narváez-Reinaldo, Juan Jesús.

6. Nombre: CEPA BACTERIANA CECT7626, USO DE DICHA CEPA PARA AUMENTAR LA TOLERANCIA AL ESTRÉS HÍDRICO DE UNA PLANTA Y COMPUESTO XEROPROTECTOR PRODUCIDO POR LA MISMA

Número de patente: P201100030

Fecha de concesión: 03/12/09

Institución: UGR

Tipo de protección: Nacional

Autores: González-López, Jesús; Manzanera-Ruiz, Maximino; Narváez-Reinaldo, Juan Jesús; SantaCruz-Calvo, Lucía; Vilchez-Morillas, Juan Ignacio